



HAL
open science

NADPH oxydase Nox4 native et recombinante : Composés quinoniques, éléments de régulation

Minh-Vu-Chuong Nguyen

► **To cite this version:**

Minh-Vu-Chuong Nguyen. NADPH oxydase Nox4 native et recombinante : Composés quinoniques, éléments de régulation. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00323877

HAL Id: tel-00323877

<https://theses.hal.science/tel-00323877>

Submitted on 23 Sep 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE GRENOBLE I - JOSEPH FOURIER
Ecole doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE – GRENOBLE I - JOSEPH FOURIER

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

NGUYEN Minh Vu Chuong

NADPH oxydase Nox4 native et recombinante

Composés quinoniques, éléments de régulation

Soutenue le vendredi 22 février 2008

Président :	Professeur Philippe GAUDIN
Rapporteurs :	Professeur Karl-Heinz KRAUSE Docteur Eric OGIER-DENIS
Examineurs :	Docteur Nicolas MOUZ Docteur Jean-Luc LENORMAND Docteur Bernard LARDY
Directeur de thèse :	Professeur Françoise MOREL

Thèse préparée au sein du Groupe de Recherche et d'Etude du
Processus Inflammatoire
GREPI TIMC-Imag UMR CNRS 5525, INSERM IFR 130

RÉSUMÉ

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) sont ubiquitaires et sont considérés comme des messagers intracellulaires. A l'origine de leur production, on trouve les NADPH oxydases (Nox) principalement dédiées à cette fonction. Nox4 est l'un des représentants de cette famille qui comprend 7 membres dont la NADPH oxydase des phagocytes. Le dysfonctionnement de Nox4 est relié à de nombreuses pathologies incluant certains cancers (du pancréas, du rein et de la peau), l'athérosclérose, l'hypertension pulmonaire ou encore l'arthrose. Cette enzyme catalyse une activité constitutive qui à l'inverse des autres Nox ne semble pas être stimuable. Le processus de transfert d'électrons aboutissant à la formation d'ions superoxyde, dénommé activité NADPH oxydase, peut être fragmenté et l'initiation de ce transfert dans la partie C terminale cytosolique est appelée activité diaphorase. La régulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 est encore peu connue. L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité NADPH oxydase et diaphorase de Nox4 et plus précisément de caractériser un mécanisme de stimulation ou d'inhibition de ces activités.

Le clonage du gène de Nox4 a mis en évidence deux isoformes protéiques (Nox4A, forme entière et Nox4B, forme délétée d'un domaine de fixation du NADPH). La mise en place de deux modèles d'études (cellulaire avec la surexpression des protéines Nox4 dans les cellules HEK293E et acellulaire avec la production de protéines recombinantes Nox4 tronquées par un système de traduction *in vitro*, RTS®) a permis d'obtenir les résultats suivants:

Premièrement, l'activité NADPH oxydase de Nox4A surexprimée dans les cellules HEK293E est constitutive et la partie C terminale cytosolique en milieu acellulaire possède une activité diaphorase (réduction de l'INT et du cytochrome c). Par contre, Nox4B est inactive car sa portion cytosolique est incapable d'initier le processus de transfert d'électrons. Ces deux isoformes surexprimés augmentent la quantité protéique de p22phox suggérant une stabilisation mutuelle des protéines Nox4 avec leur partenaire p22phox.

Deuxièmement, l'activité NADPH oxydase de Nox4 est régulée par des composés quinoniques. Une série de composés quinones faiblement substitués (benzoquinone, hydroquinone, tMetBQ) inhibe l'activité NADPH oxydase de Nox4 alors qu'une autre série (tBuBQ, tBuBHQ, duroquinone, AA-861) au contraire la stimule. L'implication du calcium et de la 5-lipoxygénase dans le mécanisme d'action des composés AA-861 et tBuBHQ a été écartée. Ces deux composés n'affectent pas l'activité diaphorase mesurée en milieu acellulaire reconstitué. Nos données convergent vers l'hypothèse d'une action directe des molécules quinones sur la protéine Nox4 au niveau de la partie N terminale membranaire de Nox4.

Nous avons dans ce travail démontré que l'activité NADPH oxydase de Nox4 n'est pas seulement constitutive mais qu'elle peut être modulée par une famille de composés quinoniques. Le mécanisme moléculaire précis reste à définir.

Mots clés: NADPH oxydase ; quinones ; traduction *in vitro* (RTS) ; protéines recombinantes ; 5-lipoxygénase ; calcium

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier madame le Professeur Françoise Morel qui a dirigé cette thèse, tout d'abord de m'avoir accueilli au sein de son groupe de recherche, puis de m'avoir guidé, encouragé, et conseillé tout au long de ces années en me laissant une grande liberté. J'ai apprécié la qualité de son encadrement empreint de rigueur et d'optimisme qui m'a d'une part permis d'appréhender ce travail avec confiance et aussi conforté dans ma volonté de poursuivre la recherche scientifique. Je voudrais aussi lui exprimer ma profonde reconnaissance pour l'aide apportée en particulier pour la période de fin de thèse.

Je remercie également monsieur le Docteur Ogier-Denis pour l'aide qu'il m'a procurée concernant la technique du siRNA et monsieur le Professeur Karl-Heinz Krause pour l'apport du modèle des cellules T-REx. Je les remercie aussi d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, pour la rapidité avec laquelle ils ont lu mon manuscrit et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Merci au Docteur Nicolas Mouz pour son accueil lors de mes visites à Protein'eXpert et à sa participation au jury.

Monsieur le Professeur Philippe Gaudin a bien voulu me faire l'honneur d'être le président du jury et je l'en remercie.

Un grand merci à monsieur le Docteur Jean-Luc Lenormand pour sa disponibilité, les discussions enrichissantes et conseils avisés qu'il m'a prodigués ainsi que pour avoir accepté de juger mon travail. Un mea culpa à son intention: Athan n'était pas seul...

Énorme merci au Docteur Bernard Lardy (Bernardo) pour avoir non seulement coordonné ce travail mais aussi pour son aide précieuse à la paillasse. J'ai fortement apprécié nos interactions et les réflexions post-manips sur Terre ou sur la comète...

Je souhaiterais formuler un immense merci pour toutes les personnes sans qui ces années de dur labeur n'auraient jamais été les mêmes :

Candice (Schtroumf Grognon) pour notre complicité sans cesse grandissante et tes qualités humaines évidentes. J'espère que tu ne diras pas "j'aime pas" mais plutôt "j'aime bien nos interactions". Sylvie B (Jeanne C) pour ton amitié et ta franchise, j'ai apprécié les pas de danse expérimentaux et d'avoir été ton vis-à-vis bureautique (ps : jeune pada-one jadis je fus, Jedi de la vaisselle bientôt je serai). Marie-Hélène pour tes conseils judicieux, ta gentillesse et ta culture musicale en siffloterie et au risque d'être coupable de plagiat, je ferai quand même cette citation MHPiène : " Tu veux que je te montre quelque chose de jolie ? ". Lolo Grange (ou Gera ou Dalida) pour ta bonne humeur perpétuelle, tes imitations et pour m'avoir mis à l'étrier lors de mon premier jour de labo en me montrant le lavage chirurgical des mains avant la culture cellulaire (protocole toujours

Remerciements

en court). Aux anciens, présents et futurs membres du GREPI avec une mention toute particulière pour Lolotte (La Blonde) et Yannick (Junior) qui ont par leur présence égayé le quotidien (tous mes vœux de bonheur pour vous deux), pour Bruno l'européen et les JLL's Girls (Romy, Lavigna et Anna) pour leur gentillesse, pour le petit dernier Athan avec qui j'ai passé de bons moments de délire improvisés. Une mention particulière pour la Pet'Roll team (Bactos, Fœtus et Franek) pour nos exploits sportifs (inespérés!) et festifs (mémorables).

Merci aussi à l'ensemble des membres du Laboratoire d'Enzymologie et les CGD pour les interactions entre autre lors des pauses café et pour les aides diverses... Spécial cassedédi à Elisabeth, Sylvie P, Michèle, Hélène ... Comment pourrais-je oublier celles sans qui rien ne pourrait tourner rond, l'équipe de choc, j'ai nommé Leila, Aurélie et Monique.

Je remercie mes amis qui ont été présents dans les moments agréables ou difficiles. Merci Zahid d'avoir été toujours là pour moi, tu pourras toujours compter sur moi. « Aux garçons sans avenir » (Momo, Hichou, Gégé, Bibi, Olivier, Samy...), que de bons moments passés ensemble et d'autres à venir pour sûr ! Merci Seb, Blandine et JB pour votre soutien local.

Je remercie bien évidemment ma famille qui a été une source infinie de réconfort, de sécurité et d'amour. Papa, Maman, je ne vous remercierai jamais assez pour les sacrifices que vous avez faits et pour l'éducation que vous m'avez donnée. A mes frères Luan, Linh et Tran, à ma sœur Lam, à mon beau-frère Philippe et mes belles-sœurs Sophie et Elise pour leur présence et leurs encouragements. A mes neveux Baptiste, Maxime, Antoine, Quentin, Matisse et à ma nièce Emma qui ont été une bouffée d'oxygène permanente et des instants de pur bonheur. **Je vous aime...**

SOMMAIRES

TABLES DES MATIERES	1
TABLES FIGURES ET TABLEAUX	6
ABRÉVIATIONS	10

INTRODUCTION	12-50
---------------------	--------------

<u>I LES DERIVES REACTIFS DE L'OXYGENE</u>	<u>12</u>
---	------------------

I.A INTRODUCTION	12
I.B SYSTEME DEFENSE: ANTIOXYDANTS	13
I.C ROLE PHYSIOLOGIQUE DES ROS	15
I.C.1 ROLE DES ROS DANS LA TRANSDUCTION DU SIGNAL	16
I.C.1.1 ROS, phosphorylation et déphosphorylation	16
I.C.1.2 Dialogue entre les ROS et le calcium	18
I.C.2 ROS ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION	19
I.C.3 ROS ET MORT CELLULAIRE	21

<u>II SOURCES DE GENERATION DE ROS</u>	<u>21</u>
---	------------------

II.A LE CYTOCHROME P450 ET ROS	22
II.B METABOLISME LIPIDIQUE ET ROS	22
II.C GAMMA GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE ET ROS	23
II.D XANTHINE OXYDOREDUCTASE ET ROS	23
II.E NO SYNTHASE ET ROS	24
II.F PEROXYSOME ET ROS	25
II.G CYCLE REDOX DES COMPOSES QUINONES	25
II.H LA MITOCHONDRIE ET ROS	26
II.I LES NADPH OXYDASES ET ROS	27
II.I.1 ACTIVATION DE LA NADPH OXYDASE PHAGOCYTAIRE	27

<u>III STRUCTURE, ACTIVITE ET FONCTION DES NADPH OXYDASES</u>	<u>28</u>
--	------------------

III.A STRUCTURE ET TOPOLOGIE DES NADPH OXYDASES	30
III.A.1 ORGANISATION DES DOMAINES CONSERVES DES NADPH OXYDASES	30
III.A.2 TOPOLOGIE DES NADPH OXYDASES	31
III.A.3 MODIFICATION POST-TRADUCTIONNELLE DES NADPH OXYDASES	33
III.A.4 ISOFORMES DES NADPH OXYDASES	34
III.B ACTIVITE DES NADPH OXYDASES	36
III.B.1 ORGANISATION DES CENTRES REDOX	36
III.B.2 MECANISME DE TRANSFERT D'ELECTRONS DE L'ACTIVITE NADPH OXYDASE DE Nox2	37
III.B.3 P22PHOX, PARTENAIRE INDISPENSABLE POUR L'ACTIVITE NADPH OXYDASE.	39
III.B.4 PARTENAIRES D'ACTIVATION DES NADPH OXYDASES : P40PHOX, P47PHOX, P67PHOX ET RAC	41
III.B.4.1 p67phox (NoxA2) et NoxA1	41
III.B.4.2 p47phox (NoxO2) et NoxO1	42
III.B.4.3 p40phox	43
III.B.4.4 Rac	44
III.B.5 ASSEMBLAGE DU COMPLEXE NADPH OXYDASE PHAGOCYTAIRE LORS DE SON ACTIVATION	44
III.C REGULATION DE L'ACTIVITE DES NADPH OXYDASES	46

III.D Nox4 : PHYSIOPATHOLOGIE	49
--------------------------------------	-----------

OBJECTIFS DU TRAVAIL	51
-----------------------------	-----------

MATÉRIELS ET MÉTHODES	52-97
------------------------------	--------------

I METHODES DE BIOLOGIE CELLULAIRE	52
--	-----------

I.A LIGNEES CELLULAIRES ET CULTURE	52
---	-----------

I.A.1 PASSAGE ET MULTIPLICATION DES CELLULES ADHERENTES	52
---	----

I.A.2 PASSAGE ET MULTIPLICATION DES CELLULES NON ADHERENTES	52
---	----

I.A.3 LIGNEES CELLULAIRES HEK293 ET HEK293E	52
---	----

I.A.4 LA LIGNEE HEK293 T-REX™ SAUVAGE ET NOX4	53
---	----

I.A.5 LIGNEES CELLULAIRES HELA	53
--------------------------------	----

I.A.6 LIGNEES CELLULAIRES CHONDROCYTAIRES C-20/A4	54
---	----

I.A.7 LIGNEES CELLULAIRES PLB-985 SAUVAGES ET NOX2-KO	54
---	----

I.B CONGELATION ET DECONGELATION	55
---	-----------

II METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	55
--	-----------

II.A RT-PCR	55
--------------------	-----------

II.A.1 EXTRACTION D'ARN TOTAL	56
-------------------------------	----

II.A.2 DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES	56
-------------------------------------	----

II.A.3 TRANSCRIPTION INVERSE (RT) : PRODUCTION D'ADNC	57
---	----

II.A.4 REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR)	57
---	----

II.A.5 SEPARATION ELECTROPHORETIQUE SUR GEL D'AGAROSE DES ACIDES NUCLEIQUES	58
---	----

II.B RT-PCR EN TEMPS REEL	58
----------------------------------	-----------

II.C METHODE DE CLONAGE POUR LA CONSTRUCTION DE PLASMIDES	61
--	-----------

II.C.1 LES BACTERIES	61
----------------------	----

II.C.1.1 Les souches bactériennes	61
-----------------------------------	----

II.C.1.2 La culture bactérienne	62
---------------------------------	----

II.C.1.3 La transformation bactérienne	62
--	----

II.C.2 LES VECTEURS	63
---------------------	----

II.C.2.1 Vecteur de sous-clonage	63
----------------------------------	----

II.C.2.2 Les vecteurs d'expression	63
------------------------------------	----

II.C.3 PRODUCTION DE L'INSERT CODANT POUR LE GENE D'INTERET PAR PCR	66
---	----

II.C.3.1 PCR simple	66
---------------------	----

II.C.3.2 2 PCR couplées :	66
---------------------------	----

II.C.3.3 Digestion par les enzymes de restriction	68
---	----

II.C.3.4 Extraction des fragments d'ADN à partir du gel agarose	68
---	----

II.C.3.5 Ligation	68
-------------------	----

II.C.3.6 Criblage des bactéries positives	69
---	----

II.C.3.7 Mini-préparation d'ADN	70
---------------------------------	----

II.C.3.8 Maxi-préparation d'ADN	70
---------------------------------	----

II.C.3.9 Purification et précipitation d'ADN : extraction au phénol/chloroforme	70
---	----

II.C.3.10 Séquençage de l'ADN	71
-------------------------------	----

III METHODES DE BIOCHIMIE	71
----------------------------------	-----------

III.A EXPRESSION DE PROTEINES RECOMBINANTES EN CELLULES EUCARYOTES	71
---	-----------

III.A.1 TRANSFECTION DES CELLULES	71
III.A.1.1 Préparation des cellules pour la transfection	71
III.A.1.2 Transfection par le phosphate de calcium	71
III.A.1.3 Transfection par l'Effectene [®] (lipofection)	72
III.A.1.4 Transfection par le JetPEI [™] (polyfection : Polyéthylèneimine)	73
III.A.1.5 Etablissement de lignées stables	74
III.A.2 EXTRACTION PROTEIQUE A PARTIR DE CELLULES EUCARYOTES	74
III.A.2.1 Préparation de lysat protéique total	74
III.A.2.2 Préparation de fractions membranaires et cytosoliques	75
III.A.2.3 Isolement des neutrophiles (PMN) à partir de sang frais	76
III.B EXPRESSION DE PROTEINES EN CELLULES PROCARYOTES	76
III.B.1 EXPRESSION DE PROTEINES EN SYSTEME BACTERIEN : INDUCTION BACTERIENNE	76
III.B.1.1 Induction bactérienne et tests d'expression	76
III.B.1.2 Expression à grande échelle	78
III.B.2 EXPRESSION DE PROTEINES EN SYSTEME ACELLULAIRE : TRADUCTION <i>IN VITRO</i> PAR LE RTS [®]	78
III.B.2.1 Test d'expression et de solubilité	79
III.B.2.2 Expression à grande échelle	80
III.C PURIFICATION DES PROTEINES RECOMBINANTES	81
III.C.1 PURIFICATION DES PROTEINES FUSIONNEES AVEC UNE ETIQUETTE POLYHISTIDINE	81
III.C.1.1 Extraction de protéines et fractionnement cellulaire	81
III.C.1.2 Purification par chromatographie d'affinité	82
III.D OUTILS UTILISES (ANTICORPS ET SYSTEME LUMIO[®]) POUR LA DETECTION DE LA PROTEINE NOX4	85
III.D.1 PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX CONTRE NOX4	87
III.D.2 PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX CONTRE LA PARTIE C TERMINALE DE NOX4	87
III.D.2.1 Préparation de l'antigène	87
III.D.2.2 Immunisation et production d'anticorps	88
III.E ANALYSE PROTEIQUE	89
III.E.1 DOSAGE DE PROTEINES	89
III.E.1.1 Mesure de l'absorbance à 280nm	89
III.E.1.2 Méthode de Bradford (Bio-Rad protein assay)	89
III.E.2 ELECTROPHORESE EN GEL D'ACRYLAMIDE (SDS-PAGE)	89
III.E.2.1 Préparation du gel d'acrylamide	90
III.E.2.2 Préparation des échantillons	90
III.E.2.3 Migration par électrophorèse des échantillons	91
III.E.2.4 Révélation des protéines sur gel acrylamide	91
III.E.3 WESTERN BLOT	92
III.E.3.1 Transfert des protéines sur membrane	92
III.E.3.2 Immunodétection des protéines par des anticorps	93
III.E.3.3 Slot blot	93
III.E.3.4 Déshybridation	93
III.E.4 CYTOMETRIE EN FLUX (FACS)	93
III.E.4.1 Contrôle de l'efficacité de la transfection	94
III.E.4.2 Mesure du flux calcique intracellulaire	94
III.E.4.3 Mesure de la production d'anions superoxydes	95
IV MESURE DES ACTIVITES NADPH OXYDASE ET DIAPHORASE	95
IV.A ACTIVITE NADPH OXYDASE PAR CHIMILUMINESCENCE	95
IV.B ACTIVITE DIAPHORASE PAR L'INT OU PAR LE CYTOCHROME C	96
V TEST DE VIABILITE CELLULAIRE : MESURE DE L'ACTIVITE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE (LDH)	97

RÉSULTATS	98-171
<u>I CLONAGE DU GENE DE NOX4</u>	99
I.A CLONAGE DE NOX4 A PARTIR DE L'ARNM DES CELLULES HEK293E.	99
I.B CLONAGE DE NOX4 A PARTIR DE LA BANQUE D'ADNC DE REIN HUMAIN ADULTE	101
<u>II ETUDE DE L'ACTIVITE NADPH OXYDASE DE NOX4 DANS LES CELLULES HEK293E</u>	103
II.A DETERMINATION DES MEILLEURES CONDITIONS DE TRANSFECTION	103
II.A.1 CHOIX DU RATIO ADN/TRANSFECTANT	104
II.A.2 CHOIX DE L'AGENT TRANSFECTANT	105
II.B ETUDE DE L'ACTIVITE NADPH OXYDASE DE NOX4 APRES TRANSFECTION TRANSITOIRE DES CELLULES HEK293E	106
II.C ETUDE DE L'ACTIVITE OXYDASE DE NOX4 APRES TRANSFECTION STABLE DANS DES CELLULES HEK293E	106
II.C.1 ANALYSE DES TRANSCRITS DES CELLULES HEK293E NATIVES OU TRANSFECTEES PAR RT-PCR (TRANSFECTION STABLE)	107
II.C.1.1 RT-PCR semi-quantitative	107
II.C.1.2 RT-PCR en temps réel	108
II.C.2 ACTIVITE NADPH OXYDASE DANS LES CELLULES HEK293E NATIVES OU SUREXPRESSANT NOX4 (TRANSFECTION STABLE)	109
II.C.3 MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE NOX4	111
II.C.3.1 Par l'utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine Nox4	111
II.C.3.2 Par l'utilisation d'outils de détection ciblés sur les étiquettes V5, histidine et FIAsh ajoutées en position C terminale de la protéine Nox4.	112
II.C.4 INTERACTION ENTRE LA PROTEINE NOX4 ET P22PHOX	113
<u>III ETUDE DE L'ACTIVITE DIAPHORASE DE NOX4 RECONSTITUEE DANS UN MILIEU ACELLULAIRE</u>	116
III.A PRODUCTION DE FORMES TRONQUEES DE NOX4 EN SYSTEME BACTERIEN	117
III.A.1 CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES UTILISEES DANS CETTE ETUDE	117
III.A.2 TESTS D'EXPRESSION ET DE SOLUBILITE DES PROTEINES NHS-NOX4AQC ET NHS-NOX4BQC	118
III.A.3 PRODUCTION A GRANDE ECHELLE DE CORPS D'INCLUSION ET PURIFICATION DES PROTEINES NHS-NOX4AQC ET NHS-NOX4BQC.	120
III.A.3.1 Purification de la protéine NHS-Nox4Aqc par affinité avec le nickel	121
III.A.3.2 Purification de la protéine NHS-Nox4Bqc par affinité avec le nickel	122
III.A.4 ANALYSE DES FORMES APPAREMMENT DEGRADEES ET OBTENUES A PARTIR DES PROTEINES NHS-NOX4AQC PRODUITES PAR LES BACTERIES BL21(λ DE3)	123
III.A.5 INTERFERENCE DE GROUPES DE CODONS RARES DANS L'EXPRESSION PROTEIQUE DE NOX4	124
III.B PRODUCTION DES PROTEINES NOX4 PAR LE SYSTEME DE TRADUCTION <i>IN VITRO</i> RTS®	132
III.B.1 OPTIMISATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES NOX4 TRONQUEES DANS LE SYSTEME RTS®	133
III.B.1.1 Tests d'expression des protéines.	134
III.B.1.2 Tests de solubilité des protéines produites.	137
III.B.1.3 Optimisation des conditions choisies pour la synthèse par RTS® des protéines recombinantes	139
III.B.2 PRODUCTION A GRANDE ECHELLE ET PURIFICATION DES PROTEINES NOX4AQC-CH ET NOX4BQC-CH	141
III.C MESURE DE L'ACTIVITE DIAPHORASE DES PROTEINES NOX4AQC-CH ET NOX4BQC-CH	143

IV L'ACTIVITE NADPH OXYDASE DE NOX4A EST MODULABLE	146
IV.A ETUDE DE L'EFFET DES COMPOSES AA-861 ET tBUBHQ SUR L'ACTIVITE NADPH OXYDASE DE NOX4 DANS LES CELLULES HEK293E	146
IV.A.1 EFFET DU COMPOSE AA-861, INHIBITEUR DE LA 5-LIPOXYGENASE	146
IV.A.2 EFFET DU COMPOSE tBUBHQ, INHIBITEUR DE LA POMPE A CALCIUM ATPASE DEPENDANTE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE	148
IV.A.3 CONFIRMATION DE L'EFFET STIMULATEUR DU tBUBHQ ET DU AA-861 SUR L'ACTIVITE NADPH OXYDASE DE NOX4 DANS D'AUTRES MODELES CELLULAIRES	150
IV.A.3.1 Modèle cellulaire HEK293 T-REx (Invitrogen)	151
IV.A.3.2 Modèle cellulaire chondrocytaire : la lignée C-20/A4	152
IV.A.4 SPECIFICITE DE L'EFFET STIMULATEUR DES COMPOSES AA-861 ET tBUBHQ SUR NOX4 PAR RAPPORT A NOX2	153
IV.A.5 DETERMINATION DU MECANISME D'ACTION DES COMPOSES AA-861 ET tBUBHQ	156
IV.A.5.1 Effets des composés AA-861 et tBuBHQ sur l'expression protéique de Nox4	156
IV.A.5.2 Rôle de la 5-lipoxygénase dans la stimulation de Nox4	158
IV.A.5.3 Rôle du calcium dans la stimulation de Nox4	159
IV.A.5.4 Effet de deux analogues structuraux quinones, le tBuBHQ et le tBuBQ sur l'activité oxydase de Nox4A	162
IV.A.6 ROLE POTENTIEL DES GROUPEMENTS ALKYLIS DES QUINONES DANS LA STIMULATION DE L'ACTIVITE NADPH OXYDASE DE NOX4	164
IV.A.6.1 Activité NADPH oxydase de Nox4 en présence des différents composés quinones	164
IV.A.6.2 Activité oxydase engendrée par les composés quinones en présence des phosphatidylcholines	167
IV.A.6.3 Composés quinones et cytotoxicité	168
IV.B EFFET DES COMPOSES AA-861 ET tBUBHQ SUR L'ACTIVITE DIAPHORASE DE LA PROTEINE NOX4AQC-CH EN MILIEU ACELLULAIRE RECONSTITUE	169

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	172
-----------------------------------	------------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	178
------------------------------------	------------

ANNEXES	197
----------------	------------

ANNEXE 1 : TABLEAUX DES AMORCES UTILISEES 197

ANNEXE 2 : MISE AU POINT DE LA RT-PCR EN TEMPS REEL DE NOX4 ET DE P22PHOX 199

ANNEXE 3 : LISTE DE PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES 202

ANNEXE 4 : ARTICLE 1. Grange L*, **Nguyen MV***, Lardy B, Derouazi M, Campion Y, Trocme C, Paclet MH, Gaudin P, Morel F (2006) NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxidants & redox signaling* **8**:1485-1496.* Equal contribution

ANNEXE 5 : ARTICLE 2. Verchier Y, Lardy B, **Nguyen MV**, Morel F, Arbault S, Amatore C (2007) Concerted activities of nitric oxide synthases and NADPH oxidases in PLB-985 cells. *Biochemical and biophysical research communications* **361**:493-498.

FIGURES

Figure 1. Formation des différents dérivés réactifs de l'oxygène.	12
Figure 2. Mécanismes de régulation des facteurs de transcription par les ROS.	21
Figure 3. Production de ROS à travers la voie de synthèse des prostaglandines par les cyclo-oxygénase (COX) et des leucotriènes par les lipoxoygénase (LOX).	23
Figure 4. Cycle redox des quinones rédox.	26
Figure 5. Cascade de réactions conduisant à l'activation du complexe multiprotéique de la NADPH oxydase phagocytaire.	27
Figure 6. Représentation linéaire de la séquence protéique des Nox.	30
Figure 7. Topologie des NADPH oxydases.	31
Figure 8. Schéma représentant les domaines hydrophobes transmembranaires de la protéine Nox4A prédits par différents programmes.	32
Figure 9. Représentation linéaire de la séquence protéique des isoformes de Nox1, Nox2, et Nox5.	34
Figure 10. Représentation linéaire et topologie supposée des isoformes de Nox4.	35
Figure 11. Mécanisme de transfert d'électrons de la protéine Nox2.	38
Figure 12. Topologie de la protéine p22phox.	40
Figure 13. Représentation des domaines caractéristiques de la protéine p67phox et NoxA1.	42
Figure 14. Représentation des domaines caractéristiques de la protéine p47phox et NoxO1.	43
Figure 15. Représentation des domaines caractéristiques de la protéine p40phox et de son isoforme.	44
Figure 16. Mécanismes moléculaires d'assemblage du complexe NADPH oxydase phagocytaire.	45
Figure 17. Principe du SYBR Green.	59
Figure 18. Principe de la ligation avec le vecteur TOPO.	63
Figure 19. Principe de l'induction de la synthèse protéique par le système T-REx.	66
Figure 20. Principe du clonage par 1) fusion de produits de PCR et 2) succession de PCR.	67
Figure 21. Principe de la transfection cellulaire par le réactif Effectene [®] .	42
Figure 22. Principe de la transfection cellulaire par le réactif JetPEI [™] .	43
Figure 23. Schéma du test d'expression des protéines recombinantes produites par induction bactérienne.	77
Figure 24. Principe du système RTS [®] .	78
Figure 25. Schéma expliquant le principe CECF du RTS 500 [®] .	80
Figure 26. Schéma du fractionnement cellulaire.	81
Figure 27. Protocole de purification avec les billes magnétiques couplées aux particules de nickel, MagneHis [®] (Promega).	83
Figure 28. Représentation des outils de mise en évidence de la protéine Nox4 (anticorps et système FIAsH) et leur site de reconnaissance.	86
Figure 29. Principales étapes de production d'anticorps monoclonaux.	88
Figure 30. Principe du système Lumio [™] .	92
Figure 31. Principe de la réaction de chimiluminescence.	95
Figure 32. ARNm de Nox4 et les amorces utilisées.	99
Figure 33. Clonage du fragment 5' et 3' de Nox4 à partir des cellules HEK293E;	100
Figure 34. Clonage du fragment 5' et 3' de Nox4 à partir d'une banque d'ADNc de rein humain adulte;	101
Figure 35. Schéma des deux isoformes A et B de Nox4.	102

Figure 36. Comparaison par FACS de l'efficacité de transfection en fonction du ratio ADN/JetPEI™ sur les cellules HEK293E.	104
Figure 37. Comparaison par FACS de l'efficacité de transfection entre le JetPEI™ et le phosphate de calcium sur les cellules HEK293E.	105
Figure 38. Activité NADPH oxydase des cellules HEK293E transfectées par le JetPEI™ ou l'Effectene® avec le plasmide pEF6/V5-His Nox4A.	106
Figure 39. RT-PCR semi-quantitative des cellules HEK293E natives (WT) et sur-exprimant Nox4.	108
Figure 40. RT-PCR en temps réel de Nox4 dans les cellules HEK293E natives (WT) ou sur-exprimant Nox4A, Nox4AV5/His, Nox4B et Nox4BV5/His.	109
Figure 41. Activité NADPH oxydase dans les cellules HEK293E natives ou transfectées par les différents plasmides pEF6/V5-His codant pour Nox4A, Nox4AV5/His, Nox4B et Nox4BV5/His.	110
Figure 42. Validation de l'anticorps monoclonal (ACm) 54.1 et de l'anticorps polyclonal (ACp) 503/540 sur différentes constructions de Nox4 recombinant.	111
Figure 43. Validation du réactif Lumio® pour la détection de l'étiquette FIAsh sur la protéine recombinante NHS-Nox4AqcFIAsh.	112
Figure 44. Activité NADPH oxydase dans les cellules HEK293E natives (WT) ou transfectées de manière stable par les différents plasmides pEF6/V5-His codant pour Nox4AFIAsh et Nox4AFIAshV5/His.	113
Figure 45. Relation entre la protéine Nox4 et p22phox.	114
Figure 46. Schéma des protéines tronquées par rapport à la protéine Nox4A utilisées pour l'étude de l'activité diaphorase de Nox4	117
Figure 47. Tests d'expression et de solubilité du plasmide pET30b codant pour les protéines NHS-Nox4Aqc et de la protéine NHS-Nox4Bqc dans les bactéries BL21(λDE3).	119
Figure 48. Fractionnement cellulaire et identification des protéines recombinantes NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc par western blot avec un anticorps anti-histidine.	120
Figure 49. Purification par affinité avec le nickel des protéines NHS-Nox4Aqc solubilisées par l'urée 8M.	121
Figure 50. Purification par affinité avec le nickel des protéines NHS-Nox4Bqc solubilisées par l'urée 8M.	122
Figure 51. Purification par affinité avec le nickel des protéines NHS-Nox4Aqc solubilisées directement dans un tampon contenant l'urée 8M.	123
Figure 52. Analyse du cadre de lecture de la séquence nucléotidique de Nox4.	125
Figure 53. Test d'expression des protéines NHS-Nox4Aqc, NHS-Nox4Bqc, NHS-Nox4A-1TM et NHS-Nox4A-tTM dans les bactéries BL21(λDE3) CodonPlus RIL.	127
Figure 54. Modèle topologique de la protéine Nox4.	128
Figure 55. Purification de la protéine NHS-Nox4-1TM et ZEBRA/MD4-GFP sur colonne His Gravitrap™.	129
Figure 56. Test des anticorps monoclonaux dirigés contre Nox4.	130
Figure 57. Schéma des protéines Nox4 fusionnées avec une séquence poly-histidines en N terminale ou en C terminale.	132
Figure 58. Test d'expression des protéines Nox4A-2TM, Nox4A-1TM, Nox4Aqc et Nox4Bqc par le système RTS®.	136
Figure 59. Test de solubilité des protéines Nox4A-1TM, Nox4Aqc et Nox4Bqc par le système RTS®.	137
Figure 60. Analyse par western blot des tests d'expression et de solubilité des protéines Nox4 tronquées par le système RTS® en fonction de la concentration de DDM, en présence du polymère NV10 (1mg/mL) ou de FAD (30μM).	140
Figure 61. Purification de la protéine Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH produite par le système RTS®500.	142
Figure 62. Activité diaphorase de la protéine Nox4Aqc-CH et de la protéine Nox4Bqc-CH solubles purifiées.	144

Figure 63. Activité diaphorase de la protéine Nox4Aqc-CH purifiée en présence du cytosol de cellules HEK293 T-REx Nox4.	145
Figure 64. Schéma représentant le rôle de la 5-lipoxygénase dans la voie de synthèse du LTB4 à partir des phospholipides membranaires.	147
Figure 65. Activité NADPH oxydase des cellules HEK293E natives (WT), surexprimant Nox4A ou Nox4B en présence du composé AA-861.	148
Figure 66. Schéma situant l'action d'inhibition du tBuBHQ sur la pompe SERCA du réticulum endoplasmique (RE). Le calcium intracytosolique qui diffuse dans le cytosol est reconduit en	149
Figure 67. Activité NADPH oxydase des cellules HEK293E natives (WT), ou surexprimant Nox4A ou Nox4B en présence du composé tBuBHQ.	150
Figure 68. Stimulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 par les composés AA-861 et tBuBHQ avec le modèle cellulaire des cellules HEK293 T-REx natives (WT) ou Nox4.	151
Figure 69. Stimulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 par les composés AA-861 et tBuBHQ avec le modèle cellulaire des chondrocytes.	153
Figure 70. Mise en évidence des protéines p67phox et Nox2 dans les cellules HEK293E.	154
Figure 71. Activité NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles (PMN) non stimulés en présence du AA-861, du tBuBHQ ou de la thapsigargine. Les PMN sont purifiés à partir de sang	154
Figure 72. Activité NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles (PMN) en présence du AA-861 ou du tBuBHQ mesurée par chimiluminescence.	155
Figure 73. Mise en évidence de la protéine p22phox par western blot dans les cellules HEK293E incubées en présence de AA-861 et tBuBHQ.	157
Figure 74. Mise en évidence de la 5-lipoxygénase dans les cellules HEK293E.	158
Figure 75. Flux calcique, mesuré par cytométrie en flux avec la sonde Fluo-3-AM, dans les cellules HEK293E Nox4 sous l'action de la thapsigargine en présence ou non de BAPTA.	160
Figure 76. Flux calcique mesuré par cytométrie en flux avec la sonde Fluo-3-AM dans les cellules HEK293E surexprimant Nox4 sous l'action des composés ionomycine, thapsigargine, AA-861, et tBuBHQ.	160
Figure 77. Activité NADPH oxydase des cellules HEK293E surexprimant Nox4A en présence d'ionomycine, de thapsigargine, du AA-861 et du tBuBHQ.	161
Figure 78. Flux calcique et activité oxydase dans les cellules HEK293E surexprimant Nox4 sous l'action des composés tBuBHQ et tBuBQ.	163
Figure 79. Schéma des structures des différentes quinones utilisées dans cette étude.	164
Figure 80. Activité NADPH oxydase des cellules HEK293E Nox4 en présence de 4 composés quinones.	165
Figure 81. Rôle potentiel des groupements alkyls des quinones dans la stimulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4.	166
Figure 82. Production intrinsèque de ROS par les différents composés quinones BQ, HQ, tMetBQ, duroquinone, tBuBQ, tBuBHQ et AA-861 en présence uniquement de phosphatidylcholine (25µg).	167
Figure 83. Test de toxicité des différents composés quinones BQ, HQ, tMetBQ, duroquinone, tBuBQ, tBuBHQ et AA-861 sur les cellules HEK293E.	168
Figure 84. Activité diaphorase de la protéine Nox4Aqc-CH purifiée en présence du cytosol de cellules HEK293 T-REx Nox4, et du AA-861 ou du tBuBHQ.	166
Figure 85. Alignement de la séquence protéique de Nox4 avec Nox2 (CLUSTAL W v1.83).	174
Figure 86. Schéma montrant la similitude entre l'organisation du Q site potentiel de Nox4 avec celui de la succinate quinone oxidoreductase.	175
Figure 87. Proposition d'un mécanisme de régulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 par les composés quinones.	176
Figure 88. Mise au point de la PCR en temps réel.	200

Figure 89. Contrôle de la spécificité des fragments amplifiés par PCR en temps réel.

TABLEAUX

Tableau 1. Distribution tissulaire principale et locus des Nox.	28
Tableau 2. NADPH oxydases et glycosylation.	33
Tableau 3. Composition des complexes NADPH oxydases nécessaire à la production d'ions superoxyde.	46
Tableau 4. Composés et additifs utilisés en RTS.	79
Tableau 5. Caractéristiques des outils utilisés pour la mise en évidence de la protéine Nox4.	87
Tableau 6. Description des protéines Nox4 fusionnées à la séquence poly-histidine et à un S tag en position N terminale.	118
Tableau 7. Représentation des principaux codons correspondants aux ARN de transfert faiblement exprimés dans les bactéries.	124
Tableau 8. Masse moléculaire théorique des différentes formes de la protéine NHS-Nox4Aqc et de la protéine NHS-Nox4Bqc produites à cause du triplet de codons rares.	125
Tableau 9. Résumé des caractéristiques des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine Nox4.	130 133
Tableau 10. Additifs utilisés en RTS [®] pour les tests d'expression des protéines Nox4.	
Tableau 11. Conditions utilisées pour l'expression des protéines par le système RTS [®] .	134
Tableau 12. Résumé du niveau d'expression des protéines produites par le système RTS [®] en fonction des différentes conditions.	136
Tableau 13. Résumé du niveau d'expression et de solubilité des protéines produites par le système RTS [®] en fonction des différentes conditions.	138
Tableau 14. Résumé de l'effet des composés ionomycine, thapsigargine, tBuBHQ et AA-861 sur le flux calcique et sur l'activité oxydase de Nox4A.	162
Tableau 15. Tableau résumant l'activité oxydase et la toxicité en présence des différents composés quinones.	170
Tableau 16. Liste des amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR semi-quantitative et en temps réel.	197
Tableau 17. Liste des amorces utilisées pour les expériences de clonages.	198

ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
AC	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP1	Activator protein 1
ARN	Acide ribonucléique
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BMK1	Big mitogen-activated protein kinase 1
BQ	p-benzoquinone
BSA	Albumine sérique bovine
CaPO ₄	Phosphate de calcium
CGD	Granulomatose septique chronique
CECF	Continuous exchange cell-free
CGD	Chronic Granulomatous Disease (granulomatose septique chronique)
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
CIAP	Calf intestinal alkaline phosphatase
CMV	Cytomégalovirus
DAG	Diacylglycérol
DDM	n-dodecyl β-D-maltoside
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DFP	Diisoprényl fluorophosphate
DHE	Dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamide
DO	Densité optique
DPI	Diphényliodonium
EBNA1	Epstein-Barr nuclear antigen-1
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Acide éthylène glycoltétraacétique
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FIH	Factor inhibiting HIF
FIAsh	Fluorescein Arsenical Hairpin binding
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (séparation des protéines par chromatographie liquide)
GGT	Gamma glutamyl transpeptidase
GSH/GSSG	Gluthation réduit/oxydé
GST	Glutathion-S-transferase
HEK	Human embryonic kidney
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HQ	Hydroquinone
Hela	Henrietta Lacks
HRP	Horseradish peroxydase
INT	Iodonitrotetrazolium
IPTG	Isopropyl thiogalactoside
JNK	c-Jun-N-terminal kinase
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactate déshydrogénase
LPS	Lipopolysaccharide
MAI	Milieu autoinducteur
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCS	Multiple cloning site (site de clonage multiple)
MMP	Metalloprotéase matricielle
MRP	Myeloid related protein
MW	Marqueur de poids moléculaire
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF κ B	Nuclear factor kappa B
NGF	Nerve growth factor
NO synthase	Nitric oxyde synthase
Nox	NADPH oxydase
NP40	Nonidet P40
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
pb	Paire de bases
PB1	Phox and Bemp1
PBS	Tampon phosphate salin
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase chain reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
PDI	Protein disulfide isomerase
phox	phagocyte oxydase
PDGF	Platelet-derived growth factor
PKC	Protéine kinase C
PLA ₂	Phospholipase A2
PMA	4 β -Phorbol 12-myristate 13-acétate
PMN	Polynucléaire neutrophile
PRR	Proline-rich region (sequence riche en résidus proline)
Ref-1	Redox factor 1
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RLU	Unité relative de lumière
ROS	Reactive oxygen species (dérivés réactifs de l'oxygène)
rpm	Revolutions per minute (tours par minute)
RT	Reverse transcription
RTS	Rapid translation system
SAPK	Stress activated protein kinase
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SERCA	Sarco\Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SH3	Src homology 3
SOB	Sulfo-oxidizing bacteria
SOC	SOB avec 20mM de glucose
SOD	Superoxyde dismutase
SQR	Succinate quinone oxidoreductase
Src	Sarcoma
SVF	Sérum de veau fœtal
TAE	Tampon Tris-acétate-EDTA
tBuBHQ	2,5-Di-tert-butylhydroquinone
tBuBQ	2,5-Di-tert-butyl-1,4-benzoquinone
TEMED	N,N,N',N' tétraméthyléthylène diamine
TGF-1 β	Transforming growth factor 1 beta
TIR	Toll-interleukine1 receptor
TLCK	N-alpha-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone
TLR4	Toll-like récepteur 4
tMetBQ	2,5-Di-tert-methyl-1,4-benzoquinone
TM	Passage transmembranaire
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TPR	Tetratricopeptide repeat
UV	Ultraviolet
V5/His	Etiquette contenant la séquence de l'antigène V5 et poly-histidine
VHL	von Hippel-Lindau
WT	De type native, sauvage

INTRODUCTION

I Les dérivés réactifs de l'oxygène

I.A Introduction

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) sont de petites molécules issues de réactions d'oxydoréduction à partir du dioxygène (O_2). Les ROS comprennent des radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), alkoxy (RO^{\bullet}), hydroperoxy (HOO^{\bullet}) et peroxy (RO_2^{\bullet}) mais également des composés non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochlorique ($HOCl$), l'ozone (O_3) et l'oxygène singulet (1O_2) [Genestra, 2007]. Les ROS peuvent être des sous-produits métaboliques provenant de l'activité du cytochrome P450, de la cyclo-oxygénase, de la lipoxygénase, de la gamma glutamyl transpeptidase (GGT), de la NO synthase ou encore de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ils peuvent être cependant produits spécifiquement par la xanthine oxydase mais surtout par les NADPH oxydases qui sont des enzymes dédiées à cette fonction.

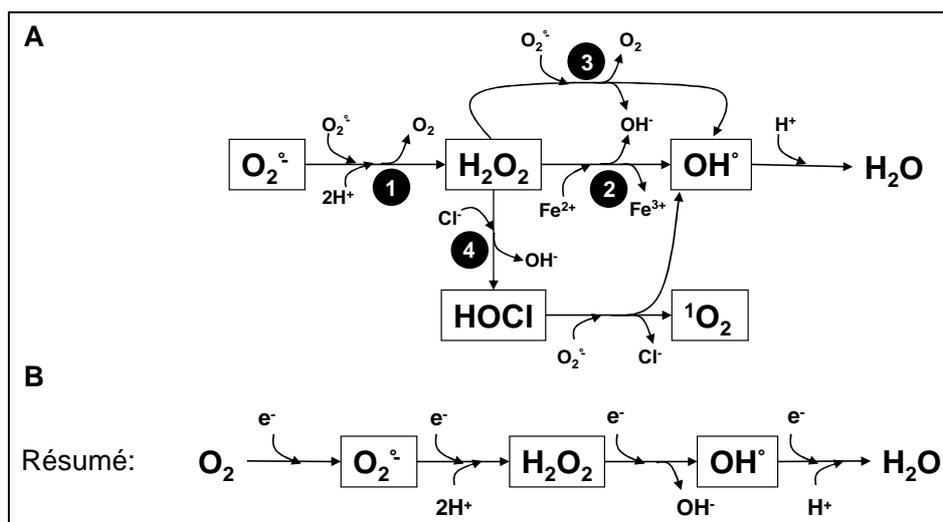


Figure 1. Formation des différents dérivés réactifs de l'oxygène. Les composés ROS sont encadrés. **A**) Cascades de réaction conduisant aux ROS. **1**) Dismutation de l'anion superoxyde, spontanée ou catalysée par la SOD. **2**) Réaction de Fenton. **3**) Réaction de Haber and Weiss. **4**) Réaction catalysée par la myélopéroxydase. **B**) Statut électronique des ROS.

Ces différents composés sont formés par des réactions en cascade, enzymatiques ou non, de transferts d'électrons entre ces molécules. Le premier ROS formé est l'anion superoxyde obtenu par la réduction par un électron de l'oxygène. Ce composé radicalaire est instable et se dismute spontanément (en particulier à pH acide) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , eau oxygénée). Cette réaction peut être catalysée par la superoxyde dismutase (SOD). Le H_2O_2 est liposoluble et peut traverser les membranes cellulaires. Les enzymes peroxydase (myélopéroxydase dans les polynucléaires neutrophiles) catalysent à partir du peroxyde d'hydrogène et en présence d'halogénures, en particuliers les chlorures dans les

neutrophiles, la formation d'acide hypochlorique qui en agissant avec les amines donne des chloramines. L'acide hypochlorique et les chloramines sont des dérivés particulièrement oxydants et toxiques. Le radical hydroxyle est formé à partir d' H_2O_2 dans la réaction de Fenton ou de Haber et Weiss. Le radical hydroxyle, très réactif, a un temps de demi-vie extrêmement court (nanoseconde) et agit vraisemblablement avec les premières molécules qu'il rencontre (*figure 1*).

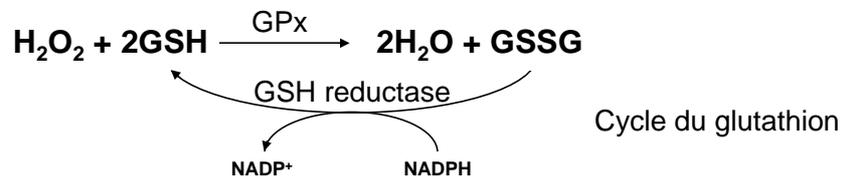
Du fait de leur avidité pour les électrons, les ROS et en particulier les radicaux libres formés réagissent rapidement avec un grand nombre de molécules comme les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Ces attaques radicalaires modifient les propriétés de ces molécules cibles et altèrent leurs fonctions biologiques. La présence des radicaux libres dans le matériel biologique a été découverte en 1954 par Commoner et ses collaborateurs [Commoner et al, 1954]. Seulement deux ans après, Denham Harman décrit les ROS comme des dérivés s'échappant de la boîte de Pandore et qui entraînent des dommages cellulaires. Il émet l'hypothèse de l'implication des ROS dans le vieillissement [Harman, 1956]. Depuis, découlant de leurs effets délétères, les ROS sont considérés comme néfastes et sont impliqués dans les phénomènes de mort cellulaire, la cancérisation et le vieillissement [Beckman et Ames, 1998].

I.B Système défense: Antioxydants

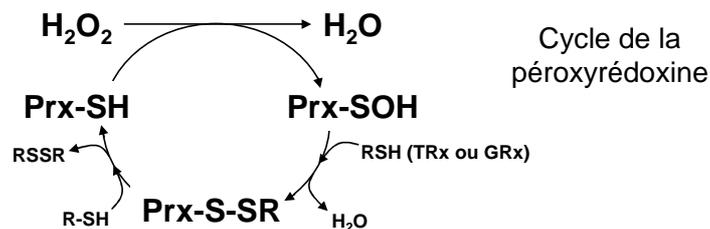
Pour combattre un stress oxydatif engendré par un taux élevé de ROS, les cellules ont développé plusieurs mécanismes, impliquant des antioxydants, pour maintenir une homéostasie redox. Un antioxydant est une molécule capable d'agir par compétition avec des substrats pour diminuer ou empêcher leur oxydation. Il s'oxyde avec les radicaux libres et annihile ainsi leur action. Deux stratégies de défense sont employées par les cellules. La première est à base de molécules tampons (vitamine E, vitamine C, coenzyme Q, glutathion, acides aminés ...) et la deuxième fait appel à des processus enzymatiques pour détoxifier les ROS (SOD, catalase, glutathion peroxydase, peroxyrédoxines).

Les ROS produits sont rendus inoffensifs par une série d'enzymes. La transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène est accélérée par la superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène est le substrat de la catalase qui le transforme en oxygène et en eau [Kirkman et Gaetani, 2007]. La catalase est localisée exclusivement au niveau des peroxyosomes donc seul les H_2O_2 contenus ou qui ont diffusé dans cet organite peuvent être éliminés. La suppression des H_2O_2 cytosoliques est réalisée par d'autres enzymes.

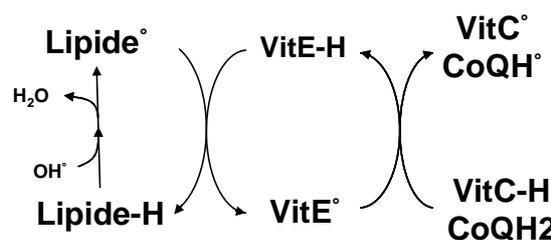
Les propriétés antioxydantes du groupement thiol (S-H) sont très importantes et sont fréquemment utilisées. Le glutathion et la thiorédoxine sont au cœur de la régulation du statut redox de la cellule. La glutathion peroxydase (GPx) catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion (GSH) réduit comme réducteur. Cette enzyme intervient dans le cycle redox du glutathion.



H_2O_2 est aussi éliminé par les peroxyrédoxines (Prx). Le cœur catalytique de ces protéines est constitué par deux résidus cystéines. Le surplus d' H_2O_2 oxyde le groupement thiol de la cystéine des Prx en groupement acide sulfénique en libérant une molécule d'eau [Rhee et al, 2005]. Les systèmes des thiorédoxines (TRx) et glutarédoxines (GRx) agissent comme des antioxydants en facilitant la réduction de protéines oxydées [Holmgren, 1989]. Ces protéines peuvent agir par exemple pour régénérer les Prx oxydés.



L'attaque des radicaux libres sur les membranes cellulaires (lipopéroxydation) entraîne ensuite une cascade de réactions radicalaires des lipides entre-eux [Halliwell et Chirico, 1993]). Ceci a pour conséquence de réduire la fluidité membranaire, d'augmenter la perméabilité des ions et d'altérer le fonctionnement des protéines membranaires. La vitamine E (α -tocophérol) est une molécule liposoluble capable d'interrompre ce processus délétère en s'intercalant dans la cascade de réactions radicalaires. La vitamine E est régénérée par la vitamine C (acide ascorbique) ou par le coenzyme Q (CoQ).



Les protéines, en particulier celles mal conformées, et les acides aminés sont potentiellement des antioxydants. L'attaque des ROS sur les protéines entraîne une modification de leur fonctionnement et augmente leur susceptibilité à être dégradées par le protéasome [Davies et al, 1987a]. L'oxydation touche particulièrement les acides aminés tryptophane, tyrosine, histidine et cystéine mais tous les acides aminés peuvent être oxydés [Davies et al, 1987b]. La capacité antioxydante des acides aminés est faible mais leur forte concentration intracellulaire (10^{-1} M) leur confère un grand pouvoir tampon [Dröge, 2002].

Ainsi, l'équilibre redox est finement régulé entre la production de ROS et leur élimination par toute une batterie de systèmes antioxydants. L'homéostasie préservée permet le fonctionnement normal de la cellule. Un stress oxydatif avec ses conséquences désastreuses apparaît lorsque la balance redox est perturbée soit par une augmentation de la synthèse des ROS, soit par un dysfonctionnement du système antioxydant.

I.C Rôle physiologique des ROS (pour revues : Kamata and Hirata, 1999 ; Dröge, 2002 ; Genestra, 2007)

L'augmentation accrue des ROS dans des circonstances particulières peut être bénéfique notamment dans le cas de la défense immunitaire contre les agents pathogènes par les cellules phagocytaires. La relation entre la production de ROS et la phagocytose a été mise en évidence à partir des années 1930. En 1933, Baldrige et Gerard ont observé une forte augmentation de la consommation d'oxygène durant la phagocytose des bactéries par les polynucléaires neutrophiles canines [Baldrige et Gerard, 1932]. Ce phénomène est insensible aux inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale et ne correspond donc pas à une utilisation supplémentaire de l'oxygène pour la production d'énergie pour le processus de phagocytose [Sbarra et Karnovsky, 1959]. En réalité, la consommation de l'oxygène conduisant à la formation de ROS est nécessaire à la destruction de l'agent pathogène. Ce phénomène est flagrant dans le cas d'une maladie héréditaire grave, la granulomatose sceptique chronique (CGD, **C**hronic **G**ranulomatous **D**isease) décrite pour la première fois par Berendes en 1957 [Berendes, 1957]. Les neutrophiles de ces patients ne sont pas capables de tuer les bactéries bien que celles-ci aient été phagocytées normalement [Quie et al, 1967]. De plus, il y a une absence de la consommation d'oxygène [Holmes et al, 1967]. Il est maintenant bien établi que le défaut de production de ROS par le complexe protéique de la NADPH oxydase phagocytaire, Nox2, est à l'origine de cette maladie. Ainsi, une forte augmentation de ROS, appelé "explosion respiratoire", a une fonctionnalité physiologique indispensable dans l'immunité.

Peu à peu, la vision négative sur le rôle des ROS a changé. Il semble que les organismes vivants ont développé des mécanismes cellulaires exploitant les avantages de la forte réactivité des ROS. Une des premières observations du rôle physiologique des ROS a été décrite en 1977. Mittal et Murad ont montré que la formation de radical hydroxyle active la guanylate cyclase, enzyme responsable de la synthèse du cGMP (cyclic Guanosine Monophosphate) qui est un messenger secondaire intracellulaire [Mittal et Murad, 1977]. Depuis la fin du 20^{ème} siècle, la découverte de gènes et de voies de signalisation sensibles aux oxydants amène à penser que les ROS sont des messagers intracellulaires pour la transduction du signal et la régulation des gènes [Kamata and Hirata, 1999 ; Dröge, 2002]. Le rôle bénéfique des ROS est renforcé par la découverte d'enzymes dont le but premier est de synthétiser les ROS : ce sont les NADPH oxydases. La présence de ROS n'est plus un phénomène accidentel mais provient d'un processus physiologique bien régulé.

I.C.1 Rôle des ROS dans la transduction du signal

De nombreux exemples de stimuli extracellulaires (facteurs de croissance, cytokines, ou d'autres ligands) entraînent une production de ROS après fixation de ces ligands sur les récepteurs correspondants. Dans la plupart des cas, l'ajout de ROS exogène entraîne une réponse avec une signalisation cellulaire semblable à celle engendrée par ces stimuli.

Par exemple, l'implication des ROS a été démontrée dans le cas de la fixation du PDGF (Platelet-derived growth factor), EGF (Epidermal growth factor), NGF (Nerve growth factor), TNF- α (Tumor necrosis factor alpha), TGF-1 β (Transforming growth factor 1 beta) sur leurs récepteurs [Bae et al, 2000 ; Bae et al, 1997 ; Ohba et al, 1994 ; Suzukawa et al, 2000 ; Meier et al, 1989 ; Junn et al, 2000]. Dans le cas du PDGF, l'utilisation de la catalase ou de la N-acétyl-cystéine (antioxydant) inhibe la cascade de phosphorylation induite par la fixation du PDGF sur son récepteur [Sundaresan et al, 1995]. Des hormones telles que l'insuline et les cytokines comme l'angiotensine II ou l'interleukine-1 β (IL-1 β) provoquent un changement du statut redox de la cellule [Krieger-Brauer et al, 1992 ; Mahadev et al, 2001 ; Griendling et al, 1994 ; Lo et al, 1998].

Les voies de signalisation induites impliquent différents acteurs comme les enzymes de type kinase ou phosphatase ou le calcium.

I.C.1.1 ROS, phosphorylation et déphosphorylation

La phosphorylation et déphosphorylation jouent un rôle primordial dans la régulation de la vie cellulaire et sont gouvernées par les protéines kinases (PK) et phosphatases (PP)

respectivement. Cette dualité permet une certaine flexibilité du système et régule l'activité des protéines cibles. L'état phosphorylé ou non des protéines clefs des voies de signalisation détermine leur activité. Ces protéines sont phosphorylées ou déphosphorylées en général soit sur un résidu tyrosine ou sérine/thréonine.

I.C.1.1.1 ROS et les protéines phosphatases : Inhibition

La régulation des tyrosines phosphatases par les ROS est un des mécanismes redox sensible le mieux caractérisé. Par exemple, l'EGF entraîne l'homodimérisation et l'autophosphorylation de son récepteur. L'inactivation du récepteur est réalisée par les tyrosine phosphatases qui le déphosphorylent. Cette déphosphorylation est retardée par l'utilisation d' H_2O_2 [Knebel et al, 1996]. Les protéines tyrosine phosphatases (PTP) possèdent toutes au sein de leur site catalytique un résidu cystéine (CBP, **c**ystein **b**ase **p**hosphatase). Cet acide aminé est très sensible à l'action des ROS. L'oxydation du groupement thiol de la cystéine en groupement acide sulfénique rend non fonctionnel les PTP. L'inactivation est réversible en présence d'antioxydants notamment à base de groupements thiol (glutathion) [Denu et Tanner, 1998].

Les protéines serine/thréonine phosphatases sont également sensibles aux ROS. De nombreuses études concernent la protéine calcineurine. La première réalisée par Wang et ses collaborateurs a montré que son inactivation est inhibée en présence de la SOD [Wang et al, 1996]. Une autre étude des effets des ROS sur les protéines phosphatases de type 1, de type 2A (PP2A), et la calcineurine (protéine phosphatase de type 2B) montre une plus grande inhibition pour la calcineurine par rapport aux deux autres phosphatases [Sommer et al, 2002]. Le mécanisme d'action précis n'est pas encore bien caractérisé.

I.C.1.1.2 ROS et les protéines kinase : Activation

La protéine Lck fait partie de la famille des protéines tyrosine kinase Src (**S**ar**c**oma). L'exposition de lymphocytes T à de H_2O_2 provoque une phosphorylation de la protéine Lck augmentant ainsi son activité kinase [Nakamura et al, 1993]. De nombreuses autres protéines tyrosine kinase (PTK) sont régulées par le statut redox de la cellule (Fyn, ZAP-70, Syk, Lyn, ...) mais l'action directe des ROS sur ces protéines n'a pas été montrée. Comme l'état de phosphorylation des résidus tyrosine des protéines dépend de l'équilibre entre les protéines kinases et phosphatases, il est difficile de distinguer l'effet des ROS sur les kinases sans tenir compte d'un effet indirect par l'intermédiaire des phosphatases.

Les MAP kinases (**M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inases) sont des protéines sérine/thréonine kinases qui transforment les signaux extérieurs en information intracellulaire. Il existe 4 groupes : ERK (Extracellular signal Regulated Kinase), JNK/SAPK (c-**J**un-**N**-terminal **k**inase/**s**tress **a**ctivated **p**rotein **k**inase), p38 kinase et BMK1 (**B**ig **m**itogen-**a**ctivated **p**rotein **k**inase **1**). Leur activité est régulée par une double phosphorylation au niveau du motif protéique thréonine-X-tyrosine [Abe et al, 1996] et par les ROS. Par exemple, l'IL-1 β ou le TNF- α induisent la production de ROS dans les chondrocytes bovins conduisant à l'activation de JNK. Les mêmes effets sont observés par l'utilisation directe d'H₂O₂ [Lo et al, 1996].

La PKC (**P**rotéine **K**inase **C**) est une sérine/thréonine protéine kinase régulée par le calcium et le diacylglycérol. Le contrôle de son activité par les ROS est plus complexe. Le traitement des cellules COS-7 sur-exprimant les différentes isoformes des PKC avec de l'H₂O₂ augmente la phosphorylation et l'activité des PKC [Konishi et al, 1997]. Gopalakrishna et Anderson ont montré que la PKC était rapidement inactivée par un traitement avec une faible concentration d'H₂O₂ (5mM) [Gopalakrishna et Anderson, 1987] alors qu'au contraire, une concentration plus forte stimulait son activité [Gopalakrishna et Anderson, 1989]. Il y a donc une dualité dans la régulation de la PKC par les ROS.

I.C.1.2 Dialogue entre les ROS et le calcium (pour revue : Yan et al, 2006)

Le calcium, comme les ROS, est un important messenger secondaire de la cellule. Sa concentration est maintenue faible dans le cytoplasme par un système de pompe à calcium ATPase dépendante (SERCA, **S**arco/**E**ndoplasmic **R**eticulum **C**a²⁺-**A**TPase). Lors d'un stimulus, sa concentration augmente rapidement soit par influx à travers la membrane plasmique soit par efflux à travers la membrane du réticulum où il est séquestré en temps normal. Il existe une communication étroite entre le calcium et les ROS, les deux messagers cellulaires prédominants [Yan et al, 2006]. Le calcium peut moduler l'homéostasie redox en augmentant les concentrations de ROS par différentes voies : en augmentant le métabolisme par stimulation du cycle de Krebs [McCormack et al, 1993], en altérant la membrane mitochondriale provoquant le relargage de ROS [Cadenas et Boveris, 1980], en activant la NADPH oxydase membranaire Nox2 [Kim-Park et al, 1997] ou Nox5 [Banfi et al, 2001]. Le calcium peut avoir aussi un rôle antioxydant en augmentant le système de défense contre les ROS comme par exemple la SOD [Gordeeva et al, 2003]. Le calcium joue donc un double rôle dans la régulation de la production de ROS, pro-oxydant ou antioxydant en fonction du contexte.

Les ROS de leur côté entraînent une augmentation du calcium intracellulaire en accélérant l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants exprimés dans les ovocytes de xénopes [Li et al, 1998]. Les ROS induisent aussi un accroissement de la concentration de calcium par une libération des stocks calciques intracellulaires en agissant soit sur les canaux contrôlés par les récepteurs à la ryanodine [Liu et al, 1994] ou à l'inositol-3-phosphate [Suzuki et Ford, 1992] soit sur les pompes SERCA [Grover et Samson, 1988]. Les ROS agissent en modifiant les résidus cystéines présents dans le site catalytique des récepteurs à la ryanodine et sur les pompes SERCA.

I.C.2 ROS et facteurs de transcription

Les ROS induisent l'expression de nombreux gènes par l'intermédiaire d'une part des voies de signalisation impliquant les MAP kinases mais aussi en agissant plus directement sur les facteurs de transcription comme l'AP1 (**A**ctivator **p**rotein **1**), le NFκB (**N**uclear **F**actor **κ**appa **B**), p53 ou encore HIF-1α. La régulation des facteurs de transcription fait également intervenir une autre protéine, Ref-1 (**R**edox **f**actor **1**). Cette protéine possède deux fonctions, l'une de réparation de l'ADN et l'autre de régulateur sensible au statut redox de la cellule. Sa partie N terminale contient un motif redox sensible caractérisé par la présence de 2 cystéines.

AP-1 fonctionne sous forme de dimères constitués par les protéines d'oncogènes *c-fos* ou *c-jun*. L'activation d'AP-1 se fait par l'intermédiaire des MAP kinases JNK. Les ROS augmentent l'activité de JNK qui phosphoryle les résidus sérines du domaine de trans-activation de *c-jun*. L'activité d'AP-1 est également régulée par les ROS au travers de résidus cystéines situés dans son domaine de fixation à l'ADN. L'oxydation des cystéines diminue la capacité de la protéine à se fixer sur l'ADN [Abate et al, 1990]. La protéine Ref-1 annule l'action des ROS en réduisant les cystéines d'AP-1. L'activation par les phosphorylations des sérines associée à la réduction du site de fixation à l'ADN de AP-1 permet une fonctionnalité complète du facteur de transcription.

p53 est le gène suppresseur de tumeur le plus étudié. L'activité de cette protéine est régulée en partie par le statut redox de la cellule. Comme pour AP-1, l'activation de p53 est régulée par le phénomène de phosphorylation notamment par la famille de MAP kinase (JNK, p38 MAPK, ERK). De plus, p53 est maintenue inactive à cause de l'oxydation de résidus cystéines. Cette oxydation crée des ponts disulfures au sein de son site de fixation à l'ADN. Ref-1 ou la protéine TRx réduit ces ponts disulfures et libère le site de fixation à l'ADN [Jayaraman et al, 1997 ; Ueno et al, 1999].

NF κ B (**N**uclear **F**actor **κ** B) est un complexe protéique constitué de deux protéines p50 et p65. En condition normale, NF κ B est inhibé par la liaison avec I κ B (**I**nhibitor **κ** B). Suite à un stimulus, l'inhibiteur est phosphorylé, ubiquitinylé et dégradé par le protéasome libérant ainsi NF κ B. Les ROS sont des modulateurs de l'activité de NF κ B sous certaines conditions et dans certains types de cellules. Ils agissent en augmentant la dégradation de I κ B. Ainsi, un traitement avec de l'H₂O₂ accélère la dégradation de I κ B [Kretz-Remy et al, 1998] alors que l'utilisation d'antioxydant par surexpression de la glutathion peroxydase conduit à l'effet inverse [Kretz-Remy et al, 1996]. Les ROS facilitent aussi la phosphorylation de l'inhibiteur [Schoonbroodt et al, 2000]. Le domaine de fixation à l'ADN du NF κ B contient également une cystéine. L'oxydation de ce résidu inhibe l'activité de liaison à l'ADN du NF κ B et la thiorédoxine est capable de restaurer cette activité [Galter et al, 1994].

HIF est un facteur de transcription constitué de deux sous-unités, α et β [Wang et Semenza, 1993] dont la régulation s'effectue au niveau post-traductionnel par des phénomènes de dégradation. En normoxie, la sous-unité HIF- α est dégradée constamment par le protéasome. Lors d'une hypoxie, la protéine est stabilisée, se dimérise au niveau du noyau avec HIF-1 β et se lie avec un co-facteur CBP (**C**REB **B**inding **P**rotein)/p300. Il induit la transcription d'une centaine de gènes dont le rôle est de permettre à la cellule de s'adapter à un environnement appauvri en oxygène. L'activité de HIF s'effectue à plusieurs niveaux : la dégradation de HIF- α est contrôlée par des prolyl hydroxylases (PHD) [Jaakkola et al, 2001] et la fixation du co-facteur CBP/p300 sur la région de transactivation en C terminale (TADC) est empêchée par FIH (**F**actor **i**nhibiting **H**IF) [Lando et al, 2002]. L'activité des hydroxylases nécessite de l'oxygène, du 2-oxoglutarate et du fer (Fe²⁺). Les ROS semblent agir sur les hydroxylases en particulier sur le fer contenu dans le site actif de ces protéines. Les ROS sont impliqués dans la stabilisation de la protéine HIF- α aussi bien dans les conditions hypoxiques et normoxiques. En condition normoxique, la thrombine, le PDGF, et le TGF- β 1 induisent quand même une accumulation de HIF dans le noyau par une voie dépendante des ROS dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux. Un traitement avec la vitamine C empêche cette accumulation [Görlach et al, 2001]. La surexpression de NF κ B, facteur de transcription régulé par les ROS, dans les cellules HEK293 stabilise HIF- α alors que son inhibition dans les mêmes cellules annule l'activation de HIF [Zhou et al, 2003]. De plus, l'oxydation d'une cystéine (cystéine 800) dans la région TADC empêche la fixation de CREB/p300 aussi bien en normoxie qu'en hypoxie. Ce phénomène est inhibé par la mutation de cette cystéine ou par la co-transfection avec la protéine Ref-1 [Ema et al, 1999]

Ainsi, la régulation des facteurs de transcription dépend de l'environnement redox contrôlé par les ROS (*figure 2*). Les ROS procurent les conditions oxydatives pour permettre

les phosphorylations par les kinases des facteurs de transcription (1) puis le retour à un environnement réducteur permet l'exécution de ces signaux (2). La persistance d'un milieu oxydant altère les sites de fixation à l'ADN ou d'interaction protéine/protéine essentielles à l'activité des facteurs de transcription (3).

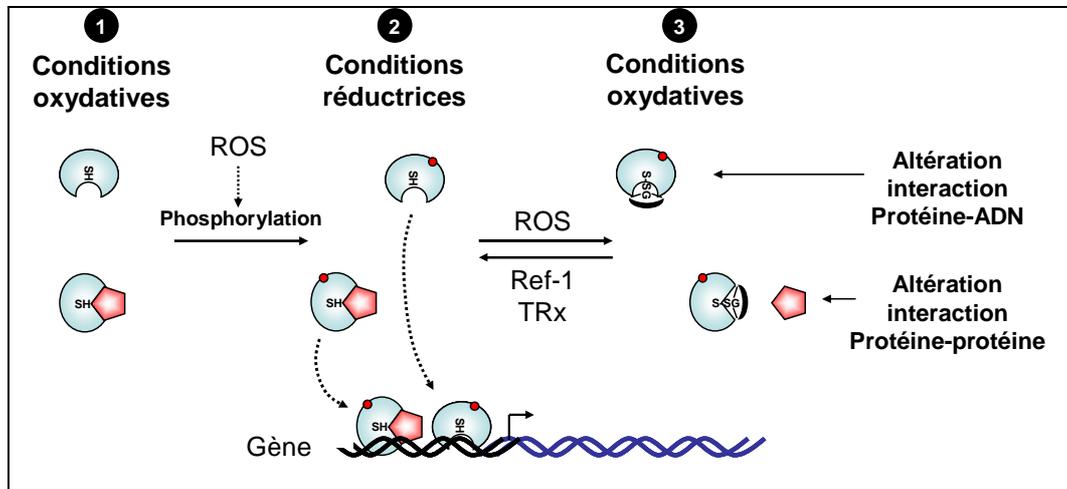


Figure 2. Mécanismes de régulation des facteurs de transcription par les ROS. 1) Les ROS activent les facteurs de transcription en induisant leur phosphorylation. 2) Un changement transitoire du statut redox permet aux facteurs de transcription de garder leur capacité de se lier à l'ADN pour la transcription des gènes cibles. 3) La persistance d'un environnement oxydatif provoque une modification des sites actifs (oxydation de cystéines clés) altérant ainsi la fonctionnalité des facteurs de transcription.

I.C.3 ROS et mort cellulaire

Une production de ROS est souvent observée lors de l'apoptose, processus de mort cellulaire programmée. Les ROS sont impliqués dans l'apoptose induite par le TGF β [Sanchez et al, 1996], p53 [Johnson et al, 1996] ou le TNF α . L'antioxydant N-acétyl-cystéine inhibe l'apoptose induite par le TNF α [Talley et al, 1995]. Les Lymphocytes B privés d'IL-3 entrent en apoptose avec une production de ROS. La surexpression de Bcl-2 ou l'utilisation d'antioxydant prévient ce processus [Hockenbery et al, 1993]. Dans le même registre, l'absence du facteur de croissance NGF entraîne une mort neuronale dépendante de la synthèse des ROS, inhibée par la surexpression de la SOD [Greenlund et al, 1995]. La mort cellulaire survenant après un dérèglement du statut redox est la cause de nombreuses pathologies comme la maladie de Parkinson [Jenner et al, 1992] ou d'Alzheimer [Zhu et al, 2007].

II Sources de production de ROS

L'origine des ROS est multiple. Les ROS sont produits de manière fortuite par le cytochrome P450, la lipoxigénase, la cyclo-oxygénase, la gamma glutamyl transpeptidase,

la chaîne respiratoire mitochondriale, et la xanthine oxydoréductase ou par le fonctionnement détourné de certaines enzymes comme la NO synthase. Les NADPH oxydases sont les seules enzymes dont la fonction primaire et unique est de produire des ROS.

II.A Le cytochrome P450 et ROS

Le cytochrome P450 joue un rôle important dans le métabolisme de nombreux composés exogènes en particulier les drogues, les médicaments, les carcinogènes et certaines molécules endogènes. Il fait partie du système des mono-oxygénases qui catalysent l'addition d'une molécule d'oxygène sur le substrat. Il est localisé au niveau du réticulum endoplasmique. Il participe aussi à la formation d'hormones stéroïdes comme la prégnénolone à partir du cholestérol en partenariat avec la mitochondrie. Le cœur catalytique du cytochrome P450 est constitué d'une molécule d'hème contenant un atome de fer. Une portion significative de ROS est produite pendant le découplage de l'activité de l'enzyme [Kuthan et Ullrich, 1982 ; Gorsky et al, 1984]. Il existe 3 niveaux de formation de ROS au cours de la réaction d'oxygénation [Zangar et al, 2004]. En absence de substrat, le découplage est total et le cytochrome P450 continue de transférer les électrons du NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) pour produire des ROS. Le cytochrome *b5*, partenaire du cytochrome P450 dans le système mono-oxygénase, atténue la production de ROS en améliorant le couplage (efficacité de transfert d'électrons) et l'affinité du cytochrome P450 pour son substrat [Gruenke et al, 1995]. Une petite production de ROS au niveau des microsomes peut donc être imputée au cytochrome P450.

II.B Métabolisme lipidique et ROS

Les lipoxgénases (LOX) et les cyclo-oxygénases (COX) sont respectivement impliquées dans la voie de synthèse des leucotriènes et des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Didion et ses collaborateurs ont montré que l'acide arachidonique augmente la production de ROS dans les artères basillaires de lapin et que cette augmentation est en partie inhibée par l'utilisation d'un inhibiteur des COX [Didion et al, 2001]. Les LOX et COX produisent des ROS en présence du NADH ou du NADPH. La synthèse d'ions superoxyde par les COX est effective en présence d'acide arachidonique et de prostaglandine G₂ et non avec de la prostaglandine H₂. De même, les LOX génèrent des ROS seulement en présence d'acide arachidonique ou linoléique. L'utilisation d'inhibiteurs des LOX et des COX annule la survenue des ROS [Kukreja et al, 1986]. La production de ROS par les LOX et COX est représentée sur la *figure 3*.

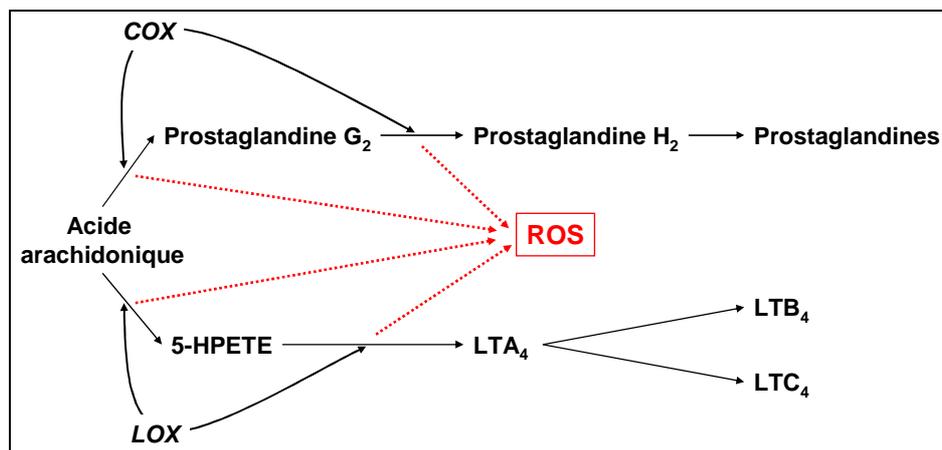


Figure 3. Production de ROS à travers la voie de synthèse des prostaglandines par les cyclo-oxygénases (COX) et des leucotriènes par les lipooxygénases (LOX). 5-HPETE, acide 5-hydroperoxy-6-trans-8,11,14-cis-eicosatetraénoïque ; LT, leucotriène.

II.C Gamma glutamyl transpeptidase et ROS

La gamma glutamyl transpeptidase (GGT) intervient dans la synthèse du glutathion. Cette enzyme est localisée au niveau de la membrane plasmique. La GGT catalyse à partir de la glutamine et de la cystéine la formation de la γ glutamylcystéine qui va être transformé en glutathion par la glutathion synthase. De manière inattendue, la GGT, qui intervient dans le système de défense contre le stress oxydatif par l'intermédiaire de l'antioxydant glutathion, est elle-même capable de produire des ROS. Il a été démontré que la production modérée d' H_2O_2 au cours de la synthèse du glutathion est essentielle à la prévention de l'apoptose et au maintien de la prolifération cellulaire des cellules de lymphome humain U937 [Del Bello et al, 1999]. En présence de glutathion et de fer ou de cuivre, la GGT peut produire une quantité plus importante de ROS engendrant de graves conséquences pour la cellule comme la lipopéroxydation des lipides membranaires [Stark et al, 1993] et des lipoprotéines de basse densité participant à l'athérosclérose [Paolicchi et al, 1999], la mutagénèse de l'ADN [Milne et al, 1993]. Un mécanisme moléculaire de production de ROS par la GGT a été proposé par Drozd et ses collaborateurs montrant l'implication de la gamma-glutamylcystéine et non du glutathion dans la production de ROS par la GGT purifiée ou surexprimée dans les cellules V79 [Drozd et al, 1998].

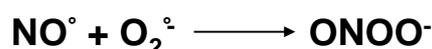
II.D Xanthine oxydase et ROS

La xanthine oxydase (XO) est un complexe homodimérique contenant une molécule de FAD (Flavine adénine dinucléotide) et du molybdène comme cofacteur. Cette enzyme intervient dans le catabolisme des purines en oxydant l'hypoxanthine en xanthine puis la xanthine en acide urique. Durant les réactions conduisant à la synthèse de l'acide urique, la

xanthine oxydoréductase génère des ROS [Sanders et al, 1997]. La xanthine oxydase existe sous deux formes. La forme initiale est la xanthine déshydrogénase (XD) qui transfère les électrons préférentiellement sur du NAD^+ . Elle est cependant capable d'utiliser l' O_2 comme substrat conduisant à la formation d'anions superoxyde. La deuxième forme est la xanthine oxydase. Elle est obtenue à partir de la XD par l'oxydation de résidus cystéines (réversible) [Nishino et Nishino, 1997] ou par coupure enzymatique (irréversible) [Amaya et al, 1990]. Cette transformation inhibe l'accessibilité du NAD^+ sans affecter celle de l' O_2 . Sous cette forme, l'activité de la XO génère principalement des ROS. Ainsi, la production de ROS par la XO joue un double rôle, elle peut intervenir dans la régulation de la signalisation cellulaire avec une faible production d'anions superoxyde (par la XD) mais elle peut aussi être à l'origine de dysfonctionnements cellulaires engendrés par un stress oxydatif (par la XO).

II.E NO synthase et ROS

La NO synthase (NOS) est une hémoprotéine catalysant la transformation de l'arginine en citrulline avec la formation d'un composé radicalaire l'oxyde nitrique, NO° . La présence d'un cofacteur, la tétrahydrobioptérine (BH_4) est nécessaire pour son fonctionnement. Le NO° est une petite molécule importante dans la signalisation de nombreux processus physiologiques comme la neurotransmission, la relaxation musculaire, et la défense de l'organisme. Le radical NO° est soluble dans un milieu aqueux et lipidique et peut donc diffuser librement à travers les membranes cellulaires. Une production anormale de ce composé entraîne un stress altérant par des réactions de nitrosylation la fonctionnalité de certaines protéines [Klatt et Lamas, 2000]. Le NO° peut réagir très rapidement avec l'anion superoxyde pour former le peroxy-nitrite.



Le peroxy-nitrite a un fort pouvoir oxydant et est capable d'induire la fragmentation de l'ADN et la lipopéroxydation des lipides membranaires [Carr et al, 2000]. Il y a une forte relation entre les ROS et les dérivés réactifs de l'oxyde nitrique (RNS) notamment pour le contrôle du tonus vasculaire où ces composés exercent des effets opposés. Il existe 3 types de NO synthase, deux dont l'activité est constitutive (nNOS neuronale et eNOS endothéliale) et une inductible par des cytokines ou endotoxines (iNOS). Dans certaines conditions lors du découplage de l'enzyme, la NO synthase génère principalement des anions superoxyde au niveau du domaine contenant l'hème [Pou et al, 1999]. En absence de son substrat (arginine), la NOS transfère l'électron de son groupement prosthétique hémique sur l' O_2 . L'état d'oxydation du cofacteur influence le découplage de la eNOS [Vasquez-Vivar et al, 2002]. L'addition de BH_4 stimule la production de NO° au détriment de la synthèse de l' O_2° mais l'inhibition n'est pas totale, une production intrinsèque de ROS par l'eNOS ayant été

montrée [Bever et al, 2006]. L'inverse est observé dans les cellules PLB985 dont le gène de la NADPH oxydase Nox2 a été invalidé. Dans ces cellules, la part de production d' $O_2^{\cdot -}$ par la NOS est augmentée. Ceci révèle une relation étroite entre les NOS et la NADPH oxydase Nox2 dans ces cellules [Verchier et al, 2007].

II.F Péroxyosome et ROS (pour revue : Schrader et Fahimi, 2006)

Le peroxyosome, isolé en 1966 [De Duve et Baudhuin, 1966], est un organelle intracellulaire entouré d'une membrane simple. Il est le siège de nombreuses réactions enzymatiques dont la principale est la β -oxydation des acides gras. Le peroxyosome tire leur nom du fait que la première étape de cette oxydation catalysée par l'enzyme acyl-CoA oxydase conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène. La mise en évidence de la présence de la catalase (marqueur classique maintenant des peroxyosomes) indique que cet organelle est impliqué dans le métabolisme de l'oxygène. Ce compartiment contient une série d'enzymes produisant des ROS comme l'acyl-CoA oxydase, l'urate oxydase, la xanthine oxydase, et la NO synthase ainsi qu'une série d'enzymes à caractère antioxydante comme la catalase, la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase et la peroxyrédoxine.

II.G Cycle redox des composés quinones

Le métabolisme des quinones implique des réactions enzymatiques d'oxydoréduction par un ou deux électrons conduisant à la formation à partir d'une benzoquinone de semiquinone ou d'hydroquinone, formes plus stable. La forme semiquinone est capable de transférer son électron sur l' O_2 donnant ainsi naissance à une molécule d'anion superoxyde et à la régénération de la forme benzoquinone originelle. La réduction de la benzoquinone suivie de son oxydation par l' O_2 est appelée cycle redox des quinones. Ce cycle implique des réductases capables de transférer un seul électron comme le cytochrome P450 ou le cytochrome b_5 . La réduction par deux électrons par la NADPH quinone oxydoréductase conduit directement à l'hydroquinone [Watanabe et al, 2004]. Dans certains cas, l'hydroquinone peut réduire respectivement une molécule d' O_2 ou d' $O_2^{\cdot -}$ en $O_2^{\cdot -}$ ou en H_2O_2 , et devenir une semiquinone (*figure 4*).

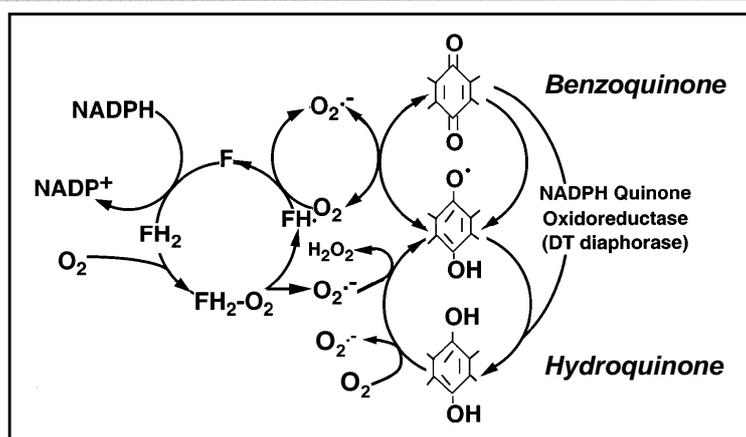


Figure 4. Cycle redox des quinones (Kehrer, 2000). L'oscillation entre les différentes formes de quinones dépend de l'environnement rédox. La forme réduite (hydroquinone) peut conduire à la formation de l'H₂O₂ et de la forme semiquinone par réaction avec l'O₂^{•-}. La forme benzoquinone peut être réduite en sa forme semiquinone par un électron provenant d'une flavoprotéine. Le produit de la réaction de la semiquinone avec l'O₂ est l'anion superoxyde. La NADPH quinone oxydoréductase transfère directement deux électrons sur la benzoquinone pour donner l'hydroquinone, forme plus stable.

La production de ROS par le biais de ce cycle redox de certains médicaments anticancéreux à base de quinone semble être à l'origine de l'efficacité de ces molécules contre le cancer. Le stress oxydatif engendré induit des dommages à l'ADN des cellules cancéreuses et active la protéine p53 [Gutierrez, 2000].

II.H La mitochondrie et ROS (pour revue Jezek et Hlavata, 2005)

La chaîne respiratoire mitochondriale est un complexe enzymatique composé de 4 compartiments nommés complexe I, II, III et IV. Le flux d'électron successif à travers ces complexes permet de créer un gradient de protons entre l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale. Ce gradient permet la synthèse d'ATP à partir de l'ADP et de phosphate par l'ATP synthase. La production de ROS s'effectue principalement au niveau des complexes I et III. Le mécanisme de formation d'anions superoxyde dans le complexe I n'est pas clairement décrit compte tenu de sa complexité (46 sous-unités). La production de ROS au sein du troisième complexe est mieux caractérisée et est due à l'ubiquinone. Ce complexe est représenté par l'enzyme Ubiquinone-cytochrome c réductase qui transfère successivement 2 électrons de l'ubiquinol (Q-OH) vers le cytochrome c. Le transfert du premier électron entraîne la formation du radical semiquinone (Q[•]) qui en réduisant l'O₂ va provoquer la formation d'O₂^{•-}. Une autre source de semiquinone provient de l'activité de la succinate deshydrogénase (complexe II) qui transfère 2 électrons du succinate vers l'ubiquinone (Q) pour former l'ubiquinol (Q-OH). La réduction par un électron conduit à la formation du radical semiquinone (Q[•]).

II.I Les NADPH oxydases et ROS

Les NADPH oxydases constituent une famille d'enzymes comptant 7 membres [Guichard et al, 2007]. Elles transfèrent successivement des électrons du NADPH jusqu'à l'accepteur final l' O_2 pour générer des anions superoxyde. Contrairement aux autres systèmes de production cités précédemment, le but premier des NADPH oxydases est de synthétiser des $O_2^{\cdot -}$. Elles sont donc la source principale physiologique de ROS. Parmi les membres de cette famille, gp91phox (**ph**agocyte **ox**ydase) est le mieux caractérisé. Cette protéine a été clonée en 1986 et identifiée comme responsable de l'explosion respiratoire impliquée dans la destruction d'agents pathogènes dans le polynucléaire neutrophile (gène *CYBB* sur le chromosome X, locus Xp21.1) [Royer-Pokora et al, 1986]. Elle est fonctionnelle sous forme de complexe assemblé suite à un stimulus propagé par une protéine G trimérique. Ce complexe comprend un cœur catalytique membranaire (gp91phox et p22phox) et des facteurs cytosoliques régulateurs (p40phox, p47phox, p67phox et Rac).

II.I.1 Activation de la NADPH oxydase phagocytaire (pour revue Morel et al, 1991)

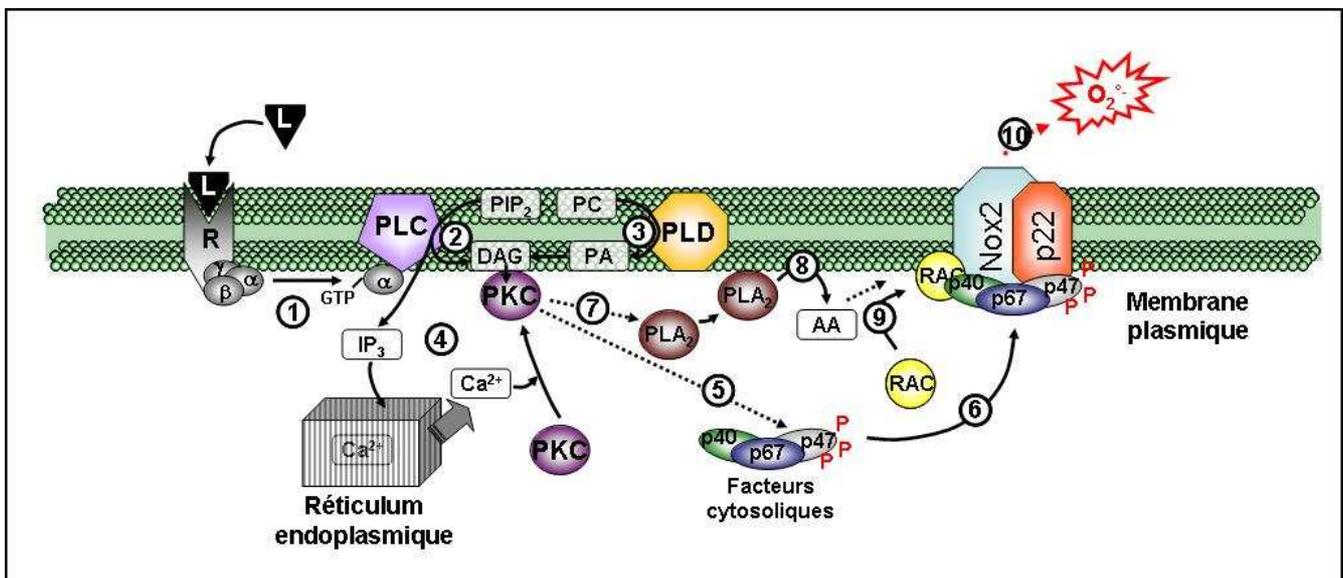


Figure 5. Cascade de réactions conduisant à l'activation du complexe multiprotéique de la NADPH oxydase phagocytaire. Voir texte pour explication (§II.I.1 Introduction).

Le complexe multiprotéique de la NADPH oxydase est dissocié à l'état de repos et son activation conduit à l'assemblage du complexe au niveau de la membrane plasmique. Ce phénomène se déroule en plusieurs étapes (*figure 5*). Suite à la fixation d'un ligand sur son récepteur couplé à une protéine G, la protéine G trimérique (α , β et γ) fixe une molécule GTP et se dissocie (1). La sous-unité α liée au GTP va activer la phospholipase C (PLC) qui produit de l'inositol-3-phosphate (IP_3) et du diacylglycérol (DAG) à partir du

phosphatidylinositol 4-5 bisphosphate (PIP₂) **(2)**. On assiste aussi à l'activation de la phospholipase D qui hydrolyse les phosphatidylcholines (PC) en acides phosphatidiques (PA) qui au final vont être convertis en DAG **(3)**. IP₃ provoque le relarguage du calcium (Ca²⁺) des stocks intracellulaires, ce qui induit la translocation de la protéine kinase C (PKC) vers la membrane plasmique **(4)**. La PKC est alors activée par la DAG et phosphoryle les facteurs cytosoliques **(5)** (provoquant leur translocation à la membrane **(6)**) ainsi que la phospholipase A2 (PLA2) **(7)** (catalysant la formation de l'acide arachidonique (AA) à partir des phospholipides membranaires **(8)**). En même temps, la protéine Rac migre de manière indépendante vers la membrane plasmique **(9)**. L'ensemble de ces phénomènes conduit à l'activation du complexe NADPH oxydase et à la formation d'ions superoxyde **(10)**. Le changement conformationnel du complexe activé est visible par microscopie à force atomique [Pacllet et al, 2000]

III Structure, activité et fonction des NADPH oxydases

Au début du 21^{ème} siècle, des homologues de gp91phox ont été caractérisés. Le premier a été identifié par trois groupes distincts. Il est appelé Mox1 (mitogenic oxidase **1**) car sa surexpression dans les cellules NIH3T3 entraîne une augmentation de la croissance et la transformation cellulaire [Suh et al, 1999]. Il est connu aussi sous le nom de NOH-1 [Banfi et al, 2000] ou gp91-2 [Kikuchi et al, 2000]. En très peu de temps, 5 autres protéines de la famille des NADPH oxydases ont été clonées : une NADPH oxydase dans les cellules rénales, Renox [Geizst et al, 2000] ; dans du tissu fœtal de rein, gp91-3 [Kikuchi et al, 2000] ; dans la thyroïde, p138^{Tox} [Dupuy et al, 1999] ou ThOx2 et ThOX1 [De Deken et al, 2000]. Dans la nouvelle terminologie, les NADPH oxydases sont regroupées sous le terme de Nox (NADPH oxydase) où Mox1 (NOH-1 ou gp91-2) devient Nox1 ; gp91phox, Nox2 ; gp91-3, Nox3 ; Renox, Nox4 ; p138^{Tox} (ThOx2), Duox2 et ThOx1, Duox1 [Cheng et al, 2001]. Le clonage de Nox5 [Banfi et al, 2001] complète la famille. Il existe deux niveaux d'expression tissulaire de ces protéines, une expression principale et secondaire (*tableau 1*). Le plus souvent, ces protéines ont été clonées à partir du type de tissu où elles sont majoritairement exprimées à l'exception de Nox3 [Krause, 2004].

Protéines	Autres noms	Locus	Lieu d'expression principale
Nox1	Mox1, NOH-1, gp91-2	Xp21.1	Côlon
Nox2	gp91phox	Xq22	Phagocytes
Nox3	gp91-3	6q25.1-26	Oreille interne
Nox4	Renox	11q14.2-q21	Rein et vaisseaux
Nox5	-	15q22.31	Organes lymphoïdes et testicules
Duox1/2	ThOx1/p138 ^{Tox} , ThOx2	15q21/15q15.3-q21	Tyroïde

Tableau 1. Distribution tissulaire principale et locus des NADPH oxydases.

Lumière sur Nox4 : clonage, distribution tissulaire et localisation subcellulaire

Nox4 a été mise en évidence initialement au niveau du rein humain [Shiose et al, 2001 ; Geiszt et al, 2000] et identifié au niveau des ostéoclastes murins [Yang et al, 2001]. Par Northern blot, l'ARNm de Nox4 est principalement exprimé au niveau du tissu rénal (adulte et fœtal). Par RT-PCR l'ARNm de Nox4 est retrouvé au niveau du pancréas, du placenta, de l'ovaire, des testicules, du muscle squelettique et de tous les tissus fœtaux [Cheng et al, 2001]. L'expression (ARNm et protéique) de Nox4 s'avère être plus diversifiée et on la retrouve essentiellement dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux [Wingler et al, 2001 ; Hoidal et al, 2003 ; Ellmark et al, 2005 ; Clempus et al 2007; Touyz et al, 2002] et les cellules endothéliales [Ago et al, 2004 ; Hu et al, 2005 ; Kuroda et al, 2005] mais aussi dans les fibroblastes (de la peau [Park et al, 2005 ; Rossary et al, 2007], cardiaques [Colston et al, 2005 ; Cucoranu et al, 2005]), les kératinocytes [Chamulitrat et al, 2004], les adipocytes [Mahadev et al, 2004 ; Mouche et al, 2007], les cellules cancéreuses (mélanomes [Brar et al, 2002 ; Govindarajan et al, 2007], pancréas [Vaquero et al, 2004 ; Edderkaoui et al, 2005 ; Mochizuki et al, 2006], rénal [Maranchie et al, 2005]), les neurones [Vallet et al, 2005 ; Dai et al, 2006] et les cellules souches hématopoïétiques [Piccoli et al, 2005].

Contrairement aux autres Nox qui semblent être localisées dans la membrane plasmique, Nox4 se localise dans les membranes internes. Un article fait cependant référence à sa présence au niveau des points d'adhésion focaux des cellules musculaires lisses des vaisseaux (co-localisation avec la vinculine [Hilenski et al, 2004]). Nox4 se retrouve aussi au niveau du réticulum endoplasmique (co-localisée avec des marqueurs fluorescents du réticulum [Van Buul et al, 2005 ; Martyn et al, 2006]) où une interaction avec la protéine PDI (**P**rotein **D**isulfide **I**somerase) a été révélée par co-localisation et co-immunoprécipitation [Janiszewski et al, 2005]. La présence spécifique de Nox4 dans le réticulum n'est pas bien confirmée car elle peut résulter seulement d'une accumulation en cours de sa synthèse. De manière inattendue, Nox4 a été mise en évidence dans le noyau par immunofluorescence et par western blot [Hilenski et al, 2004]. Les images d'immunofluorescence par microscopie confocale montrent que Nox4 se trouve dans le nucléoplasme ce qui est étrange pour une protéine membranaire. Kurado et ses collaborateurs retrouvent cette localisation (immunofluorescence et western blot) et caractérisent une activité oxydase dans la fraction nucléaire isolée qui est diminuée quand l'ARNm de Nox4 est supprimé par l'utilisation d'ARN interférences [Kuroda et al, 2005]. Par contre, cette activité utilise préférentiellement le NADH par rapport au NADPH contrairement à ce qui a été montré dans les cellules HEK293 surexprimant Nox4 [Serrander et al, 2007].

III.A Structure et topologie des NADPH oxydases

III.A.1 Organisation des domaines conservés des NADPH oxydases

Les NADPH oxydases sont des protéines à 6 passages transmembranaires à l'image de la protéine Nox2 (*figure 6*).

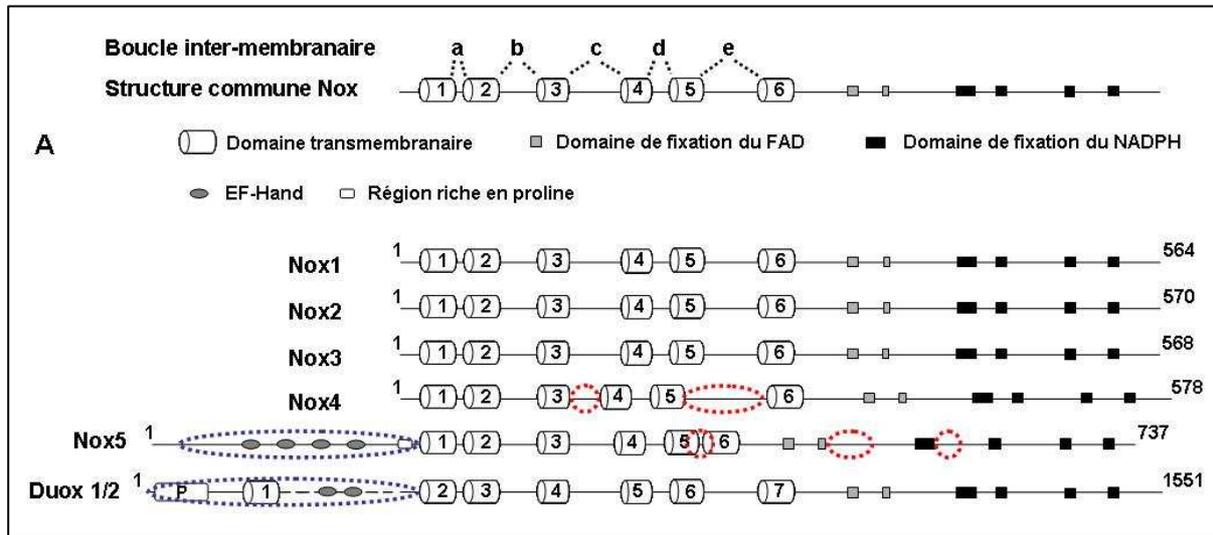


Figure 6. Représentation linéaire de la séquence protéique des Nox. Les Nox à l'image de la protéine Nox2 possèdent 6 passages transmembranaires prédits, deux sites de fixation du FAD, quatre sites de fixation du NADPH. Nox5 possède 4 séquences EF-Hand et une séquence riche en proline en position N terminale (entourées par un cercle bleu discontinu). Les Duox1/2 ont une séquence très homologue à celle des peroxydases (P), un passage transmembranaire et 2 séquences EF-Hand du côté N terminal (entourés par un cercle discontinu) par rapport à la structure de Nox2. La longueur des segments reliant les différents domaines diffère entre les Nox en particulier pour Nox5 et Nox4 (domaines encadrés par un cercle rouge discontinu).

Elles possèdent toutes 3 domaines caractéristiques bien conservés servant de point d'ancrage aux molécules essentielles pour le transfert des électrons jusqu'à l'oxygène : une séquence de fixation du NADPH, une pour le FAD au niveau de la portion cytosolique et quatre histidines (au sein des 3èmes et 5èmes passages transmembranaires) coordonnant 2 hèmes. Les protéines Nox1 (564 acides aminés) et Nox3 (568 acides aminés) sont les plus proches de Nox2 avec respectivement 60% et 58% d'homologie de séquence. Nox5 (737 acides aminés) et les Duox1/2 (1551/1548 acides aminés) possèdent une région N terminale allongée par rapport à Nox2. Nox5 possède de plus 4 motifs EF-Hand pouvant fixer le calcium. Pour les Duox 1/2, on trouve, dans l'ordre à partir de l'extrémité N terminale, un domaine "péroxydase-like" extracellulaire (forte homologie avec des peroxydases), un passage transmembranaire en plus puis 2 motifs EF-Hand. Ces domaines additionnels sont entourés par un cercle discontinu bleu sur la *figure 6*. En dehors de ces régions particulières, la région NADPH oxydase de Nox5 et des Duox présente une bonne homologie avec Nox2 (47% pour les Duox). Nox4 (578 acides aminés) est le plus éloigné de Nox2 avec seulement 39% d'homologie. L'alignement des séquences primaires a révélé que certaines régions de

ces Nox reliant les passages transmembranaires entre eux ou avec les différents domaines FAD et NADPH varient en nombre d'acides aminés (*figure 6*, séquences entourées par un cercle discontinu rouge). Ces différences concernent essentiellement les protéines Nox4 et Nox5 et ces variations peuvent influencer la structure et la régulation de l'activité NADPH oxydase des différentes Nox.

Lumière sur Nox4 : structure protéique

La structure de Nox4 garde la même organisation globale que Nox2 avec les 6 passages transmembranaires, les histidines dans le 3^{ème} et 5^{ème} passages transmembranaires coordonnant les deux hèmes, et les domaines correspondant aux sites de fixation du FAD et du NADPH. Deux régions extracellulaires diffèrent des autres Nox : la boucle c est raccourcie alors que la boucle e est fortement allongée. Due à la localisation supposée de Nox4 dans les membranes internes, ces séquences sont alors exposées dans la lumière des organites et pourraient intervenir dans la régulation de son activité.

III.A.2 Topologie des NADPH oxydases

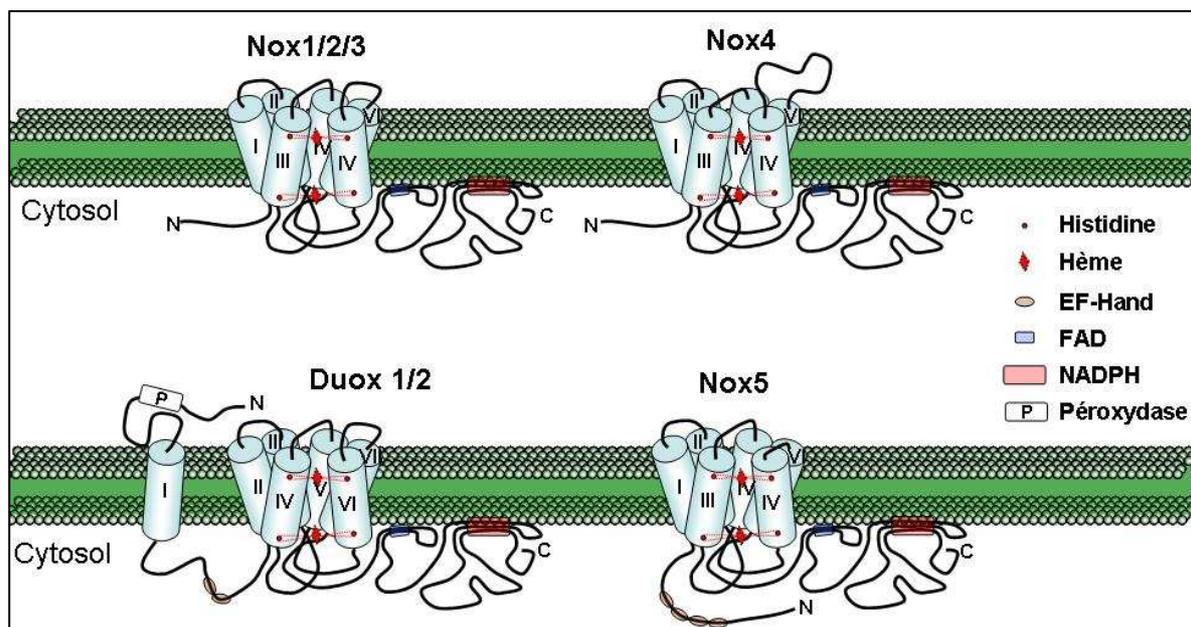


Figure 7. Topologie des NADPH oxydases. Les extrémités N terminale et C terminale des Nox sont cytosoliques. Nox1-5 possèdent 6 passages transmembranaires alors que les Duox en possèdent 7, de ce fait l'extrémité N terminale (contenant le domaine homologue aux peroxydases) des Duox1/2 est extracellulaire.

La structure de Nox2 n'étant pas encore résolue, les données concernant sa topologie découlent de données prédictives et expérimentales. Les boucles c et e ont été caractérisées comme extracellulaires par l'identification des épitopes des anticorps monoclonaux spécifiques de Nox2 (phage display) [Burrill et al, 2001 ; Yamauchi et al, 2001 ; Campion et al, 2007]. La boucle b est impliquée dans l'interaction avec le facteur

cytosolique p47phox et a donc une localisation intracellulaire [DeLeo et al, 1995 ; Biberstine-kinkade et al, 1999]. Les parties N terminale [Paclet et al, 2004] et C terminale [Imajoh-Ohmi et al, 1992] ont été déterminées comme cytosoliques. Il est maintenant admis que Nox2 est une protéine polytopique de type II avec une extrémité N terminale orientée du côté du cytosol, 6 passages transmembranaires et une queue cytosolique C terminale. Aucune étude topologique n'a été réalisée pour les nouvelles NADPH oxydases et leur organisation est calquée sur les connaissances concernant Nox2 (figure 7).

Lumière sur Nox4 : topologie

En ce qui concerne Nox4, l'utilisation des programmes de prédiction de domaines hydrophobes permet de retrouver en général la localisation de ces régions (figure 8). Le 6^{ème} passage transmembranaire apparaît comme faiblement hydrophobe alors que la quasi-totalité des programmes indique l'existence d'une région fortement hydrophobe proche du premier site de fixation du NADPH au sein de la queue cytosolique. Ces prédictions sont proches de celles observées par Marques et ses collaborateurs pour Nox2 [Marques et al, 2007].

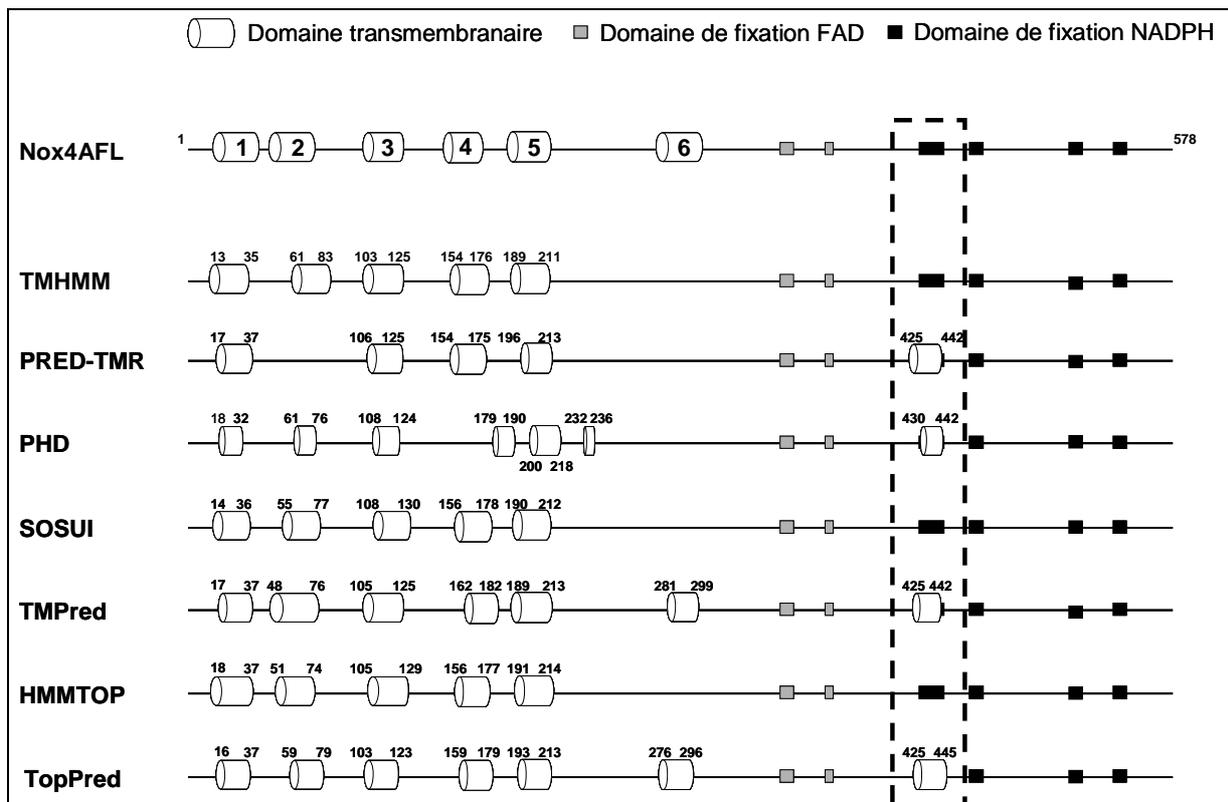


Figure 8. Schéma représentant les domaines hydrophobes transmembranaires de la protéine Nox4A prédits par différents programmes. La topologie de la protéine Nox4A obtenue par comparaison de sa séquence avec son homologue Nox2 est montrée en haut de la figure. On remarque en plus des 6 passages transmembranaires identifiés dans tous les membres de la famille des Nox, une forte hydrophobicité dans la partie cytosolique de Nox4, particulièrement au niveau du premier site de fixation du NADPH (région encadrée en pointillée). Les nombres de part et d'autre des domaines hydrophobes correspondent aux numéros des acides aminés.

III.A.3 Modification post-traductionnelle des NADPH oxydases

La protéine Nox2 synthétisée sous forme immature au niveau du réticulum endoplasmique a un poids moléculaire de 65kDa. Elle subit ensuite une maturation par glycosylation sur trois résidus asparagines (Asn¹³², Asn¹⁴⁹ et Asn²⁴⁰) [Wallach et Segal, 1997] augmentant son poids moléculaire révélé par western blot jusqu'à 91kDa (origine de sa dénomination, gp91phox). Après analyse des acides aminés des nouvelles Nox, on trouve des séquences consensus de N-glycosylation potentielles (Asn-X-Ser/Thr ; où X est un acide aminé quelconque) (*tableau 2*). La protéine Nox5 ne possède aucun site de N-glycosylation prédit. Dans le cas de Nox1, ces sites ne semblent pas être glycosylés car Nox1 apparaît sous la forme d'une bande unique entre 55 et 60kDa par western blot [Janiszewski et al, 2005]. Cet état de fait reste à confirmer compte tenu de l'absence d'anticorps réellement spécifique dirigés contre Nox1. Les protéines Nox3 et Duox1/2 sont glycosylées (révélé par une baisse de la masse moléculaire par déglycosylation) [Nakano et al, 2007 ; De Deken et al, 2002].

Protéines	Sites potentiels de N-glycosylation			Glyco-sylation	MW kDa	Références
	N terminale	Boucle c	Boucle e			
Nox1	-	Asn162	Asn236	Non	55/60	a
Nox2	-	Asn132/149	Asn240	Oui	65→91	b
Nox3	-	Asn163	Asn238*	Oui	50→55	c
Nox4	-	Asn130/133*	Asn230/236	Oui ?	65→75-80	d
Nox5	-	-	-	Non	75	e
Duox1	Asn94/342/354/461/534	-	-	Oui	160→190	f
Duox2	Asn100/348/382/455/537	-	-	Oui	160→190	f

Tableau 2. NADPH oxydases et glycosylation. L'analyse des séquences des différentes Nox a été réalisée avec le programme NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Les asparagines correspondent aux sites potentiels de N-glycosylation (séquence consensus Asn-X-Ser/Thr ; où X est un acide aminé quelconque). * signifie que la position de cette asparagine correspond à un site de glycosylation conservé par rapport à Nox2. MW, masse moléculaire. Références : **a**, Janiszewski et al, 2005 ; **b**, Wallach et Segal, 1997 ; **c**, Nakano et al, 2007 ; **d**, Shiose et al, 2001 ; **e**, Belaiba et al, 2007 et **f**, De Deken et al, 2002.

Un site de coupure du peptide signal déterminé par les programmes de prédiction a été proposé par Cheng pour les Nox [Cheng et al, 2001]. Ce modèle est contredit par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la partie N terminale de Nox2 [Paquet et al, 2004].

Lumière sur Nox4 : modification post-traductionnelle

Peu de données concernent les transformations post-traductionnelles de Nox4 par N-glycosylation. La protéine Nox4 est révélée par deux bandes (65kDa et 75-80kDa) par western blot avec deux anticorps polyclonaux différents : anticorps dirigé contre les 20 derniers acides aminés de Nox4 [Shiose et al, 2001] et un anticorps dirigé contre les acides aminés 320-428 [Hilenski et al, 2004 ; Sturrock et al, 2007]. Ces deux formes n'ont pas la

même localisation subcellulaire. La protéine de 65kDa est retrouvée dans le noyau [Hilenski et al, 2004]. La forme de 75-80kDa pourrait correspondre à la forme glycosylée mais l'utilisation de l'enzyme N-glycosidase F n'abaisse pas sa masse moléculaire [Shiose et al, 2001]. En utilisant le programme SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), un site de coupure après l'acide aminé 35 a été prédit. Comme pour Nox2, ce site ne semble pas fonctionnel puisque la GFP fusionnée en position N terminale de la protéine Nox4 n'est pas relarguée après surexpression dans les cellules HEK293 [Martyn et al, 2006].

III.A.4 Isoformes des NADPH oxydases

A la suite du clonage des gènes des différents membres de la famille des NADPH oxydases, des isoformes résultant d'un épissage alternatif de l'ARNm des gènes de Nox1, Nox2, Nox4, et Nox5 ont été mis en évidence. L'ensemble de ces protéines et isoformes sont représentés sur la *figure 9*.

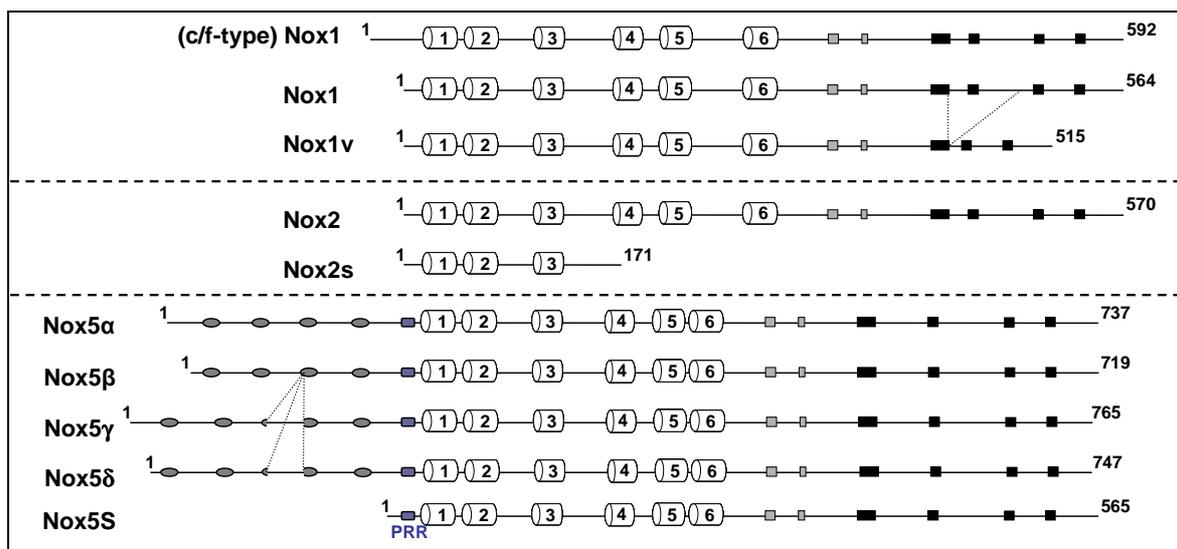


Figure 9. Représentation linéaire de la séquence protéique des isoformes de Nox1, Nox2, et Nox5. PRR correspond à la séquence riche en proline de Nox5.

Un premier isoforme de Nox1 a été proposé [Banfi et al, 2000] mais il s'est avéré être un artéfact expérimental. L'isoforme Nox1v, décrit par Geiszt [Geiszt et al, 2004] est épissé de l'exon 11 qui contient un domaine prédit de fixation du NADPH. Contrairement à Nox1, ce variant ne possède aucune activité NADPH oxydase. 2 autres ARNm de Nox1 (c-type et f-type) ont été mis en évidence et proviennent d'une régulation différentielle du promoteur de Nox1. Ces 2 ARNm codent pour une même protéine Nox1 (c/f-type) allongée du côté N terminal capable d'avoir une activité NADPH oxydase équivalente à Nox1 [Arakawa et al, 2006]. En ce qui concerne Nox2, un isoforme NOX-2S tronqué a été décrit [Heidari et al, 2004]. L'épissage a fait apparaître un nouvel exon IIIa contenant un codon stop. Cette isoforme bien que non fonctionnelle, semble être importante car elle est conservée chez la

souris. Il existe 4 autres isoformes décrits lors du clonage de Nox5 (Nox5 correspond à Nox5 α) : Nox5 β , Nox5 γ et Nox5 δ [Banfi et al, 2001] et Nox5S [Cheng et al, 2001]. Ces protéines diffèrent par leur extrémité N terminale (contenant les 4 EF-Hand). Nox5 α , Nox5 β et Nox5S sont fonctionnelles et l'activité de Nox5 α et β est régulée par le calcium contrairement à Nox5S qui ne possède pas les séquences EF-Hand [BelAiba et al, 2007].

Lumière sur Nox4 : isoformes

5 isoformes de Nox4 ont été caractérisés par Goyal et ses collaborateurs et sont nommés Nox4B, C, D, E ; Nox4A est la protéine Nox4 classique [Goyal et al, 2005] (figure 10).

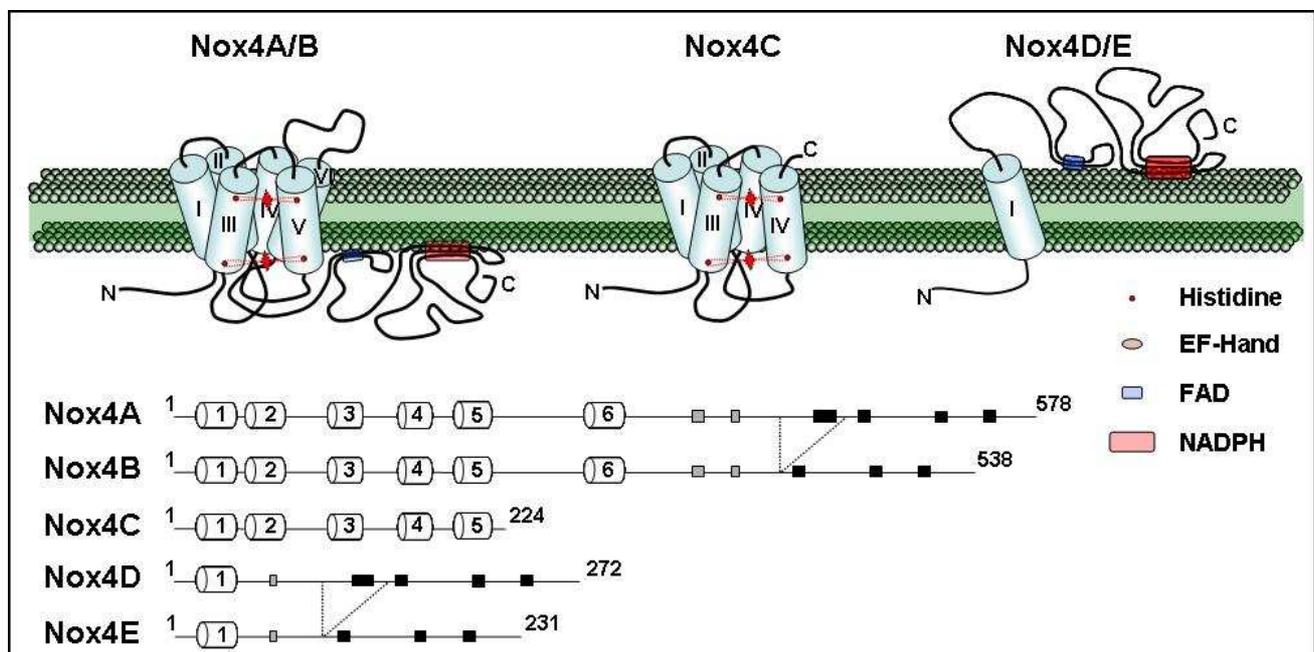


Figure 10. Représentation linéaire et topologie supposée des isoformes de Nox4.

Ces protéines peuvent être classées en 3 catégories :

1. Nox4 et Nox4B : les 2 formes les plus longues. L'isoforme B diffère de Nox4A par un épissage de l'exon 14 qui entraîne une délétion du premier domaine de fixation du NADPH. Comme le NADPH est le substrat de l'oxydase, le variant Nox4B est ainsi incapable de produire des ions superoxydes (dichlorofluorescéine). La surexpression de Nox4B dans les cellules A549 réduit l'activité oxydase endogène, ceci probablement par un phénomène de compétition. La compétition par Nox4B peut se faire au niveau de partenaires potentiels de Nox4 qui restent à identifier.

2. Nox4C est le résultat de l'épissage des exons 9, 10 et 11. Cette délétion entraîne un changement du cadre de lecture et fait apparaître un codon stop sur l'exon 12. Nox4C ne possède que les 5 premiers passages transmembranaires et est incapable d'avoir une activité enzymatique. On remarque également comme pour l'isoforme Nox4B l'effet dominant

négalif sur l'activité oxydase endogène. Le même constat est observé par la surexpression d'un mutant semblable ne contenant seulement que les 6 passages transmembranaires (Nox4 Δ FAD/NADPH) dans les cellules adipocytes [Mahadev et al, 2004].

3. *Nox4D et Nox4E : isoformes ne possédant qu'un seul passage transmembranaire suivi de la queue cytosolique. Ceci est le fruit d'un épissage de l'exon 3 jusqu'à l'exon 11. De manière inattendue, l'isoforme Nox4D possède une activité oxydase équivalente à Nox4 lorsqu'elle est surexprimée dans les cellules A549. Cela est surprenant sachant que les histidines prédites pour coordonner les deux hèmes ne sont pas présentes sur Nox4D. Pour Nox2, 2 modèles coexistent pour la coordination des hèmes. Le premier propose une coordination des hèmes uniquement sur Nox2. L'autre modèle propose une coordination d'un hème entre une histidine de Nox2 et l'histidine 94 de p22-phox [Quinn et Gauss, 2004]. Nox4D possède 3 histidines en position 16, 44 et 47 situées dans une région hydrophobe qui pourraient potentiellement être impliquées dans la coordination de l'hème avec p22phox. Cependant, il semble que la présence de 2 hèmes soit nécessaire pour permettre le passage des électrons au travers de la membrane or p22phox ne contient qu'un seul résidu histidine dans sa séquence. Nox4E en plus de Nox4D est délété de l'exon 14. Cet isoforme Nox4E est inactif. Il est particulièrement intéressant de remarquer que contrairement à Nox4B et Nox4C, sa surexpression dans les cellules A549 n'entraîne pas d'inhibition de l'activité endogène. Si on considère l'hypothèse d'un partenaire protéique qui serait piégé par les isoformes inactifs de Nox4, le fait que Nox4B et Nox4C inhibent l'activité endogène et non Nox4E permet d'émettre une hypothèse concernant la région de fixation de ce partenaire potentiel qui se situerait donc entre la fin du premier passage transmembranaire et le début de la queue cytosolique. Nox4D et Nox4C apparaissent sous formes glycosylées et leur localisation prédite est cytosolique.*

III.B Activité des NADPH oxydases

III.B.1 Organisation des centres rédox

Les analyses des séquences montrent une homologie entre la protéine Nox2 et la famille de la ferrédoxine NADP⁺-réductase (FNR), suggérant que la partie cytosolique de Nox2 contient des sites de fixation du FAD et du NADPH [Rotrosen et al, 1992 ; Segal et al, 1992]. Des expériences de photo-affinité ont montré la fixation du NADPH et du FAD sur la protéine Nox2 [Doussière et al, 1986 et 1995 ; Segal et al, 1992]. Le transport d'électrons à travers la membrane est fréquemment décrit pour les protéines possédant deux molécules d'hèmes coordonnées par des histidines (cytochrome *bc₁* de la chaîne respiratoire mitochondriale [Xia et al, 1997] ou encore la protéine ferredoxine réductase (FRE1) chez la levure [Finegold et al, 1996]). C'est le cas aussi pour Nox2 où des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que les histidines au sein du 3^{ème} (H101 et H115) et 5^{ème}

passage transmembranaire (H209 et H222) sont responsables de l'organisation des deux hèmes : l'un interne se trouve proche du côté cytosolique (coordonné par les histidines H101 et H209) et l'autre externe proche du milieu extracellulaire (coordonné par les histidines H115 et H222) [Biberstine-kinkade et al, 2001]. Ainsi, le trajet de l'électron du NADPH vers l'oxygène est relayé par plusieurs centres redox : d'abord le domaine contenant une molécule de FAD (queue cytosolique) puis celui contenant deux hèmes coordonnés chacun par deux histidines (*figure 11 ; A*).

Lumière sur Nox4 : centres redox

L'organisation des centres redox de Nox4 est calquée par homologie sur celle de Nox2.

III.B.2 Mécanisme de transfert d'électrons de l'activité NADPH oxydase de Nox2 (pour revue : Cross et Segal, 2004)

Le mécanisme de transfert d'électrons est très bien documenté pour la protéine Nox2. Il s'effectue en 7 étapes par des réactions d'oxydoréduction suivant le potentiel redox des molécules contenues dans chaque centre redox (*figure 11 ; B*).

La première étape **(1)** consiste en un transfert de deux électrons du NADPH sur le FAD. La suite du mouvement électronique se poursuit par le transfert d'un électron unique entre le FADH₂ réduit et le premier hème interne **(2)**. Ceci conduit à la formation d'un composé radicalaire FAD[•]. La limitation du transfert d'un seul électron est due au fait que la molécule d'hème ne peut accepter qu'un seul électron à la fois. Donc l'hème interne doit réduire d'abord l'hème externe **(3)** avant de recevoir à nouveau le 2^{ème} électron du radical FAD[•] **(5)**. L'hème externe réduit transfère ensuite son électron sur l'oxygène pour donner l'ion superoxyde **(4)**. Le cheminement du 2^{ème} électron se poursuit comme précédemment de l'hème interne vers l'hème **(6)** externe puis vers l'oxygène **(7)**. Le parcours des électrons est réalisé avec un gradient de potentiel redox favorable à l'exception de l'étape **(3)** et **(6)** qui s'effectuent contre ce gradient. Pour ces deux étapes, la fixation d'une molécule d'oxygène à proximité de l'hème externe crée les conditions énergétiques favorables pour la réduction de l'oxygène en ion superoxyde. L'absence du substrat (O₂) entraîne une accumulation des électrons au niveau de l'hème interne. Par compensation de charge au transfert d'électrons, l'existence d'un flux inverse de protons a été proposée [Henderson et Meech, 2002] mais contestée [DeCoursey et al, 2002].

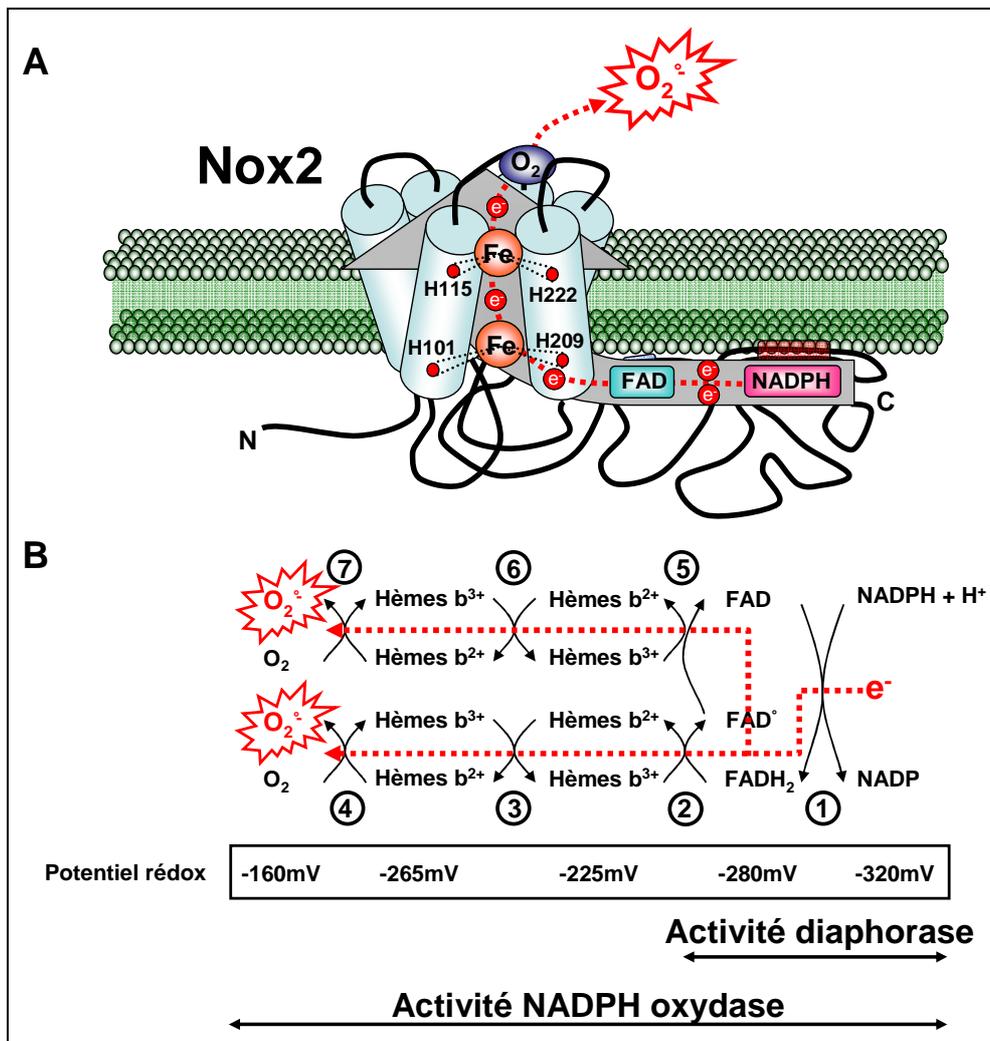


Figure 11. Mécanisme de transfert d'électrons de la protéine Nox2. **A)** Schéma représentant le transfert des électrons dans les différents centres redox de la protéine Nox2. Les électrons provenant du donneur initial, NADPH, traversent la membrane relayés par les centres redox du FAD puis des hèmes pour au final réduire l'oxygène et ainsi générer l'ion superoxyde. Les histidines représentées co-ordinent les deux hèmes contenant chacun un atome de fer. **B)** Mécanisme de transfert d'électrons (schéma inspiré d'après Wallach et Segal, 2004). Le transfert des 2 électrons fournis par le NADPH (étape 1) s'effectue en 7 étapes avec un transport du premier électron à partir du FADH $_2$ (étapes 2, 3 et 4). Le deuxième électron est transporté à la suite du premier à partir du radical FAD $^{\bullet}$ (étapes 5, 6 et 7). L'activité diaphorase (étapes 1 et 2) est portée par la portion cytosolique de la protéine.

L'activité diaphorase correspond au transfert d'électron jusqu'au centre redox du FAD et est située au niveau de la queue cytosolique de Nox2. Cette activité peut être distinguée de l'activité NADPH oxydase par utilisation d'un accepteur d'électron direct du FAD, l'INT (**I**odonitrotetrazolium) dans des cellules PLB985 (sur la protéine entière [Pessach et al, 2001] et sur la protéine tronquée ne contenant que la partie cytosolique [Pessach et al, 2006]). Des expériences avec des formes tronquées de la protéine Nox2 produite par des bactéries ont pu déterminer la région responsable de cette activité qui correspond aux acides aminés 221 à 570. Cette activité diaphorase est intrinsèque et ne nécessite pas la présence de facteurs cytosoliques. Cependant ces facteurs cytosoliques (Rac1 et p67phox) sont capables de la stimuler [Han et al, 2001 ; Nisimoto et al, 2004]. La même remarque est faite

par l'addition de cytosol de cellules lymphocytaires normales sur la protéine tronquée Nox2 en système acellulaire [Marques et al, 2007].

Lumière sur Nox4 : mécanisme de transfert d'électrons

Aucune donnée n'existe à l'heure actuelle concernant l'activité diaphorase de Nox4.

III.B.3 p22phox, partenaire indispensable pour l'activité NADPH oxydase.

La protéine p22phox (195 acides aminés) forme avec Nox2 le cytochrome b_{558} , cœur catalytique du complexe NADPH oxydase des phagocytes. Cette protéine est codée par le gène *CYBA* localisé sur le chromosome 16 (locus, 16q24), elle apparaît sous forme d'une bande à 22kDa (origine de sa dénomination, p22phox) par western blot et ne semble pas glycosylée. p22phox est une protéine membranaire dont la topologie n'est pas encore déterminée catégoriquement.

Les programmes de prédiction des domaines hydrophobes proposent une structure oscillant entre deux, trois et quatre passages transmembranaires (*figure 12 ; A*). La compilation des séquences correspondant aux épitopes des anticorps polyclonaux anti-peptides [Imajoh-Ohmi et al, 1992], monoclonaux [Taylor et al, 2004] et aux sites d'interaction avec les facteurs cytosoliques [Sumimoto et al, 1996 ; Dahan et al, 2002] couvre quasiment la totalité de la protéine p22phox avec une même conclusion : ces séquences sont intracellulaires. p22phox possède une région riche en proline (acides aminés 151 à 160) qui sert de point d'ancrage pour les facteurs cytosoliques lors de l'activation du complexe oxydase. De plus, l'absence d'anticorps et de sites sensibles aux protéases contre une partie extracellulaire de p22phox [Imajoh-Ohmi et al, 1992] indique qu'une très faible portion de la protéine est exposée à la surface extracellulaire. Ces données conduisent à un modèle proposé par Taylor et ses collaborateurs avec 2 passages transmembranaires (*figure 12 ; B*) [Taylor et al, 2004]). La localisation de deux régions demeure incertaine : la région contenant les acides aminés 111 à 115 supposée membranaire a été identifiée comme interagissant avec la protéine p67phox donc cytosolique [Dahan et al, 2002] et une région prédite comme hydrophobe (acides aminés 36 à 52) qui n'est la cible d'aucuns anticorps laissant la possibilité que cette région puisse être membraire (transmembranaire ou boucle hydrophobe).

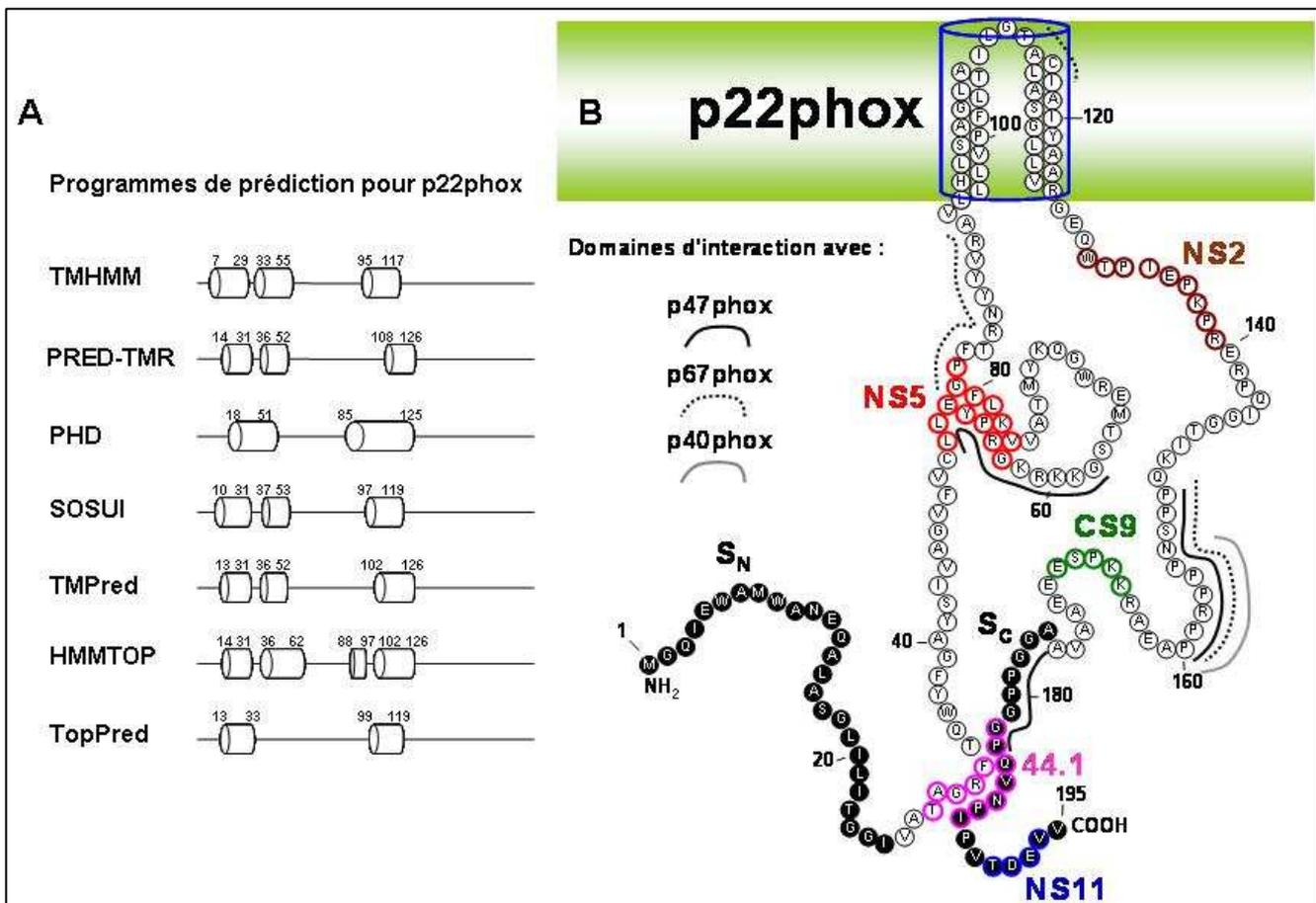


Figure 12. Topologie de la protéine p22phox. **A)** Prédiction de domaines hydrophobes de p22phox par différents programmes. Les nombres de part et d'autre des domaines hydrophobes correspondent aux numéros des acides aminés. Les prédictions indiquent une topologie possible avec 2, 3 et quatre passages transmembranaires. **B)** Représentation du modèle topologique de p22phox proposé par Taylor et ses collaborateurs avec les sites entrant en jeu dans des interactions avec des anticorps et les facteurs cytosoliques p47phox et p67phox. Les anticorps polyclonaux anti-peptides sont S_N (acides aminés 1 à 25) et S_C (acides aminés 176 à 195) [Imajoh-Ohmi et al, 1992]. Les anticorps monoclonaux sont NS2 (acides aminés 126 à 138), NS5 (acides aminés 51 à 57 et 75 à 89), NS11 (acides aminés 191 à 195), CS9 (acides aminés 159 à 172) [Taylor et al, 2004] et 44.1 (acides aminés 181 à 188) [Burritt et al, 1995]. Les traits noirs pleins désignent les sites d'interaction avec p47phox, les traits noirs en pointillés les sites d'interaction avec p67phox [DeLeo et al, 1995 ; Dahan et al, 2002 ; Nobuhisa et al, 2006] et le trait gris plein le site d'interaction avec p40phox [Tamura et al, 2007].

p22phox est étroitement liée à Nox2 avec une stœchiométrie de 1:1 [Huang et al, 1995], ils se stabilisent mutuellement. Les protéines Nox2 ou p22phox seules sont dégradées par le protéasome [DeLeo et al, 2000 ; Block et al, 2007]. Nox2 est synthétisée sous forme de précurseur dans le réticulum endoplasmique (masse moléculaire de 65kDa). L'interaction avec p22phox et l'incorporation des hèmes sont nécessaires à sa maturation via la N-glycosylation [Yu et al, 1999]. Il a été rapporté que p22phox était également indispensable à la maturation de Nox3 [Nakano et al, 2007] et serait stabilisée par l'interaction avec Nox1 [Ambasta et al, 2004]. L'importance de p22phox pour l'activité NADPH oxydase (surexpression ou inhibition par ARN interférence) a été décrite pour Nox1, Nox2, Nox3 et Nox4, par contre il semble que l'activité de Nox5 soit indépendante de p22phox [Ambasta et al, 2004 ; Nakano et al, 2007 ; Kawahara et al, 2005].

Lumière sur Nox4 : Nox4 et p22phox, partenaires

La relation entre p22phox et Nox4 est très étroite. L'interaction entre ces deux protéines est révélée par des expériences de co-localisation par immunofluorescence et par co-immunoprécipitation [Hilenski et al, 2004]. L'augmentation de l'expression de la protéine Nox4 stabilise p22phox et l'interaction entre ces deux protéines est indispensable à l'activité NADPH oxydase de Nox4 [Ambasta et al, 2004 ; Martyn et al, 2006]. L'extinction du message de p22phox par ARN interférence annule l'activité de Nox4. La région poly-proline de p22phox n'est pas utile pour l'activité de Nox4 puisqu'une mutation non fonctionnelle ou une délétion de cette région n'a pas de conséquence sur l'activité de Nox4 contrairement à celle de Nox1, Nox2 et Nox3 [Kawahara et al, 2005]. La mutation de la 2^{ème} histidine H119 (correspondant à H115 de Nox2) conservée du 3^{ème} passage transmembranaire en leucine inhibe comme pour Nox2 l'interaction avec la protéine p22phox [Ambasta et al, 2004].

III.B.4 Partenaires d'activation des NADPH oxydases : p40phox, p47phox, p67phox et Rac

L'implication de facteurs cytosoliques d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire a été révélée par l'identification de mutations génétiques de l'une ou l'autre de ces protéines conduisant à la granulomatose sceptique chronique (CGD). Des homologues de p47phox et p67phox ont été caractérisés et nommés respectivement NoxO1 (**Nox Organizer 1**) ou p41nox et NoxA1 (**Nox Activator 1**) ou p51nox [Banfi et al, 2003 ; Takeya et al, 2003 ; Geiszt et al, 2003].

III.B.4.1 p67phox (NoxA2) et NoxA1

La protéine p67phox de 526 acides aminés (aussi appelée NoxA2 par comparaison avec son isoforme NoxA1) est codée par le gène *NCF-2* (locus 1q25). Elle est révélée avec une masse moléculaire de 67kDa par western blot (origine de sa dénomination, p67phox). p67phox contient de nombreux domaines impliqués dans les interactions protéine/protéine. p67phox contient successivement à partir de l'extrémité N terminale quatre motifs TPR ("**T**etratricopeptide **R**epeat", liaison avec Rac [Koga et al, 1999]), une séquence PRR (riche en proline), un domaine d'activation (AD, liaison avec Nox2 [Han et al, 1998]), un motif SH3 (Src homology 3), un domaine PB1 (**P**hox and **B**emp**1**, liaison avec le site PC de p40phox [Nakamura et al, 1998]) et enfin un autre motif SH3 (liaison avec le site PRR de p47phox [Mizuki et al, 2005]) (figure 13).

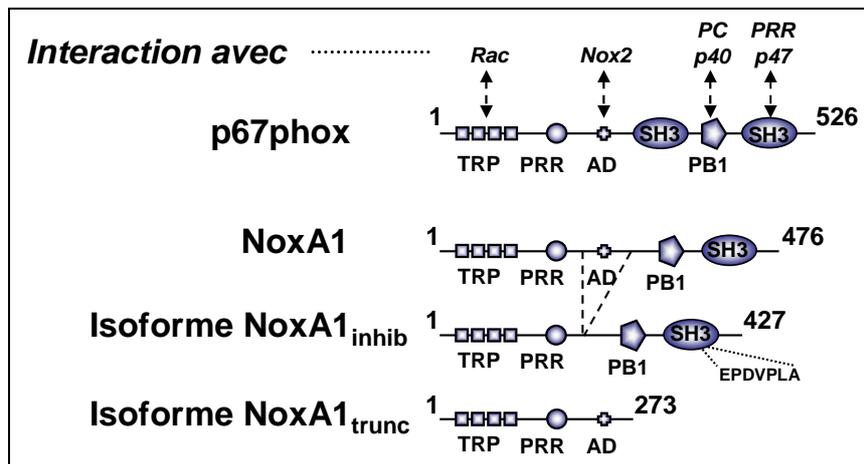


Figure 13. Représentation des domaines caractéristiques de la protéine p67phox et NoxA1. TPR, tetratricopeptide repeat ; PRR, région riche en proline ; AD, activation domaine ; PB1, Phox et Bemp1 domaine ; SH3, Src homology domaine ; PC, Phox et cdc domaine. Les doubles flèches en pointillées indiquent les domaines d'interaction des protéines p67phox ou NoxA1 avec d'autres protéines.

La protéine NoxA1 de 476 acides aminés est codée par le gène *NOXA1* (locus 9q34.3) et est révélée avec une masse moléculaire de 54kDa par western blot. NoxA1 partage seulement 28% d'homologie avec p67phox. Tous les motifs de p67phox sont présents à l'exception du premier SH3 (*figure 13*). La dénomination NoxA1 la rattache plus à la protéine Nox1 du fait de leur co-localisation tissulaire ce qui contraste avec NoxA2 (p67phox) que serait plus directement lié à Nox2 [Takeya et al, 2003]. On dénombre 2 isoformes pour NoxA1, NoxA1_{trunc} et NoxA1_{inhib}. NoxA1_{trunc} ne possède pas la partie C terminale contenant les domaines PB1 et SH3. Cet isoforme accélère le transfert des électrons catalysé par Nox1 en présence de NoxO1. NoxA1_{inhib} est déléetée du domaine d'activation et contient 7 acides aminés en plus dans la région SH3. NoxA1_{inhib} agit comme un dominant négatif pointant de ce fait l'importance de la séquence protéique du domaine SH3 [Valente et al, 2007].

III.B.4.2 p47phox (NoxO2) et NoxO1

La protéine p47phox de 390 acides aminés (aussi appelée NoxO2) est codée par le gène *NCF-1* (locus 7q11.23). Elle est révélée avec une masse moléculaire de 47kDa par western blot. p47phox a plutôt un rôle d'organisateur pour l'assemblage du complexe NADPH oxydase car sa présence n'est pas requise pour l'activité NADPH oxydase en système acellulaire reconstitué [Freeman et al, 1996]. Comme la protéine p67phox, p47phox est organisée en domaines permettant des interactions avec d'autres protéines. En partant de l'extrémité N terminale, on trouve un motif PX (domaine Phox homology, liaison avec les phospholipides de la membrane [Kanai et al, 2001 ; Ago et al, 2001] et avec les deux motifs SH3 internes de p47phox [Hiroaki et al, 2001]), deux motifs SH3 (liaison avec la séquence

PRR de p22phox [Nobuhisa et al, 2006]), une région auto-inhibitrice (AIR, liaison intramoléculaire avec les 2 motifs SH3 de p47phox [Yuzawa et al, 2004]) et une séquence riche en prolines (PRR, liaison avec le 2^{ème} motif SH3 de p67phox [Mizuki et al, 2005]) (figure 14). p47phox est phosphorylée au cours de l'activation du complexe NADPH oxydase au niveau de résidus sérines dans la région auto-inhibitrice, ce qui démasque les sites SH3 permettant ainsi sa fixation sur p22phox.

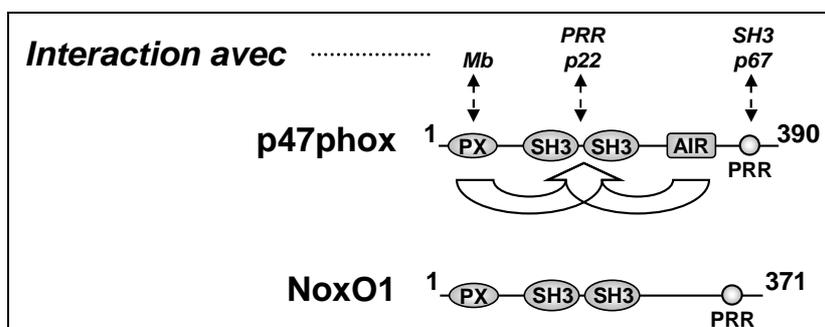


Figure 14. Représentation des domaines caractéristiques de la protéine p47phox et NoxO1. PX, Phox homology domaine ; SH3, Src homology domaine ; AIR, région auto-inhibitrice ; PRR, région riche en proline. Les doubles flèches en pointillées indiquent les domaines d'interaction des protéines p47phox ou NoxO1 avec d'autres protéines. Les grandes flèches montrent l'interaction intramoléculaire inhibitrice entre la région AIR et PX avec les domaines SH3.

La protéine NoxO1 de 371 acides aminés est codée par le gène *NOXO1* (locus 16p13) et est révélée à une masse moléculaire de 44kDa par western blot. NoxO1 partage seulement 23% d'homologie avec p47phox. Les domaines de p47phox sont bien conservés sauf la région auto-inhibitrice qui est absente de NoxO1 (figure 14) [Takeya et al, 2003] suggérant que NoxO1 est constitutivement active. 4 isoformes pour NoxO1 ont été caractérisés : NoxO1 α , NoxO1 β (correspond à NoxO1), NoxO1 γ et NoxO1 δ . Ces protéines sont obtenues par épissage alternatif de l'exon 3, qui modifie la séquence protéique du domaine PX (liaison aux lipides membranaires). Ceci a une répercussion sur leur efficacité à activer les Nox [Takeya et al, 2006] et sur l'affinité de ces domaines PX pour les phospholipides [Cheng et al, 2005] entraînant une localisation subcellulaire différente (NoxO1 β à la membrane plasmique, NoxO1 γ à la membrane plasmique et nucléaire, et NoxO1 α et δ aux membranes internes et cytosol) [Ueyama et al, 2007].

III.B.4.3 p40phox

La protéine p40phox de 339 acides aminés est codée par le gène *NCF-4* (locus22q13.1). Elle est révélée avec une masse moléculaire de 40kDa par western blot. Elle possède un domaine PX (liaison avec les phospholipides de la membrane [Kanai et al, 2001 ; Ago et al, 2001]) en N terminal suivi d'un motif SH3 (liaison avec le site PRR de p47phox [Ito et al, 1996] et de p22phox [Tamura et al, 2007]) et d'un domaine PC (domaine Phox et

cdc, liaison avec le motif PB1 de p67phox [Nakamura et al, 1998]) en C terminal (*figure 15*). Un seul isoforme pour p40phox a été décrit. Il résulte de l'insertion d'un exon supplémentaire conduisant à la production d'une protéine rallongée du coté C terminal. La séquence protéique est également changée par cette insertion qui fait disparaître le domaine PC. Cet isoforme est exprimé dans les cellules myéloïdes mais est dégradé au niveau du cytosol par une prolyl endopeptidase [Hasebe et al, 1999 et 2001].

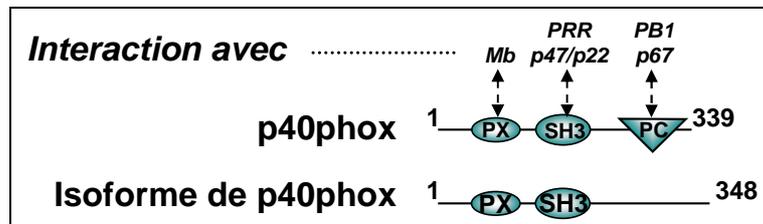


Figure 15. Représentation des domaines caractéristiques de la protéine p40phox et de son isoforme. PX, Phox homology domaine ; SH3, Src homology domaine ; PC, Phox et cdc domaine ; PB1, Phox et Bemp1 domaine et PRR, région riche en proline. Les doubles flèches en pointillées indiquent les domaines d'interaction des protéines p40phox avec d'autres protéines.

III.B.4.4 Rac

Rac est une petite protéine G monomérique qui intervient dans la signalisation cellulaire notamment dans la régulation de l'activité NADPH oxydase. Il existe 3 différentes isoformes de Rac et Rac2 surtout exprimées dans la lignée myéloïde est plus spécifique de Nox2. Rac interagit avec les constituant de la NADPH oxydase via : une région C terminale prénylée (liaison avec la membrane), une région effectrice (liaison avec le site TPR de p67phox [Lapouge et al, 2000]) et une région d'insertion (liaison avec Nox2 [Diekmann et al, 1994]). Au repos Rac est associée à une molécule inhibitrice de la dissociation du GDP (Rho-GDI, GDP Dissociation Inhibitor) [Kwong et al, 1993]. Au cours de l'activation du complexe NADPH oxydase phagocytaire, il échange son GDP contre un GTP et s'associe à la membrane avec le complexe NADPH oxydase pour l'activer [Kreck et al, 1996].

III.B.5 Assemblage du complexe NADPH oxydase phagocytaire lors de son activation

L'assemblage du complexe est régulé par une succession de phosphorylations et d'interactions protéine/protéine (*figure 16*).

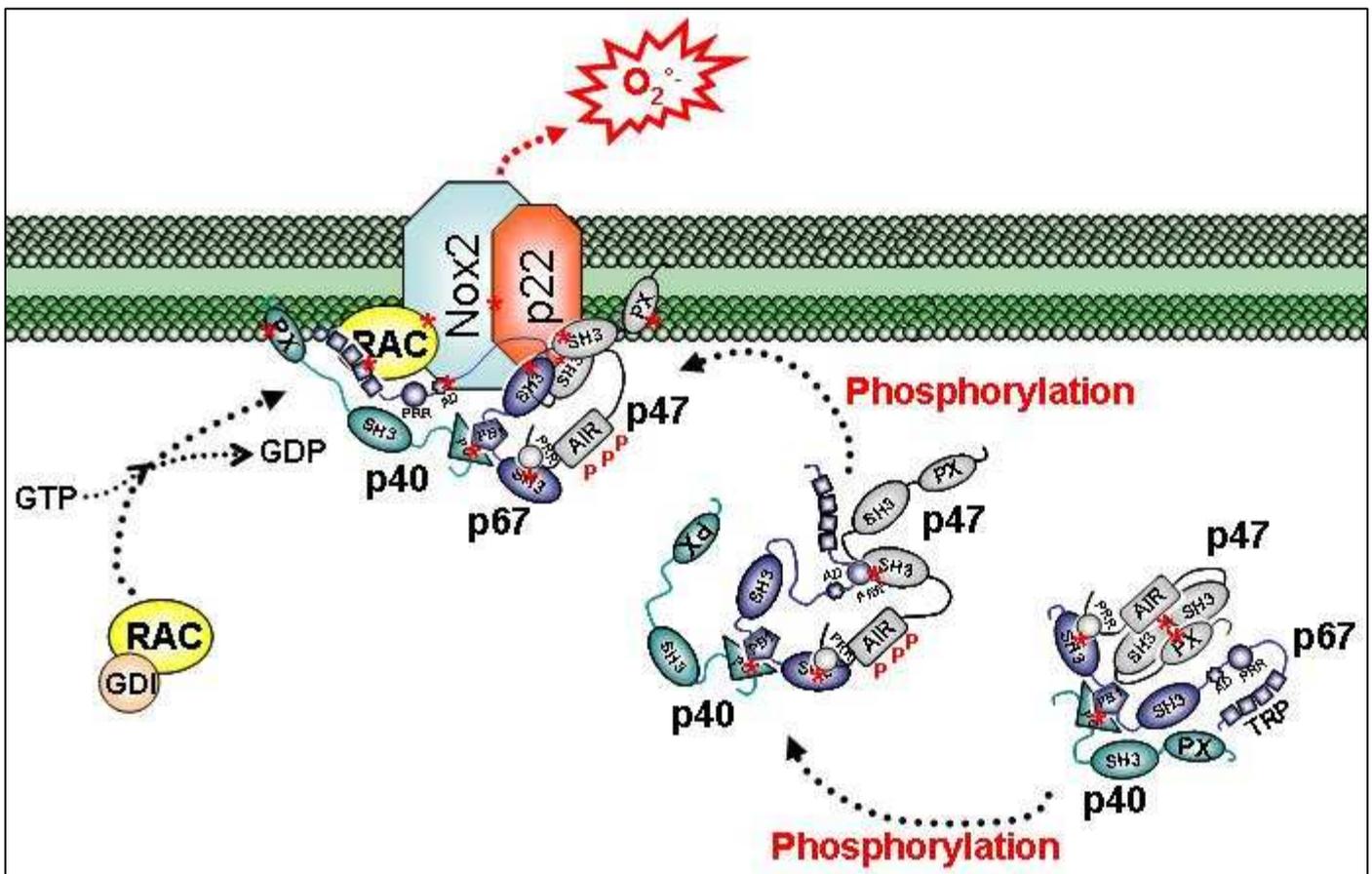


Figure 16. Mécanismes moléculaires d'assemblage du complexe NADPH oxydase phagocytaire. Rac et le complexe des facteurs cytosoliques transloquent à la membrane indépendamment. La lettre P (en rouge) désigne la phosphorylation de p47phox et les astérisques (en rouge) montrent les régions d'interaction protéine/protéine. Les différentes régions des facteurs cytosoliques correspondent à : PX, Phox homology domaine ; SH3, Src homology domaine ; AIR, région auto-inhibitrice ; PRR, région riche en proline ; PC, Phox et cdc domaine ; TPR, tetratricopeptide repeat ; AD, activation domaine ; PB1, Phox et Bemp1 domaine. GDI signifie guanine nucleotide dissociation inhibitors.

On assiste à deux phénomènes de translocation indépendants de Rac et du complexe de facteurs cytosoliques :

1. La protéine Rac inhibée par la liaison à la Rho-GDI au repos migre vers la membrane une fois libre pour interagir avec Nox2. L'ancrage à la membrane de Rac est réalisé par sa partie C terminale hydrophobe.
2. Le complexe cytosolique (p40phox, p47phox et p67phox) est préformé dans le cytosol par des interactions entre la séquence C terminale SH3 de p67phox et la région C terminale riche en proline de p47phox, et entre le domaine TPR de p67phox et PB1 de p40phox. La migration de ce complexe est initié par une série de phosphorylations sur les facteurs cytosoliques (p40phox, p67phox et p47phox) et essentiellement sur la région auto-inhibitrice de p47phox libérant ainsi les sites d'interaction (SH3) et le domaine PX permettant l'accrochage de p47phox à la membrane. p47phox joue le rôle d'organisateur car c'est lui qui entraîne [Nisimoto et al, 1999]. La séquence PX de p40phox se lie également à la membrane.

Une fois à la membrane, de nouvelles interactions se créent entre tous ces acteurs : Rac se lie avec Nox2 et au domaine TPR de p67phox, p47phox par ses séquences SH3 interagit avec la région riche en proline de p22phox, et p67phox active le transfert d'électrons par la liaison de son domaine activateur sur Nox2. Le complexe NADPH oxydase phagocytaire entier ainsi formé devient fonctionnel. Ce complexe activé existe sous 2 états conformationnels [Paquet et al, 2000] : un premier état partiellement actif où le transfert d'électron est effectif mais restreint et un second état conformationnel totalement actif. La transition entre ces deux états est régulée par la protéine p67phox et les MRP8/14 (**M**yeloid **r**elated **p**rotein) [Berthier et al, 2003 ; Paquet et al, 2007]. Les MRP par leur domaine EF-Hand sont sensibles au calcium et peuvent agir directement sur le complexe NADPH oxydase ou par interaction avec p67phox. L'effet potentialisateur des MRP a été montré aussi dans les neutrophiles bovins [Doussière et al, 2001].

III.C Régulation de l'activité des NADPH oxydases

L'activité de Nox2 est sous la dépendance de stimuli qui entraînent des phosphorylations et l'assemblage du complexe. Ces stimuli (activateurs) peuvent être des molécules comme le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP), le composant C5a du complément, l'interleukine 8 ou les leucotriènes qui activent Nox2 par leur fixation à des récepteurs membranaires mais aussi des molécules comme l'acide arachidonique ou le PMA (4 β -phorbol 12-myristate 13-acétate).

L'activité NADPH oxydase est régulée par l'efficacité de l'assemblage des facteurs régulateurs. L'affinité entre les différents facteurs et les Nox est indiquée dans le *tableau 3* [Bedard et Krause, 2007 ; Lambeth et al, 2007].

Protéines	p22phox	Rac	p47phox	NoxO1	p67phox	NoxA1	p40phox
Nox1	++	++	+	++	+	++	?
Nox2	++	++	++	+	++	+	++
Nox3	++	+/-	+	++	+	+	?
Nox4	++	+/-	-	-	-	-	?
Nox5	-	-	-	-	-	-	?
Duox1/2	-	-	-	-	-	-	?

Tableau 3. Composition des complexes NADPH oxydases nécessaire à la production d'ions superoxyde. Nomenclature : - signifie qu'il n'y a pas intervention des facteurs régulateurs ; +/- indique que la relation n'est pas évidente avec des données contradictoires dans la littérature ; + notifie que le facteur régulateur intervient mais n'est pas spécifiquement dédié à cette fonction ; ++ montre une spécificité du facteur régulateur pour la Nox correspondante et ? indique qu'il n'y a pas de données s'y référant.

Les facteurs cytosoliques p47phox ou p67phox et leur homologue NoxO1 ou NoxA1 sont interchangeables. Cependant p47phox et p67phox sont plus spécifiques pour Nox2 alors que NoxO1 et NoxA1 interagissent plutôt avec Nox1 et Nox3.

Comme NoxO1 ne possède pas de région auto-inhibitrice, le complexe NADPH oxydase Nox1/NoxA1/NoxO1 peut avoir une activité constitutive stimulable par le PMA [Cheng et al, 2006]. Nox3 possède une petite activité constitutive en présence uniquement de p22phox qui peut être augmenté avec NoxO1. Par contre l'addition de PMA n'a pas d'effet sur l'activité de NADPH oxydase de Nox3 [Ueno et al, 2005]. La protéine Rac interviendrait dans l'optimisation de l'activité de Nox1 et de Nox3 [Ueyama et al, 2006].

La combinaison des Nox avec les facteurs cytosoliques ou leurs isoformes modifie leur capacité à produire des ions superoxyde. De nombreux isoformes ont été décrites pour les nouveaux facteurs cytosoliques NoxO1 (§III.B.4.2 Introduction) et NoxA1 (§III.B.4.1 Introduction). La présence simultanée de ces isoformes peut réguler par compétition l'activité NADPH oxydase. Par exemple, l'isoforme NoxA1_{trunc} augmente l'activité de Nox1 alors que l'isoforme NoxA1_{inhib} l'annule. La même remarque concernant l'effet dominant négatif potentiel des isoformes des Nox peut être faite (isoformes Nox1v et Nox2S, §III.A.4 Introduction).

L'activité de Nox5 et des Duox est régulée essentiellement par le calcium. Ces deux protéines n'ont pas besoin de p22phox [Banfi et al, 2004 ; Ameziane-EI-Hassani et al, 2005 ; Kawahara et al, 2005].

Une autre manière d'augmenter la production d'ions superoxyde des NADPH oxydases se situe au niveau de la régulation de l'expression protéique de ces protéines. Ceci a été surtout décrit pour Nox1 dont l'expression augmente en présence de facteurs de croissances [Lambeth et al, 2007].

Lumière sur Nox4 : régulation de son activité

*A l'inverse des autres Nox (Nox1, Nox2, et Nox3) l'activité NADPH oxydase de Nox4 n'est pas affectée par la présence des facteurs cytosoliques précités. La surexpression seule de Nox4 est suffisante pour produire des ions superoxyde [Geiszt et al, 2001 ; Shiose et al, 2001 ; Serrander et al, 2007]. De plus, la co-expression de Nox4 avec les différentes combinaisons de facteurs cytosoliques (p47phox, p67phox, NoxO1 et NoxA1) ne change pas son activité [Martyn et al, 2005]. Cette indépendance vis-à-vis des facteurs cytosoliques pourrait s'expliquer par l'inutilité de la région poly-proline de p22phox dans l'activité de Nox4 [Kawahara et al, 2005]. En dehors de p22phox, l'interaction de Nox4 avec d'autres protéines a été rapportée pour la PDI (**P**rotein **D**isulfide **I**somerase) [Janiszewski et al, 2005] et pour le récepteur des lipopolysaccharides TLR4 (**T**oll-**I**ike **r**écepteur **4**, [Park et al, 2004]). La partie*

C terminale de Nox4 (acides aminés 451 à 530) interagit directement avec le domaine TIR (Toll-interleukine1 receptor) du récepteur (acides aminés 739–769) comme l'ont montré Park et ses collaborateurs par des expériences de doubles hybrides et de "GST-pull down" [Park et al, 2006]. La relation entre Nox4 et la protéine Rac est moins claire voire contradictoire. Certains auteurs rapportent une implication de Rac sur la régulation de l'activité de Nox4 endogène [Gorin et al, 2003 ; Mahadev et al, 2004] alors que d'autres ont montré en utilisant la technique de l'ARN interférence que la présence de Rac n'était pas nécessaire à l'activité NADPH oxydase de Nox4 surexprimée [Martyn et al, 2005].

Il semble d'après les données de la littérature que l'activité NADPH oxydase de Nox4 soit constitutive et que l'augmentation de son activité soit liée à une expression protéique renforcée. L'angiotensine II [Wingler et al, 2001 ; Touyz et al, 2002], l'interleukine-1 β , la thrombine et le PDGF [Ellmark et al, 2005] augmentent le transcrite de Nox4 et ainsi la production de ROS dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux [Wingler et al, 2001 ; Touyz et al, 2002]. Le même phénomène est observé avec le TGF β (dans les hépatocytes [Murillo et al, 2007] et dans les fibroblastes cardiaques [Cucoranu et al, 2005]), la cytokine pro-inflammatoire TNF α (dans les cellules musculaires lisses de l'aorte [Moe et al, 2006]), et le cannabidiol, dérivé non psychotrope du cannabis (dans les cellules leucémiques [McKallip et al, 2006]). Le traitement des cellules musculaires lisses de l'aorte par le 7-ketocholesterol conduit à une augmentation de l'ARNm de Nox4 dès les premières heures engendrant un stress oxydatif du réticulum endoplasmique, stress qui conduit à l'apoptose cellulaire [Pedruzzi et al, 2004]. Une baisse de l'activité de Nox4 liée à baisse du niveau de son ARNm a été observée dans les fibroblastes des patients atteints d'une forme de résistance à l'insuline, le lepréchaunisme (syndrome de Donohue) [Park et al, 2005].

La régulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 est également possible par compétition avec ses isoformes dominants négatifs Nox4B, Nox4C. En effet, ces isoformes co-existent dans les cellules embryonnaires de rein (HEK293) et dans le tissu pulmonaire [Goyal et al, 2005].

Certains auteurs rapportent une augmentation rapide de l'activité de Nox4 endogène après stimulation (dans les 5 premières minutes) des cellules adipocytaires par l'insuline [Mahadev et al, 2004] ou des cellules mésangiales rénales par l'angiotensine II [Gorin et al, 2003]. La même observation est faite lors de l'exposition des cellules endothéliales aortiques pendant 30 minutes à des lipopolysaccharides (LPS) [Park et al, 2004]. Ce laps de temps, en particulier pour l'insuline et pour l'angiotensine II est trop court pour être compatible avec une synthèse de novo de la protéine Nox4 et posent question sur le caractère stimuable de Nox4. Gorin et ses collaborateurs montrent le rôle de Rac dans cette stimulation. La

stimulation par le LPS de l'activité de Nox4 semble passer par une interaction directe entre la protéine Nox4 et le domaine TIR du récepteur des LPS. L'ensemble des études décrivant une augmentation rapide de l'activité de Nox4 ne fournit aucune donnée sur le niveau de l'expression de l'ARNm ou protéique de Nox4.

Donc Nox4 a une activité constitutive régulée par son expression protéique mais le mécanisme précis expliquant son augmentation rapide d'activité reste à déterminer.

III.D Nox4 : physiopathologie

De nombreux travaux rapportent le rôle de Nox4 dans plusieurs pathologies. Nox4 représente la source majeure de production de ROS dans le rein, et pourrait participer à la fibrose glomérulaire en relayant l'effet de l'angiotensine II [Gorin et al, 2003] dans les cellules mésangiales conduisant à l'hypertrophie glomérulaire. Elle est également impliquée dans la néphropathie diabétique où une augmentation de son transcrit a été rapportée [Etoh et al, 2003 ; Gorin et al, 2005].

Sa localisation principale rénale suggère que Nox4 soit un senseur redox de l'oxygène en liaison avec la protéine HIF (**H**ypoxia **I**nducible **F**actor) (§I.C.3 Introduction) [Shiose et al, 2001]. Dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux pulmonaires, l'expression de HIF est régulée par l'activité de Nox4 via le facteur de transcription NF- κ B [Bonello et al, 2007]. Dans les pathologies cancéreuses, HIF par le biais de ses gènes cibles (plus d'une centaine) permet à la cellule cancéreuse de proliférer dans un environnement appauvri en oxygène et par stimulation de la néo-angiogenèse, de faciliter le processus métastatique [Maxwell, 2005]. Une relation directe entre l'activité enzymatique de Nox4 et HIF a été identifiée récemment dans la maladie de von Hippel-Lindau (VHL) (lié à des mutations germinales du gène suppresseur de tumeur vhl). L'inhibition de l'expression de la protéine Nox4 par siRNA dans les cellules de carcinome rénal à cellules claires 786-O VHL-/- induit une réduction drastique du transcrit de HIF ainsi que des gènes cibles de ce facteur de transcription [Maranchie et al, 2005; Block et al, 2007]. Dans le cancer du pancréas, l'inhibition de l'activité de Nox4 (inhibiteurs chimiques spécifiques ou extinction de son expression) restaure la sensibilité à l'apoptose des cellules cancéreuses [Vaquero et al, 2004 ; Edderkaoui et al, 2005 ; Mochizuki et al, 2006]. Nox4 favorise également la croissance métastatique de cellules de mélanome [Brar et al, 2002 ; Govindarajan et al, 2007]. Ainsi, Nox4 en produisant des ROS favorise la survie et la croissance de la tumeur.

Nox4 est aussi capable de potentialiser la voie de signalisation induite par l'insuline dans les cellules d'adipocytes 3T3-L1 [Mahadev et al, 2004]. Ainsi, la compréhension de son mécanisme d'action trouvera son application dans le traitement du diabète insulino-résistant

de type 2. L'expression de Nox4 est diminuée dans les fibroblastes de la peau des patients atteints de lepréchaunisme qui est une maladie orpheline touchant le gène du récepteur de l'insuline avec un état d'insulino-résistance extrême [Park et al, 2005].

Il est maintenant admis que la surproduction de ROS participe au développement de physiopathologies cardiovasculaires. Nox4 est essentielle à la différenciation des fibroblastes cardiaques en myofibroblastes [Cucoranu et al, 2005 ; Li et al, 2006]. Nox4 a été décrite comme la NADPH oxydase majoritaire des cellules endothéliales [Ago et al, 2004] mais est aussi présente dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux [Hilenski et al, 2004]. Elle est impliquée dans la maintenance de la différenciation de ces cellules [Clempus et al, 2007 ; Deliri et al, 2007]. La production de ROS induite par l'urotensine II dans l'hypertension pulmonaire est dépendante de Nox4 [Djordjevic et al, 2005]. Nox4 serait l'un des protagonistes impliqué dans le contrôle de l'apoptose par un stress oxydatif du réticulum endoplasmique des cellules musculaires lisses de l'aorte en contact avec les lipides oxydés (7-kétocholestérol), ce qui le positionnerait comme un acteur essentiel de la pathologie athéromateuse [Pedruzzi et al, 2004].

Le signal pro-inflammatoire des lipopolysaccharides sur les récepteurs TLR4 des cellules endothéliales aortiques est relayé par l'activité NADPH oxydase de Nox4 [Park et al, 2006].

La destruction du cartilage dans l'arthrose résulte d'un déséquilibre en faveur de la production d'enzymes protéolytiques, les métalloprotéases matricielles (MMP) principalement la collagénase 1 (MMP-1). L'interleukine-1 β est probablement le facteur le plus important dans la génèse de l'arthrose [Pelletier et al, 1989]. L'IL-1 β conduit en effet à augmenter l'expression de la MMP-1 par les chondrocytes humains; la voie de signalisation emprunt e étant dépendante des ROS et contrôlant les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B [Lo et al, 1998 ; Liacini et al, 2002]. La présence de Nox2 et de ses partenaires cytosoliques a été montr e dans la lignée de chondrocytes C-20/A4 [Moulton et al, 1997]. Dans un travail conduit en partenariat avec le Docteur Grange (GREPI), nous avons confirmé l'expression de ces protéines mais aussi mis en évidence l'ARNm de Nox4 dans cette lignée. En présence d'IL-1 β , nous observons une agmentation de l'expression de la pro-MMP-1 par les cellules C-20/A4. Dans ces cellules, la source de production de ROS n'est pas clairement définie et l'oxydase impliqu e non identifi e. Nous avons montré dans le modèle des chondrocytes C-20/A4 stimulés par IL-1 β que la surexpression de Nox4 contrairement à Nox2, conduit à une augmentation de la production des ROS en rapport avec la sécrétion de la pro-MMP1. Pour la première fois, il a été possible de relier l'activité oxydase de Nox4 à une expression augment e de métalloprotéases, MMP-1 [Grange et al, 2006].

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Objectifs du travail

La NADPH oxydase Nox4 semble être une cible de choix car elle se trouve à la convergence de nombreuses pathologies du vieillissement. Le contrôle de son activité constitue donc un enjeu thérapeutique majeur.

Nox4 est la moins connue de tous les membres de cette famille, Nox/Duox. Il est rapporté pour Nox4 dans la plupart des cellules où elle est exprimée, une activité NADPH oxydase extrêmement faible et constitutive. Aucun mécanisme d'activation et de régulation n'est évoqué.

Nous nous proposons dans ce travail d'analyser les modalités de transfert d'électrons médiée par Nox4 au travers des questions suivantes :

1. Quelle est la nature de la NADPH oxydase Nox4 fonctionnelle ?
2. Existe-t-il des partenaires d'activation et de régulation ?

Pour répondre à ces interrogations, nous avons mis en place deux modèles d'étude. Le premier est basé sur la surexpression de la protéine Nox4 dans les cellules HEK293E et le second est un modèle d'étude acellulaire épuré construit à partir de différentes formes de Nox4 recombinant purifiées, qui ont été synthétisées dans un système bactérien (par des cellules entières ou par traduction *in vitro*).

Le travail a débuté par la caractérisation de l'activité NADPH oxydase (système cellulaire) et diaphorase (système acellulaire) constitutive de Nox4 servant de base pour la recherche d'une modulation de ces activités. A partir des principaux résultats, nous tenterons de proposer un mode de régulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4.

**MATERIELS
ET
METHODES**

I Méthodes de biologie cellulaire

I.A Lignées cellulaires et culture

Toutes les cellules sont cultivées dans des conditions standard de culture humidifiée (37°C et 5% CO₂).

I.A.1 Passage et multiplication des cellules adhérentes

Les cellules adhérentes arrivées à confluence sont lavées au PBS stérile (KCl 2,7mM, KH₂PO₄ 1,5mM, NaHPO₄ 8,1mM, NaCl 137mM pH 7,3) après élimination du milieu de culture puis traitées par la trypsine-EDTA (0,25%) jusqu'à leur décollement (contrôle du détachement par microscope). La trypsine est neutralisée par l'addition d'au moins 8 volumes de milieu complet pour 1 volume de trypsine. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5min à 350g à température ambiante puis reprises par du milieu de culture complet par pipetages successifs. Une dilution allant de 1:2 à 1:10 en fonction du type de cellules est effectuée dans une nouvelle boîte de culture avec du milieu de culture complet (en fonction du type cellulaire).

I.A.2 Passage et multiplication des cellules non adhérentes

Les cellules sont changées tous les 3 jours. La boîte de culture est mise à la verticale pendant un temps de 5 à 10min pour permettre la décantation des cellules et pour éliminer les cellules mortes (sédimentent moins rapidement). Les deux tiers du volume sont éliminés et le reste est homogénéisé par pipetages puis divisé au 1:3 dans une nouvelle boîte avec du milieu de culture complet.

I.A.3 Lignées cellulaires HEK293 et HEK293E

Les cellules HEK293 (Invitrogen) sont issues de rein embryonnaire humain (Humain Embryonic Kidney) transformées par les gènes E1A et E1B de l'adénovirus de type 5 [Graham et al, 1977].

Les cellules HEK293E expriment de manière stable l'antigène nucléaire 1 (EBNA1) du virus d'Epstein-Barr. Elles sont adhérentes et ont une morphologie épithéliale. Le milieu

de culture complet a pour base du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, avec du sodium pyruvate 0,11 g/L et 4,5g/L de glucose) supplémenté avec 2mM de L-Glutamine, 100U/mL de pénicilline G et 100µg/mL de streptomycine, 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (30 min à 60°C). Les cellules HEK293E transfectées sont sélectionnées avec un antibiotique correspondant au gène de résistance codé par le plasmide.

Le passage se fait avec une dilution au 1:10.

I.A.4 La lignée HEK293 T-REx™ sauvage et Nox4

Les cellules HEK293 T-REx (Invitrogen) sont des cellules initialement issues de rein embryonnaire humain (Humain Embryonic Kidney) transformées par les gènes E1A et E1B de l'adénovirus de type 5. Le milieu de culture complet a pour base du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium avec 4,5g/L de glucose) supplémenté avec 2mM de L-Glutamine, 100U/mL de pénicilline G et 100µg/mL de streptomycine, 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté. Les cellules HEK293 T-REx sauvages (WT) expriment de manière stable la protéine Tétracycline répresseur (tetracyclin repressor protein) provenant du plasmide pcDNA6/TR. Le maintien du plasmide permettant l'expression de cette protéine se fait avec l'addition dans le milieu de culture de 5µg/mL de blasticidine. Les cellules HEK293 T-REx Nox4 contiennent en plus du plasmide pcDNA6/TR, un autre plasmide pDEST30-Nox4 sous la régulation d'un promoteur Tet-on CMV (CytomégaloVirus). Ces cellules sont cultivées en présence de 5µg/mL de blasticidine et de 400µg/mL de G418 (Généticine).

Le passage se fait avec une dilution au 1:10. Ces cellules nous ont été données par le Dr. Lena Serrander (laboratoire PATIM, Prof K.H. Krause, Genève).

I.A.5 Lignées cellulaires Hela

Les cellules Hela proviennent d'un prélèvement effectué sur une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus et décédée en 1951, **Henrietta Lacks**. Ce sont des cellules adhérentes et de type épithélial. Le milieu de culture complet a pour base du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplémenté avec 2mM de L-Glutamine, 100U/mL de pénicilline G et 100µg/mL de streptomycine, 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté.

Le passage se fait avec une dilution au 1:10. Ces cellules nous ont été données par le Pr. Karl-Heinz Krause (PATIM, Genève).

I.A.6 Lignées cellulaires chondrocytaires C-20/A4

Les chondrocytes C-20/A4 sont issus de lignées immortalisées par le virus SV40. Ce sont des cellules adhérentes cultivées en mono-couche [Finger et al, 2004] en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplémenté avec 2mM de L-Glutamine, 100U/mL de pénicilline G et 100µg/mL de streptomycine, 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté. Ces lignées de chondrocytes gardent un phénotype chondrocytaire en culture et elles sont validées pour l'étude et la recherche sur la physiologie de la dégénérescence cartilagineuse [Goldring et al, 2004]. Les cellules transfectées sont sélectionnées par 10µg/mL de blasticidine.

Le passage se fait avec une dilution au 1:2. Ces cellules nous ont été données par le Dr M. Goldring [Goldring et al, 1994] (Harvard Institute of Medecine, Boston).

I.A.7 Lignées cellulaires PLB-985 sauvages et Nox2-KO

Les cellules PLB-985 sont issues d'une lignée cellulaire myélomonoblastique humaine d'une patiente de 38 ans atteinte d'une leucémie chronique [Tucker et al, 1987]. Ces cellules ont la capacité de se différencier en monocytes ou en granulocytes après addition d'agents de différenciation : elles expriment alors tous les composants du complexe de la NADPH oxydase Nox2 (Nox2, p22-phox, p40-phox, p47-phox et p67-phox). Les cellules PLB-985 sont non adhérentes et correspondent à un sous clone de cellules HL-60.

Les cellules PLB-985 Nox2-KO sont obtenues à partir des cellules PLB-985 dont le gène *CYBB*, codant pour Nox2, a été invalidé par recombinaison homologue au niveau de l'exon 3 avec l'insertion d'une cassette codant pour la protéine phosphotransferase hygromycine B [Zhen et al, 1993]. Les cellules PLB-985 Nox2-KO n'expriment pas la protéine Nox2 ; par conséquent l'activité du complexe oxydase est totalement abolie.

Ces deux types de cellules sont cultivés en présence d'un milieu complet à base de RPMI 1640, supplémenté avec 2mM de L-Glutamine, 100U/mL de pénicilline G et 100µg/mL de streptomycine, 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté.

Le passage se fait avec une dilution au 1:2. Ces cellules ont été données par le Dr. Mary C. Dinauer (Department of Pediatrics and Medical and Molecular Genetics, Indiana).

Différenciation des cellules PLB-985 :

Les cellules sont lavées au PBS puis sont comptées sur une cellule de Malassez et 5x10⁵ cellules sont différenciées avec l'ajout de 0,5% de diméthylformamide (DMF) dans le milieu de culture complet pendant 5 à 6 jours [Tucker et al, 1987].

« Priming » des cellules PLB-985 :

Les cellules PLB-985 sont rendu adhérentes par un traitement au PMA (4 β -Phorbol 12-myristate 13-acétate) 50nM pendant 40 à 60 minutes. Elles sont ensuite lavées et cultivées avec le milieu de culture complet. L'analyse de l'activité NADPH oxydase est réalisée le lendemain.

I.B Congélation et décongélation

Congélation :

Les cellules sont numérotées sur cellule de Malassez et 10⁷ cellules sont reprises dans 1mL contenant 10% (v/v) de DMSO avec 90% (v/v) de SVF puis transférées dans un cryotube. La congélation se fait par paliers successifs de température dans une boîte de congélation (Nalgen™ Cryo) contenant de l'alcool (isopropanol) dans un congélateur à -80°C. Les cryotubes sont conservés dans de l'azote liquide.

Décongélation :

La décongélation se fait par passage direct du cryotube de l'azote liquide en bain-marie à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées deux fois dans le milieu de culture adéquat (centrifugation 350g pendant 5min) puis finalement reprises dans le milieu de culture complet contenant 20% de SVF. Le milieu de culture est changé le lendemain puis les cellules sont cultivées selon les conditions adaptées à chaque type cellulaire.

II Méthodes de biologie moléculaire

II.A RT-PCR

Le RT-PCR (Transcription Inverse suivi d'un Réaction de Polymérisation en Chaîne) permet de mettre en évidence un ARNm spécifique. L'ARNm est tout d'abord retranscrit en ADNc (ADN complémentaire) par la réaction RT par une transcriptase réverse ensuite l'ADNc est amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques du gène d'intérêt. L'analyse de l'amplifiat est faite par une migration sur un gel d'agarose à l'aide de 0,05% (p/v) bromure d'éthidium (BET) sous lumière ultraviolette (§II.A.5 Matériels et méthodes).

II.A.1 Extraction d'ARN total

L'extraction doit se faire de manière à éviter toute contamination par les RNAses qui dégraderaient l'ARN (matériel stérile « RNase free », port de gants). Les cellules sont lavées deux fois au PBS et 10^8 cellules sont ressuspendues dans 1mL de TRIzol® (Gibco-BRL), solution composée à 50% par du phénol et contenant un agent de dissociation, le thiocyanate de guanidium nécessaire pour détruire les structure cellulaires et pour inactiver les RNAses endogènes [Chomczynski et al, 1987] (possibilité de conservation à -80°C). Après 5 à 10 minutes à température ambiante et sous agitation énergique pour permettre une lyse homogène, 0,2mL de chloroforme sont ajoutés à l'échantillon. La préparation est agitée vigoureusement et incubée 2 à 3 minutes à température ambiante, puis elle est centrifugée à 10 000 g pendant 15min à 4°C . Les ARN totaux sont isolés dans la phase aqueuse supérieure alors que les ADN et les protéines sont retrouvés au niveau de l'anneau blanchâtre intermédiaire séparant la phase aqueuse de celle du phénol. Les ARN totaux sont transférés dans un tube eppendorf et précipités par 0,5mL d'isopropanol pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot est récupéré après une centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C ; il est lavé par 1mL d'éthanol 70 % (v/v) dans de l'eau DEPC (eau traité au préalable avec le **Diethylpyrocarbonate**, qui dénature les RNAses, à 0,1% puis le DEPC est dégradé par le passage en autoclave). Il est alors séché à l'air libre puis remis en suspension par 34 μL à 54 μL d'eau DEPC selon la taille du culot. Un chauffage de 10 minutes à 60°C est possible pour faciliter la dissolution complète de l'ARN. Les ARN totaux sont dosés par spectrométrie à 260nm et ensuite conservés à -80°C (un an).

II.A.2 Dosage des acides nucléiques

Le dosage est réalisé par spectrométrie. Des volumes de 4 μL d'ARN ou 5 μL d'ADN sont dilués dans 1mL d'eau stérile dans une cuve en quartz. Le spectre d'absorption est lu entre 240nm et 340nm. Les acides nucléiques absorbent à 260nm et les protéines à 280nm. La quantité d'ARN ou d'ADN est déterminée en sachant que une absorbance, $\text{DO}=1$ à 260nm correspond à 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ARN et à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ADN.

Le rapport $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$ permet d'évaluer la pureté de la préparation en acides nucléique. Une bonne pureté se situe entre 1,8 à 1. Si l'ADN n'est pas suffisamment pur, il est possible d'effectuer une extraction d'ADN par la méthode au phénol/chloroforme (§II.C.3.10 Matériels et méthodes).

II.A.3 Transcription inverse (RT) : production d'ADNc

Cette étape permet de transcrire les ARNm totaux en ADNc. La réaction de transcription inverse est réalisée dans 20 μ L de volume final.

	Volume	[C] final
Tampon réaction 10X	2	1X
MgCl ₂ 25mM	4	5mM
Mix dNTP 10 mM	4	2,5mM
Oligo-polyd _(T) ₁₅	2	1,5 μ g
RNAse Inhibitor	1	50U
AMV-RT	0,80	20U
ARN	5 μ g	0,25 μ g/ μ L
H ₂ O qsp 20 μ L	x	

La réaction de transcription inverse est réalisée selon le protocole suivant :

- 10min à 25°C (hybridation des amorce polyd_(T)₁₅ sur la séquence polyA des ARNm)
- 1h à 42°C (transcription de l'ARNm en ADNc par l'enzyme de transcription inverse, AMT-RT)
- 5min à 99°C (arrêt de la réaction par la dénatur ation de l'enzyme)

Les ADNc sont conservés à -20°C.

II.A.4 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

Cette technique permet d'obtenir une quantité importante d'ADN à partir d'une matrice de nucléotides peu concentrée. Elle utilise la propriété de retranscription de l'ADN de l'enzyme ADN polymérase. Deux types d'enzyme sont utilisés : la Taq polymerase (QBiogen) ou la pfu (Promega). Ces deux enzymes diffèrent par leur vitesse de synthèse. La Taq (polymérise 60-100 nucléotides/s) est deux fois plus rapide que la pfu. Mais sa rapidité entraîne des erreurs plus fréquentes dans la séquence amplifiée. Ainsi, pour des expériences de mise en évidence de la présence d'ADNc ne nécessitant pas une utilisation ultérieure de l'amplifiat, la Taq a été utilisée. Par contre, lorsque l'amplifiat sera utilisé (clonage par exemple), l'usage de la pfu est préférable. La réaction de PCR se fait dans un volume final de 50 μ L.

PCR Taq	Volume	[C] final
Tampon Taq 10X	5	1X
dNTP 10mM	1	0,2mM
MgCl ₂ 50mM	3	3mM
Amorce sens 40 μ M	0,35	0,3 μ M
Amorce anti-sens 40 μ M	0,35	0,3 μ M
Taq	0,30	1,5U
ADNc	2,5	
Eau stérile qsp 50 μ L	37,5	

PCR pfu	Volume	[C] final
Tampon Taq 10X	5	1X
dNTP 10mM	1,25	0,25mM
MgCl ₂ 50mM	3	3mM
Amorce sens 40 μ M	0,35	0,3 μ M
Amorce anti-sens 40 μ M	0,35	0,3 μ M
pfu	0,50	1,5U
ADNc	0,5	
Eau stérile qsp 50 μ L	x	

Le principe de la réaction est le suivant ; elle se déroule en plusieurs étapes :

- 1) Dénaturation de l'ADN double brin à 94°C pendant 5 minutes.
- 2) 30 à 35 cycles d'amplification.
 - a. Dénaturation de l'ADN double brin à 94°C pendant 1min.
 - b. Hybridation des amorces spécifiques à la température d'hybridation spécifique à chaque couple d'amorces utilisées pendant 1min.
 - c. Elongation par la polymérase à 72°C pendant 1 à 2 minutes en fonction de la longueur de la séquence à amplifier.
- 3) La réaction se termine par une élongation supplémentaire de 10min à 72°C.

Les produits de PCR sont gardés à 4°C en attendant une analyse sur gel agarose mais peuvent être stockés pour un temps plus long à -20°C.

Les amorces utilisées pour la RT-PCR sont indiquées dans l'annexe 1.

II.A.5 Séparation électrophorétique sur gel d'agarose des acides nucléiques

Les différents fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur taille sur un gel d'agarose. La préparation du gel se fait de la manière suivante : on dilue l'agarose au pourcentage (p/v) voulu (de 0,5% à 2,5% ; les gels de faible pourcentage en agarose permettent de mieux discriminer les ADN de grande taille et inversement) dans un tampon Tris-acétate (TAE 0,5X). La dissolution de l'agarose se fait par chauffage au four micro-onde. Puis, 0,05% (p/v) de bromure d'éthidium est ajouté sous hotte. La solution est ensuite versée dans un dispositif pour coulage de gel puis refroidie à température ambiante.

La préparation de l'échantillon à déposer se fait de la manière suivante : les échantillons sont dilués dans un tampon de dépôt (5X 80% v/v formamide, 20% de bleu de bromophénol (0,5%) et de Xylène cyanol (0,5%) et sont déposés ainsi qu'un marqueur de taille dans les puits du gel d'agarose préalablement mis dans l'appareil d'électrophorèse. La migration s'effectue dans le tampon TAE 0,5X sous un courant de 100V. La révélation est faite sous lumière U.V et une image est enregistrée.

II.B RT-PCR en temps réel

La technique de RT-PCR en temps réel permet de déterminer de manière précise la proportion d'ARNm d'intérêt dans l'échantillon en comparaison à un gène de ménage (la

GAPDH). Ceci est qualifié de quantification relative corrigée par un gène de référence. Elle permet une lecture en temps réel du nombre de copies d'ADN.

Plusieurs techniques utilisant différentes sortes de fluorochrome peuvent être utilisées. Dans nos expériences, nous utilisons le "SYBR Green" (Roche) pour la détection de la quantité d'ADN double brin présent. Le principe du composé SYBR Green est exposé dans la *figure 17*. Les mesures sont faites avec le kit LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green I dans l'appareil Light Cycler 1.5 (Roche). On obtient une courbe exponentielle qui est corrélée à la quantité d'ADN amplifié. Ainsi, plus il y a d'ADNc (reflet de la quantité d'ARNm) au départ de la réaction, plus la fluorescence apparaît tôt. En déterminant le moment de l'apparition de la fluorescence, on peut quantifier de manière relative le niveau d'expression des différents transcrits dans les cellules en se rapportant à celui du gène de ménage.

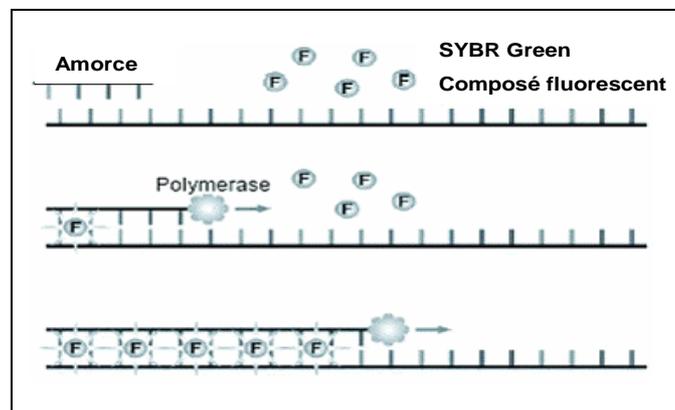


Figure 17. Principe du SYBR Green. Le SYBR Green est un composé qui ne fluoresce que s'il est fixé à l'ADN double brin. La lecture de fluorescence se fait en fin d'élongation lorsque tous les brins d'ADN sont synthétisés et sont donc organisés en double brin.

La réaction de transcription inverse est réalisée comme indiqué dans le paragraphe §II.A.3 Matériels et méthodes. La solution d'ADNc obtenue est diluée au 1/10. La réaction de PCR en temps réel se fait avec 5µL de la solution d'ADNc diluée dans 20µL de volume final dans des capillaires en verre permettant la lecture de la fluorescence en temps réel. Les amorces utilisées sont répertoriées dans l'annexe 1.

Préparation de la réaction pour Nox4, p22-phox et la GAPDH :

- 1) Dans un tube eppendorf de 1,5mL, mettre les proportions indiquées dans le tableau suivant :

1 réaction de qPCR	Volume (µL)
H ₂ O PCR grade qsp 15µL	9
Primers Sens 0,5µM	1
Primers Reverse 0,5µM	1
SYBR Green Master Plus Mix	4
ADNc (1:10)	5

- 2) Transférer dans les capillaires en verre
 - 3) Placer toujours dans le même ordre les échantillons
 - 4) Lancer la réaction selon le programme suivant pour chaque gène :
- L'étape de pré-incubation correspond à la phase de dénaturation.

Pour Nox4 :

Analyse	Cycles	Etape	Température	Temps	Acquisition
		Pré-Incubation			
Non	1		95°C	10 min	Non
		Amplification			
		Dénaturation	95°C	15s	Non
Quantification	45	Hybridation	66°C	10s	Non
		Elongation	72°C	21s	Non
		Lecture fluorescence	82°C	1s	simple
		Melting Curve			
		Dénaturation	95°C	0s	Non
Melting Curve	1	Hybridation	65°C	15s	Non
		Melting	95°C gradient=0,1°C/s	0s	Continue
		Refroidissement			
Non	1		4°C	30s	Non

Pour p22-phox :

Analyse	Cycles	Etape	Température	Temps	Acquisition
		Pré-Incubation			
Non	1		95°C	10 min	Non
		Amplification			
		Denaturation	95°C	15s	Non
Quantification	45	Hybridation	70°C	10s	Non
		Elongation et lecture fluorescence	72°C	8s	Simple
		Melting Curve			
		Dénaturation	95°C	0s	Non
Melting Curve	1	Hybridation	65°C	15s	Non
		Melting	95°C gradient=0,1°C/s	0s	Continue
		Refroidissement			
Non	1		4°C	30s	Non

Pour la GAPDH :

Analyse	Cycles	Etape	Température	Temps	Acquisition
GAPDH		Pré-Incubation			
Non	1		95°C	10 min	Non
		Amplification			
		Dénaturation	95°C	15s	Non
Quantification	45	Hybridation	70°C	10s	Non
		Elongation et lecture fluorescence	72°C	10s	Simple
		Melting Curve			
		Dénaturation	95°C	0s	Non
Melting Curve	1	Hybridation	65°C	15s	Non
		Melting	95°C gradient=0,1°C/s	0s	Continue
		Refroidissement			
Non	1		4°C	30s	Non

II.C Méthode de clonage pour la construction de plasmides

II.C.1 Les bactéries

II.C.1.1 Les souches bactériennes

Deux sortes de souches bactériennes d'*Escherichia coli* ont été utilisées : les souches de clonage et les souches d'expression.

Les souches de clonage (DH5_α et TOP10) (Invitrogen) sont des souches qui permettent l'amplification du plasmide d'intérêt. La sélection des bactéries se fait grâce à sa résistance pour un antibiotique donné dont le gène de résistance correspondant est codé par ce plasmide.

Les souches d'expression BL21(λDE3) (Novagen) utilisent le système d'expression du promoteur T7 leur permettant de synthétiser la protéine d'intérêt de manière contrôlée. Le terme DE3 indique que la souche porte une copie du gène de l'ARN polymérase T7 au sein de son chromosome sous le contrôle du promoteur *LacUV5*. Cette polymérase se fixe sur le promoteur T7 en amont du gène d'intérêt présent sur les vecteurs d'expression. L'addition d'une quantité donnée d'IPTG ("Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside") conduit à la synthèse massive de l'ARN polymérase qui va alors induire l'expression de la protéine d'intérêt.

Les souches d'expression BL21(λDE3) CodonPlus-RIL (Stratagen) sont des bactéries BL21(λDE3) exprimant en plus les ARN de transfert pour les codons rares codant pour les arginines (R, AGA et AGG), pour une isoleucine (I, AUA) et pour une leucine (L, CUA). Ces bactéries permettent la synthèse de protéines contenant dans leur séquence de

nombreux codons rares souvent organisés en groupe. La souche bactérienne est cultivée en présence de 50µg/mL de chloramphénicol.

II.C.1.2 La culture bactérienne

Les bactéries *E.coli* sont cultivées en aérobiose à 37°C, soit en milieu liquide sous agitation rotative (300 rpm) ou soit sur un milieu solide. Les milieux de culture Luria-Bertani (LB) sont stérilisés par un autoclave à 120°C pendant 30min. Pour les milieux solides, on ajoute dans le milieu LB 15g d'agar pour un litre avant le passage en autoclave. Les antibiotiques sont ajoutés dans le milieu autoclavé après leur refroidissement à une concentration finale de 100µg/mL pour l'ampicilline et de 50µg/mL en milieu liquide et de 30µg/mL en milieu solide pour la kanamycine. Les souches d'*E.coli* se conservent classiquement à 4°C pendant 4 à 8 semaines en milieu solide contenant les antibiotiques adéquats. Pour une conservation à long terme (plusieurs années), les souches bactériennes peuvent être congelées, à -80°C ou dans de l'azote liquide, dans du LB contenant 40% (v/v) de glycérol stérile.

La densité bactérienne en milieu de culture liquide peut être estimée par une mesure de l'absorption à 600nm : 1 unité $DO_{600nm} = 8 \times 10^8$ bactéries/mL

II.C.1.3 La transformation bactérienne

La transformation bactérienne est faite à partir de vecteurs issues d'une ligation (§II.C.3.5 Matériels et méthodes) ou à partir de plasmides déjà construits. Des cellules bactériennes compétentes commerciales sont décongelées à 4°C sur la glace. Le plasmide (10 à 50ng) ou le produit de la ligation (2µL) sont mis en contact avec les bactéries décongelées (10µL pour le plasmide ; 50µL pour la ligation) pendant 30min à 4°C. Ensuite, les bactéries subissent un choc thermique pendant 45 secondes dans un bain à 42°C. Les bactéries sont immédiatement remises dans la glace pendant 2min (permet l'entrée de l'ADN). Chaque transformation est diluée dans 500µL de SOC (SOB, **S**ulfo-**o**xidizing **b**acteria, avec 20mM de glucose) et incubée pendant 45min à 37°C sous agitation rotative (300 rpm) pour régénérer les bactéries transformées. Les bactéries ayant incorporé le plasmide referment leur paroi et expriment le gène de résistance à l'antibiotique de sélection. Elles sont ensuite étalées sur une boîte de Pétri contenant le milieu de culture solide avec l'antibiotique de sélection adéquat et incubées une nuit à 37°C. Les colonies formées sont alors analysées.

II.C.2 Les vecteurs

II.C.2.1 Vecteur de sous-clonage

Le vecteur de sous-clonage utilisé est pCR[®]-BluntII-TOPO (Invitrogen) qui utilise les propriétés de l'enzyme, la Topoisomérase I. Ce vecteur est linéaire et la Topoisomérase I est liée à chaque extrémité au phosphate d'une tyrosine. La ligation de l'insert, provenant directement d'un produit de PCR, se fait entre le groupement 5' hydroxyle et le groupement phosphate du vecteur chassant ainsi la Topoisomérase I (*figure 18*). Ce vecteur contient en plus le gène codant pour la protéine CcdB qui est létale pour la bactérie. Lorsque l'insert est présent dans le vecteur, la Ccdb n'est plus exprimée et les colonies de bactéries positives sont vivantes.

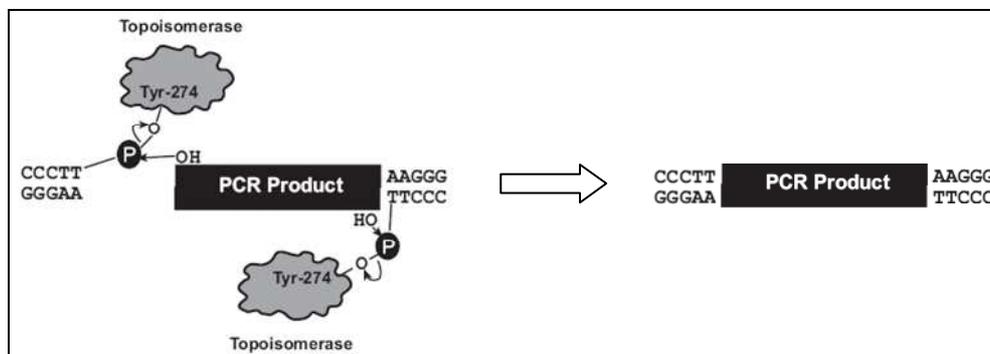


Figure 18. Principe de la ligation avec le vecteur TOPO. La séquence du gène d'intérêt issu directement du produit de PCR est insérée dans le vecteur Topo grâce à la topoisomérase I qui cède sa place.

II.C.2.2 Les vecteurs d'expression

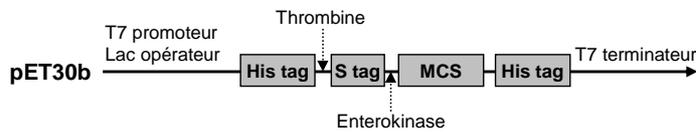
II.C.2.2.1 Les vecteurs d'expression bactérienne

Selon le type de vecteurs bactériens, l'expression de la protéine d'intérêt peut se faire soit au sein de la bactérie BL21 (λ DE3), soit dans un système de traduction *in vitro* RTS[®] (**R**apid **T**ranslation **S**ystem) (Roche) ;

Le système pET (Novagen):

Le vecteur pET30b comporte un site de multiclonaage (MCS) en aval du promoteur T7-Lac opérateur inductible par l'IPTG. Il contient également une séquence codant pour la protéine Lacl (**l**actose repressor **i**nducible). Cette protéine se fixe sur la séquence Lac opérateur (opérateur lactose) et empêche l'activité de la T7 polymérase. L'inducteur, IPTG, inactive le répresseur Lacl et permet ainsi la transcription du gène d'intérêt par la T7 polymérase. Ce vecteur contient deux types d'étiquettes, poly-histidine (His tag) de part et

d'autre du site de multiclonaage (MCS) et S tag en position C terminale. Ce vecteur code pour un gène de résistance à la kanamycine. L'étiquette poly-histidine permet la mise en évidence de la protéine synthétisée par un anticorps anti-histidine mais permet également sa purification avec des matrices à base de nickel ou de cobalt. Des sites de coupure par des protéases donnent la possibilité d'éliminer les étiquettes.



Le système pGEX (GE Healthcare) :

Le vecteur permet l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée en amont avec la GST (glutathion S-transférase). La GST est classiquement utilisée pour la purification des protéines recombinantes. Il possède aussi une séquence T7 promoteur-Lac opérateur. Un site de coupure protéasique permet aussi d'éliminer la GST après la purification.



Le système pIVEX (Roche) :

Les vecteurs pIVEX (In Vitro Expression) ont été développés par la société Roche spécialement pour optimiser l'expression massive de protéines recombinantes *in vitro*, adaptés au système RTS. Ils contiennent tous les éléments régulateurs nécessaires à la synthèse protéique compatible avec l'ARN polymérase dans un système procaryote (promoteur et terminateur T7, site de fixation du ribosome). L'introduction d'une étiquette polyhistidine soit en N-terminal ou en C-terminal permet une purification efficace de la protéine. Ces vecteurs ne possèdent pas de séquence Lac opérateur ce qui rend difficile leur utilisation au sein des souches d'expression bactériennes.

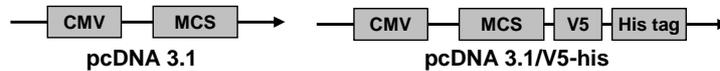


II.C.2.2.2 Les vecteurs d'expression de mammifère

Le système pcDNA (Invitrogen) :

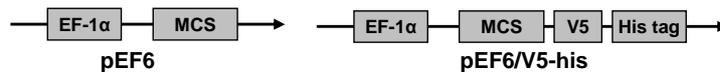
Ce vecteur possède un promoteur CMV (cytomegalovirus) d'expression fort pour les cellules eucaryotes et une séquence correspondant à un gène de résistance au G418

(Généticine). Il possède un gène de résistance à l'ampicilline pour permettre son amplification et son maintien en système bactérien. Ce vecteur existe en plusieurs versions dans les trois phases de lecture (version a, b, c) mais également des étiquettes correspondant à l'antigène V5 et à une séquence polyhistidine en C-terminal du site de multiclonaage.



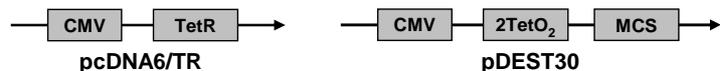
Le système pEF (Invitrogen):

Ce vecteur possède un promoteur EF (**E**longation **F**acteur) d'expression fort pour les cellules eucaryotes et une séquence correspondant à un gène de résistance à la blasticidine. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline pour permettre son amplification et son maintien en système bactérien. Ce vecteur existe en plusieurs versions dans les trois phases de lecture (version a, b, c) mais également des étiquettes correspondant à l'antigène V5 et à une séquence polyhistidine en C-terminal du MCS.



Le système T-REx (Invitrogen) :

C'est un système de synthèse protéique inductible dans les cellules mammifères. Le principe est illustré dans la *figure 19*. Il repose sur l'expression de deux plasmides : le premier pcDNA 6/TR code pour une protéine TetR qui est un répresseur de l'opérateur de la tétracycline (TetO₂) situé sur le second plasmide pDEST30. Le second plasmide possède un site de multiclonaage pour le clonage du gène d'intérêt en aval de l'opérateur TetO₂. La synthèse du gène d'intérêt est inhibée par la fixation de TetR sur son opérateur. Lorsqu'on ajoute de la tétracycline dans le milieu de culture, celui-ci pénètre dans la cellule et libère TetR de l'opérateur permettant la synthèse du gène d'intérêt. Ces deux plasmides ont un promoteur CMV et un gène de résistance à l'ampicilline. Le pcDNA 6/TR a un gène de résistance à la blasticidine et le pDEST30 au G418.



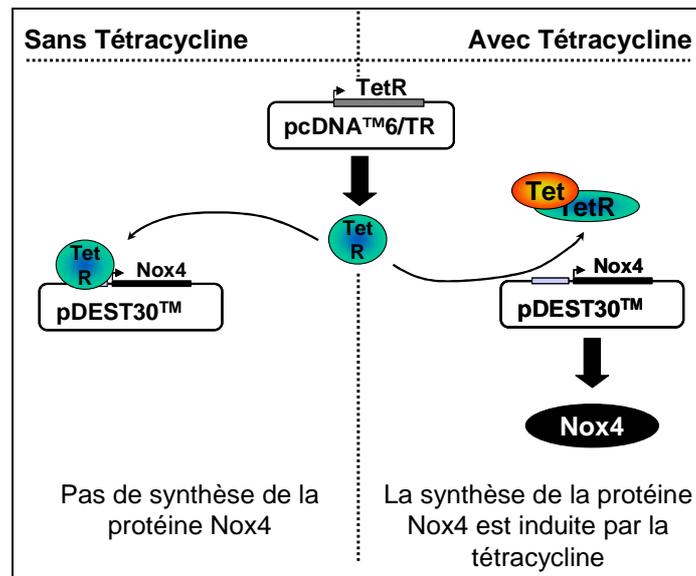


Figure 19. Principe de l'induction de la synthèse protéique par le système T-REx. L'induction de la production de la protéine d'intérêt est réalisée par l'addition d'IPTG qui provoque la libération de TetR de l'opérateur lactose libérant ainsi le promoteur CMV.

II.C.3 Production de l'insert codant pour le gène d'intérêt par PCR

II.C.3.1 PCR simple

La séquence correspondant au gène d'intérêt est amplifiée par PCR en utilisant des amorces spécifiques contenant le site de restriction voulu pour le clonage. La PCR est réalisée avec la pfu pour se soustraire des mutations pouvant se produire lors de la synthèse. Les conditions de PCR sont décrites plus haut (§II.A.4 Matériels et méthodes). Les produits de PCR sont ensuite déposés sur gel agarose et la bande d'intérêt est découpée et l'ADN est extrait à partir de l'agarose (§II.C.3.4 Matériels et méthodes)

La liste des amorces utilisées pour le clonage est indiquée dans l'annexe 1.

II.C.3.2 2 PCR couplées :

Fusion de produits de PCR:

Le but de ce protocole est de créer une protéine chimère ou délétée par PCR. Le principe est expliqué dans la *figure 20*. On effectue une première PCR avec la pfu afin d'obtenir les deux inserts à fusionner en utilisant des amorces se chevauchant. La conception des amorces se chevauchant doit respecter le cadre de lecture des deux séquences nucléotidiques d'intérêt. Les inserts amplifiés isolés sur gel agarose sont ensuite extraits de l'agarose et élués par 30µL d'eau distillée stérile. La deuxième PCR est faite avec l'addition de 20µL d'éluat de chaque insert dans le volume réactionnel sans amorces. La

PCR est faite avec 10 cycles à la température de fusion des amorces servant pour la première PCR puis suivi de 20 cycles à la température précédente augmentée de 3 à 5°C. Le produit final de PCR est analysé sur gel agarose et la taille doit correspondre à la somme de la taille des deux inserts [Yon et Fried, 1989].

Succession de PCR:

Le but de ce protocole est d'ajouter une petite séquence d'ADN, souvent un étiquette, au gène d'intérêt. Ce protocole est différent du précédent car la partie à ajouter est trop courte et ne permet pas une manipulation aisée pour la migration et la purification sur gel agarose. Cependant, cette séquence est quand même trop conséquente pour être couverte par une seule amorce sans gêner l'efficacité de la PCR. Le principe est expliqué sur la *figure 20*. La première PCR, effectuée avec la pfu, permet d'ajouter la première partie de l'étiquette. Ensuite, 0,3µL du produit de PCR va servir de matrice pour la deuxième PCR. Le produit final de PCR est analysé sur gel agarose.

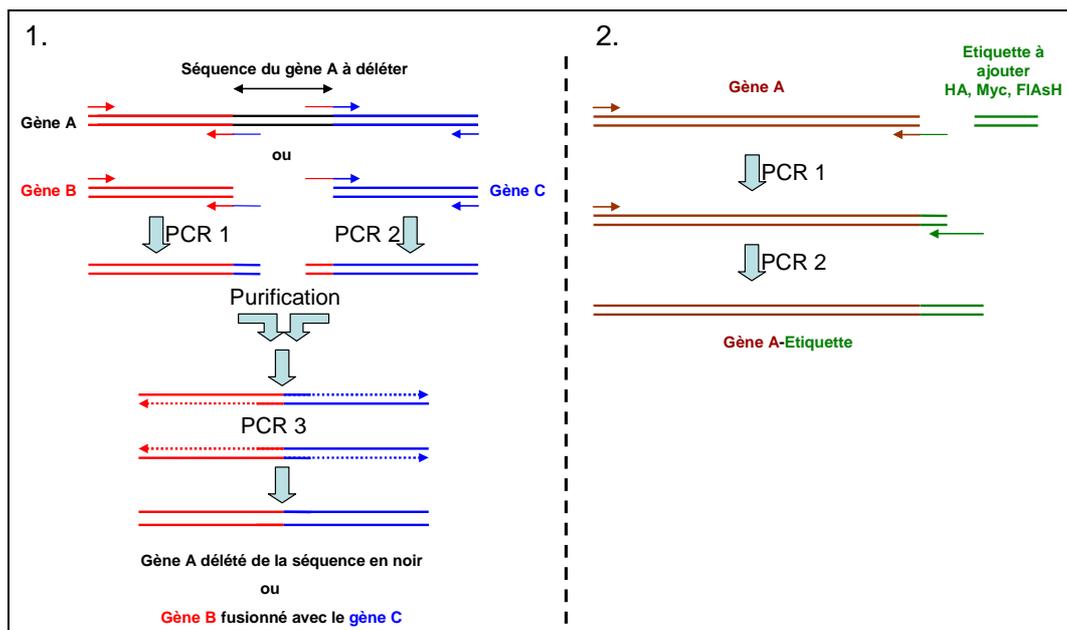


Figure 20. Principe du clonage par 1) fusion de produits de PCR et 2) succession de PCR. 1) Deux PCR sont réalisées avec deux couples d'amorces différents (rouges et bleus). La séquence commune entre les deux produits de PCR permet de fusionner ces deux fragments avec une dernière réaction de PCR. **2)** Une première PCR est réalisée avec un couple d'amorce pour amplifier le gène d'intérêt avec une séquence supplémentaire en 3' correspondant à l'étiquette. Une deuxième permet de compléter la séquence de l'étiquette en position 3' du gène d'intérêt.

La liste des amorces utilisées pour ce protocole est indiquée dans l'annexe 1.

II.C.3.3 Digestion par les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui coupent l'ADN double brin au niveau d'une séquence nucléotidique palindromique spécifique. Classiquement, on utilise 1 unité d'enzyme pour digérer 1 µg d'ADN pendant 1h à 2h à la température adéquate (souvent 37°C) dans le tampon préconisé par le fournisseur. Le volume d'enzyme ne doit pas excéder 1/10^{ème} du volume final de la réaction pour éviter des coupures non spécifiques de certaines enzymes ("activité star"). Le produit de digestion est ensuite analysé par électrophorèse sur gel d'agarose.

II.C.3.4 Extraction des fragments d'ADN à partir du gel agarose

La migration sur gel agarose permet de vérifier la qualité de la PCR et de la coupure par les enzymes de restriction. Le gel est observé et les bandes d'intérêt sont coupées rapidement (pour éviter des mutations engendrées par les U.V.) sous lumière U.V. L'extraction de l'ADN est effectuée avec le kit QIAquick[®] Gel Extraction (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. L'agarose est dissout dans le premier tampon pendant 10min à 50°C puis purifié sur mini-colonne. L'élution est réalisée par 30µL d'eau distillée stérile. La présence de l'insert ou du vecteur digéré et leur concentration est vérifiée avec le dépôt de 2µL de l'éluat par électrophorèse sur gel agarose.

II.C.3.5 Ligation

La réaction de ligation se fait dans un volume réactionnel de 10µL à 20µL. Le rapport entre insert et le plasmide digéré est de 3 pour une même concentration d'ADN. 100ng d'insert sont incubés avec 300ng de plasmide coupé dans le tampon de ligation avec la T4 DNA ligase (Promega) à 14°C pendant la nuit. Un contrôle sans insert est réalisé en parallèle afin d'estimer le pourcentage de re-ligation du vecteur sur lui-même. Dans les cas où le vecteur est digéré par une seule enzyme de restriction, la re-ligation du vecteur sur lui-même doit être évitée par déphosphorylation des extrémités libres. Un aliquote de 1µL d'enzyme CIAP (**C**alf **I**ntestinal **A**lkaline **P**hosphatase) (Promega) est ajouté à la fin de la réaction de digestion. La déphosphorylation s'effectue pendant 20min à 37°C, puis l'enzyme est dénaturée pendant 10min à 65°C.

2µL sont utilisés pour la transformation bactérienne suivant le protocole décrit plus haut (§II.C.1.3 Matériels et méthodes).

II.C.3.6 Criblage des bactéries positives

Les colonies de bactéries issues de la transformation sont analysées pour vérifier la présence de l'insert dans le plasmide incorporé. En effet, il est possible que la bactérie contienne le plasmide de clonage vide issu de la re-ligation du vecteur digéré sur lui-même. Pour confirmer la présence de l'insert dans les colonies bactériennes, nous pouvons utiliser deux méthodes.

Par digestion enzymatique :

C'est la procédure la plus couramment utilisée pour la vérification de la présence de l'insert. Chaque colonie est repiquée et mise en culture liquide pendant une nuit à 37°C sous agitation rotative (300 rpm). L'ADN plasmidique est ensuite extrait des bactéries en suivant le protocole de la mini-préparation d'ADN (minipreps). Une digestion par des enzymes de restriction pour extraire l'insert (ce sont souvent les mêmes enzymes que lors du clonage) est réalisée selon le protocole décrit précédemment (§II.C.3.3 Matériels et méthodes). L'analyse du profil de digestion est faite par électrophorèse sur gel agarose. La taille du fragment d'ADN digéré doit correspondre à la taille prédite.

Par PCR :

La vérification de la présence de l'insert est faite par PCR directement sur la colonie bactérienne en utilisant les amorces qui ont servi au clonage. Cette technique est utilisée pour les clonages délicats qui nécessitent de tester un nombre important de transformants. Ce protocole a l'avantage d'éviter de réaliser un grand nombre de minipreps et il offre un gain de temps considérable lorsque les tampons des enzymes de restriction ne sont pas compatibles et que leur utilisation nécessite une digestion en 2 temps (séquentielle). Le criblage est réalisé avec la Taq polymérase avec le milieu réactionnel décrit ci-dessus (§II.A.4 Matériels et méthodes) avec une étape supplémentaire. Les colonies bactériennes sont piquées avec un cône stérile et celui-ci est trempé dans le tube contenant le milieu réactionnel de la PCR. Ensuite, les bactéries restantes sur le cône sontensemencées dans 2mL de LB contenant l'antibiotique de sélection durant la nuit à 37°C sous agitation rotative (300 rpm). La PCR sur colonies bactériennes nécessite une première étape supplémentaire de dénaturation pour lyser les bactéries de 10min à 94°C. La PCR se poursuit ensuite classiquement. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel agarose et seules les colonies positives (amplification de l'insert par PCR) qui ont poussé durant la nuit seront analysées par coupure enzymatique après une mini-préparation d'ADN (§II.C.3.7 Matériels et méthodes).

II.C.3.7 Mini-préparation d'ADN

La veille de la préparation, une colonie bactérienne (DH5 α ou TOP10) est ensemencée dans 2mL de milieu de culture LB avec l'antibiotique adéquat correspondant au plasmide. La culture est mise sous incubation durant la nuit à 37°C sous agitation rotative (300 rpm). Le lendemain, 1,5mL de la culture sont centrifugés à 13 000 rpm pendant 1min. Le culot bactérien est ensuite traité selon les indications du fournisseur en utilisant le kit d'extraction plasmidique QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Les bactéries sont lysées et le lysat est clarifié par centrifugation (10min à 13 000 rpm). Le surnageant est appliqué sur une colonne contenant une membrane de silice ayant une capacité de fixation supérieure à 20 μ g d'ADN. Après lavage, l'ADN plasmidique est élué par 50 μ L d'eau distillée stérile. Une vérification de la présence du plasmide est réalisée par migration sur gel agarose. La préparation plasmidique est conservées à -20°C.

II.C.3.8 Maxi-préparation d'ADN

Une maxi-préparation permet d'obtenir une grosse quantité d'ADN pur nécessaire pour les expériences de transfection dans les cellules de mammifères mais également pour les expériences de traduction *in vitro* (RTS). Une pré-culture est réalisée durant la journée à partir d'une colonie bactérienne dans 10mL de milieu de culture LB contenant l'antibiotique adéquat. Cette pré-culture sert à ensemencer au 1:500 une culture de 250mL contenant toujours l'antibiotique de sélection, culture qui sera incubée à 37°C sous agitation forte (300 rpm) durant la nuit. Le culot bactérien obtenu par centrifugation (10 000 g à 4°C pendant 10min) est traité selon les indications du fournisseur en utilisant le kit d'extraction plasmidique HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Ce kit permet une extraction au maximum de 750 μ g d'ADN. La pureté et la concentration de l'échantillon sont contrôlées par spectrophométrie (§II.A.2 Matériels et méthodes).

II.C.3.9 Purification et précipitation d'ADN : extraction au phénol/chloroforme

Cette technique permet d'éliminer les protéines contaminantes demeurant dans la préparation d'ADN. Celles-ci sont enlevées grâce à l'utilisation du phénol. Un volume équivalent de phénol:chloroforme:isométhanol (proportion 24:24:1) et d'échantillon d'ADN sont mélangés vigoureusement. La phase aqueuse où va se trouver l'ADN est séparée de la phase organique contenant les protéines par une centrifugation de 2min à 12 000rpm à 4°C.

La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et un volume de chloroforme est ajouté. Après un mélange vigoureux, la phase aqueuse contenant l'ADN est récupérée après une centrifugation de 2min à 12 000rpm à 4°C. L'ADN est ensuite précipité avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et 2 volumes d'éthanol pur pendant 1h à -80°C ou durant la nuit à -20°C. L'ADN est culoté avec une centrifugation de 20min à 12 000rpm et à 4°C puis lavé avec une solution à 70% d'éthanol. Puis le culot d'ADN est ensuite séché à l'air libre à température ambiante et remis en solution par de l'eau stérile. La pureté et la concentration de l'échantillon sont contrôlées par spectrophométrie.

II.C.3.10 Séquençage de l'ADN

Le séquençage des plasmides clonés est nécessaire pour vérifier qu'il y a pas eu d'erreurs ni de mutation lors de l'étape de la PCR et aussi pour contrôler si le cadre de lecture est respecté dans le cas de protéines fusionnées. Le séquençage est réalisé par une société de biotechnologie Génome Express (Grenoble) ou par la société Agowa (Allemagne). Plus de 2µg de plasmide pur repris dans de l'eau distillée stérile doivent être envoyés à une concentration minimale de 0,2µg/µL. Le séquençage peut être réalisé avec des amorces dites universelles ou par des amorces classiques.

III Méthodes de biochimie

III.A Expression de protéines recombinantes en cellules eucaryotes

III.A.1 Transfection des cellules

III.A.1.1 Préparation des cellules pour la transfection

Les cellules adhérentes sont divisées la veille selon le protocole de passage de cellules classique (§I.A Matériels et méthodes). Elles sont réparties dans les boîtes de culture afin d'obtenir une confluence entre 50% et 70% le jour de la transfection.

III.A.1.2 Transfection par le phosphate de calcium

La transfection au phosphate de calcium est une des premières techniques de transfection utilisée pour introduire de l'ADN exogène dans les cellules en culture. Ce

procédé est fréquemment utilisé car il est simple, peu onéreux et convient à beaucoup de cellules. Cependant, son efficacité de transfection est faible en comparaison avec d'autres techniques de transfection. Le principe de la réaction est le suivant : le phosphate de calcium condense l'ADN en formant un précipité qui se lie à la membrane plasmique. Ce précipité est ensuite endocyté par les cellules permettant l'entrée de l'ADN.

Le protocole de transfection est décrit pour des cellules ayant une confluence entre 50% et 70% dans les boîtes de 25cm². 5µg du plasmide d'intérêt sont dilués dans 200µL de tampon CaCl₂ (250mM) puis cette solution est ajoutée délicatement (gouttes à gouttes) dans 200µL de tampon HEPES-phosphate 2X (140 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,4 mM Na₂HPO₄, pH 7,05). Après 60 secondes d'incubation de l'ensemble, à température ambiante, la solution de transfection ainsi constituée est ajoutée aux cellules dans 1,8mL de milieu de culture complet classique. 16 heures plus tard, le surnageant de culture est enlevé et remplacé par un milieu de culture complet frais pour permettre aux cellules de poursuivre leur croissance.

III.A.1.3 Transfection par l'Effectene[®] (lipofection)

L'effectene est commercialisé par la société Qiagen et son principe repose sur l'utilisation de lipides (*figure 21*) qui vont former des micelles et enrober l'ADN compacté pour permettre son entrée dans la cellule par fusion membranaire. L'interaction entre le complexe effectene/ADN (charges positives) et les phospholipides de membranes (charges négatives) se fait par opposition de charges.

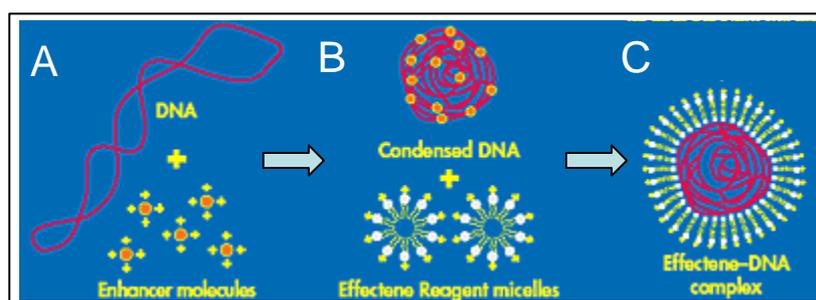


Figure 21. Principe de la transfection cellulaire par le réactif Effectene[®] (Schéma Qiagen). **A** : compaction de l'ADN par l'enhancer. **B** : formation du complexe ADN-effectene. **C** : micelles lipidiques contenant l'ADN à transférer.

La charge globale du complexe effectene-ADN est déterminée par le rapport entre la quantité d'ADN et d'effectene. La liaison optimale de ce complexe avec la membrane plasmique nécessite une charge nette légèrement négative. Des mises au point pour déterminer le rapport optimum ont été faites au préalable.

Le protocole de transfection est décrit pour des cellules ayant une confluence entre 50% et 70% dans les plaques 6 puits. Le plasmide d'intérêt (0,4µg) est dilué dans un volume final de 100µL de tampon de condensation de l'ADN « EC ». Un volume de 3,2µL "d'enhancer" est ensuite ajouté. La solution est mélangée au vortex pendant 1s puis incubée à température ambiante pendant 5 minutes. Puis, 10µL d'effectene sont ajoutés suivi d'une homogénéisation au vortex pendant 10s. Le tout est incubé pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. Pendant cette incubation, le milieu de culture des cellules est remplacé par 1600µL de milieu de culture complet frais dans les puits contenant les cellules. 600µL de milieu de culture complet frais sont ajoutés à la solution de transfection et la totalité du mélange est mise en contact avec les cellules. Après 24h à 48h, les cellules sont analysées ou sont sélectionnées par les antibiotiques adéquats pour obtenir des lignées exprimant de manière stable la protéine d'intérêt (§III.A.1.5 Matériels et méthodes).

III.A.1.4 Transfection par le JetPEI™ (polyfection : Polyethylenimine)

Le jetPEI™ est un polycation linéaire qui forme avec l'ADN des agrégats faiblement toxiques et plus stables que ne le sont les complexes lipides-ADN. Dans la cellule, il se comporte comme une « éponge à protons » : il induit la rupture des endosomes par gonflement osmotique, provoquant le largage rapide de l'ADN dans le cytoplasme tout en le protégeant des nucléases cytosoliques (*figure 22*).

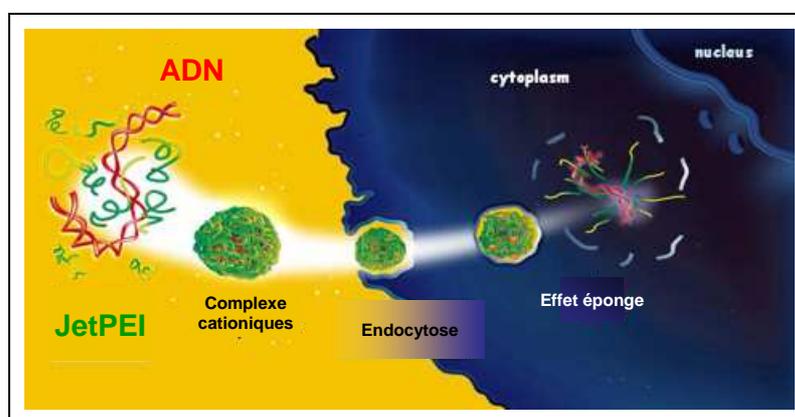


Figure 22. Principe de la transfection cellulaire par le réactif JetPEI™ (*Schéma Polyplus Transfection*). Le complexe JetPEI-ADN formé pénètre dans la cellule par endocytose. Il est libéré au de l'endosome niveau du cytosol par un effet dit "effet éponge".

La charge globale du complexe JetPEI-ADN (R) est déterminée par le rapport entre la quantité d'ADN et de JetPEI. Des mises au point pour déterminer le rapport (R) optimum ont été faites au préalable. Le volume de JetPEI est calculé avec la formule suivante :

$$\mu\text{L JetPEI} = ((\mu\text{g ADN} \times 3) \times R) / 7,5.$$

Le protocole de transfection est décrit pour des cellules ayant une confluence entre 50% et 70% dans les plaques 6 puits. Le plasmide d'intérêt (3 μ g) est dilué dans un volume final de 100 μ L de NaCl 150mM et parallèlement le JetPEI (3,6 μ L) est dilué dans un volume final de 100 μ L de NaCl 150mM. Le mélange s'effectue en ajoutant délicatement 100 μ L de la solution de JetPEI diluée aux 100 μ L de la solution contenant l'ADN (attention, pas l'inverse). L'homogénéisation est réalisée au vortex pendant 3s puis le tout est incubé 20min à température ambiante. Pendant cette incubation, le milieu de culture des cellules est remplacé par 2mL de milieu de culture complet frais dans les puits contenant les cellules. La totalité du mélange de transfection est mise en contact avec les cellules. Après 24h à 48h, les cellules sont analysées.

III.A.1.5 Etablissement de lignées stables

L'utilisation d'antibiotique dans le milieu complet de culture des cellules permet de sélectionner les cellules qui ont incorporées le plasmide d'intérêt codant pour un gène de résistance à l'antibiotique additionné. L'établissement de la lignée stable s'effectue 24h après la transfection. A ce stade, les cellules sont divisées de manière classique et sont remises en culture avec un milieu contenant l'antibiotique de sélection. Les cellules sont cultivées en présence de cet antibiotique pendant 3 semaines (les cellules non transfectées ne peuvent pas lutter contre l'action de l'antibiotique et meurent).

La liste des antibiotiques et les concentrations de sélection utilisées en fonction du type cellulaire sont indiquées dans le tableau suivant:

Type cellulaire	Blasticidine μ g/mL	G418 μ G/mL
HEK293E	5	500
HEK293 T-REx	5	400
C-20/A4	10	1000

III.A.2 Extraction protéique à partir de cellules eucaryotes

III.A.2.1 Préparation de lysat protéique total

Les extraits protéiques provenant de cellules de mammifères peuvent être obtenus de différentes manières, mécanique (sonication) ou chimique (détergents).

Extraction de protéines par sonication :

Les cellules remises en suspension, après le traitement par la trypsine et lavages au PBS, sont ajustées à une concentration de 10^8 cellules/mL dans une solution de PBS. Elles subissent un traitement anti-protéasique par le DFP (diisopropylfluorophosphate) qui est un inhibiteur puissant des protéases à sérine, à la concentration finale de 3mM pendant 15min à 4°C. Le culot cellulaire traité au DFP, obtenu après une centrifugation à 350g pendant 5min à 4°C, est repris par une solution de PBS contenant des inhibiteurs de protéases (TLCK 10µM, leupeptine 1,8µM, pepstatine 1,5µM). La suspension cellulaire est lysée aux ultrasons avec 3 cycles de 10s à 40W et 1min d'intervalle dans la glace entre chaque cycle. Une centrifugation à « basse vitesse » à 1000g pendant 15min à 4°C permet d'éliminer les cellules non lysées. Le surnageant obtenu contient la fraction membranaire et cytosolique. La concentration protéique est déterminée par un dosage par la méthode de Bradford (§III.A.1.2.4 Matériels et méthodes).

Extraction de protéines par traitement aux détergents :

Les détergents, agents amphiphiles, provoquent la rupture des membranes cellulaires en s'insérant à l'interface eau/lipide et permettent de solubiliser les protéines. Les cellules remises en suspension, après le traitement par la trypsine, sont lavées au PBS. Les cellules sont ensuite lysées avec un tampon (Tris-HCl 20mM pH 7,6 ; NaCl 150mM ; 1mM EDTA ; 1% Triton X-100 (v/v) ; cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche)). La lyse s'effectue pendant 20 à 30min à 4°C sur roue rotative. Le lysat est ensuite centrifugé à 10 000g pendant 10min à 4°C. Le surnageant contient l'extrait protéique et est dosé par la méthode de Bradford (§III.A.1.2.4 Matériels et méthodes).

III.A.2.2 Préparation de fractions membranaires et cytosoliques

Le surnageant basse vitesse obtenu après sonication ou l'extrait cellulaire en détergent est soumis à une ultracentrifugation à 100 000g pendant 1h à 4°C. Le surnageant correspondant au cytosol est récupéré et filtré sur une membrane 0,22µm. La quantité de protéines est dosée selon la méthode de Bradford (§III.E.1.2.4 Matériels et méthodes) et le cytosol est aliquoté et conservé à -80°C. Le culot correspondant aux membranes brutes est lavé et remis en suspension dans du PBS. La suspension membranaire est homogénéisée par un cycle de sonication de 2s à 40W dans la glace et le contenu protéique est dosé selon la méthode de Bradford, puis ajusté à 3mg/mL pour être aliquoté et conservé à -80°C.

III.A.2.3 Isolement des neutrophiles (PMN) à partir de sang frais

L'Etablissement Français du Sang permet l'approvisionnement en sang frais (20mL) prélevé sur citrate de sodium le matin même de l'expérimentation. Les PMNs sont isolés selon la méthodologie décrite par Böyum en 1968. Le sang frais est tout d'abord dilué 2 fois dans dans PBS contenant 1% (v/v) de citrate de sodium tri-sodique stérile. La dilution est ensuite déposée délicatement sur un gradient de densité composé de 10mL de Ficoll-Hypaque (d=1,077) (Amersham Biosciences) Une centrifugation à 800g pendant 20min à température ambiante permettra de séparer les lymphocytes (anneau blanc situé à l'interface du plasma et de la couche de Ficoll) des polynucléaires et érythrocytes qui sédimentent. Le surnageant (plasma + anneau lymphocytaire + Ficoll) est éliminé. Le culot (érythrocytes + polynucléaires neutrophiles) est remis en suspension dans un tampon de lyse hypotonique (NH₄Cl 155mM, KHCO₃ 10mM, EDTA 0,1mM pH 7) puis incubé pendant 15min à 4°C. Le culot de PMNs est récupéré après une centrifugation à 300g pendant 5min à 4°C, puis lavé et remis en suspension dans le tampon PBS.

III.B Expression de protéines en cellules procaryotes

III.B.1 Expression de protéines en système bactérien : Induction bactérienne

III.B.1.1 Induction bactérienne et tests d'expression

Les inductions bactériennes sont réalisées dans du milieu de culture LB ou dans un milieu MAI (milieu auto-inducteur).

L'induction avec le milieu LB se fait par addition d'IPTG lorsque la culture bactérienne est en phase de croissance exponentielle avec une densité optique entre 0,7 et 1.

L'induction avec le milieu MAI est automatique [Studier et al, 2005]. Le principe repose sur la régulation par la bactérie de l'utilisation de différentes sources de carbone du milieu pour sa croissance. La méthode utilise un mélange de sources de carbone (glucose et lactose) dans le milieu de culture. La bactérie utilise en priorité le glucose pour son métabolisme et une fois le glucose épuisé, elle va permettre l'entrée du lactose. Celui-ci est métabolisé en allolactose, l'inducteur naturel de l'opéron lactose conduisant à la production de la protéine cible. La présence d'une autre source de carbone, le glycérol permet à la bactérie de croître et de produire en même temps la protéine d'intérêt. Au final, la biomasse

obtenue est bien supérieure par rapport à l'utilisation du LB et de ce fait, la quantité de protéines produites est théoriquement plus grande pour un même volume de culture.

Pour chaque type de protéines, les tests d'expression sont réalisés en fonction de différents critères : la température, le temps, le milieu d'induction et le cas échéant la souche de bactérienne.

Une pré-culture est lancée avec la colonie bactérienne d'intérêt la veille dans un milieu de culture LB contenant les antibiotiques adéquats pour la sélection du plasmide. Le lendemain, une culture est ensemencée en ajoutant la pré-culture au 1:100 soit dans du LB ou dans du MAI contenant l'antibiotique de sélection. L'induction avec le milieu LB est effectuée avec l'ajout de 1mM d'IPTG lorsque la culture aura atteint une densité optique entre 0,7 et 1. L'induction avec le milieu MAI se fait automatiquement. La température et le temps d'induction est à définir pour chaque type de protéines produites.

Au moment de l'induction, un aliquote de 1,5mL est prélevé, puis centrifugé et le culot correspondant aux bactéries non induites est solubilisé dans 250µL de tampon de dépôt (§III.E.2.2 Matériels et méthodes). L'induction est réalisée soit par addition de 1mM l'IPTG dans le LB soit automatiquement dans le MAI. Ensuite, la culture est divisée en trois tubes (pour les 3 températures d'induction). Chaque groupe de tube est mis à incuber soit à 17°C, à 25°C sur la nuit ou à 37°C pendant 4h sous agitation. A la fin de la période d'induction, on prélève 1,5mL de chacune des conditions, le culot bactérien après centrifugation est repris dans 250µL de tampon de dépôt. Les différents échantillons sont alors analysés en SDS-PAGE (§III.E.2 Matériels et méthodes) et les protéines sont colorées au bleu de Coomassie (15µL d'échantillon) (§III.E.2.4 Matériels et méthodes) et identifiées par western blot (5µL d'échantillon) (§III.E.3 Matériels et méthodes) (figure 23).

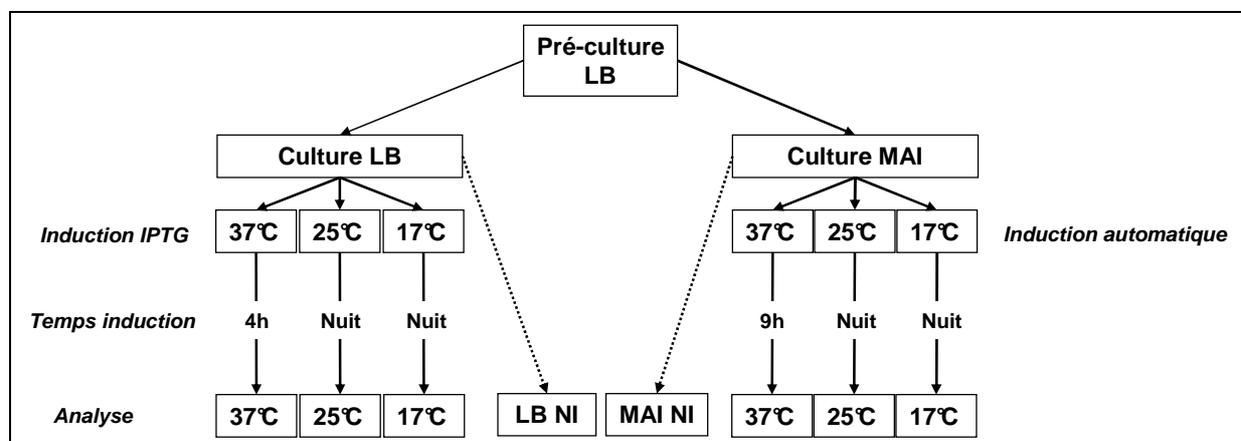


Figure23. Schéma du test d'expression des protéines recombinantes produites par induction bactérienne. LB, Luria-Bertani ; MAI, milieu autoinducteur ; NI, non induit.

III.B.1.2 Expression à grande échelle

Une pré-culture est ensemencée la veille dans du milieu LB avec l'antibiotique correspondant à la sélection. Un volume de 10mL de la pré-culture est inoculé dans 1L de LB (soit 1:100) contenant le même antibiotique. La culture est ensuite incubée à 37°C sous agitation. Quand la densité optique atteint une valeur comprise entre 0,7 et 1, l'induction avec l'addition 1mM d'IPTG est réalisée et l'incubation s'effectue selon les conditions optimales déterminées par les tests d'expression. A la fin de l'induction, le culot bactérien est récupéré par une centrifugation à 10 000g à 4°C. Ce culot peut être conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

III.B.2 Expression de protéines en système acellulaire : traduction *in vitro* par le RTS® (Rapid Translation System)

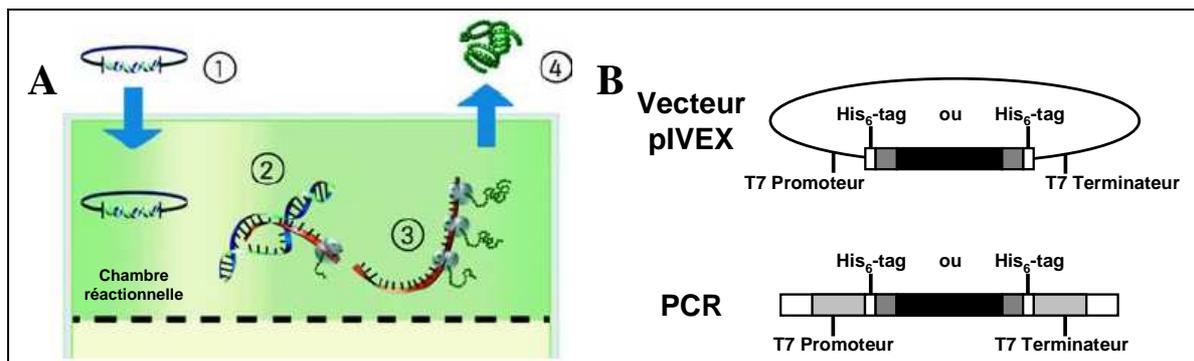


Figure 24. Principe du système RTS®. **A)** (schéma Roche) Les différentes étapes de la réaction de RTS. 1) Ajout de la matrice d'ADN dans la solution réactionnelle. 2) et 3) Couplage transcription-traduction. Les ribosomes traduisent directement les ARNm en cours de synthèse par la T7 ARN polymérase. 4) Expression et accumulation de la protéine durant le temps de réaction. **B)** Matrice d'ADN servant pour la réaction de RTS.

Le RTS (Rapid Translation System) est un système couplant la transcription et la traduction de protéines *in vitro* qui utilise un milieu réactionnel à base de lysat d'*E.coli*. Ce lysat est issu de bactéries optimisées génétiquement pour leur fournir un appareillage transcriptionnel et traductionnel efficace. Ce système est plus flexible que l'induction classique de la synthèse de protéines dans les bactéries car il permet un ajout aisé de substrats (détergents, lipides, couples oxydoréducteur, cofacteurs, etc...) ou de protéines (chaperones, partenaires, etc. ...) pendant le processus de traduction. Ainsi, les protéines en cours de synthèse peuvent être directement prises en charges par ces additifs afin de favoriser leur bonne conformation ou leur solubilisation, ce qui est impossible en système d'induction bactérien. Il permet par ailleurs une production de protéines rapide et en grande quantité dans un faible volume réactionnel. La synthèse protéique peut se faire à partir d'une matrice d'ADN linéaire (produit de PCR) ou plasmidique. Des éléments de régulation

peuvent être ajoutés par PCR ou par clonage de part et d'autre du gène d'intérêt comme le promoteur T7, le site de fixation du ribosome en amont et le terminateur T7 en aval ainsi que la position N terminal ou C terminal de l'étiquette poly-histidine.

III.B.2.1 Test d'expression et de solubilité

Les tests d'expression et de solubilité sont réalisés à petite échelle avec un volume réactionnel de 30 μ L avec le kit RTS 100 E. coli HY de la firme Roche. La composition de ce milieu est le suivant :

	Volume (μ L)
<i>Lysat d'E.coli</i>	6
<i>Mix énergétique (énergie nécessaire aux processus enzymatiques)</i>	5
<i>Acides aminés</i>	6
<i>Méthionine</i>	0,5
<i>Inhibiteurs de protéases (cystéine et sérine) (Roche) 10X</i>	2,5
<i>ADN (1μg/μL) du gène d'intérêt</i>	2,5
<i>Additifs</i>	x
<i>Tampon de reconstitution (qsp 30μL)</i>	x

La réaction est réalisée dans un tube eppendorf de 1,5mL à 20°C pendant 20 à 24h. Différents additifs ont été utilisés pour optimiser le niveau d'expression et de solubilité de la protéine produite et sont listés dans le tableau suivant :

Détergents	Concentration finale
Nonidet P40 (NP40)	5mM
<i>n</i> -dodecyl β -D-maltoside (DDM)	0,1mM
Couple oxydoréducteur	
GSH/GSSG	0,1mM/4mM
Chaperonne	
GroE (Roche)	0,5 μ L
Polymère	
NV10	1,25 μ L
Cofacteur	
FAD	30 μ M

Tableau 4. Composés et additifs utilisés en RTS.

L'estimation de la quantité et de la solubilité de la protéine produite est effectuée par western blot en utilisant un anticorps anti-histidine couplé à une peroxydase (HRP). A la fin de la réaction de synthèse *in vitro*, on prélève 5 μ L du milieu représentant la fraction totale pour l'analyse par western blot et 20 μ L qui seront centrifugés à 4°C à 14 000rpm pendant 30min pour séparer les protéines insolubles et solubles. Le surnageant dont on prélève 5 μ L

correspond à la fraction soluble. Le culot, contenant les protéines insolubles, est repris par 20 μ L de tampon Tris-HCl 50mM pH 7,3 ; 5 μ L serviront pour les analyses ultérieures. Les différentes fractions (totale, soluble et insoluble) sont traitées avec le tampon de dépôt (§III.E.2.2 Matériels et méthodes) pour réaliser un western blot (§III.E.3 Matériels et méthodes).

III.B.2.2 Expression à grande échelle

Une fois les conditions optimales d'expression et de solubilité établies, une production à grande échelle dans 1mL de volume réactionnel est réalisée en utilisant le kit de synthèse RTS 500 ProteoMaster E. coli HY. Une synthèse protéique à grande échelle est rendue possible grâce au système d'échange en continu appelé CECF (Continuous Exchange Cell-Free) [Shirokov et al, 2007]. Ce système est basé sur l'échange de substrat et de métabolites à travers deux membranes semi-perméables. Durant la réaction de couplage transcription/traduction, les composants énergétiques, les nucléotides et les acides aminés sont consommés alors que se forment des métabolites issus des différentes réactions enzymatiques. Ces déchets peuvent avoir une action inhibitrice sur la synthèse protéique. Le système CECF permet de s'affranchir de ces difficultés en fournissant de manière continue les substrats essentiels provenant du compartiment d'approvisionnement pendant que les métabolites diffusent vers le compartiment d'approvisionnement. Ceci permet une expression de la protéine en continu pouvant aller jusqu'à 24h de réaction.

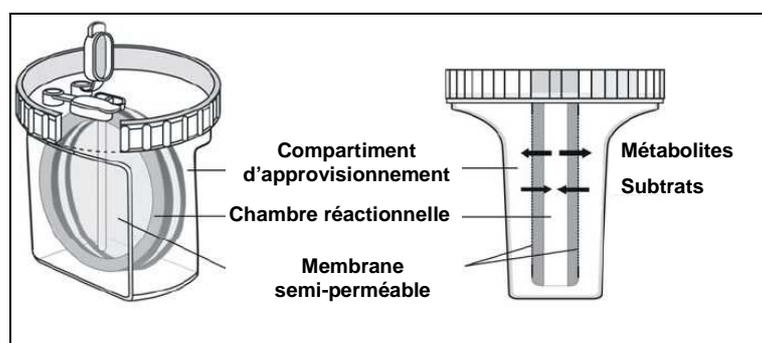


Figure 25. Schéma expliquant le principe CECF du RTS 500[®] (schéma Roche). La réaction de synthèse protéique est réalisée dans la chambre réactionnelle. L'approvisionnement en énergie du système et l'évacuation des métabolites s'effectue grâce à la présence de membranes semi-perméables entre la chambre réactionnelle et le compartiment d'approvisionnement.

L'expression de la protéine Nox4Aqc et Nox4Bqc se fait en présence de la protéine chaperonne GroE (40 μ L pour une réaction de 1mL), du couple oxydoréducteur GSH/GSSG (0,1mM/4mM) et du *n*-dodecyl β -D-maltoside (0,1mM) à 20 $^{\circ}$ C pendant 24h sous agitation 990 rpm dans l'appareil ProteoMaster (Roche). A la fin de la réaction, un aliquote de 5 μ L est analysé par western blot. L'échantillon est ensuite centrifugé à 43 000g pendant 30min à 4 $^{\circ}$ C. Le surnageant correspond à la fraction de protéines solubles ; le culot est resuspendu

dans 1mL de tampon phosphate de sodium 150mM pH 7,4 et 300mM de NaCl. Des fractions aliquotes de 5µL sont analysées par western blot.

III.C Purification des protéines recombinantes

III.C.1 Purification des protéines fusionnées avec une étiquette polyHistidine

III.C.1.1 Extraction de protéines et fractionnement cellulaire

Le culot de bactéries induites issues d'une culture de 1L (§III.B.12 Matériels et méthodes) est resuspendu dans 15mL de tampon de lyse A (Tris 50mM pH 7,5, NaCl 100mM, EDTA 1mM, MgCl₂ 2mM, 10µM TLCK, 1,8µM leupeptine, 1,5µM pepstatine, lysosyme 1mg/mL). Une première sonication de 3 cycles de 15s dans de la glace est réalisée sur l'échantillon. Une centrifugation à 10 000g pendant 10min à 4°C permet sédimenter les bactéries non lysées. Le surnageant est mis de coté à 4°C et le culot est de nouveau remis en solution avec 15mL de tampon de lyse A. Une deuxième série de sonication est réalisée. Les deux surnageant issus des sonications sont réunis dans un seul tube et sont ensuite centrifugés à 46 000g pendant 30h à 4°C. Le surnageant correspond aux protéines solubles (conservé à -20°C) et le culot aux protéines insolubles.

Le fractionnement cellulaire permet de déterminer dans quelles conditions la protéine d'intérêt est solubilisée. Les protéines insolubles vont subir une série successive de traitements par différents tampons.

1. Premièrement dans le tampon A-NaCl (tampon A avec **2M NaCl**). Ceci permet l'extraction des protéines en éliminant les interactions ioniques.
2. Puis avec le tampon A-Triton (tampon A avec **2% triton X-100**). Ce tampon extrait les protéines en supprimant les interactions hydrophobes.
3. Ensuite avec le tampon A-1urée (tampon A avec **1M d'urée**). Ce tampon dénature de manière modérée les protéines.

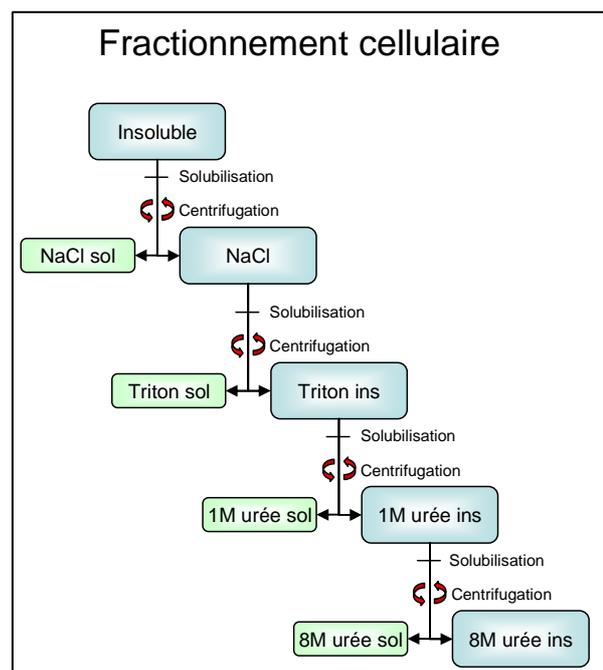


Figure 26. Schéma du fractionnement cellulaire.

4. Et enfin dans le tampon A-8Urée (tampon A avec **Urée 8M**, 1mM glycine). Les protéines sont totalement dénaturées par l'urée.

Le culot insoluble est rincé une fois puis est solubilisé dans le tampon suivant. Chaque solubilisation est réalisée sur roue tournante à 4°C pendant 30 min dans un tube contenant un petit barreau magnétique (aide à la solubilisation) à l'exception de la dernière étape qui dure toute la nuit. La séparation de la fraction soluble et insoluble est effectuée à chaque fois par une centrifugation à 46 000g à 4°C pendant 30min et un aliquote du surnageant est prélevé pour une analyse sur gel SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie et par western blot.

III.C.1.2 Purification par chromatographie d'affinité

Deux protocoles ont été utilisés pour purifier les protéines recombinantes fusionnées à une étiquette polyhistidine. Le premier procédé a été réalisé au sein de la société de biotechnologie, Protéine Expert. Dans ce contexte, nous avons pu ainsi mettre en place les conditions d'expression et de purification de la protéine NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc en utilisant le système de séparation des protéines par chromatographie liquide (FPLC). Nous avons également utilisé les colonnes commerciales His Gravitrap (GE Healthcare) et aussi des résines TALON Superflow Resin™ (Clontech). Les étapes de purification sont les suivantes :

1. Préparation de la résine en l'équilibrant avec le tampon dans lequel est diluée la protéine.
2. Chargement de l'échantillon sur la colonne (récupération du filtrat)
3. Lavages (récupération des fractions de lavages)
4. Elution en utilisant un gradient croissant d'imidazole (compétition entre l'imidazole du gradient et le noyau imidazole de l'histidine)

III.C.1.2.1 Purification par des billes magnétiques couplées au nickel

La purification des protéines fusionnées avec une étiquette polyhistidine avec les billes magnétiques couplées au nickel est réalisée avec le kit MagneHis® de Promega. Le nickel présente une affinité pour l'histidine. Le fait que le nickel soit couplé à des billes magnétiques permet une purification aisée en utilisant un aimant. Le protocole se déroule de la manière suivante. L'extrait protéique est mis en contact avec les billes magnétiques (30µL de billes pour 1mL d'extrait) et homogénéisé par inversion. Le contact permettant la fixation

de la protéine sur le nickel s'effectue à la température ambiante pendant 2min. Le tube est ensuite placé sur un aimant pendant 30sec pour capturer les billes. Le surnageant, correspondant au filtrat, est alors enlevé par pipetage. Le tube est ensuite enlevé de l'aimant et les billes sont remises en suspension par le tampon de lavage contenant 10mM d'imidazole et 500mM de NaCl. Le tube est de nouveau placé sur l'aimant et après 30sec, le surnageant, correspondant au lavage, est enlevé par pipetage. Cette étape de lavage est répétée 2 fois. L'élution est réalisée avec un tampon contenant 500mM d'imidazole pendant 2min à température ambiante. Le tube est ensuite mis sur l'aimant pendant 30sec puis le surnageant contenant les protéines d'intérêt est prélevé à la pipette et transféré dans un nouveau tube. A chaque étape de la purification, un aliquote est conservé pour une analyse ultérieure par SDS-PAGE et par western blot.

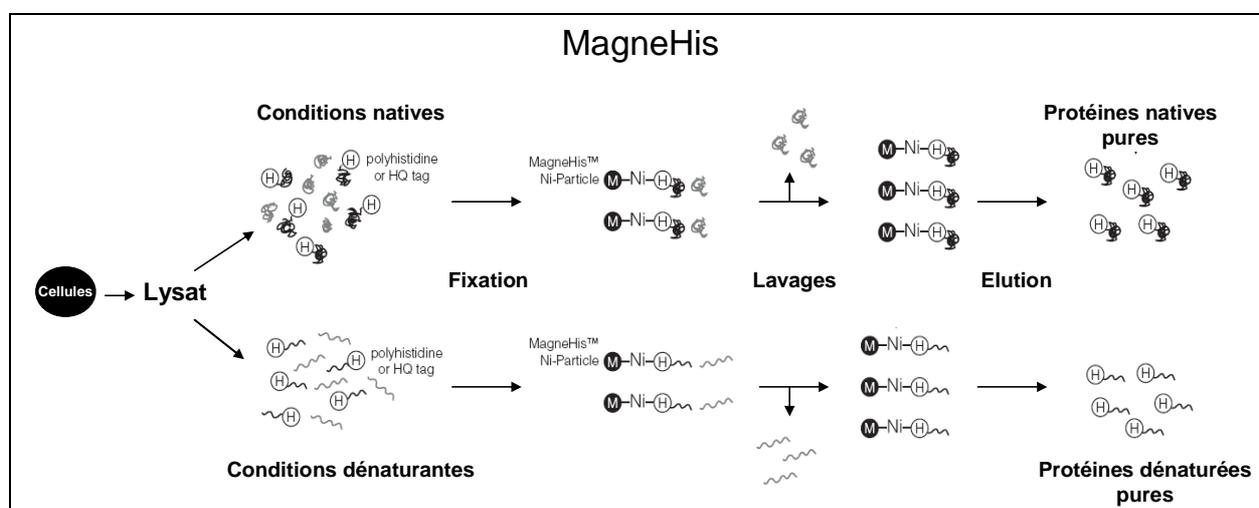


Figure 27. Protocole de purification avec les billes magnétiques couplées aux particules de nickel, MagneHis® (Promega). La purification peut se faire sur des protéines natives ou dénaturées et contient les étapes suivantes : fixation des protéines sur les billes magnétiques couplées au nickel, lavage pour enlever les protéines contaminantes, élution en présence d'imidazole pour libérer les protéines des billes.

III.C.1.2.2 La chromatographie liquide rapide sur l'appareil BioLogic DuoFlow

L'appareil BioLogic DuoFlow de BioRad permet de réaliser une séparation des protéines par chromatographie liquide (FPLC). Cet appareil est spécialement conçu pour la purification de protéines, de peptides ou de molécules biologiques. Il est automatisé et toutes les étapes de la purification (équilibrage de la résine, chargement de l'échantillon, étapes de lavages, et gradient permettant l'élution) peuvent être entièrement programmées. L'appareil effectue des récoltes de fractions régulièrement et nous pouvons également suivre l'évolution de la purification en temps réel en observant les pics d'absorbances à 280nm, correspondant à la protéine d'intérêt ou aux contaminants protéiques. Son débit de

10mL/min autorise des temps d'exécution plus rapides. Nous avons la résine Ni Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare).

Le programme de purification a été le suivant (les volumes utilisés sont décrits en nombre de volume de résine ou volume de colonne ou C.V., le tampon A correspond à celui dans lequel la protéine est solubilisée et B au même tampon avec 1M d'imidazole) :

1. Préparation de la résine en l'équilibrant avec le tampon A dans lequel est diluée la protéine (10 C.V.) (5mM/min)
2. Chargement de l'échantillon sur la colonne (récupération du filtrat) (2mL/min)
3. Lavages (récupération des fractions de lavages) (20 C.V.) (5mL/min)
 - a. 10 C.V. de tampon A
 - b. Puis 10 C.V. de 95% de tampon A et 5% de tampon B
4. Elution en présence d'un gradient croissant d'imidazole (15 C.V.) (2mL/min)
5. Finalisation de l'élution avec 10 C.V. de tampon B (2mL/min)

Pour les protocoles utilisant l'appareil BioLogic, nous avons réalisé ce qu'on appelle un "gradient parfait" qui consiste à maintenir la concentration en imidazole constante aussi longtemps qu'un pic d'absorbance à 280nm est détecté. Le numéro des fractions correspondant à l'absorbance est connu et les fractions contenant le filtrat, le lavage et les protéines éluées sont déposées sur gel SDS-PAGE ; les protéines sont colorées au bleu de Coomassie et identifiées par western blot.

Ce protocole a été utilisé pour la protéine Nox4Aqc et Nox4Bqc en condition dénaturante (8M urée).

III.C.1.2.3 La chromatographie d'affinité avec la colonne His Gravitrap™

La colonne His Gravitrap™ est une colonne prête à l'emploi contenant la résine Ni Sepharose™ 6 Fast Flow. L'affinité de l'étiquette polyhistidine fusionnée avec la protéine d'intérêt est réalisée avec le nickel. Nous avons utilisé cette colonne pour la purification de la protéine Nox4A-1™ servant d'antigène pour la production d'anticorps monoclonaux (§III.D.1 Matériels et méthodes) ainsi qu'une protéine servant de contrôle négatif ZEBRA/MD4-GFP.

La protéine Nox4Aqc à purifier est dans un tampon A-8Urée (§III.C.1.1 Matériels et méthodes) avec 10mM d'imidazole. La colonne est équilibrée avec 10mL de tampon A-8Urée. Puis l'échantillon est chargé. Le filtrat est récupéré pour une analyse en SDS-PAGE.

La résine est ensuite lavée avec 10mL de tampon A-8Urée à 10mM d'imidazole, puis 10mL à 40mM d'imidazole. Puis ensuite, on effectue une renaturation partielle de la protéine directement sur la colonne avec un gradient décroissant d'urée. La renaturation se fait avec un passage successif de 10mL de tampon A contenant 40mM d'imidazole, 1mM de glycine et 7M, puis 6M, 5M, 4M, 3M et finalement 2M d'urée. L'élution est effectuée avec 4mL de tampon A contenant 2M d'urée et 250mM d'imidazole (4 fractions de 1mL) puis ensuite avec 4mL de tampon A contenant 2M d'urée et 500mM d'imidazole (4 fractions de 1mL). Chaque étape de purification est analysée en SDS-PAGE.

III.C.1.2.4 La chromatographie d'affinité avec la résine TALON Superflow Resin™ (Clontech)

Ce protocole a été utilisé pour la purification des protéines recombinantes Nox4Aqc et Nox4Bqc produite à grande échelle par le système RTS® (§III.B.2.2 Matériels et méthodes). La résine utilisée est la TALON® Polyhistidine-Tag Purification Resins à base de cobalt. La résine (2mL) est prélevée et centrifugée à 700g pendant 2min à température ambiante. Le culot est lavé deux fois par 20mL de tampon d'équilibration (phosphate de sodium 100mM pH 7,4, 300mM NaCl, 20mM d'imidazole). Après une dernière centrifugation, il est resuspendu par 20mL de ce même tampon et ajouté dans la colonne fermée par un bouchon pour permettre le tassement de la résine. Pendant ce temps, la fraction soluble de 1mL issue du RTS est diluée dans 10mL de tampon de fixation sodium phosphate 150mM pH 7,4, 300mM NaCl, 20mM d'imidazole, 0,1mM de *n*-dodecyl β -D-maltoside. Toutes les étapes de purification sont faites à 4°C dans une chambre froide. Une fois la résine tassée, on enlève le bouchon et dès que le tampon d'équilibration arrive au sommet de la résine, on ajoute l'échantillon. La mise en contact de l'échantillon se fait en circuit fermé grâce à une pompe péristaltique durant la nuit. Le lendemain, le filtrat est recueilli dans un tube falcon 50mL. La résine est alors lavée deux fois avec 5mL de tampon de fixation. L'élution s'effectue avec 5mL de tampon de fixation contenant 250mM d'imidazole par fractions de 500 μ L. Chaque étape de purification est analysée en SDS-PAGE et western blot.

III.D Outils utilisés (anticorps et système Lumio®) pour la détection de la protéine Nox4

1. Pour les protéines avec une étiquette FIAsh, nous avons utilisé le système de révélation Lumio® (Invitrogen) (§III.E2.4 Matériels et méthodes).

2. Pour la détection des protéines Nox4 possédant une étiquette contenant l'antigène V5 et/ou une séquence poly-histidine, nous disposons d'anticorps monoclonaux commerciaux anti-V5 (GKPIPPLLGLDST) (Invitrogen) et anti-histidines (HHHHHH) (Sigma).

3. Pour la détection de la protéine Nox4 sans étiquette, nous avons utilisé un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine Nox2, l'anticorps 54.1 (fourni par A. Jésaïtis). L'épitope (PKIAVDGP) reconnu par cet anticorps est en partie retrouvé dans la séquence de la protéine Nox4A mais pas dans la protéine Nox4B :

Épitope 54.1	1	-----	-----	---	<u>PKIAVDG</u>	<u>P</u>	-----
Séquence Nox2	366	FNACGCDKQE	FQDAWKL---	---	<u>PKIAVDG</u>	<u>P</u>	FGTASEDFV SYEVVMLVGA
Séquence Nox4A	382	RDLLLPPSSQ	DSEILPFIQS	RNY	<u>PKLYIDG</u>	<u>P</u>	FGSPFEESL NYEVSLCVAG
Séquence Nox4B	382	RDLLLPPSSQ	DSEILPFIQS	RNY	<u>PK</u>	---	-----

L'anticorps 54.1 marque également la protéine Nox4A recombinante [Burritt et al, 2003].

4. Nous avons produit un anticorps polyclonal dirigé contre une séquence de la protéine Nox4 (⁸⁸KVPSRRTRRLDKSR¹⁰²), inspiré de l'anticorps polyclonal décrit par Pedrucci et ses collaborateurs [Pedrucci et al, 2004]. Cette séquence se trouve au niveau de la deuxième boucle inter-membranaire.

5. Nous avons synthétisé des anticorps monoclonaux à partir de la partie C terminale de Nox4 (résidus 206 à 578).

L'ensemble de ces anticorps (y compris le système FIAsh) et leur site de reconnaissance sur la protéine Nox4 est représenté sur la figure 28.

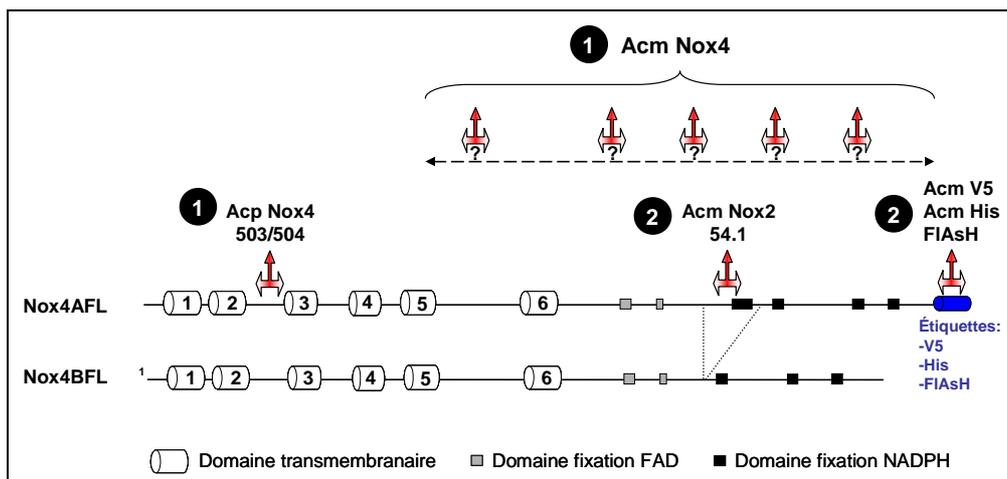


Figure 28. Représentation des outils de mise en évidence de la protéine Nox4 (anticorps et système FIAsh) et leur site de reconnaissance. La triple flèche désigne le site de reconnaissance sur la protéine Nox4 des anticorps et du système FIAsh. Acp correspondent aux anticorps polyclonaux ; Acm, aux anticorps monoclonaux. Le chiffre (1) désigne les anticorps produit par notre laboratoire ; le chiffre (2) aux anticorps ou système de détection FIAsh existants. Les anticorps Acp 503/504, Acm Nox4 et Acm Nox2 reconnaissent une séquence spécifique de Nox4. Les anticorps Acm V5, Acm His et le système FIAsh reconnaissent une séquence située sur l'étiquette additionnelle.

Le tableau 5 suivant résume les caractéristiques de chaque anticorps et du système FIAsH.

Séquence reconnue		Outils	Type	Épitope
Étiquettes	FIAsH	Lumio [®] (Invitrogen)	-	CCPGCC
	Antigène V5	Anti-V5 (Invitrogen)	Monoclonal	GKPIPPELLGLDST
	Poly-histidine	Anti-Histidine (Sigma)	Monoclonal	HHHHHH
Anti-Nox2		54.1 (A. Jesaitis)	Monoclonal	PKIAVDGP
Anti-Nox4		503/504 (GREPI)	Polyclonal	⁸⁸ KVPSRRTRRLDKSR ¹⁰²
Anti-Nox4		5 clones	Monoclonal	?

Tableau 5. Caractéristiques des outils utilisés pour la mise en évidence de la protéine Nox4.

III.D.1 Production d'anticorps polyclonaux contre Nox4

L'antigène pour l'immunisation des lapins est un peptide synthétique correspondant aux acides aminés ⁸⁸KVPSRRTRRLDKSR¹⁰² de la protéine Nox4. La synthèse du peptide et la production de sérums de lapin ont été confiées à la société Néosystème. Deux sérums ont été obtenus et les anticorps polyclonaux nommés 503 et 504 sont purifiés.

III.D.2 Production d'anticorps monoclonaux contre la partie C terminale de Nox4 (résidus 206 à 578)

III.D.2.1 Préparation de l'antigène

L'antigène servant pour l'injection aux souris correspond à la partie C terminale de la protéine Nox4 allant de l'acide aminé 206 à l'acide aminé 578. Cette protéine contient une étiquette poly-histidine du côté N terminal. La production de cette protéine a été réalisée par induction bactérienne dans des bactéries BL21(λ DE3) avec le vecteur pET30b NHS-Nox4-1TM. Pour permettre le criblage négatif des anticorps produits, nous avons en parallèle produit et purifié une protéine totalement différente de Nox4, la protéine ZEBRA/MD4-GFP possédant la même étiquette polyhistidine que NHS-Nox4A-1TM. La purification a été effectuée selon le protocole indiquée dans le paragraphe §III.C.1.2.3 des Matériels et méthodes à l'aide d'une colonne de nickel His GraviTrap (GE Healthcare). 1mg de protéine NHS-Nox4-1TM a été nécessaire pour la réalisation de ce projet. La protéine purifiée a été confiée à la société Biotem qui s'est chargé de la phase de développement des anticorps.

III.D.2.2 Immunisation et production d'anticorps

L'immunisation est réalisée sur 5 souris et la production des anticorps spécifiques au niveau sérique est contrôlée par ELISA sur la protéine NHS-Nox4A-1TM purifiée (*figure 29, 1*) comparativement à la protéine ZEBRA/MD4-GFP purifiée (antigène négatif). Les sérums (*figure 29, 2*) ont été également testés au sein de notre laboratoire par western blot et tous reconnaissent la protéine NHS-Nox4A-1TM. Une des souris positive a été sélectionnée pour l'étape d'hybridation lymphocytaire (fusion cellulaire, *figure 29, 3 et 4*). A l'issue de cette étape, 5 surnageants d'hybridomes positifs pour le test ELISA et pour le western blot (*figure 29, 5a et b*) sont choisis pour l'étape de clonage par dilutions limites (*figure 29, 6a*). Le surnageant des clones stables obtenus est également testé par ELISA sur l'antigène et congelé pour la conservation de la lignée. Les 6 clones sont ensuite injectés dans la cavité péritonéale de la souris (*figure 29, 6b*). Une tumeur s'est développée et le liquide d'ascite contenant l'anticorps monoclonal fortement concentré est prélevé (*figure 29, 7*).

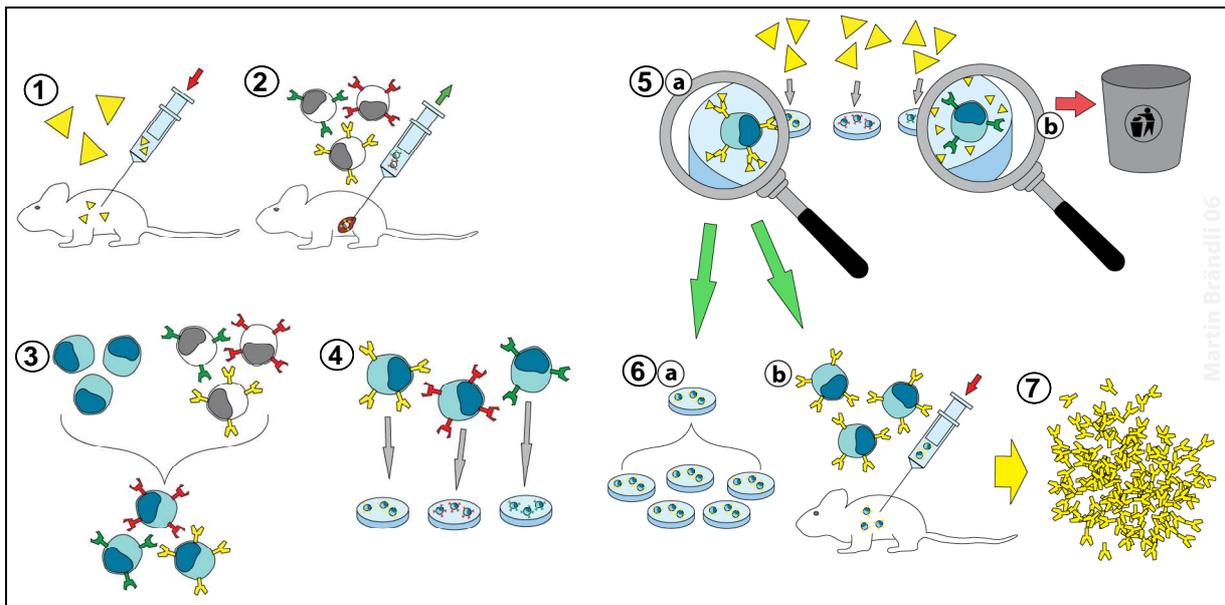


Figure 29. Principales étapes de production d'anticorps monoclonaux (schéma modifié wikipédia, http://fr.wikipedia.org/wiki/Anticorps_monoclonaux). 1) Injection de l'antigène dans la souris. 2) Obtention des sérums contenant les anticorps dirigés contre l'antigène (Test ELISA). 3 et 4) Hybridation lymphocytaire avec des myélomes. 5a et 5b) Test des clones positifs par ELISA et western blot sur l'antigène. 6a) clonage par dilution limite des hybridomes. 6b) Production des anticorps monoclonaux par injection du clone d'hybridome chez la souris. Obtention d'anticorps monoclonaux à partir de liquide d'ascite.

III.E Analyse protéique

III.E.1 Dosage de protéines

III.E.1.1 Mesure de l'absorbance à 280nm

Cette méthode est basée sur l'absorbance à 280nm des groupements aromatiques des acides aminés tels que la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine. Cette méthode de mesure est essentiellement utilisée pour suivre les protéines en sortie de chromatographie, en mesurant la densité optique des fractions à 280nm.

III.E.1.2 Méthode de Bradford (Bio-Rad protein assay)

Le bleu de Coomassie (G250) en milieu acide forme un complexe avec les protéines en se fixant sur les groupements amines libres. Il change alors de couleur en passant du rouge (absorption à 465nm) au bleu (absorption à 595nm) [Bradford, 1976]. La concentration protéique est proportionnelle à l'absorbance à 595nm. Elle est déterminée en comparaison avec une courbe d'étalonnage connue et croissante en sérum albumine bovine (BSA). Le réactif de Bradford permet un dosage rapide et simple. L'étalon pour la gamme et les échantillons sont incubés avec 1mL du réactif de Bradford pendant au minimum 5min à température ambiante. La lecture s'effectue au cours des 30min suivantes (période de stabilité de la coloration). Cette méthode permet de doser de faibles quantités de protéines, de l'ordre du μg , dans des milieux de concentration saline élevée. Seule les tampons très alcalins ou contenant des détergents (triton X-100, SDS, etc....) à de fortes concentrations (supérieur à 0,1%) peuvent interférer lors de la coloration.

III.E.2 Electrophorèse en gel d'acrylamide (SDS-PAGE)

La méthode de SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) [Laemmli et Favre, 1973] permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire au travers d'un gel de polyacrylamide. A un pH donné, les protéines acquièrent une charge négative ou positive selon leur point isoélectrique. Cette propriété leur permet de migrer au sein d'un champ électrique. Pour cette technique électrophorétique, les protéines sont incubées en présence de β -mercaptoéthanol qui rompt les ponts disulfures et de SDS qui dénature et homogénéise la charge des protéines leur conférant une charge uniquement négative. Ainsi, toutes les protéines traitées vont migrer dans la même direction sous un champ électrique et pourront être séparées seulement en fonction de leur masse

moléculaire au travers d'un gel de polyacrylamide. Pour connaître la taille approximative des différentes protéines de l'échantillon déposé, un mélange de protéines colorées dont la masse moléculaire est connue, est déposé en même temps. Le pourcentage en acrylamide du gel usuellement utilisé oscille entre 7% à 15%. Le choix de la concentration de l'acrylamide se fait en fonction de la taille de la protéine d'intérêt que l'on veut séparer. Plus le maillage est épais (haut pourcentage) plus les protéines migrent lentement et cela permet de mieux séparer les protéines de petites masse moléculaire.

III.E.2.1 Préparation du gel d'acrylamide

Les proportions indiquées correspondent à la préparation de 2 gels 6x8 cm de 0,75mm d'épaisseur.

Gel de séparation 10% :	Volume (mL)
Eau	5,8
Tris-HCl 1,5M pH 8,9	3
Acrylamide/bis-acrylamide 40% (p/v)	3
SDS 10% (p/v)	0,120
Persulfate d'ammonium 10% (p/v)	0,075
TEMED	0,0125

Gel de concentration :	Volume (mL)
Eau	1,83
Tampon Upper (Tris 0,25M, SDS 0,2%, pH 8,8)	2,5
Acrylamide/bis-acrylamide 40% (p/v)	0,625
Persulfate d'ammonium 10% (p/v)	0,030
TEMED	0,010

III.E.2.2 Préparation des échantillons

La dénaturation des protéines s'effectue extemporanément par l'addition d'un tampon de dépôt (SDS 2% (p/v), Tris-HCl 630mM, bleu de bromophénol 0,004%, saccharose 1% (p/v), EDTA 0,1mM) et 2,5% de β mercaptoethanol. Les échantillons sont dénaturés à 60°C pendant 1h ou à 95°C pendant 5min.

Préparation des échantillons pour le système Lumio™ (§III.E.2.4 Matériels et méthodes) :

La préparation des échantillons est réalisée selon les indications du fournisseur. La solution de dénaturation est fournie et sa formulation est étudiée pour ne pas interférer avec

le réactifs FIAsH. On mélange 15µL d'échantillons avec 5µL de tampon de dépôt Lumio 5X. On ajoute 0,2µL de Lumio™ Green Detection Reagent sous hotte chimique puis on incube le tout à 70°C pendant 10min. La préparation est refroidie 2min à 4°C. On ajoute ensuite 2µL de Lumio™ In-Gel Detection Enhancer puis on incube pendant 5min à température ambiante. Les échantillons sont alors prêts à être déposés sur gel acrylamide.

III.E.2.3 Migration par électrophorèse des échantillons

La migration des protéines s'effectue dans un tampon de migration (Tris 25mM pH 8,8, glycine 192mM, SDS 0,1% (p/v)) au sein d'une cuve d'électrophorèse. Elle est de 75V au niveau du gel de concentration puis de 175V une fois que les protéines ont pénétré dans le gel de séparation. L'électrophorèse est arrêtée quand le front de migration, visible grâce au bleu de bromophénol, arrive en bas du gel.

III.E.2.4 Révélation des protéines sur gel acrylamide

III.E.2.4.1 Coloration au bleu de Coomassie

Le gel est incubé dans une solution de bleu de Coomassie (bleu de Coomassie (R250) 0,25% (p/v), méthanol 50% (v/v), acide acétique 10% (v/v)) pendant au minimum 30min sous agitation. L'excès de coloration est éliminé avec des lavages successifs dans une solution de décoloration (éthanol 26% (v/v), acide acétique 7% (v/v)). Les bandes bleues présentes sur le gel correspondent aux protéines contenues dans l'échantillon.

III.E.2.4.2 Par fluorescence avec le système Lumio™ (Invitrogen)

La technologie du Lumio™ Green Reagent est basée sur la propriété du réactif FIAsH (Fluorescein Arsenical Hairpin binding) [Griffin et al, 1998] de pouvoir se lier de manière covalente sur un motif tétracystéine spécifique (CCXXCC, où C correspond à une cystéine et X à n'importe quel acide aminé) (*figure 30*). Le motif CCPGCC, où P et G correspondent respectivement à la proline et à la glycine, a été démontré comme étant la meilleure séquence pour l'utilisation du composé FIAsH [Adams et al, 2002]. Ce motif est rarement retrouvé au sein des séquences protéiques naturelles. Le réactif FIAsH est un composé bisarsénique libre non fluorescent mais qui le devient lorsqu'il se fixe sur le motif tétracystéine avec un maximum d'excitation à 500 nm (aussi sous lumière UV) et un maximum d'émission à 535 nm. La fixation sur la protéine d'intérêt fusionnée avec ce motif s'effectue

pendant la préparation des échantillons (§III.E.2.2 Matériels et méthodes) avant la migration par électrophorèse. La révélation peut être faite à la fin de la migration avec la lumière UV. Il est possible d'utiliser ensuite le gel d'acrylamide pour réaliser un western blot (§III.E.3 Matériels et méthodes). La révélation peut également se faire après transfert sur la membrane de nitrocellulose ou en fin de western blot.

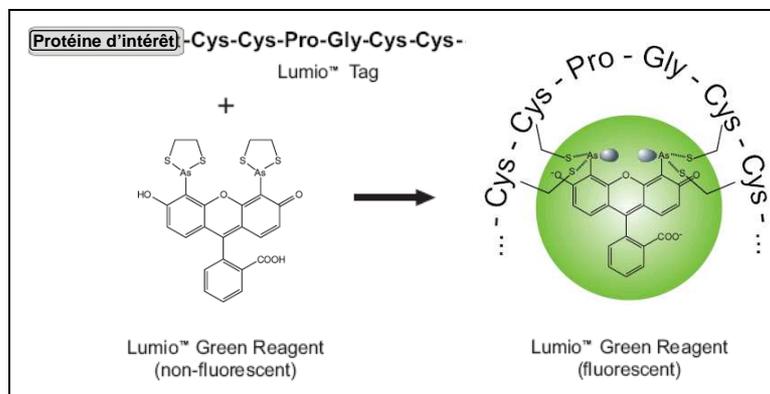


Figure 30. Principe du système Lumio™. Le composé Lumio™ se fixe sur la séquence FIAsh (CCPGCC) de manière covalente et devient fluorescent sous une excitation par les UV.

III.E.3 Western blot

III.E.3.1 Transfert des protéines sur membrane

Les protéines séparées par électrophorèse sont électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose. A la fin de la migration, le dispositif de transfert est préparé de la manière suivante : on découpe 6 feuilles de papiers Whatman n°3 et une feuille de membrane de nitrocellulose aux mêmes dimensions que le gel. Ces feuilles sont trempées dans le tampon de transfert (Tris 25mM pH 8,3, glycine 129mM, SDS 0,01% (p/v), méthanol 20% (v/v)). Le transfert s'effectue dans une cuve constituée de deux électrodes de graphite (une cathode et une anode) reliées au générateur. Le « sandwich » permettant le transfert des protéines est constitué de la façon suivante : l'anode, 3 feuilles de papier Whatman, la feuille de nitrocellulose, 3 feuilles de papier Whatman, et enfin la cathode. Les protéines chargées négativement en présence de SDS migrent vers l'anode sous un champ électrique (1mA/cm² de gel) [Towbin et al, 1992]. Le temps de transfert dépend de l'épaisseur du gel : 1h15 pour un gel de 0,75mm d'épaisseur et 2h30 pour un gel deux fois plus épais. Le contrôle de l'efficacité du transfert peut se faire de 2 manières. La première, en colorant le gel après le transfert pour déterminer s'il reste encore des protéines non transférées et la deuxième, en colorant la membrane par le rouge ponceau (rouge ponceau à 0,1% (p/v), acide acétique 1% (v/v)). La coloration au rouge ponceau est réversible et n'interfère pas avec la suite du protocole du western blot.

III.E.3.2 Immunodétection des protéines par des anticorps

A la fin du transfert, les sites libres de la membrane de nitrocellulose sont saturés pendant une heure à température ambiante dans une solution de blocage PBS-Tween 0,05%-lait 4% (PBS 1X, Tween 20 0,05% (p/v), lait déshydraté « Régilait » 4% (p/v)) (possibilité d'incuber à 4°C pendant la nuit). La membrane est ensuite incubée pendant 1h avec une solution PBS-Tween 0,05% contenant l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt (possibilité d'incuber à 4°C pendant la nuit). La membrane est ensuite lavée 3 fois dans un tampon PBS-Tween 0,05% puis incubée pendant 1h avec une solution PBS-Tween 0,05% contenant l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire (possibilité d'incuber à 4°C pendant la nuit). Finalement, la membrane est lavée 3 fois pendant 1h avec une solution PBS-Tween 0,05% avant d'être révélée par chimiluminescence en utilisant le réactif ECL[®] (Amersham).

III.E.3.3 Slot blot

Le slot blot permet comme le western blot de détecter les protéines grâce à l'utilisation d'anticorps à la différence qu'avec cette dernière technique, les protéines sont en conditions non dénaturantes. L'échantillon brut est déposé directement sur la nitrocellulose et est adsorbé par aspiration à l'aide d'une pompe à vide. Les étapes de blocage, de fixations des anticorps et de révélation sont les mêmes que pour le western blot (§III.E.3.2 Matériels et méthodes).

III.E.3.4 Déshybridation

La déshybridation permet d'éliminer les anticorps fixés sur les protéines figées sur la membrane de nitrocellulose. Ce processus autorise de réutiliser la membrane pour la fixation d'autres anticorps. Ainsi, la membrane est incubée pendant 30min à 50°C avec le tampon de déshybridation (Tris-HCl 63mM pH 6,8, SDS 2% p/v), β -mercaptoéthanol 100mM) puis rincée 2 fois avec le tampon PBS-Tween 0,05% pendant 10min. Elle est alors prête à être réutilisée pour une immunodétection (§III.E.3.2 Matériels et méthodes).

III.E.4 Cytométrie en Flux (FACS)

La cytométrie en flux (FACS) est une technique permettant l'analyse individuelle et multiparamétrée de cellules ou d'éléments subcellulaires. Elle est essentiellement utilisée

pour la mesure de fluorescence produite par des anticorps conjugués ou par des composés fluorescents. Les données sont traitées et analysées avec le logiciel WinMDI 2.8.

III.E.4.1 Contrôle de l'efficacité de la transfection

Les cellules sont transfectées selon le protocole décrit au paragraphe §III.A.1.1 des Matériels et méthodes avec un plasmide permettant l'expression de la protéine eGFP (**e**nhanced **G**reen **F**luorescent **P**rotein). 24h à 48h après la transfection, les cellules sont trypsinées et lavées et resuspendues dans du PBS. La solution contenant les cellules est directement utilisée pour la mesure au FACS afin de déterminer le pourcentage de cellules ayant incorporées et exprimées la GFP.

III.E.4.2 Mesure du flux calcique intracellulaire

Les cellules sont remises en suspension, après un traitement par la trypsine et lavages au PBS. Elles sont ajustées à une concentration de 10^7 cellules/mL dans une solution Tyrode « free » (HEPES 10mM pH 7,3, NaCl 145mM, KCl 2,5mM, glucose 10mM, $MgCl_2$ 1,2mM) et incubées avec 10 μ M de Fluo-3-AM (ester **A**cetom**e**thoxyl, sonde à calcium fluorescente) ou avec en plus 20 μ M de BAPTA (un piègeur de calcium) pour les expériences de contrôles négatifs pendant 30min à 37°C à l'abri de la lumière. Le couplage de la sonde Fluo-3 avec le groupement AM (hydrophobe) permet son entrée dans la cellule en traversant les membranes cellulaires. Une fois dans le cytosol, les estérases cellulaires clivent la liaison entre la sonde et l'AM rendant alors impossible la sortie de la sonde. Les cellules sont ensuite lavées et reprises avec du Tyrode « free » à 10^7 cellules/mL. Une prise d'essai de 50 μ L (5×10^6 cellules) est diluée dans 500 μ L d'une solution Tyrode "free" contenant soit 1,5mM de $CaCl_2$ pour les expériences en présence du calcium, soit 1mM d'EGTA pour les expériences sans calcium. L'analyse du flux calcique est effectuée au FACS à l'aide d'un cytomètre FacsCalibur (Benton-Dickinson) en mesurant la fluorescence émise par la sonde Fluo-3 lorsqu'elle se fixe sur le calcium (excitation à 485 nm, émission à 520 nm). L'enregistrement commence avec 1min de lecture (la ligne de base) puis les différents composés sont ajoutés et la réponse calcique intracellulaire est mesurée pendant 5min. La cinétique du flux calcique est obtenue avec la fluorescence moyennée toutes les 5sec.

III.E.4.3 Mesure de la production d'anions superoxydes

La mesure de production d'anions superoxyde s'effectue avec le dihydroéthidium (DHE). Ce composé est internalisé dans les cellules vivantes et est déshydrogéné sous l'action des anions superoxyde en éthidium qui s'intercale dans les brins d'ADN, rendant ainsi le noyau fluorescent (excitation à 535nm et émission à 610nm).

Les cellules sont remises en suspension, après un traitement par la trypsine et lavages au PBS. Elles sont ajustées à une concentration de 10^7 cellules/mL dans du PBS et incubées avec $5\mu\text{M}$ de DHE pendant 20min à 37°C à l'abri de la lumière. Ensuite, les cellules sont maintenues à 4°C dans de la glace toujours à l'abri de la lumière et sont analysées dans les 10min par un cytomètre en flux.

IV Mesure des activités NADPH oxydase et diaphorase

IV.A Activité NADPH oxydase par chimiluminescence

Cette technique permet la mesure de la production totale de dérivés réactifs de l'oxygène grâce à la lumière émise par une réaction de chimiluminescence. La luminescence est définie par l'émission de lumière résultant de la dissipation d'énergie d'une substance allant d'un état excité vers l'état initial. Pour la chimiluminescence, l'excitation est produite par une réaction chimique. Le luminol est oxydé par le peroxyde d'hydrogène et une peroxydase, la HRP (Horse^radish Peroxidase) (figure 31). Le retour de cet état excité vers l'état fondamental s'accompagne d'une émission de lumière quantifiée ici par un luminomètre (Luminoscan Labsystem). Cette technique est particulièrement sensible. Elle mesure l'ensemble des espèces réactives de l'oxygène comprenant l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène [Rinaldi et al, 2007].

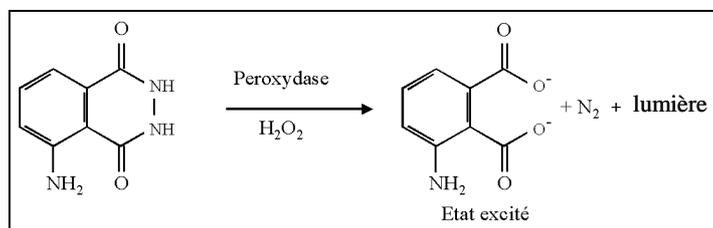


Figure 31. Principe de la réaction de chimiluminescence.

Les cellules sont remises en suspension, après un traitement par la trypsine et lavages au PBS. 5×10^5 cellules solubilisées dans $50\mu\text{L}$ de PBS sont incubées dans $200\mu\text{L}$ de PBS contenant $20\mu\text{M}$ de luminol, 10U/mL de Horseradish peroxydase (HRP) pour la mesure de l'activité oxydase de Nox4, ou $20\mu\text{M}$ de luminol, 10U/mL de HRP, 20mM de

glucose, 0,5mM de MgCl₂ et 0,9mM de CaCl₂ pour la mesure de l'activité oxydase de Nox2. La stimulation ou l'inhibition de l'activité oxydase est obtenue avec l'addition de composés au début de l'enregistrement. Les mesures sont réalisées en plaque 96 puits pendant 90min avec une mesure toutes les minutes. L'unité est exprimée en RLU (Relative Luminescence Unit).

Activité par chimiluminescence	Nox4	Nox2
Nombre de cellules (dans 0,05mL PBS)	5x10 ⁵	5x10 ⁵
Luminol	20μM	20μM
HRP	10U/mL	10U/mL
Glucose	-	20mM
MgCl ₂	-	0,5mM
CaCl ₂	-	0,9mM
Volume final dans PBS	0,25mL	0,25mL

IV.B Activité diaphorase par l'INT ou par le cytochrome c

L'activité diaphorase correspond au transfert d'électrons initié dans la partie cytosolique de Nox4. Ce protocole est une adaptation de la procédure expérimentale utilisée pour la mesure de l'activité oxydase en système acellulaire reconstitué [Berthier et al, 2003] et décrit pour l'activité diaphorase de la protéine Nox2 [Marques et al, 2007]. Deux composés sont utilisés pour la mesure de l'activité diaphorase de Nox4 : l'INT (iodonitro tetrazolium chloride) (500nm, $\epsilon_{500nm}=11mM^{-1}.cm^{-1}$) et le cytochrome c (550nm, $\epsilon_{550nm}=21,1mM^{-1}.cm^{-1}$). 10pmol de protéine recombinantes purifiées produites par RTS (§III.B.2.2 Matériels et méthodes) sont incubés pendant 5min à 4°C dans 100μ L de PBS de contenant 10μM de FAD avec ou non des éléments de modulation de l'activité (300μg cytosol ou composés stimulateurs). Puis les 100μL sont ajoutés aux 900μL de PBS contenant 10μM de FAD, 100μM d'INT ou de 100μM de cytochrome c. L'initiation de la réaction de transfert d'électron s'effectue par l'addition de 15μL de NADPH (150μM final) après l'obtention d'une ligne de base stable. La réduction de l'INT et du cytochrome c est suivie à 500nm pour l'INT et 550nm pour le cytochrome c pendant 30min.

Etapes	Activité diaphorase	Nox4
Incubation (0,1mL)	Quantité de protéine	10pmol
	Cytosol	± 300μg
	Composés	± xM
	FAD	10μM
Milieu commun (0,9mL)	FAD	10μM
	Cytochrome c / INT	100μM
Initiation (0,015mL)	NADPH	150μM
Mesure (30min)	Volume final dans PBS	1,015mL

V Test de viabilité cellulaire : mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH)

Le dosage de l'activité de la LDH est une technique utilisée pour estimer la lésion membranaire des cellules. L'activité de la LDH est mesurée dans le surnageant cellulaire par un automate HITACHI 911 en utilisant une technique spectrophotométrique par mesure de l'absorbance à 340nm de l'oxydation du NADH en NAD en présence de pyruvate.

Je tiens à remercier le Professeur K.H. Krause et le Docteur Léna Serrander (laboratoire PATIM, Pr K.H. Krause, Genève) pour nous avoir fourni les cellules HEK293 T-REx WT.

RESULTATS

Présentation du travail et de la stratégie adoptée

Ce travail de thèse est particulièrement focalisé sur l'étude de la fonctionnalité de la protéine Nox4. Il s'articule en 4 parties:

	Pages
I. Le <u>clonage</u> du gène de Nox4.	98
II. Etude de l' <u>activité NADPH oxydase</u> de Nox4 dans un modèle cellulaire (HEK293E).	102
III. Caractérisation de l' <u>activité diaphorase</u> de Nox4 dans un modèle acellulaire à base de protéines recombinantes purifiées.	115
IV. <u>Modulation</u> de l'activité NADPH oxydase de Nox4 (utilisation des deux modèles mis en place)	145

I Clonage du gène de Nox4

La stratégie de clonage ainsi que les amorces utilisées sont représentées dans la figure 32. Nox4 a été cloné à partir de deux fragments notés 5' et 3' car les tentatives pour obtenir en une fois la séquence entière ont été infructueuses. Un site de restriction interne Bam HI commun aux deux fragments rend possible la reconstitution de la séquence entière.

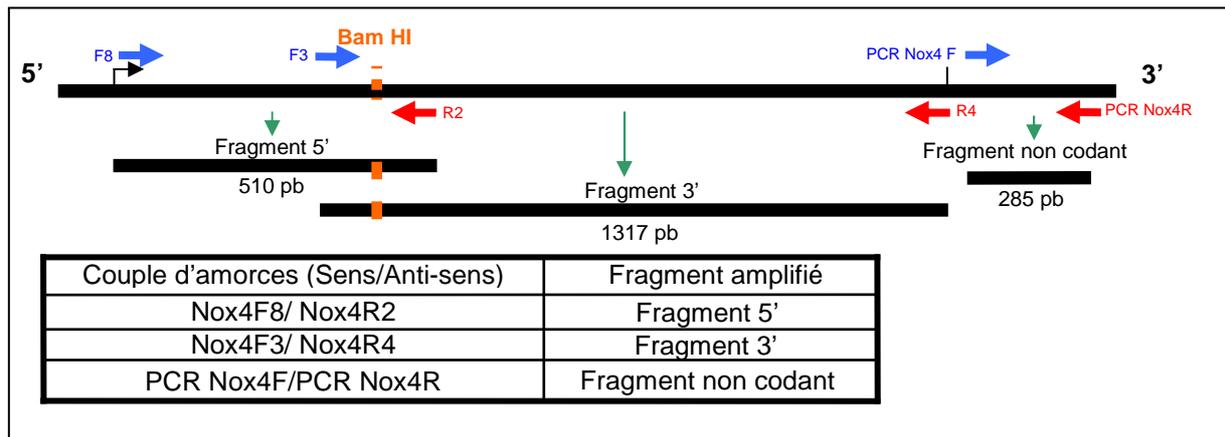


Figure 32. ARNm de Nox4 et les amorces utilisées. Les amorces Nox4F8/R2 ou Nox4F3/R4 servent à amplifier les fragments 5' et 3' respectivement. Le couple d'amorces PCR Nox4F/Nox4R permet d'amplifier un fragment correspondant à une région non traduite de l'ARNm de Nox4. Ce fragment va servir d'amorce antisens spécifique pour la réaction de transcription inverse (§I.A Résultats I)

Le clonage de Nox4 s'est déroulé en deux temps :

- Dans un premier temps en utilisant comme matrice l'ARNm des cellules HEK293E qui expriment naturellement Nox4.
- Puis dans un deuxième temps en utilisant une banque d'ADNc de rein adulte humain (Clontech®).

I.A Clonage de Nox4 à partir de l'ARNm des cellules HEK293E.

Les ARN totaux des cellules HEK293E sont extraits par la technique du phénol/chloroforme (kit d'extraction Trizol®). 5µg sont utilisés pour la réaction de transcription inverse (RT).

Nous avons testé de nombreuses conditions de RT-PCR (températures d'hybridation des amorces en RT et en PCR, température d'élongation de la RT, adjuvants, ...) pour obtenir les résultats d'amplifications illustrés dans la *figure 33*.

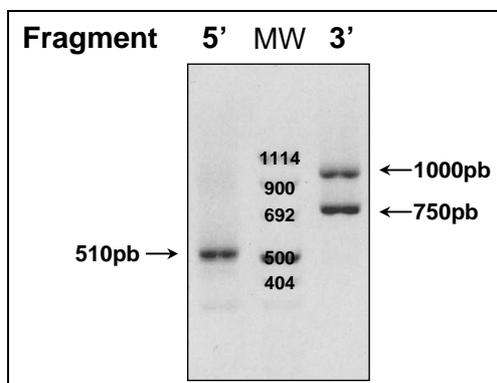


Figure 33. Clonage du fragment 5' et 3' de Nox4 à partir des cellules HEK293E. 5µg d'ARN totaux de cellules HEK293E sont utilisés pour la réaction de transcription inverse (50°C pour le fragment 5' et 70°C pour le 3'). Migration sur gel agarose 1% des produits de PCR effectuées avec le couple d'amorces Nox4F8/R2 pour fragment 5' ou avec le couple d'amorces Nox4F3/R4 pour fragment 3'. Les ADN sont révélés par la fluorescence du bromure d'éthidium incorporé sous lumière UV. MW, marqueur de poids moléculaire.

L'amplification du fragment 5' a pu être réalisée en utilisant une température d'élongation pour l'enzyme AMV-RT de 50°C. Cette bande correspond à la taille de 510pb attendue, illustrés sur la *figure 33*. Ce fragment 5' a été inséré dans un vecteur de sous clonage TOPO puis celui-ci a été transformé dans les bactéries *E.coli* TOP10. Le résultat du séquençage du plasmide TOPO-Nox4-5' donne un clone dont la séquence correspond bien à celle de Nox4.

L'amplification du fragment 3' par RT-PCR a été plus compliquée. L'utilisation d'amorces classiques polydT pour la transcription réverse n'a donné aucun résultat d'amplification par PCR. Nous avons utilisé alors un fragment correspondant à la région non codante en 3' (*figure 32*) comme amorce. L'analyse de la structure de l'ARNm de Nox4 par le logiciel RNAstructure v3.71 [Mathews et al, 1999], révèle la présence de nombreuses structures secondaires. L'emploi de ce long fragment permet d'adopter une température d'hybridation plus élevée, 70°C, pour la RT. L'AMV-RT garde son activité jusqu'à une température de 70°C [Fuchs et al, 1999]. A cette température, la structure secondaire de l'ARNm de Nox4 étant plus lâche, le processus de la transcription inverse de l'AMV-RT est facilité. Par cette approche, deux fragments ont pu être amplifiés (*figure 33*), mais leur taille, 1000pb et 750pb, est inférieure à celle attendue.

Devant ces difficultés d'amplification pour reconstruire le gène de Nox4 en entier, nous avons décidé de cloner le gène à partir d'une banque d'ADNc de rein humain adulte commercialisée par Clontech [Geiszt et al, 2000 ; Yang et al, 2001].

I.B Clonage de Nox4 à partir de la banque d'ADNc de rein humain adulte

L'ADNc de la banque a été utilisé pour effectuer les PCR avec les amorces Nox4F8/Nox4R2 ou Nox4F3/Nox4R4 pour amplifier les fragments 5' et 3' respectivement (figure 34).

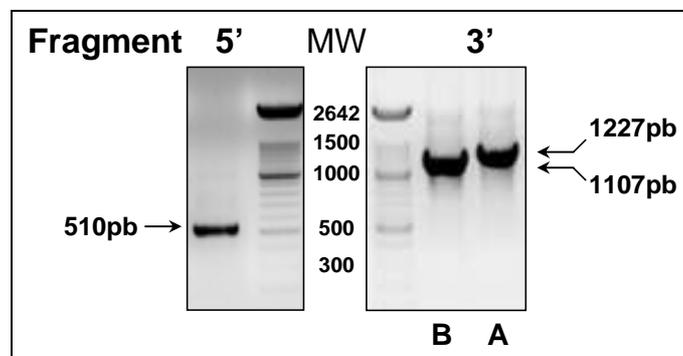


Figure 34. Clonage du fragment 5' et 3' de Nox4 à partir d'une banque d'ADNc de rein humain adulte. Migration sur gel agarose 1% des produits de PCR effectuées avec le couple d'amorces Nox4F8/R2 pour fragment 5' ou avec le couple d'amorces Nox4F3/R4 pour fragment 3'. Obtention de deux segments pour le fragment 3' : segment **A** (1227pb) et segment **B** (1107pb). Les ADN sont révélés par la fluorescence du bromure d'éthidium incorporé sous lumière UV. MW, marqueur de poids moléculaire.

On obtient pour le fragment 5' un segment d'une taille de 510pb correspondant à celle attendue. Le séquençage après sous clonage dans le vecteur TOPO de ce fragment donne une séquence correspondant à Nox4 (figure 34).

Pour ce qui concerne le fragment 3', on observe deux inserts de tailles différentes (figure 3 ; A et B). L'insert du clone A (1227pb) est à la taille attendue alors que celui du clone B est plus petit (1107pb). Le séquençage indique qu'il s'agit bien de la séquence du gène de Nox4 pour les deux fragments.

Les deux fragments du gène de Nox4 5' et 3' sont réunis dans le vecteur d'expression de mammifère pEF6/V5-His (Invitrogen) en utilisant les enzymes de restriction KpnI, BamHI et SpeI. On obtient au terme du clonage, deux ARNm de Nox4 :

- Le premier ARNm correspond exactement à la séquence de 1737pb du gène de Nox4 (Shiose, n° accession AB041035).

- Le second est aussi identique à l'ARNm de Nox4 à l'exception du 14^{ème} exon de 120pb qui a été épissé (*Figure 35*). Cet exon correspond au premier domaine prédit de fixation de NADPH. Cette observation a déjà été inscrite dans une banque de données (Strausberg, n° d'accension BC040105). L'isoforme Nox4B est décrite comme inactive [Goyal et al, 2005].

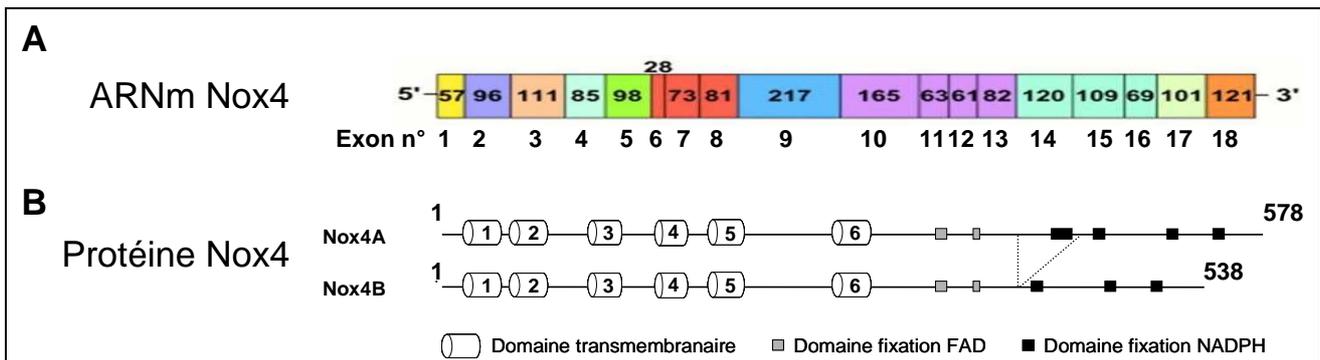


Figure 35. Schéma des deux isoformes A et B de Nox4. A) Représentation des exons dans la séquence de l'ARNm de Nox4 (Shiose, 2001). Les numéros dans la séquence de l'ARNm de Nox4 correspondent au nombre de nucléotides présents dans chaque exon. Les numéros en dessous indiquent l'ordre des exons. **B)** Schéma des deux isoformes de la protéine Nox4, Nox4A et Nox4B (issue d'un épissage du 14^{ème} exon).

Les amorces utilisées pour la construction de l'ensemble des plasmides au cours de ce travail sont répertoriées dans l'annexe 1.

Conclusions : Clonage du gène de Nox4

A l'issu du clonage du gène de Nox4 à partir d'une banque d'ADNc de rein humain adulte, deux isoformes ont été obtenus : Nox4A (forme entière) et Nox4B (forme tronquée au niveau du premier site de fixation du NADPH). L'isoforme Nox4B inactive servira de contrôle négatif dans toutes les approches utilisées.

La stratégie d'étude de l'activité de la protéine Nox4 a été conduite selon deux approches :

La première avec pour modèle les cellules HEK293E (cellules humaines embryonnaires de rein), a pour objectif de caractériser l'activité oxydase de Nox4 dans une cellule exprimant normalement Nox4.

La deuxième avec pour modèle différentes constructions de la protéine Nox4 recombinante produites par un système bactérien, a pour objectif d'étudier l'activité diaphorase de Nox4 reconstituée dans un milieu acellulaire simplifié.

II Etude de l'activité NADPH oxydase de Nox4 dans les cellules HEK293E

La fonctionnalité de la protéine Nox4 est étudiée dans les cellules HEK293E qui expriment naturellement Nox4 mais faiblement. Ceci nous a conduit à étudier l'activité NADPH oxydase de Nox4 après surexpression des gènes codant pour les protéines Nox4A et Nox4B. Pour cela, nous avons opté pour deux types de constructions plasmidiques avec le vecteur d'expression eucaryote pEF6/V5-His. Ces plasmides permettent de rajouter une "étiquette" contenant un épitope V5 et une séquence poly-Histidine (V5/His) destinées à faciliter par la suite la détection et la purification des protéines synthétisées. Néanmoins, cette étiquette a pour conséquence l'addition de 48 acides aminés en position C terminale qui peuvent avoir un impact sur la conformation de la protéine et affecter son activité.

Nous avons dans un premier temps optimisé les conditions de transfection des cellules HEK293E.

II.A Détermination des meilleures conditions de transfection

On a utilisé différents transfectants et analysé différentes conditions de transfection avec un plasmide contrôle codant pour l'eGFP (**e**nhanced **G**reen **F**luorescent **P**rotein). L'efficacité de la transfection est estimée par la fluorescence intrinsèque de cette protéine par cytométrie en flux (FACS).

II.A.1 Choix du ratio ADN/transfectant

Le "ratio" du complexe ADN/transfectant (R) est important à définir car il conditionne sa charge nette, essentielle pour son entrée dans la cellule. Ainsi, pour la transfection avec le JetPEI, nous avons utilisé 3 rapports ADN/transfectant différents (R=3, 5, ou 10) avec le plasmide pTT-eGFP codant pour l'eGFP. 24h après la transfection, les cellules sont analysées au FACS. On observe que quelque soit le rapport ADN/transfectant, l'eGFP est exprimée (figure 36 ; fluorescence au dessus de log 10) mais il y a une différence d'efficacité de transfection selon les conditions adoptées. Cette différence est visible entre les 3 conditions (figure 36 ; A et B).

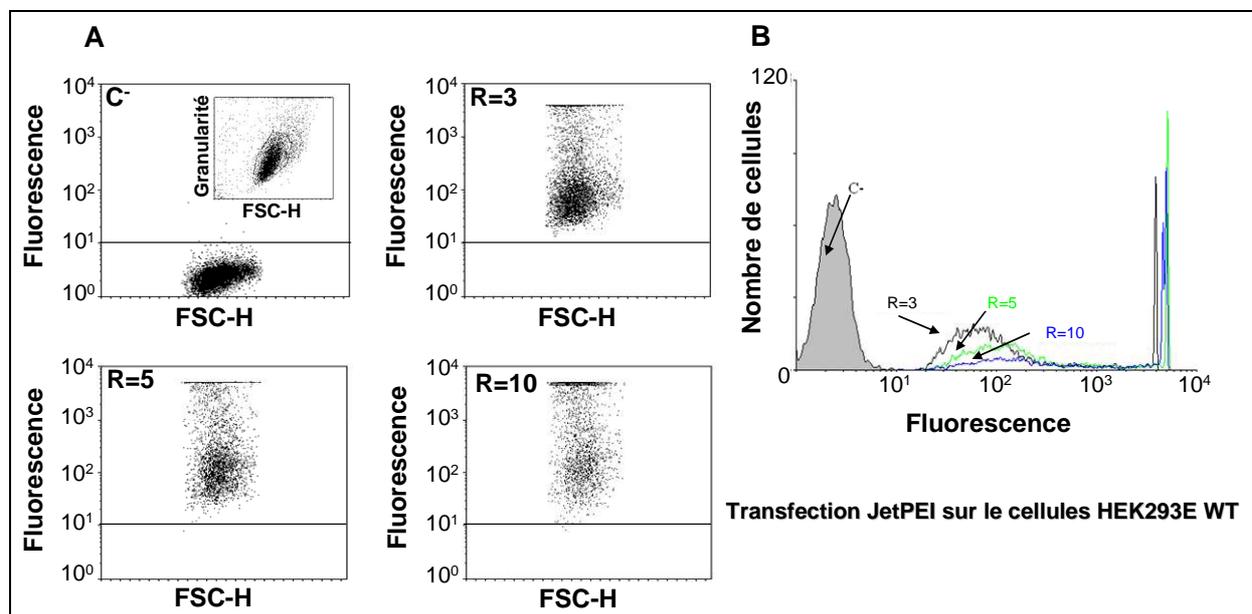


Figure 36. Comparaison par FACS de l'efficacité de transfection en fonction du ratio ADN/JetPEI™ sur les cellules HEK293E. Les cellules HEK293E ont été transfectées avec le plasmide pTTeGFP selon 3 rapports ADN/transfectant (R=3, 5 et 10). La fluorescence des cellules est ensuite analysée au FACS 24h après la transfection. **A)** Représentation en nuage de points de la fluorescence de l'eGFP surexprimée en fonction de la taille des cellules (FSC-H). Le petit encart indique l'état des cellules et représente la granularité en fonction de la taille des cellules. **B)** Représentation sous forme d'histogramme du nombre de cellules en fonction de la fluorescence de l'eGFP surexprimée. C⁻, cellules non transfectées; R, ratio ADN/JetPEI™.

Le ratio 3 semble être le plus indiqué pour une bonne transfection dans les cellules HEK293E car nous obtenons plus de cellules transfectées avec une fluorescence homogène.

II.A.2 Choix de l'agent transfectant

Nous avons ensuite comparé 2 modalités de transfection pour les cellules HEK293E, à savoir le JetPEI™ (type polycationique) (§II.A.1.3 Matériels et méthodes) ou la précipitation au phosphate de calcium (§II.A.1.2 Matériels et méthodes). Les mêmes quantités d'ADN et de plasmide ont été utilisées pour ces deux techniques. Les résultats sont montrés dans la *figure 37*. On observe une bonne transfection des cellules HEK293E aussi bien avec le JetPEI™ (93%) qu'avec le phosphate de calcium (80%). Néanmoins, la technique au phosphate de calcium est plus toxique, puisque 20% de la population cellulaire sont sous forme de débris comparé à 3% pour le JetPEI™.

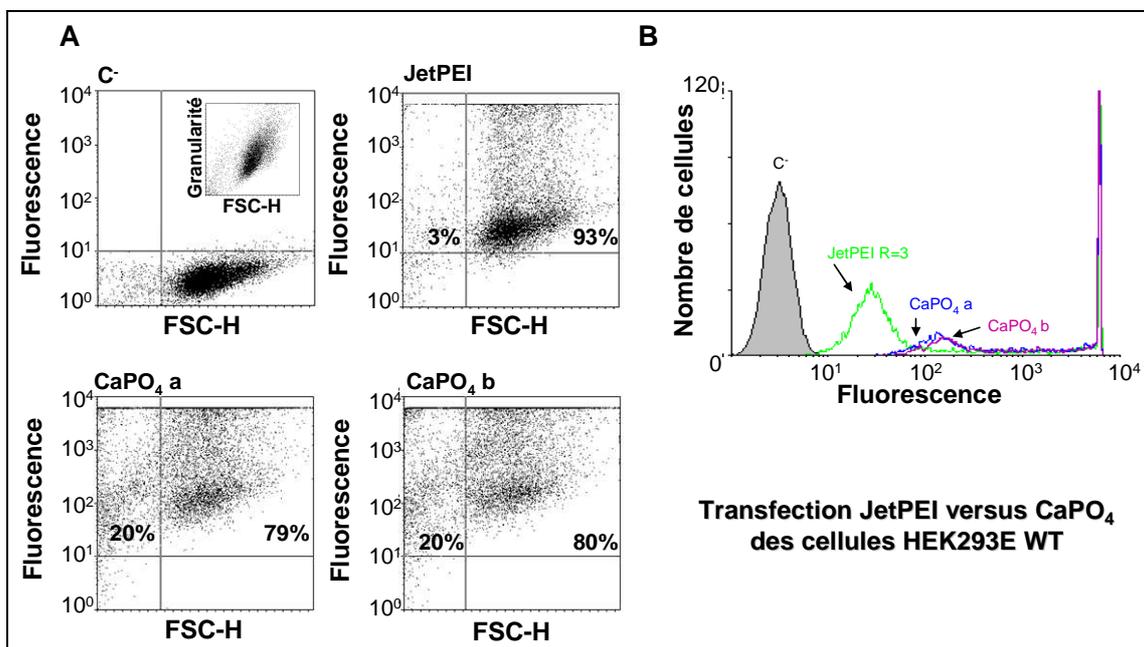


Figure 37. Comparaison par FACS de l'efficacité de transfection entre le JetPEI™ et le phosphate de calcium sur les cellules HEK293E. Les cellules HEK293E ont été transfectées avec le plasmide pTT-eGFP avec le rapport ADN/transfectant R=3 pour le JetPEI™ ou avec le phosphate de calcium. La fluorescence des cellules est ensuite analysée au FACS 24h après la transfection. **A)** Représentation en nuage de point de la fluorescence de l'eGFP surexprimée en fonction de la taille des cellules. Le petit encart indique l'état des cellules et représente la granularité en fonction de la taille des cellules. **B)** Représentation sous forme d'histogramme du nombre de cellules en fonction de la fluorescence de l'eGFP surexprimée. C-, cellules non transfectées; R, ratio ADN/JetPEI™; CaPO₄, phosphate de calcium; a, 10µg d'ADN; b, 25µg d'ADN.

Ainsi, nous avons opté pour l'utilisation du JetPEI™ avec un ratio de 3 pour la transfection des cellules HEK293E.

II.B Etude de l'activité NADPH oxydase de Nox4 après transfection transitoire des cellules HEK293E

Une fois les conditions optimales de transfection déterminées, nous avons évalué l'activité NADPH oxydase de Nox4. Pour cela, nous avons transfecté les cellules HEK293E de manière transitoire avec le plasmide pEF6/V5-His Nox4A. L'activité de Nox4 est mesurée par chimiluminescence en présence du luminol un jour, deux jours et trois jours après la transfection. Quelque soit la technique de transfection utilisée (JetPEI™ et Effectene®), les résultats sont équivalents. On peut voir sur la *figure 38* que la protéine Nox4A surexprimée dans les cellules HEK293E est active comparativement aux cellules non transfectées. Cette activité est constitutive et est observée dès le premier jour après la transfection. Elle décroît ensuite de manière linéaire en fonction du temps.

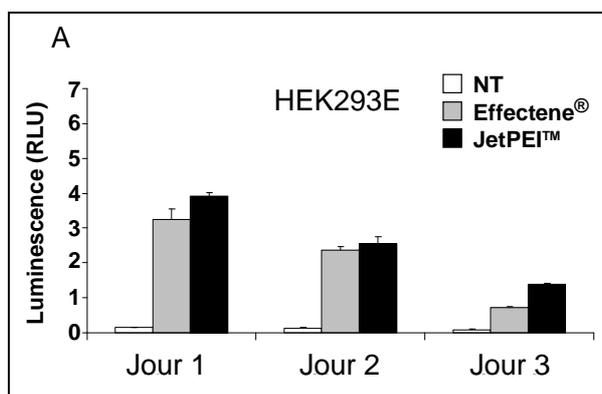


Figure 38. Activité NADPH oxydase des cellules HEK293E transfectées par le JetPEI™ ou l'Effectene® avec le plasmide pEF6/V5-His Nox4A. A) Une série de transfactions ont été réalisées en duplicata. Les cellules HEK293E transfectées sont traitées par la trypsine, lavées puis 5×10^5 cellules sont incubées dans 250 μ L de milieu expérimental contenant la horseradish peroxydase (HRP) et du luminol pour la mesure de chimiluminescence. Les valeurs sont exprimées en unités relatives de luminescence (RLU) et correspondent à la somme sur 90min des mesures à raison d'une mesure toutes les minutes. NT, cellules non transfectées.

II.C Etude de l'activité oxydase de Nox4 après transfection stable dans des cellules HEK293E

Les cellules HEK293E sont transfectées avec les plasmides pEF6/V5-His permettant la surexpression de Nox4A et de Nox4B fusionnées ou non avec une étiquette V5/His. L'expression des protéines est maintenue grâce à une sélection par la blasticidine (5 μ g/mL) pendant trois semaines. Les cellules sont par la suite toujours cultivées en présence de blasticidine pour conserver la sélection.

La vérification de l'expression des protéines codées par les plasmides transfectés a été réalisée à différents niveaux :

- transcrit
- activité oxydase
- protéine

II.C.1 Analyse des transcrits des cellules HEK293E natives ou transfectées par RT-PCR (transfection stable)

II.C.1.1 RT-PCR semi-quantitative

La surexpression des transcrits de Nox4 dans les cellules HEK293E est contrôlée par RT-PCR. Une fois sélectionnées par la blasticidine, les cellules sont lysées et les ARN totaux sont extraits par la technique du phénol/chloroforme (kit d'extraction Trizol[®]). 5µg d'ARN sont utilisés pour la réaction de la transcriptase inverse (RT) et deux couples d'amorces pour la PCR (*figure 39, C*):

- Un couple d'amorce (1) interne de Nox4 va amplifier aussi bien le transcrit de Nox4 endogène que le transcrit issu du plasmide. La surexpression est observée par rapport aux cellules non transfectées (WT).
- Un couple d'amorce (2) avec une amorce anti-sens V5 uniquement présent sur le transcrit possédant l'étiquette V5/His ; donc seuls les transcrits de Nox4 issu de ce plasmide seront amplifiés.

On remarque tout d'abord que les cellules HEK293E n'expriment pas constitutivement les transcrits de Nox1, ni ceux de Nox2. On remarque aussi que le niveau de l'ARNm de p22-phox demeure inchangé dans les différents types cellulaires (*figure 39, A*).

On voit aussi sur la *figure 39 (A)* que l'amplification de l'ARNm de Nox4 par le couple d'amorce 1 est plus forte dans les cellules sur-exprimant Nox4 par rapport aux cellules natives. La présence des ARNm codant pour les protéines Nox4A-V5/His et Nox4B-V5/His est révélée par l'utilisation d'amorces spécifiques de l'étiquette (2). On observe ainsi, une

bande à 940pb pour l'ARNm de Nox4AV5/His et une bande plus basse à 820pb pour l'ARNm de Nox4BV5/His du à l'épissage de l'exon 14 (120pb) (figure 39, B).

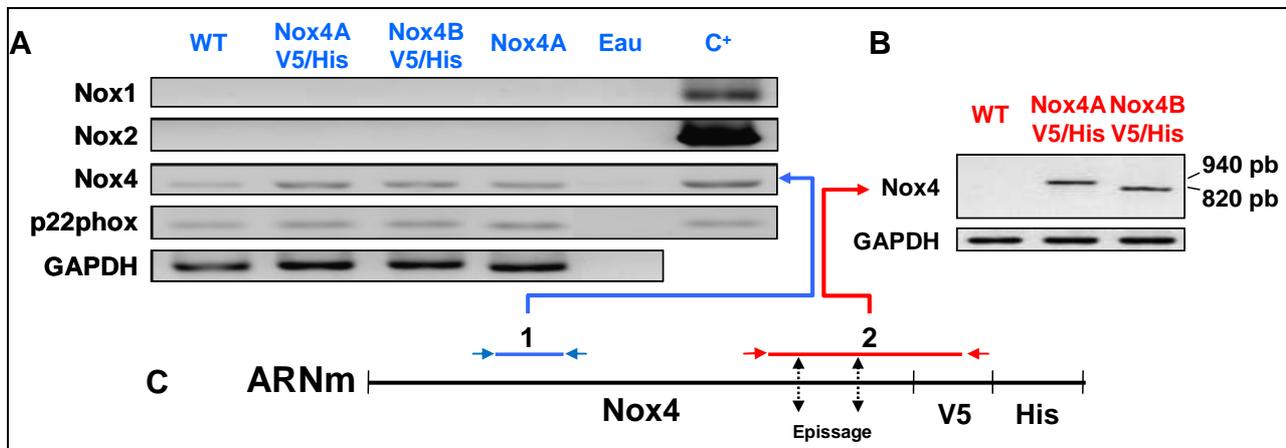


Figure 39. RT-PCR semi-quantitative des cellules HEK293E natives (WT) et sur-exprimant Nox4. 5µg d'ARN totaux sont utilisés pour la réaction de transcription inverse et la PCR a été réalisée avec les amorces indiquées dans le tableau en annexe. **A)** Le couple d'amorces n°1 amplifie l'ARNm de Nox4 endogène et issu du plasmide d'expression (600pb). Les contrôles positifs (C⁺) ont été réalisés en utilisant un plasmide codant pour le gène correspondant. **B)** Le couple d'amorces n°2 amplifie l'ARNm de Nox4 étiqueté par la séquence V5/His donc issu du plasmide. Le couple d'amorces n°2 amplifie un fragment de 940pb pour Nox4AV5/His et un fragment de 820pb pour Nox4BV5/His. **C)** Représentation de la disposition des couples d'amorces n°1 et 2 sur l'ARNm de Nox4.

On a pu ainsi par cette approche mettre en évidence une augmentation des transcrits de Nox4 dans les cellules HEK293E issus du plasmide codant pour les protéines Nox4. Contenu de ces informations uniquement qualitatives, nous avons réalisé des expériences de RT-PCR en temps réel pour quantifier l'ARNm de Nox4.

II.C.1.2 RT-PCR en temps réel

La technique de RT-PCR en temps réel permet d'estimer de manière instantanée la quantité relative d'un transcrite en comparaison avec celui d'un gène de ménage, ici la GAPDH. Le principe et la mise au point de la technique sont expliqués dans l'annexe 2. Les résultats, après normalisation avec la GAPDH sont illustrés sur la figure 40.

Les amorces conçues permettent aussi bien d'amplifier les transcrits de l'isoforme Nox4A que Nox4B. La présence de l'ARNm de Nox4 endogène est retrouvée dans les cellules HEK293E WT à un niveau très faible en comparaison avec celui de l'ARNm de la GAPDH (0,0008). Le niveau d'expression des transcrits de Nox4 est fortement augmenté (de 250 à 500 fois plus) dans les cellules transfectées par rapport aux cellules natives (figure 40).

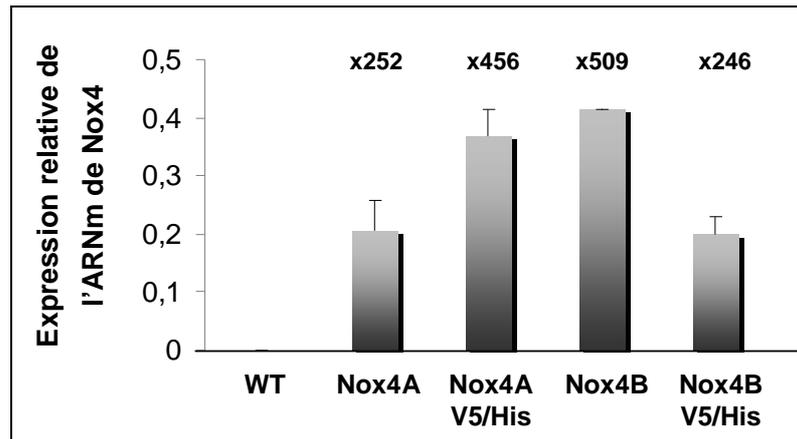


Figure 40. RT-PCR en temps réel de Nox4 dans les cellules HEK293E natives (WT) ou surexprimant Nox4A, Nox4AV5/His, Nox4B et Nox4BV5/His. 5 μ g d'ARN totaux sont utilisés pour la réaction de transcription inverse et la PCR a été réalisée avec le couple d'amorces qNox4F/qNox4R indiquées dans le tableau en annexe 1. La quantité relative de d'ARNm de Nox4 est obtenue par le rapport ARNm de Nox4 sur l'ARNm de la GAPDH (gène de ménage). Les chiffres au dessus des barres représentent l'augmentation du nombre de transcrits dans les cellules transfectées par rapport aux cellules natives.

Ceci est en accord avec les résultats de RT-PCR semi-quantitative. L'augmentation n'est pas la même pour tous les ARNm de Nox4. Il y a deux fois plus de transcrits de Nox4AV5/His et de Nox4B que de Nox4A et Nox4BV5/His.

II.C.2 Activité NADPH oxydase dans les cellules HEK293E natives ou surexprimant Nox4 (transfection stable)

5x10⁵ cellules HEK293E natives ou surexprimant de manière stable Nox4A ou Nox4A-V5/His et Nox4B ou Nox4B-V5/His sont utilisées pour les mesures de chimiluminescence réalisées en présence de luminol (*figure 41 ; A*). Les résultats sont les suivants:

1. Les cellules HEK293E natives (WT) possèdent une activité endogène très faible et difficilement mesurable.
2. L'activité NADPH oxydase mesurée avec les cellules surexprimants Nox4A est supérieure (75 fois) à celles des cellules natives.
3. La présence d'une étiquette V5/His en position C terminale diminue d'environ 28% l'activité oxydase mesurée.
4. La protéine Nox4B est inactive ce qui est corrélé avec l'absence du premier site de fixation du NADPH [Goyal et al, 2005].

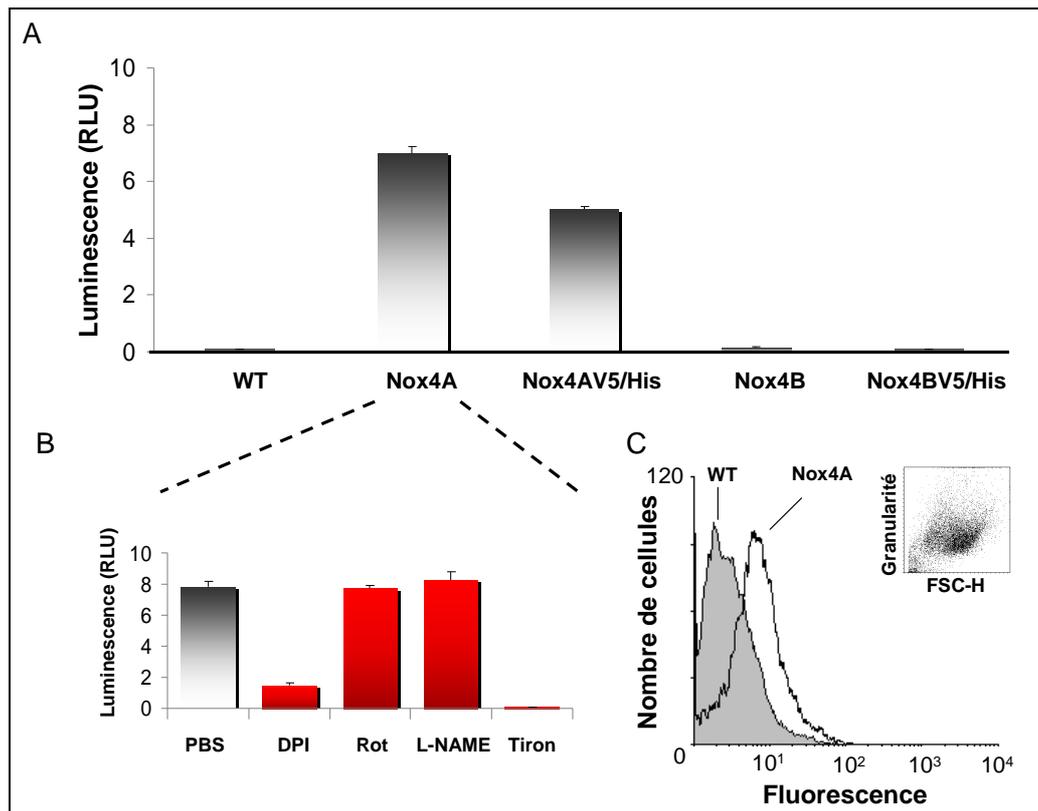


Figure 41. Activité NADPH oxydase dans les cellules HEK293E natives ou transfectées par les différents plasmides pEF6/V5-His codant pour Nox4A, Nox4AV5/His, Nox4B et Nox4BV5/His. A) et B) Mesure de l'activité NADPH oxydase par le luminol. Les cellules sont traitées par la trypsine, lavées puis 5×10^5 cellules sont incubées dans 250 μ L de milieu expérimental contenant la horseradish peroxydase (HRP) et du luminol pour la mesure de chimiluminescence. Les valeurs sont exprimées en unités relatives de luminescence (RLU) et correspondent à la somme sur 90min des mesures à raison d'une mesure toutes les minutes. Les inhibiteurs utilisés sont : DPI, diphenyleneiodonium 10 μ M; Rot, roténone 1 μ M; L-NAME 100 μ M; Tiron 0,5 μ M. C) Mesure de l'activité NADPH oxydase par le dihydroéthidium (DHE). 10^7 cellules/mL sont incubées dans du PBS avec 5 μ M de DHE pendant 20min à 37°C à l'abri de la lumière. Ensuite, la fluorescence des cellules est analysée par cytométrie en flux. Représentation sous forme d'histogramme de la fluorescence des cellules. Le petit encart indique l'état des cellules et représente la granularité en fonction de la taille des cellules.

L'activité NADPH oxydase de Nox4A observée est donc confirmée par la mesure de la quantité de $O_2^{\bullet -}$ (ions superoxydes) produits en utilisant une sonde fluorescente, le dihydroéthidium (DHE), sensible aux anions superoxyde (*figure 41 ; C*). La spécificité de l'activité oxydase de Nox4A a été analysée à l'aide d'inhibiteurs connus comme le tiron qui piège les ions superoxydes, la roténone et la L-NAME qui inhibent respectivement la chaîne respiratoire mitochondriale et la NO synthase (nitric oxide synthase) et qui dans ce contexte sont sans effet. Seul le DPI, inhibiteur des flavoprotéines (dont fait partie Nox4), abaisse l'activité oxydase (*figure 41 ; B*). L'ensemble de ces observations est donc en faveur d'une production d' $O_2^{\bullet -}$ par Nox4A.

II.C.3 Mise en évidence de l'expression de la protéine Nox4

II.C.3.1 Par l'utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine Nox4

Dans cette partie, nous avons utilisé deux sortes d'anticorps : un anticorps monoclonal 54.1 (PKIAVDGP) spécifique de Nox2 mais reconnaissant un épitope commun à Nox2 et Nox4 et un anticorps polyclonal 503/504 (produit au laboratoire) dirigé contre la deuxième boucle inter-membranaire de Nox4 (résidus ⁸⁸KVPSRRTRRLDKSR¹⁰²) [Pedruzzi et al, 2004]. L'anticorps 54.1 marque la protéine Nox4 recombinante purifiée [Baniulis et al, 2005]. Ces anticorps ont été dans un premier temps validés sur des protéines recombinantes tronquées construites à partir de l'ADN complémentaire codant pour Nox4 et produites par induction bactérienne (§III.B.1 Matériels et méthodes) ou par un système de traduction *in vitro* (RTS[®]) (§III.B.2 Matériels et méthodes) (figure 42).

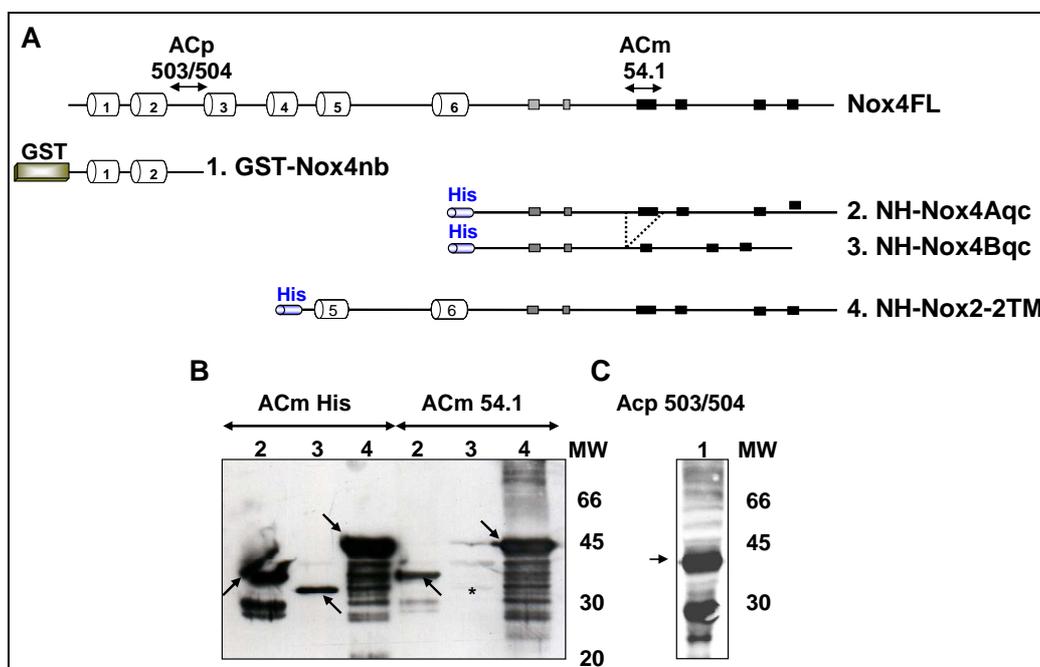


Figure 42. Validation de l'anticorps monoclonal (ACm) 54.1 et de l'anticorps polyclonal (ACp) 503/540 sur différentes constructions de Nox4 recombinant. **A)** Schéma des différentes protéines recombinantes utilisées. La protéine GST-Nox4nb est produite dans les bactéries BL21(λ DE3). Les protéines NH-Nox2-2TM, NH-Nox4Aqc et NH-Nox4Bqc sont synthétisées par le système de traduction *in vitro* (RTS[®]). La protéine NH-Nox2-2TM a été fournie par Bruno Marques (laboratoire Human Protein Therapy). **B)** Expériences de western blot en présence des anticorps 54.1 (1:1000) et anti-histidines couplé à la HRP (Horseradish peroxydase) (1:5000). Les protéines recombinantes sont ajoutées (5 μ L) successivement : piste 2, NH-Nox4Aqc ; piste 3, NH-Nox4Bqc et piste 4, NH-Nox2-2TM et sont indiquées sur le gel par une flèche. *, absence de marquage de NH-Nox4Bqc par l'anticorps monoclonal 54.1. **C)** Expériences de western blot réalisées à partir des protéines recombinantes GST-Nox4nb en présence de l'anticorps polyclonal 503/504 (1:1000). Nomenclature des protéines: NH indique que la protéine contient une étiquette histidine en position N terminale ; qc désigne la queue cytosolique ; TM, pour passage transmembranaire et nb correspond à la partie N terminale de Nox4 jusqu'à la deuxième boucle inter-membranaire de Nox4 (boucle b). MW, marqueur de poids moléculaire.

Les résultats montrent que les deux types d'anticorps 54.1 et 503/504 marquent ces constructions en western blot à l'exception de NH-Nox4Bqc qui ne possède pas l'épitope pour l'anticorps monoclonal 54.1 (*figure 42 ; B*).

Nous n'avons obtenu aucun résultat positif sur les cellules entières HEK293E natives ou surexprimant Nox4.

II.C.3.2 Par l'utilisation d'outils de détection ciblés sur les étiquettes V5, histidine et FIAsH ajoutées en position C terminale de la protéine Nox4.

Dans cette partie, nous avons utilisé les anticorps monoclonaux du commerce anti-V5 (Invitrogen) et anti-histidine couplés à la HRP (Horseradish péroxydase) (Sigma) ainsi que le système de détection Lumio™ (§III.E.2.4.2 Matériels et méthodes). Le choix de ces étiquettes a été motivé par leur petite taille pour ne pas interférer avec l'activité NADPH oxydase de Nox4. Une étiquette comme la eGFP annule quasiment l'activité de Nox4 [Martyn et al, 2006]. La protéine recombinante NHS-Nox4AqcFIAsH a été produite dans les bactéries BL21(λDE3) est marquée par le système Lumio® (détection de l'étiquette FIAsH) (*figure 43 ; B*).

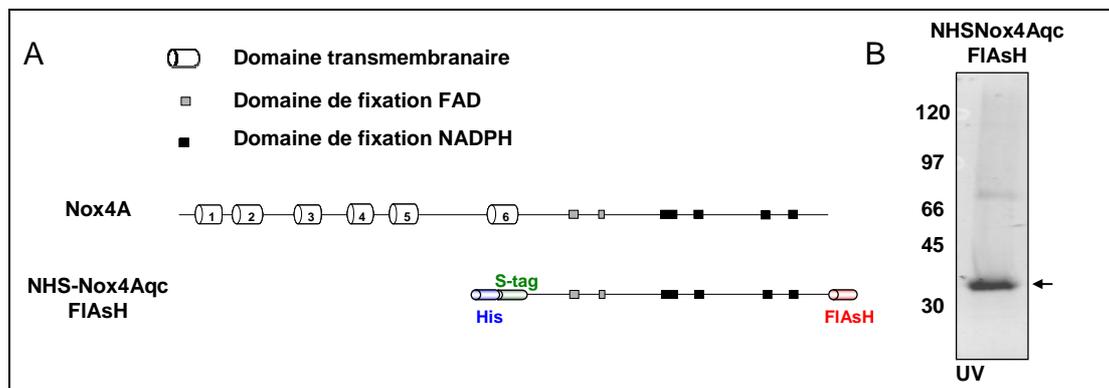


Figure 43. Validation du réactif Lumio® pour la détection de l'étiquette FIAsH sur la protéine recombinante NHS-Nox4AqcFIAsH. **A)** Schéma de la protéine NHS-Nox4AqcFIAsH recombinante. Cette protéine est produite dans les bactéries BL21(λDE3) et sert de contrôle positif pour la révélation par le réactif Lumio®. **B)** Révélation de la protéine NHS-Nox4AqcFIAsH par le système Lumio™ dans un gel SDS-PAGE soumis à la lumière Ultraviolette (UV). La flèche montre la position de la bande correspondant à la protéine NHS-Nox4AqcFIAsH. Nomenclature des protéines: NHS indique que la protéine contient une étiquette histidine et S tag en position N terminale.

La surexpression stable des protéines Nox4AFIAsH et Nox4AFIAsH-V5/His a été réalisée en parallèle à celles de Nox4AV5/His dans les cellules HEK293E (§II.A.3.2

Résultats II). La mesure de l'activité NADPH oxydase dans ces cellules montre que Nox4 possédant l'étiquette FIAsh produit des ions O_2^\ominus (figure 44 ; B). On remarque comme précédemment (§II.A.3.2 Résultats II) que l'étiquette V5/His diminue l'activité oxydase mesurée (environ 20%).

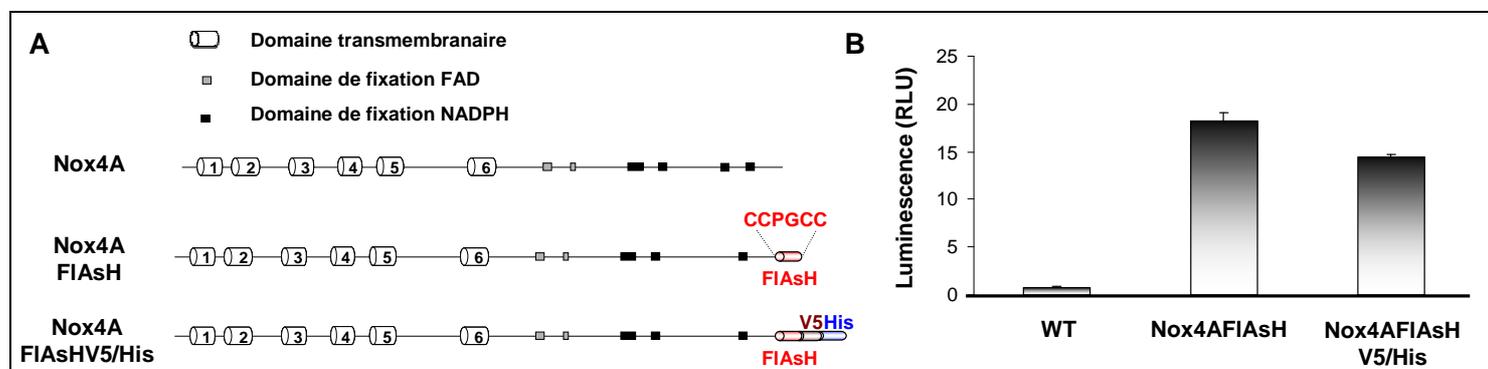


Figure 44. Activité NADPH oxydase dans les cellules HEK293E natives (WT) ou transfectées de manière stable par les différents plasmides pEF6/V5-His codant pour Nox4AFIAsh et Nox4AFIAshV5/His. **A)** Schéma des protéines Nox4 fusionnées à l'étiquette FIAsh surexprimées dans les cellules HEK293E. **B)** Mesure de l'activité NADPH oxydase des cellules HEK293E natives ou surexprimant Nox4AFIAsh ou Nox4AFIAshV5/His. Les cellules sont traitées par la trypsine, lavées puis 5×10^5 cellules sont incubées dans 250 μ L de milieu expérimental contenant la horseradish peroxydase (HRP) et du luminol pour la mesure de chimiluminescence. L'activité NADPH oxydase est mesurée par chimiluminescence en présence du luminol. Les valeurs sont exprimées en unités relative de luminescence (RLU) et correspondent à la somme sur 90min des mesures à raison d'une mesure toutes les minutes.

La caractérisation de la protéine Nox4 portant les étiquettes V5, poly-histidines et FIAsh par les anticorps anti-V5, anti-histidines ou par le système Lumio™ ne donne pas de résultats probants ni sur des extraits de protéines totaux (1% Triton X-100), ni sur les protéines contenues dans la fraction membranaire (obtenue après ultracentrifugation), ou dans les radeaux lipidiques (obtenus par ultracentrifugation du lysat traité au triton X-100 ; au niveau desquels serait localisée Nox4 [Hilenski et al, 2004]), et ni dans les fractions protéiques purifiées à l'aide de billes magnétiques couplés au nickel (MagneHis®, Proméga) (§III.C.1.2.3 Matériels et méthodes).

II.C.4 Interaction entre la protéine Nox4 et p22phox

Nox4 surexprimée développe une activité NADPH oxydase dans les cellules HEK293E qui expriment les transcrits des deux sous-unités d'un cytochrome de type *b* : Nox4 (isoforme de gp91phox) et p22phox (§II.A.3.2 figure 41, A Résultats II). Aucun autre partenaire n'a été à ce jour identifié de manière formelle. Nous avons analysé les conséquences d'une surexpression de Nox4 sur la régulation de l'expression du gène de p22phox.

L'influence au niveau transcriptionnel de p22phox est montrée sur la *figure 45 (A)*. Les résultats de RT-PCR en temps réel de p22-phox effectuée sur les différentes cellules de notre étude ne révèlent aucune différence significative du niveau d'expression de l'ARNm de p22-phox. Ainsi, la surexpression de Nox4 n'a pas de répercussion sur l'intensité de la transcription du gène p22-phox dans les cellules HEK293E. On observe par ailleurs que l'ARNm de p22phox est présent en grande quantité avec un rapport ARNm de p22phox/ARNm de la GAPDH égal à 2 (c'est-à-dire qu'il y a deux fois plus de transcrite de p22phox que de celui de la GAPDH).

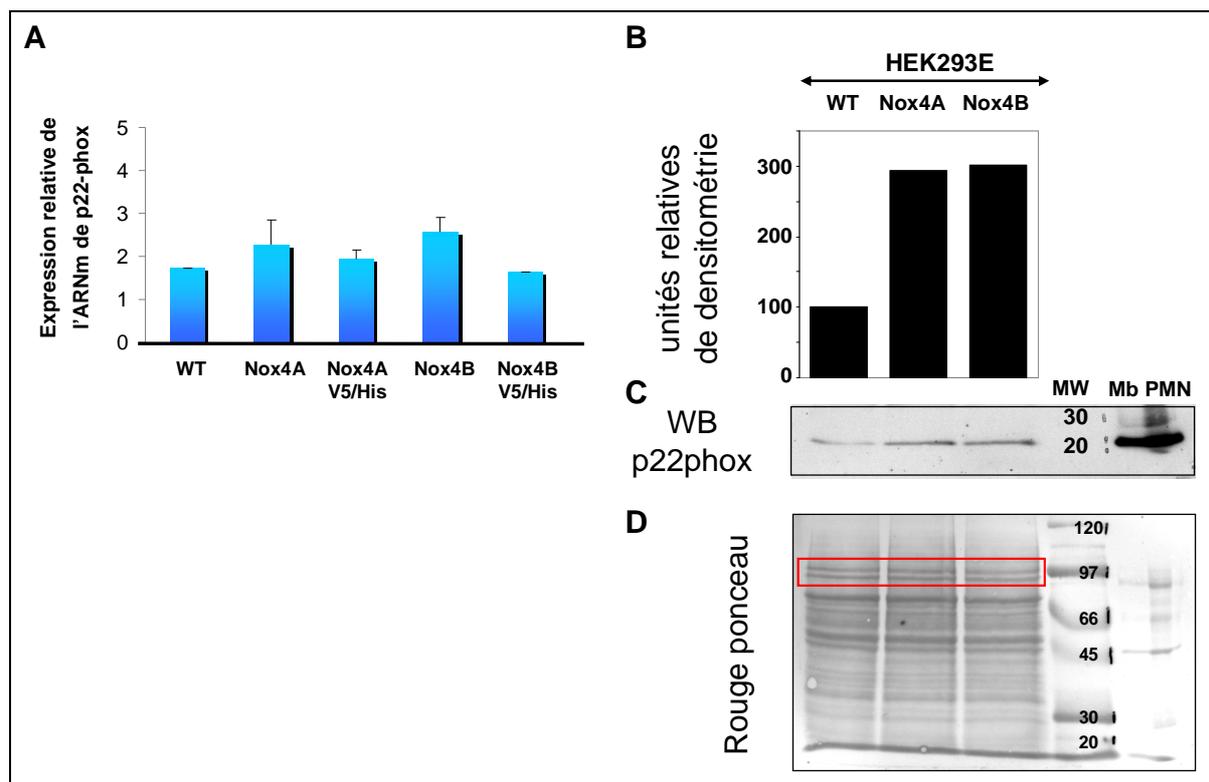


Figure 45. Relation entre la protéine Nox4 et p22phox. **A)** Analyse du taux des transcrits de p22phox. RT-PCR en temps réel de p22phox dans les cellules HEK293E natives (WT) ou surexprimant Nox4A, Nox4AV5/His, Nox4B et Nox4BV5/His. La quantité relative de d'ARNm de p22phox est obtenue par le rapport ARNm de p22phox/ARNm de la GAPDH (gène de ménage). **B) C) et D)** Stabilisation de la protéine p22phox par Nox4. Les cellules natives ou surexprimant Nox4A ou Nox4B sont lysées dans un tampon RIPA (radioimmunoprecipitation assay : PBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 μ M TLCK, 1,8 μ M leupeptine, 1,5 μ M pepstatine). 100 μ g de chaque extrait protéique sont déposés sur un gel SDS-PAGE. **C)** Western blot avec l'anticorps monoclonal 16G7 dirigé contre p22phox des extraits protéique des cellules HEK293E natives (WT), surexprimant Nox4A ou Nox4B. **B)** Le graphique représente la quantification relative de la densité des bandes correspondant à p22phox (western blot) normalisée avec la densité de deux bandes majoritaires colorées au rouge ponceau de la même membrane (encadrées) **(D)**. Les mesures densitométriques ont été réalisées avec le programme Scion Image (Scion Corporation). MW, marqueur de poids moléculaire.

La protéine p22phox est nécessaire au fonctionnement de la protéine Nox4 et l'interaction entre ces deux protéines est très étroite et participe à leur stabilisation mutuelle.

Nous avons utilisé un anticorps monoclonal développé et validé au laboratoire dirigé contre la protéine p22phox, le 16G7 (Y. Champion, article en préparation). Les résultats d'immunomarquage montrent que la quantité de protéines p22phox est plus importante dans les cellules surexprimant Nox4A ou Nox4B que dans les cellules natives (WT) (*figure 45, B, C et D*).

Cette augmentation résulte d'un phénomène post-transcriptionnel puisqu'elle est indépendante de la quantité d'ARNm de p22phox (constante dans les 3 types cellulaires). Ceci suggère une stabilisation de la protéine p22phox par la surexpression de Nox4A et de Nox4B. La dépendance entre les protéines Nox et p22phox a été rapporté pour la protéine Nox2, Nox3 et également Nox4 [Zhu et al, 2006 ; Nakano et al, 2007 ; Ambasta et al, 2004 ; Hilenski et al, 2004 ; Martyn et al, 2006]. L'augmentation de l'expression de la protéine p22phox en réponse à la surexpression de Nox4A et de Nox4B suggère de manière indirecte la présence des protéines Nox4A et Nox4B dans les cellules transfectées.

Conclusions : Activité NADPH oxydase de Nox4 dans le modèle d'étude cellulaire

Dans cette partie, nous avons pu mettre en évidence que :

- *La protéine Nox4A surexprimée dans les cellules HEK293E est capable de générer constitutivement des dérivés réactifs de l'oxygène.*
- *La présence d'une étiquette de petite taille diminue l'activité de Nox4A sans pour autant l'annuler.*
- *L'isoforme Nox4B ne possède pas la capacité de produire des ROS du à l'absence du premier site de fixation du NADPH.*
- *Il n'a pas été possible de révéler la présence de la protéine Nox4 directement avec l'anticorps monoclonal 54.1 et l'anticorps polyclonal (503/504) dans les cellules entières.*
- *La surexpression des protéines Nox4A ou Nox4B entraîne une augmentation d'expression de la protéine p22phox vraisemblablement par un phénomène de stabilisation respective des deux sous unités.*

III Etude de l'activité diaphorase de Nox4 reconstituée dans un milieu acellulaire

Le mécanisme de production des ions superoxyde par les NADPH oxydases se caractérise par un transfert successif d'électrons provenant du donneur initial, le NADPH, jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène. Différents acteurs interviennent dans ce transfert, le FAD reçoit les électrons provenant du NADPH, puis les transmet aux hèmes (coordinés par les histidines présentes dans les 3^{ème} et 5^{ème} passages transmembranaires), électrons qui à leur tour vont réduire l'oxygène. Le domaine correspondant à la queue cytosolique de Nox2 est capable supporter une activité diaphorase observable par la réduction de différents accepteurs d'électrons comme le NBT, le cytochrome c ou l'INT. Aucune donnée n'existe à l'heure actuelle concernant l'activité diaphorase de la queue cytosolique de Nox4.

La protéine Nox4 n'a encore jamais été isolée probablement compte tenu des très faibles quantités exprimées mais aussi parce que la localisation subcellulaire n'est pas parfaitement définie. Nous nous sommes donc orientés vers la production de Nox4 recombinant en système bactérien. L'étude fonctionnelle de Nox4 nécessite la production de protéines solubles ce qui n'a à ce jour jamais été réalisé pour aucune Nox à l'exception de Nox2 [Marques et al, 2007]. Une des difficultés majeures pour l'obtention de protéines solubles réside dans le fait que la protéine Nox4 possède de nombreuses régions hydrophobes et la production en masse de ces protéines peut aboutir à la synthèse de corps d'inclusion provenant de phénomènes d'agrégation par interactions hydrophobes. Nox4 possède 6 passages transmembranaires (homologie avec Nox2) avec une région au niveau de la queue cytosolique (entre l'acide aminé 425 et 445) prédite comme fortement hydrophobe par la quasi-totalité des programmes analysés (TMHMM, PRED-TMR, DAS, PHD, SOSUI, TMPred, HMMTOP et TopPred).

La production de ces protéines a été abordée selon deux approches parallèles :

1. La première approche utilise le système d'induction de la synthèse protéique par l'IPTG des bactéries *E.coli*. Cette partie du travail a été conduite en collaboration avec le docteur Nicolas Mouz de la société de biotechnologie Protéin'eXpert. Cette société possède une grande expertise dans le champ de la production de protéines recombinantes fonctionnelles à des fins thérapeutiques.

2. La deuxième approche utilise un système de traduction *in vitro* (RTS[®], Roche) à partir d'un lysat bactérien. Cette partie a été réalisée en collaboration avec le docteur Jean-Luc Lenormand (laboratoire Human Protein Therapy, partenaire du GREPI). Ce laboratoire travaille sur la délivrance cellulaire de protéines membranaires synthétisées par le système RTS[®] à des fins thérapeutiques.

Le caractère très hydrophobe de Nox4 nous a fait cibler notre travail sur des formes tronquées de la protéine Nox4 décrites dans la *figure 46*.

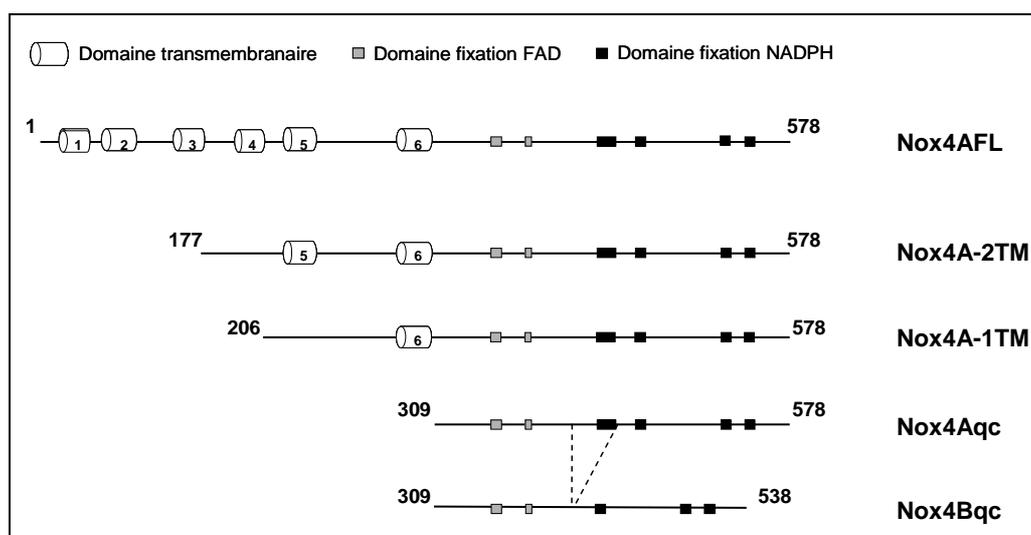


Figure 46. Schéma des protéines tronquées par rapport à la protéine Nox4A utilisées pour l'étude de l'activité diaphorase de Nox4. Trois protéines de longueurs différentes dérivent de l'isoforme Nox4A (Nox4A-2TM, Nox4A-1TM et Nox4Aqc) et une protéine Nox4Bqc de l'isoforme Nox4B.

Différents plasmides d'expression correspondant à des formes tronquées de Nox4 fusionnées à une étiquette poly-histidines ont été construits. Selon la position de l'étiquette et selon le système d'expression utilisé, les séquences ont été clonées dans les vecteurs pET30b, pIVEX 2.4 Nde ou pIVEX 2.3 MCS (§II.C.2.2.1 Matériels et méthodes).

III.A Production de formes tronquées de Nox4 en système bactérien

III.A.1 Constructions plasmidiques utilisées dans cette étude

Afin d'utiliser le système d'induction par l'IPTG, nous avons utilisé le plasmide pET30b qui possède un opérateur lactose régulé par la protéine LacI. Une étiquette poly-

histidines et un S tag ont été rajoutés du côté N terminal des protéines Nox4 (*tableau 6*). Ces plasmides codant pour les protéines Nox4-2TM, Nox4-1TM, Nox4Aqc et Nox4Bqc ont été introduits dans des souches bactériennes d'expression BL21(λ DE3).

Séquence de départ	Nom de la protéine	Position des acides aminés	Masse moléculaire kDa
Nox4A	NHS-Nox4A-2TM	177 à 578	52
	NHS-Nox4A-1TM	206 à 578	48
	NHS-Nox4Aqc	309 à 578	36
Nox4B	NHS-Nox4Bqc	309 à 538	32

Tableau 6. Description des protéines Nox4 fusionnées à la séquence poly-histidine et à un S tag en position N terminale. La séquence nucléotidique codant pour ces différentes protéines est clonée dans le vecteur d'expression bactérien pET30b (Novagen). Les masses moléculaires sont calculées à partir des séquences protéiques par le programme ProtParam (serveur internet ExPASy). Nomenclature : NHS, étiquette poly-histidine et S tag en position N terminale ; qc, queue cytosolique ; TM, transmembranaire.

Nous avons dans un premier temps focalisé nos travaux sur l'expression de la protéine NHS-Nox4Aqc et de son isoforme inactif NHS-Nox4Bqc.

III.A.2 Tests d'expression et de solubilité des protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc

Quatre conditions d'induction ont été évaluées pour chaque protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc : dans deux milieux (Luria-Bertani (LB) et autoinducteur (MAI)) et avec deux températures (17,5°C et 37°C) différents.

L'induction bactérienne est réalisée avec 1mM d'IPTG dans du LB ou automatiquement dans le MAI (milieu auto-inducteur). L'induction à 37°C est arrêtée après 3h (LB) ou 9h (MAI) et celle à 17,5°C après toute une nuit. Le culot est récupéré et lysé par sonication dans un tampon de lyse. Le surnageant après centrifugation à 10 000g est soumis à une deuxième centrifugation à 46 000g pendant 30min à 4°C ce qui permet de séparer la fraction contenant les protéines solubles (surnageant) des protéines insolubles (culot). Les échantillons correspondants à ces différentes fractions sont analysés sur gel SDS-PAGE après coloration au bleu de Coomassie et par western blot à l'aide d'un anticorps anti-histidine (*figure 47*).

Les protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc sont produites en utilisant les conditions d'inductions effectuées à 37°C avec du milieu LB ou MAI (*figure 47 ; A ; colonne 1, surnageant 10 000g*). La totalité des protéines produites est insoluble (*figure 47 ; A ; colonne 3 par rapport à la colonne 2, surnageant 46 000g*). La révélation avec un anticorps

anti-histidine aboutit aux mêmes constatations (figure 47 ; B). Une faible quantité de protéines solubles est observée seulement pour la protéine NHS-Nox4Bqc (figure 47 ; B et C ; condition MAI, 37°C ; colonne 3) mais cette proportion est trop faible pour être exploitable.

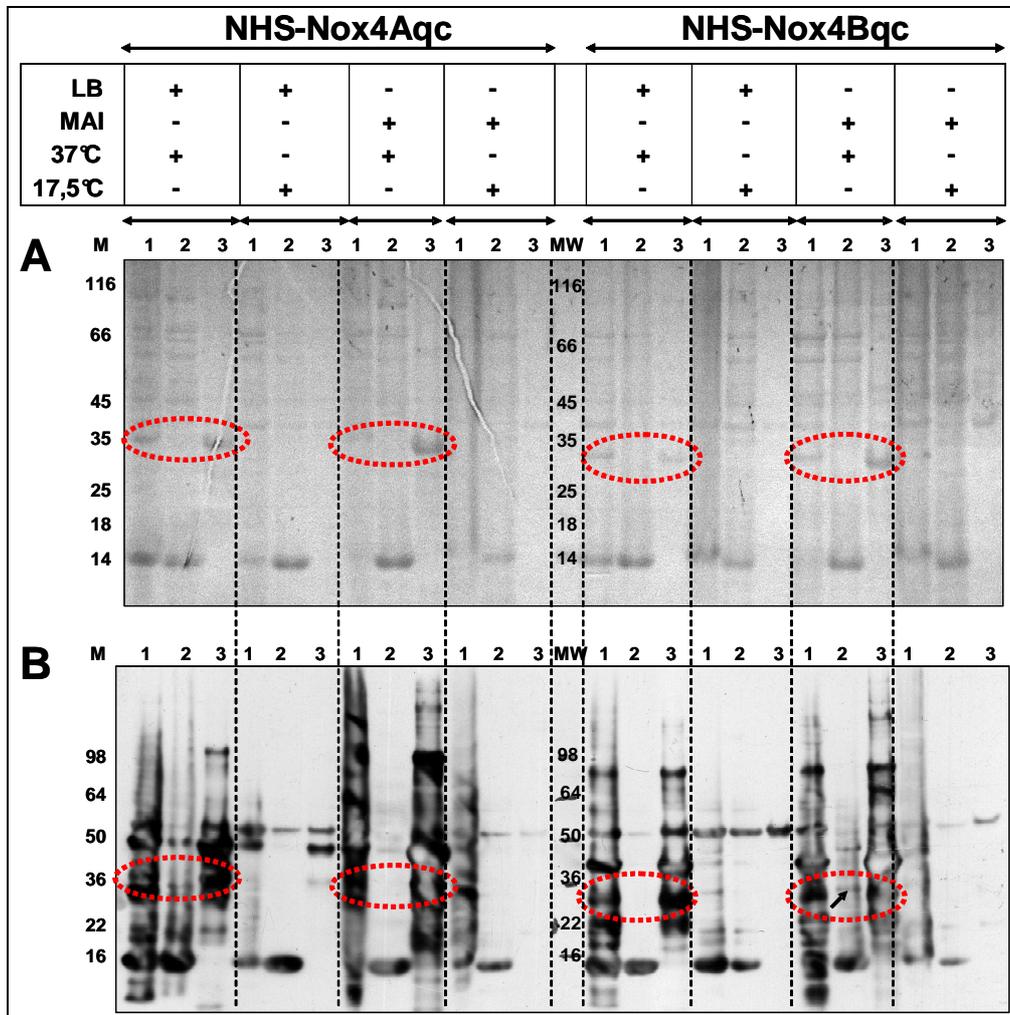


Figure 47. Tests d'expression et de solubilité du plasmide pET30b codant pour les protéines NHS-Nox4Aqc et de la protéine NHS-Nox4Bqc dans les bactéries BL21(λ DE3). La synthèse des protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc par les bactéries BL21(λ DE3) est réalisée selon quatre conditions, deux températures (37°C ou 17,5°C) et deux milieu de culture (LB ou MAI). Les bactéries sont lysées par sonication. Le surnageant 10 000g (1), 46 000g (soluble, 2) et les protéines insolubles (3) sont analysés sur Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (A) et par western blot (anticorps anti-histidines, 1:5000) (B). Les protéines d'intérêts sont entourées par un cercle en pointillé. La flèche indique la protéine NHS-Nox4Bqc dans la fraction soluble (induction MAI, 37°C). Les résultats sont rassemblés par groupe (1, 2 et 3) selon les conditions d'expression (tableau supérieur) LB à 37°C ou 17°C ; MAI à 37°C ou 17°C. MW, marqueur de poids moléculaire.

Nous avons ensuite déterminé les conditions dans lesquelles la protéine NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc peuvent être solubilisées (§III.C.1.1 Matériels et méthodes). Le culot de protéines insolubles est traité avec 4 tampons successivement : tampon de lyse contenant du NaCl 2M (NaCl), ou du Triton X-100 2% (Triton), ou d'urée 1M (1Urée), ou d'urée 8M (8Urée). La solubilisation dans chaque tampon s'effectue par incubation et

agitation par rotation à 4°C pendant 30min (ou une nuit pour l'urée 8M) suivie d'une centrifugation à 46 000g à 4°C pendant 30min pour recueillir les protéines solubles (surnageant) et insolubles (culot).

Les résultats illustrés sur la *figure 48* indiquent que les protéines Nox4Aqc et Nox4Bqc solubles se retrouvent essentiellement dans la fraction préparée avec le tampon de lyse et l'urée 8M (*figure 48 ; colonne 6*).

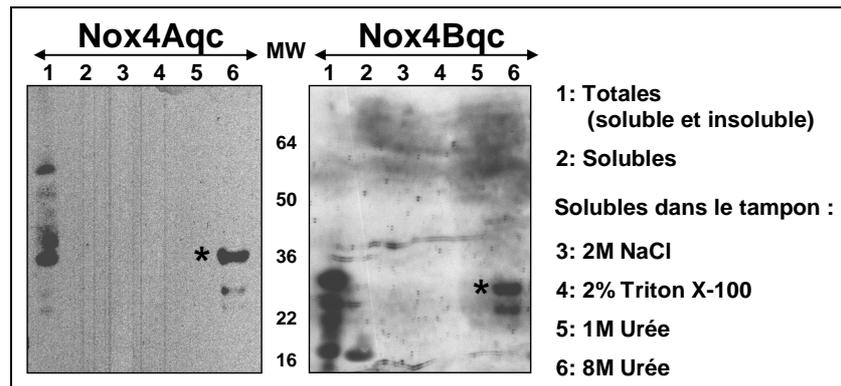


Figure 48. Fractionnement cellulaire et identification des protéines recombinantes NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc par western blot avec un anticorps anti-histidine. Les protéines totales (solubles et insolubles) (1) contenues dans le surnageant de centrifugation base vitesse du tampon de lyse (Tris 50mM pH 7,5, NaCl 100mM, EDTA 1mM, MgCl₂ 2mM, 10µM TLCK, 1,8µM leupeptine, 1,5µM pepstatine, lysosyme 1mg/mL) sont séparées en fraction soluble (2) et insoluble (46 000g). Les protéines insolubles sont traitées successivement avec le tampon de lyse dans lequel on ajoute du NaCl 2M (3), ou de Triton X-100 2% (4), ou d'Urée 1M (5) ou enfin d'Urée 8M (6). Anticorps anti-histidine (dilution 1:5000). *, indique les bandes correspondant à la protéine NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc. MW, marqueur de poids moléculaire.

Donc, les tests d'expression et de solubilité nous indiquent que les protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc sont produites par les bactéries BL21(λDE3) induites à 37°C dans du milieu LB ou MAI. Les protéines obtenues sont sous forme de corps d'inclusion. La solubilisation de ces protéines n'est possible que dans un tampon dénaturant contenant 8M d'urée. Cette fraction soluble sera utilisée pour la purification des protéines d'intérêt.

III.A.3 Production à grande échelle de corps d'inclusion et purification des protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc.

L'induction des protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc est réalisée dans un volume de 8L de MAI pendant 9h à 37°C. Le culot de bactéries induites est lysé et la fraction contenant les protéines insolubles est reprise par le tampon de lyse contenant 2M de NaCl puis en présence d'urée 8M (§II.B.1.2 Résultats II). Les protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc solubles dans l'urée 8M sont ensuite purifiées.

III.A.3.1 Purification de la protéine NHS-Nox4Aqc par affinité avec le nickel (Ni^{2+})

Les protéines solubles dans l'urée 8M vont être purifiées en conditions dénaturantes avec la résine Ni Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare). Tout le processus de purification est réalisé sur l'appareil BioLogic (BioRad) où différents paramètres (conductibilité et absorbance) sont monitorés (§III.C.1.2.2 Matériels et méthodes). L'éluion s'effectue selon un "gradient parfait" de concentration croissante d'imidazole. Dès l'apparition d'un pic d'absorbance, la concentration en imidazole est maintenue constante jusqu'à la disparition complète de ce pic, puis le gradient se poursuit. Ceci permet d'isoler les protéines ayant différentes affinités avec le nickel.

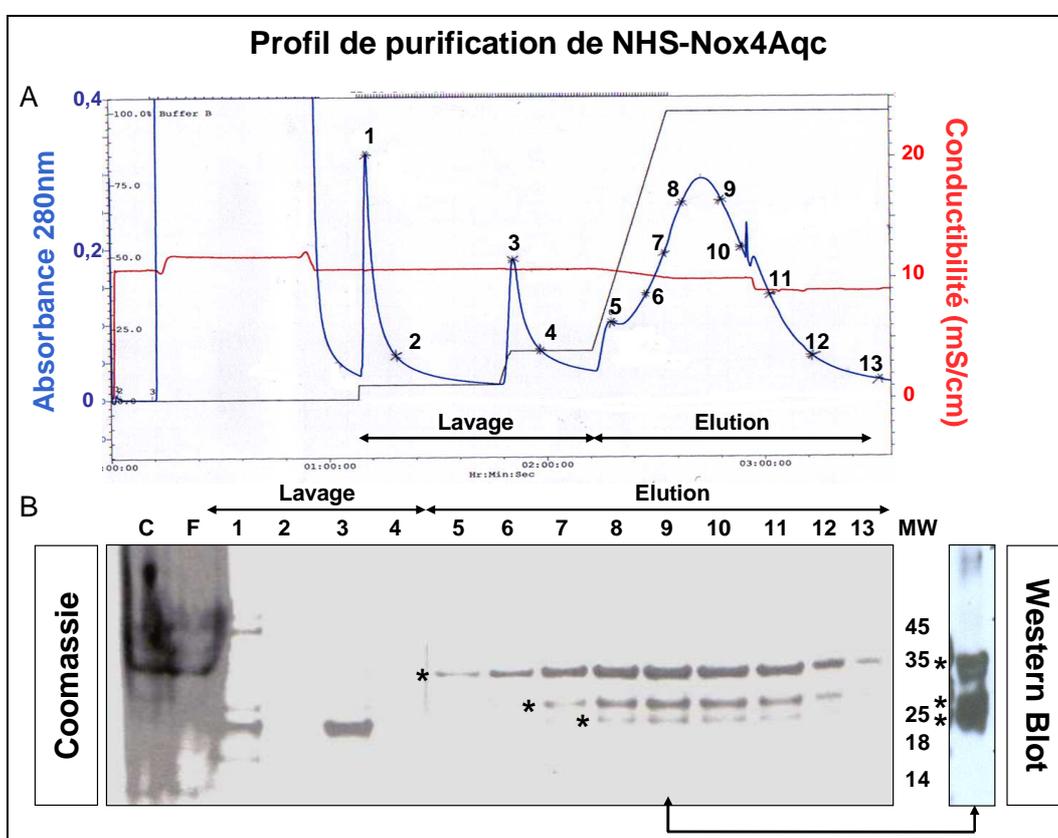


Figure 49. Purification par affinité avec le nickel des protéines NHS-Nox4Aqc solubilisées par l'urée 8M. **A)** Chromatogramme de la purification de la protéine NHS-Nox4Aqc réalisé sur l'appareil BioLogic. L'évolution de la purification est suivie en observant l'absorbance à 280nm et la conductibilité. On observe une forte augmentation de l'absorbance lors du chargement de l'échantillon à travers la colonne F (filtrat). L'étape de lavage permet d'éliminer les protéines contaminantes (pic 1 et 3). L'éluion est réalisée avec un gradient croissant de concentration d'imidazole (50mM à 1M). Les fractions à chaque étape de la purification sont récoltées. **B)** Analyse des différentes étapes de la purification par gel SDS-PAGE (coloration au bleu de Coomassie) et par western blot (anticorps anti-histidine, 1:5000). La fraction C correspond à l'échantillon servant pour le chargement de la colonne et contient les protéines NHS-Nox4Aqc solubilisées dans 8M d'urée. *, indique les bandes correspondant à la protéine NHS-Nox4Aqc. MW, marqueur de poids moléculaire.

Cependant, on observe des protéines de tailles inférieures dans l'éluât; leur profil d'éluion est compatible avec celui de produits de dégradation (même variation d'intensité que la protéine NHS-Nox4Aqc) ou à une synthèse incomplète.

III.A.3.2 Purification de la protéine NHS-Nox4Bqc par affinité avec le nickel

Le même protocole de purification a été utilisé pour la protéine NHS-Nox4Bqc.

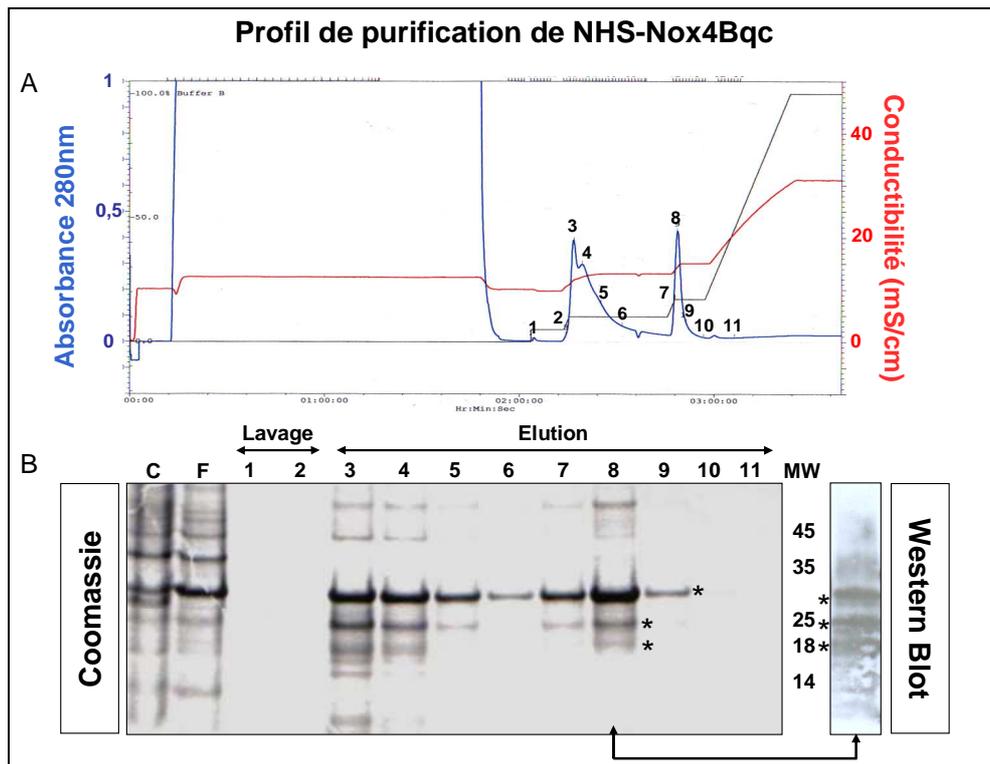


Figure 50. Purification par affinité avec le nickel des protéines NHS-Nox4Bqc solubilisées par l'urée 8M. **A)** Chromatogramme de la purification par affinité au Ni²⁺ de la protéine NHS-Nox4Bqc réalisé sur l'appareil BioLogic. L'évolution de la purification est suivie en observant l'absorbance et la conductibilité. On observe une forte augmentation de l'absorbance lors du passage de l'échantillon à travers la colonne (F, filtrat). L'éluion est réalisée avec un gradient croissant de concentration d'imidazole (50mM à 1M). Les fractions à chaque étape de la purification sont récoltées. **B)** Analyse des différentes étapes de la purification par gel SDS-PAGE (coloration au bleu de Coomassie et par western blot (anticorps anti-histidine, 1:5000)). La fraction C correspond à l'échantillon servant pour le chargement de la colonne et contient les protéines NHS-Nox4Bqc solubilisées dans 8M d'urée. *, indique les bandes correspondant à la protéine NHS-Nox4Bqc. MW, marqueur de poids moléculaire.

Le chromatogramme montre deux pics d'éluion vers 100mM et 200mM d'imidazole (figure 50 ; A ; pic 3 et 8). L'analyse sur gels SDS-PAGE des différentes fractions montre que les échantillons correspondant aux deux pics d'éluion contiennent la protéine NHS-Nox4Bqc intacte mais également ses formes dégradées ou incomplètes (coloration au bleu de Coomassie et par western blot) (figure 50 ; B). Nous sommes ici de nouveaux confrontés aux

mêmes problèmes de dégradation ou de synthèse incomplète déjà évoqués avec la protéine NHS-Nox4Aqc.

Afin de séparer les différentes formes des protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc, nous avons réalisé une étape de filtration sur gel (une colonne XK 26/60) après avoir rassemblé toutes les fractions d'élution. L'ensemble de ces protéines (intactes ou "dégradées") sortent de la colonne au même niveau (volume d'exclusion) et ne sont donc pas séparées.

III.A.4 Analyse des formes apparemment dégradées et obtenues à partir des protéines NHS-Nox4Aqc produites par les bactéries BL21(λ DE3)

La présence de formes dégradées peut survenir lors du traitement des protéines (lyse ou extraction) par des protéases bactériennes endogènes encore actives. Pour prévenir ce phénomène, le culot bactérien induit est directement lysé dans un tampon contenant l'urée 8M (tampon A-8M urée). La présence d'urée 8M permet de dénaturer et d'inactiver toutes les protéines libérées y compris les protéases. On évite alors par ce biais une dégradation de la protéine NHS-Nox4Aqc lors de la préparation de l'échantillon. La fraction de protéines solubles dans le tampon A-8M urée est alors purifiée comme décrit précédemment (§II.B.1.3.1 Résultats II).

Bien que les échantillons aient été traités en permanence avec 8M d'urée, on retrouve dans les fractions d'élution la protéine NHS-Nox4Aqc avec ses formes "parasites" de taille inférieure (*figure 51*). Ces autres formes sont donc déjà présentes dans la bactérie BL21(λ DE3).

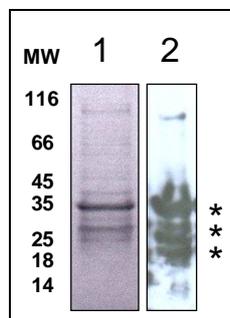


Figure 51. Purification par affinité avec le nickel des protéines NHS-Nox4Aqc solubilisées directement dans un tampon contenant l'urée 8M. Analyse de la fraction d'élution sur gel SDS-PAGE par coloration au bleu de Coomassie (**colonne 1**) et par western blot à l'aide d'un anticorps anti-histidine (**colonne 2**) des protéines NHS-Nox4Aqc solubles, extraites directement à partir des bactéries avec le tampon de lyse contenant l'urée 8M. *, indique les bandes correspondant à la protéine NHS-Nox4Aqc. MW, marqueur de poids moléculaire.

III.A.5 Interférence de groupes de codons rares dans l'expression protéique de Nox4

Une explication possible pour l'apparition de formes "parasites" est la traduction incomplète de l'ARNm par le ribosome. La synthèse de protéines eucaryotes par la bactérie peut selon la séquence nucléotidique de la protéine cible être délicate. La fréquence des codons portés par les ARNt varie fortement d'une espèce à l'autre. Certains d'entre eux sont très peu représentés au sein de la bactérie et correspondent à des codons dits rares [Wada et al, 1992]. Le pourcentage d'expression de ces ARNt bactériens est décrit dans le *tableau 7*.

Acide aminé	Arginine				Cystéine	Isoleucine	Leucine	Proline	Thréonine
	CGA	CGG	AGA	AGG					
Codon	CGA	CGG	AGA	AGG	UGU	AUA	CUA	CCC	ACA
%	0,3	0,5	0,2	0,2	0,4	0,4	0,3	0,4	0,1

Tableau 7. Représentation des principaux codons correspondants aux ARN de transfert faiblement exprimés dans les bactéries. Le pourcentage représente la moyenne de la fréquence d'utilisation de ce codon pour 100 codons [Wada et al, 1992].

En général, l'existence parsemée de ces codons rares au sein de la séquence nucléotidique influence peu la traduction. Par contre, le regroupement de plusieurs de ces codons peut provoquer un ralentissement voire une pause de la machinerie traductionnelle bactérienne. Deux conséquences peuvent découler de cette attente :

1. Un changement de la phase de lecture du ribosome ("frameshift") passant de la phase 0 à la phase +1. Dans ce nouveau cadre de lecture, la séquence protéique est complètement changée et la synthèse peut s'arrêter prématurément suite à l'apparition d'un codon stop. Tout ceci aboutit à une protéine aberrante et raccourcie à partir des codons rares. Ce phénomène a été décrit surtout pour un tandem de codon rares, AGG-AGG ou AGA-AGA [Spanjaard et van Duin, 1988]. Le décalage de phase de lecture est dû à la faible représentation des ARNt correspondants [Spanjaard et al, 1990]. Cette situation est aggravée si une grande quantité d'ARNm est présent dans la bactérie [Gurvich et al, 2005]. C'est le cas ici pour la protéine NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc dont le gène est sous l'influence du promoteur fort du bactériophage T7.
2. Un arrêt de la traduction conduisant ainsi à la synthèse d'une protéine tronquée [Varenne et Lazdunski, 1986].

L'analyse de la séquence nucléotidique de Nox4 révèle l'existence de nombreux codons rares et en particulier deux régions :

1. Les nucléotides ²⁷⁴AGG AGA ACC AGG AGA²⁸⁸ (⁹²RRTRR⁹⁸) où se retrouvent deux tandems de codons rares codant pour quatre arginines.
2. Les nucléotides ¹³⁶³AGA AGA CUA¹³⁷¹ (⁴⁵⁵RRL⁴⁵⁷) où se trouve un triplet de codons rares codant pour deux arginines et une leucine. Cette région est localisée dans la séquence codant pour les protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc.

Le décalage de la phase de lecture conduit à un arrêt de la synthèse protéique 50 acides aminés après les codons rares au lieu des 279 pour la protéine NHS-Nox4Aqc (figure 52) et des 237 pour la protéine NHS-Nox4Bqc. Dans ce cas de figure, les protéines obtenues auront des masses moléculaires de 27kDa et 23kDa pour les protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc respectivement (tableau 8).

Nucléotide: Phase 0: Phase +1:	1363 <u>aga</u> aagactataacttttattttgggtatgcagagatatccagtccttccggttggtttgcagatt 1424 R R L Y F I W V C R D I Q S F R W F A D E D Y T L F G Y A E I S S P S V G L Q I
Nucléotide: Phase 0: Phase +1:	1425 tactctgtatggttcataacaagttttggcaagagaacagacctgactatgtcaacatcc 1485 L L C M L H N K F W Q E N R P D Y V N I Y S V C C I T S F G K R T D L T M S T S
Nucléotide: Phase 0: Phase +1:	1486 agctgtacctcagtcaaacagatgggatacagaagataattggagaaaaatatcatgcac 1546 Q L Y L S Q T D G I Q K I I G E K Y H A S C T S V K Q M G Y R R - L E K N I M H Stop

Figure 52. Analyse du cadre de lecture de la séquence nucléotidique de Nox4. La séquence nucléotidique correspond à la partie 3' de l'ARNm de Nox4 (nucléotide 1363 à 1546). La phase 0 (commençant par le codon aga) est le cadre de lecture normale et produit la partie C terminale de la protéine Nox4. La phase +1 (suite au "frameshift", commençant par le codon gaa surligné), en gras, aboutit à une séquence protéique complètement différente de celle de Nox4 avec un arrêt de la synthèse de la protéine prématurément, 50 acides aminés plus tard.

Dans le cas d'un arrêt de la synthèse au niveau de ce groupement de codons rares, les protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc auront une masse moléculaire théorique de 21kDa et de 17kDa respectivement (tableau 8).

Protéine	Normale	Arrêt traduction	Décalage de lecture +1
NHS-Nox4Aqc	36kDa	21kDa	27kDa
NHS-Nox4Bqc	32kDa	17kDa	23kDa

Tableau 8. Masse moléculaire théorique des différentes formes de la protéine NHS-Nox4Aqc et de la protéine NHS-Nox4Bqc produites à cause du triplet de codons rares. Les masses moléculaires sont calculées à partir des séquences protéiques par le programme ProtParam (serveur internet ExPASy).

En examinant les bandes surnuméraires issues de la purification de NHS-Nox4Aqc et de NHS-Nox4Bqc, on observe la présence de deux bandes de masse moléculaire inférieure (*figures 48, 49, 50 et 51*). Pour NHS-Nox4Aqc, on observe une bande aux alentours de 20kDa et une autre vers les 28kDa et pour NHS-Nox4Bqc, une vers 18kDa et l'autre vers 24kDa. Ces masses moléculaires sont proches de celles prédites dans le tableau 8. Ces protéines tronquées peuvent être révélées par un anticorps anti-histidines car l'étiquette poly-histidines se trouve du côté N-terminal des protéines de fusion.

Pour outrepasser les problèmes liés à l'existence de ces codons rares, plusieurs critères doivent être pris en compte:

1. La réduction de la température d'induction est parfois suffisante. En agissant de la sorte, la bactérie ralentit son métabolisme donnant plus de temps aux ribosomes pour trouver les ARNt rares. Mais dans notre cas, l'induction à 17°C n'a pas donné de résultats probants (*figure 47*).
2. L'utilisation d'autres souches bactériennes modifiées. Les bactéries BL21(λ DE3) CodonPlus-RIL (§I.C.1.1 Matériels et méthodes) surexpriment des ARNt rares correspondant aux codons AGA, AGG, AUA et CUA. Cette souche est donc particulièrement adaptée pour l'expression de la protéine NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc.

Nous avons transformé les bactéries BL21(λ DE3) CodonPlus-RIL avec les plasmides d'expression codant pour les protéines NHS-Nox4Aqc, NHS-Nox4Bqc, NHS-Nox4A-1TM et NHS-Nox4A-2TM. Une induction de l'expression de ces protéines a été réalisée par l'addition d'IPTG à 15°C pendant la nuit dans du milieu LB. Le culot de bactéries induites est traité avec le tampon de dépôt et l'analyse des inductions est effectuée sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie et par western blot. L'induction de la synthèse des protéines NHS-Nox4Aqc, NHS-Nox4Bqc et Nox4A-1TM dans les bactéries BL21(λ DE3) CodonPlus-RIL ne conduit pas à l'apparition de bandes de tailles inférieures ni en coloration de Coomassie, ni par western blot avec un anticorps anti-histidines (*figure 53*). Par contre, il n'y a pas d'induction de la protéine Nox4A-2TM.

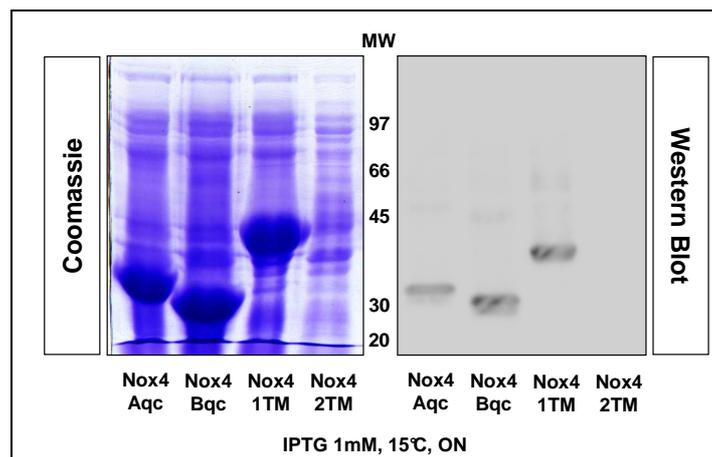


Figure 53. Test d'expression des protéines NHS-Nox4Aqc, NHS-Nox4Bqc, NHS-Nox4A-1TM et NHS-Nox4A-2TM dans les bactéries BL21(λ DE3) CodonPlus RIL. Les bactéries sont induites par 1mM d'IPTG à 15°C ou à température ambiante (RT, 27 °C) pendant la nuit (O.N.). Les lysats totaux des bactéries non induites (NI) et induites sont déposés sur gel SDS-PAGE coloré par le bleu de Coomassie **(A)**. **(B)** Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie et western blot (anticorps anti-histidine, 1:5000) des protéines induites Nox4Aqc, Nox4Bqc, Nox4A-1TM et Nox4A-2TM. *, indique les bandes correspondant aux protéines Nox4. MW, marqueur de poids moléculaire.

Donc, la production de la protéine Nox4 par les bactéries nécessite une analyse précise de sa séquence nucléotidique. L'absence de synthèse de la protéine NHS-Nox4A-2TM pose des questions inhérentes à la production des protéines membranaires dans un système bactérien. La toxicité de ces protéines vis-à-vis de la bactérie pourrait jouer un rôle [Miroux et al, 1996].

III.A.5.1.1 Production d'anticorps monoclonaux spécifiques de Nox4

En l'absence d'anticorps reconnaissant spécifiquement Nox4, nous avons développé une stratégie de production d'anticorps monoclonaux dirigés contre Nox4. Les objectifs sont d'une part de "cartographier" la protéine Nox4 et d'étudier sa topologie membranaire et d'autre part de préparer des outils pour isoler la protéine et analyser ses modalités d'interaction avec son partenaire p22phox. Une approche similaire (topologie et inhibition) a été développée dans notre laboratoire avec succès sur la protéine Nox2 [Campion et al, 2007].

L'antigène est la protéine tronquée Nox4 recombinante (résidus 206 à 578) qui contient la partie cytosolique, le 6ème passage transmembranaire, la dernière boucle extracellulaire comprise entre le 5ème et le 6ème passage transmembranaire ainsi qu'une étiquette poly-histidine et un S tag en position N terminale (*figure 54*). La séquence en

acides aminés de la dernière boucle extracellulaire de Nox4 est très différente de celle des autres membres de la famille des NADPH oxydases.

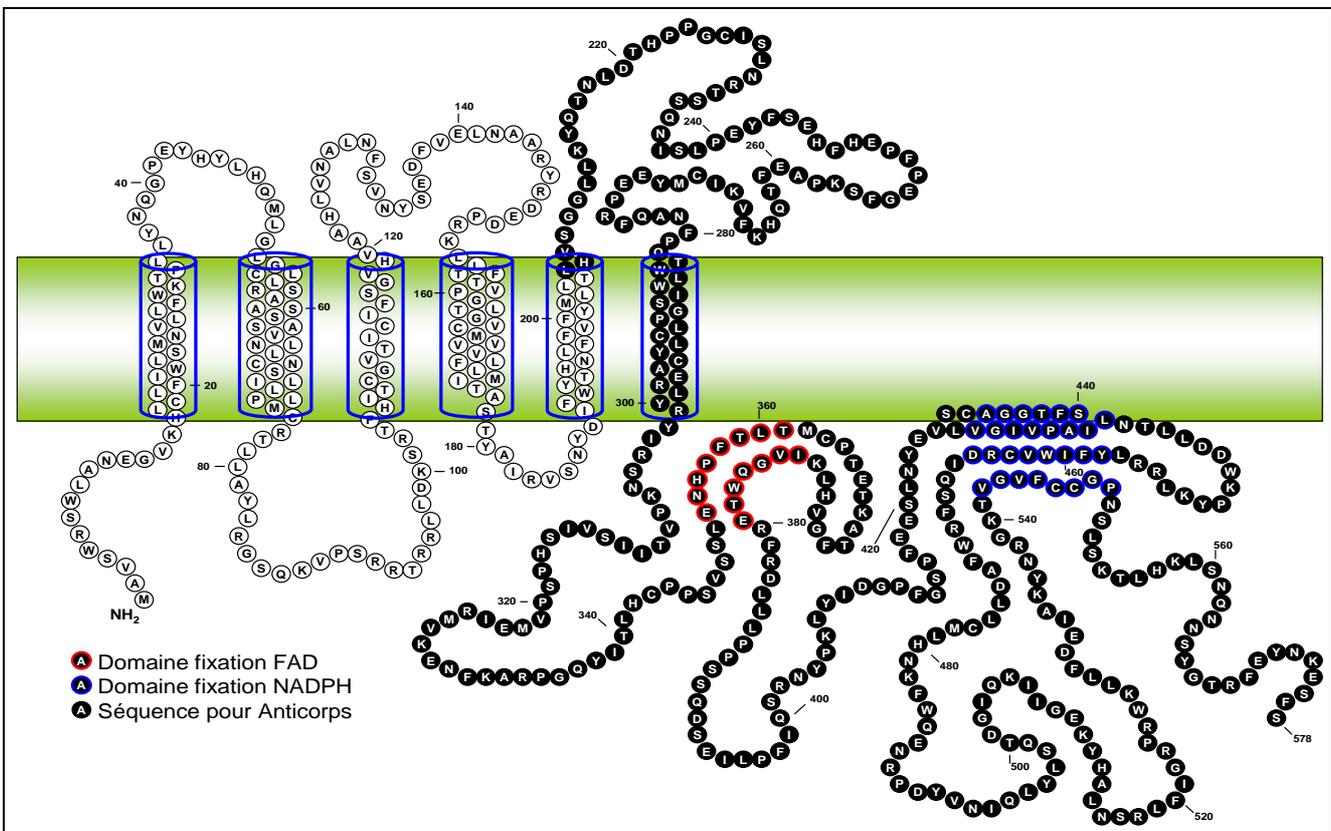


Figure 54. Modèle topologique de la protéine Nox4. La séquence d'acides aminés en noir correspond à la protéine Nox4-1TM produite, purifiée et injectée dans les souris pour la production d'anticorps monoclonaux. Les anticorps monoclonaux ont été produits par la société Biotem.

III.A.5.1.1.1 Préparation de la protéine Nox4 recombinante en système bactérien

Une étape préliminaire a permis de révéler que la protéine NHS-Nox4A-1TM est exprimée seulement de manière insoluble en système bactérien (*figure 55 ; A*). C'est cette fraction qui sera utilisée pour la purification. La protéine NHS-Nox4A-1TM est induite dans les bactéries BL21(λ DE3) CodonPlusRIL à température ambiante pendant 4h (§III.D.2.1 Matériels et méthodes). Après une lyse des bactéries, le lysat total est centrifugé et les corps d'inclusion présents dans le culot sont remis en suspension dans un tampon dénaturant contenant de l'urée 8M. Le surnageant de centrifugation (100 000g) issu de cette solubilisation est déposé sur une colonne His Gravitrap™ (§III.D.1.2.3 Matériels et méthodes). Après une renaturation partielle sur colonne, l'éluion est réalisée en présence d'imidazole. Nous avons en parallèle produit et purifié une protéine totalement différente de

Nox4, la protéine ZEBRA/MD4-GFP qui possède la même étiquette poly-histidine que NHS-Nox4A-1TM (le plasmide codant pour ZEBRA/MD4-GFP a été fourni par Romy Rothe du laboratoire Human Protein Therapy). La *figure 55 (B)* montre la fraction d'élué de NHS-Nox4A-1TM et de ZEBRA/MD4-GFP (antigène négatif) sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. La pureté des protéines dans l'échantillon est estimée supérieure à 80% par une analyse densitométrique avec le logiciel Scion Image (Scion corporation) et la quantité de protéines purifiées est évaluée en référence à une gamme d'albumine (BSA). Les protéines purifiées sont utilisées pour la préparation des anticorps monoclonaux (société Biotem).

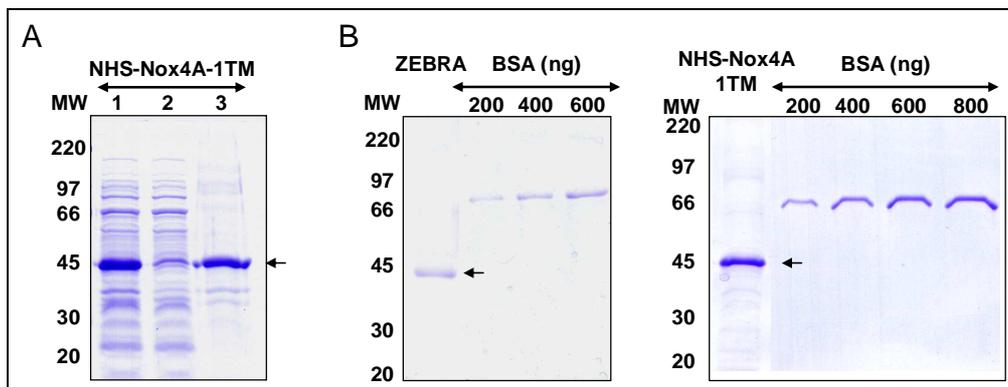


Figure 55. Purification de la protéine NHS-Nox4-1TM et ZEBRA/MD4-GFP sur colonne His Gravitrap™. **A)** Test de solubilité de la protéine NHS-Nox4A-1TM. Les bactéries BL21(λ DE3) contenant le plasmide pET30b Nox4A-1TM induites sont lysées et le surnageant basse vitesse (1) est centrifugé à 14 000 rpm à 4°C pendant 30min pour séparer les protéines solubles (2) (surnageant) et insolubles (3) (culot). Ces 3 fractions sont analysées sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. La flèche indique la protéine NHS-Nox4-1TM. **B)** Purification de la protéine ZEBRA/MD4-GFP (ZEBRA) et de NHS-Nox4A-1TM. Les bactéries après induction sont détruites par sonication. Le surnageant basse vitesse est ultracentrifugé et les corps d'inclusions sont purifiés avec une colonne His Gravitrap™. Les éluats sont déposés sur un gel SDS-PAGE ainsi qu'une gamme croissante d'albumine (BSA). Le gel est coloré par le bleu de Coomassie. La flèche indique les protéines NHS-Nox4A-1TM et ZEBRA/MD4-GFP purifiée. MW, marqueur de poids moléculaire.

III.A.5.1.1.2 Préparation des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine NHS-Nox4A-1TM

NHS-Nox4A-1TM préparé sous forme recombinante et purifiée a été injectée à des souris Balb/C (15 et 50 μ g/souris). Les sérums puis les surnageants d'hybridomes ont été contrôlés positif sur l'antigène NHS-Nox4A-1TM et négatif sur ZEBRA/MD4-GFP par ELISA (société Biotem) et par western blot (notre laboratoire) (§III.D.2.2 Matériels et méthodes).

Au terme des étapes d'immunisation et de production d'anticorps, 5 clones (7C9, 6B11, 10B4, 8E9, 5F9) ont été obtenus sous forme de liquide d'ascite ou d'anticorps purifiés. La spécificité de ces anticorps a été validée par western blot sur des protéines Nox4

recombinantes: NHS-Nox4A-1TM, Nox4A-1TM-CH et Nox4Aqc-CH (acide aminé de 309 à 578). Les deux dernières protéines possèdent une séquence polyhistidine en position C terminale (*figure 56 ; A*). Tous les anticorps reconnaissent la protéine antigène NHS-Nox4A-1TM et Nox4A-1TM-CH. 4 anticorps (7C9, 6B11, 10B4, 5F9) parmi les 5 marquent la protéine Nox4Aqc-CH à l'exception de l'anticorps 8E9 (*figure 56 ; B*). Ceci montre que les anticorps 7C9, 6B11, 10B4, et 5F9 reconnaissent un épitope au niveau de la queue cytosolique de Nox4 contrairement à l'anticorps 8E9 qui se fixe sur une région en amont de la queue cytosolique.

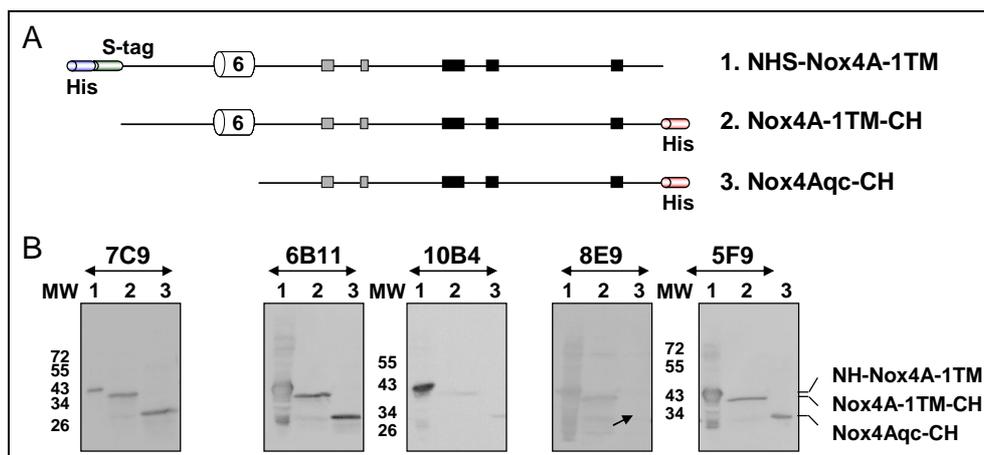


Figure 56. Test des anticorps monoclonaux dirigés contre Nox4. **A)** Représentation des protéines NHS-Nox4A-1TM, Nox4A-1TM-CH et Nox4Aqc-CH. **B)** Western blot avec les 5 anticorps monoclonaux (7C9, 6B11, 10B4, 8E9, 5F9) sur les 3 protéines Nox4 recombinantes : la colonne 1 correspond à la protéine NHS-Nox4A-1TM ; la colonne 2 à Nox4A-1TM-CH et la colonne 3 à Nox4Aqc-CH. La flèche indique l'absence de marquage de l'anticorps 8E9 pour la protéine Nox4Aqc-CH. MW, marqueur de poids moléculaire.

C'est un travail qui débute et les résultats sont préliminaires mais encourageants. Les caractéristiques des anticorps monoclonaux sont résumées dans le tableau 9.

Nom du clone	Isotypes	Antigène NHS-Nox4A-1TM		Epitope	
		ELISA	Western Blot	Queue cytosolique	Boucle e
10B4	IgG1	+	+	+	-
5F9	IgG2a	+	+	+	-
6B11	IgG2b	+	+	+	-
7C9	IgM	+	+	+	-
8E9	IgM	+	+	-	+

Tableau 9. Résumé des caractéristiques des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine Nox4.

Conclusions : Production de protéines Nox4 recombinantes par les bactéries BL21(λ DE3)

Au terme de nos expériences, nous avons pu déterminer les conditions suivantes:

- *La production des protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc (pET30b) par les bactéries BL21(λ DE3) est importante et conduit à la formation de corps d'inclusion.*
- *La solubilisation des protéines NHS-Nox4Aqc et NHS-Nox4Bqc à partir des corps d'inclusion n'est possible que dans un tampon dénaturant contenant de l'urée 8M.*
- *La production de ces protéines par les bactéries BL21(λ DE3) abouti à l'apparition de formes tronquées "parasites". Ces dernières ne correspondent pas à des produits de dégradation mais à des protéines issues d'une synthèse incomplète.*
- *L'apparition de ces protéines est la conséquence de l'effet négatif d'un des groupements de codons rares situé dans la partie cytosolique de Nox4 (¹³⁶³AGA AGA CUA¹³⁷¹) sur la machinerie traductionnelle bactérienne.*
- *Le choix de la souche d'expression bactérienne BL21(λ DE3) CodonPlus RIL a permis de produire différents fragments de la protéine Nox4 sans contamination par des formes tronquées parasites.*

Ainsi, nous connaissons maintenant les meilleures conditions de production et de purification des protéines NHS-Nox4Aqc, NHS-Nox4Bqc et NHS-Nox4-1TM. La suite du travail va porter sur la détermination des conditions de renaturation des protéines purifiées et à terme sur l'utilisation de ces protéines renaturées dans une étude structure/fonction de Nox4.

III.B Production des protéines Nox4 par le système de traduction *in vitro* (RTS[®], Rapid Translation System)

Le RTS[®] (Rapid Translation System) est un système couplant la transcription et la traduction de protéines *in vitro* (§III.B.2 Matériel et méthodes). Il utilise pour cela un milieu réactionnel à base de lysat d'*E.coli*. Ce lysat est issu de bactéries optimisées génétiquement pour leur fournir un appareillage transcriptionnel et traductionnel efficace. Il permet d'augmenter la stabilité de la protéine notamment grâce à des mutations de certaines protéases. Ce système est plus flexible que l'induction bactérienne en cellules entières car il est totalement ouvert. Il est possible d'ajouter des substrats (détergents, lipides, couples oxydoréducteur, cofacteurs, etc. ...) ou des protéines (chaperones, partenaires, etc. ...) pendant le processus de traduction. Ainsi, les protéines en cours de synthèse peuvent être directement prises en charge par ces additifs afin de favoriser leur solubilisation et leur bonne conformation. Le RTS[®] permet une production rapide de protéines en grande quantité dans un faible volume réactionnel.

Nous avons utilisé deux sortes de plasmides spécialement développés pour ce système d'expression (Roche): le plasmide pIVEX 2.4Ndel ou le plasmide pIVEX 3.1MCS qui permettent d'ajouter respectivement une étiquette poly-histidines en position N terminale ou C terminale de la protéine (§II.C.2.2.1 Matériels et méthodes). Quatre séquences codant pour les protéines Nox4A-2TM, Nox4A-1TM, Nox4Aqc et Nox4Bqc ont été clonées dans ces deux types de vecteurs (*figure 57*). La mise en évidence des protéines produites et leur purification se feront à l'aide de l'étiquette poly-histidines.

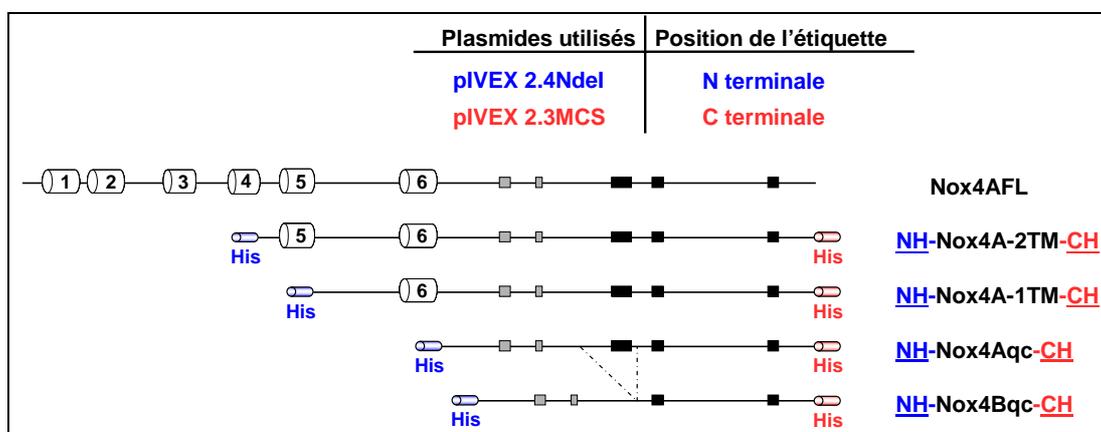


Figure 57. Schéma des protéines Nox4 fusionnées avec une séquence poly-histidines en N terminale ou en C terminale. Les séquences nucléotidiques codant pour ces différentes protéines sont clonées dans les vecteurs d'expression bactérien pIVEX 2.4Ndel et pIVEX 3.1MCS (Roche).

III.B.1 Optimisation de l'expression des protéines Nox4 tronquées dans le système RTS®

Nous avons évalué l'expression des différentes constructions en présence de détergents, de protéines chaperonnes et d'un couple redox. Les différents additifs utilisés sont indiqués dans le *tableau 10*.

Détergents	Concentration finale
Nonidet P40 (NP40)	5mM
<i>n</i> -dodecyl β -D-maltoside (DDM)	0,1mM
Couple oxydoréducteur	
GSH/GSSG	0,1mM/4mM
Chaperonne	
GroE (Roche)	0,5 μ L

Tableau 10. Additifs utilisés en RTS® pour les tests d'expression des protéines Nox4.

1. Nous avons utilisé deux détergents non-ioniques, le DDM (*n*-docéyl β -D-maltoside) et le Nonidet P40 (NP40). Le choix de ces détergents a été effectué en fonction de leur caractère non dénaturant sur les protéines membranaires. La concentration utilisée a été choisie en tenant compte de la concentration micellaire critique (CMC, concentration à partir de laquelle des micelles se forment). La concentration de DDM utilisée est de 0,1mM ($CMC_{DDM}=0,1mM$) et celle du NP40 est de 5mM (100 fois supérieure à la CMC_{NP40}).
2. Le couple redox glutathion (GSH) réduit et oxydé (GSSG) intervient comme intermédiaire dans la formation de ponts disulfures notamment en connexion avec une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique PDI (Protein Disulfide Isomerase) [Ferrari et Söling, 1999]. Il n'existe aucune donnée concernant la présence de ponts disulfures pour les protéines NADPH oxydase. Néanmoins, l'interaction entre la protéine PDI avec Nox1, p22phox et Nox4 a été montrée [Janiszewski et al, 2005]. Ces auteurs émettent l'hypothèse que l'activité de la PDI interviendrait dans le trafic et l'assemblage du complexe NADPH oxydase de Nox4 et de Nox1 dans les cellules musculaires lisse des vaisseaux. Nous avons utilisé le couple GSH/GSSG à la concentration respective de 0,1mM et de 4mM pour la synthèse des protéines Nox4.
3. La protéine appelée GroE est un complexe cytosolique constitué de deux protéines, GroEL et GroES. Ce complexe a un rôle de chaperonne et forme un cylindre dans lequel les protéines sont prises en charge pour être correctement conformées. Elles sont

capables d'agir sur les protéines ayant un poids moléculaire compris entre 20kDa et 60kDa. Nous avons utilisé des protéines GroE recombinantes disponibles pour le système RTS®.

La détermination des meilleures conditions d'expression pour les huit protéines a été réalisée dans un volume réactionnel restreint de 30µL (§III.B.2.1 Matériels et méthodes) en présence ou non des additifs précités. La synthèse protéique se déroule à 20°C entre 20h à 24h dans un appareil thermo-régulé (iCycler, Bio-Rad).

Les conditions d'expression utilisées tout au long de cette étude sont indiquées dans le *tableau 11*.

Conditions	A	B	C	D	E	F	G
Dodécyl maltoside 0,1mM	-	+	+	+	-	-	-
NP40 5mM	-	-	-	-	+	+	+
GroE	-	-	+	+	-	+	+
GSH/GSSG 0,1mM/4mM	-	-	-	+	-	-	+

Tableau 11. Conditions utilisées pour l'expression des protéines par le système RTS®.

III.B.1.1 Tests d'expression des protéines.

A la fin de la réaction de RTS® suivant les conditions du *tableau 11*, un aliquote de 5µL correspondant à la fraction de protéines totales synthétisées est prélevé pour l'analyse par western blot avec un anticorps anti-histidines. Les résultats sont montrés dans la *figure 58*.

On observe que le profil d'expression de ces protéines est différent selon les conditions utilisées.

Examinons tout d'abord l'influence de la position de l'étiquette. La position de l'étiquette (C terminale ou N terminale) peut influencer l'expression de la protéine à plusieurs niveaux. Elle peut par exemple modifier la structure de l'ARNm favorisant l'accrochage ou l'activité des ribosomes. Elle peut aussi changer la stabilité de la protéine la rendant plus soluble. 3 cas de figures peuvent être constatés :

1. Pas d'influence sur l'expression protéique de la position de l'étiquette comme par exemple pour la protéine Nox4A-2TM où quel que soit les conditions, les protéines NH-Nox4A-2TM et Nox4A-2TM-CH sont bien exprimées (*figure 58 ; A ; conditions A à G ; NH-Nox4A-2TM comparées à Nox4A-2TM-CH*).
2. Un effet positif sur la production protéique de l'étiquette en position N terminale comme par exemple pour les protéines Nox4A-1TM et Nox4Bqc. La protéine NH-Nox4A-1TM est fortement exprimée en présence de NP40 et de GroE par rapport à la protéine Nox4A-1TM-CH (*figure 58 ; A ; conditions F ; NH-Nox4A-1TM comparées à Nox4A-1TM-CH*). La même chose est remarquée pour la protéine NH-Nox4Bqc en comparaison avec Nox4Bqc-CH en présence de GroE (*figure 58 ; B ; conditions GroE ; NH-Nox4Bqc comparées à Nox4Bqc-CH*).
3. Une influence inhibitrice sur la synthèse protéique de l'étiquette en position N terminale. Ceci est observé pour la protéine NH-Nox4A-1TM en contraste avec la protéine Nox4A-1TM-CH en absence de tout additif (*figure 58 ; A ; conditions A ; NH-Nox4A-1TM comparées à Nox4A-1TM-CH*).

Ces observations montrent qu'il n'y a pas de règle générale pour ce qui concerne l'effet de la position de l'étiquette dont l'influence doit être déterminée au cas par cas pour chaque type de protéine et pour chaque condition d'expression.

Quels sont les effets des différents additifs sur l'expression des protéines Nox4 tronquées ?

A l'exemption de la protéine NH-Nox4A-1TM, on remarque une augmentation de l'expression protéique en présence du détergent DDM, de GroE avec ou sans le couple GSH/GSSG (*figure 58 ; A ; conditions C et D ; Nox4A-2TM, Nox4Aqc et Nox4Bqc*) ou en présence de NP40, de GroE et de GSH/GSSG (*figure 58 ; A ; conditions G ; Nox4A-2TM, Nox4A-1TM-CH, Nox4Aqc et Nox4Bqc*). Pour la protéine NH-Nox4A-1TM, la synthèse est augmentée pour les conditions en présence de DDM (plus ou moins GroE ou GSH/GSSG) (*figure 58 ; A ; conditions B, C et D ; NH-Nox4A-1TM*) mais surtout avec du NP40 et GroE (*figure 58 ; A ; conditions B, C et D ; NH-Nox4A-1TM*).

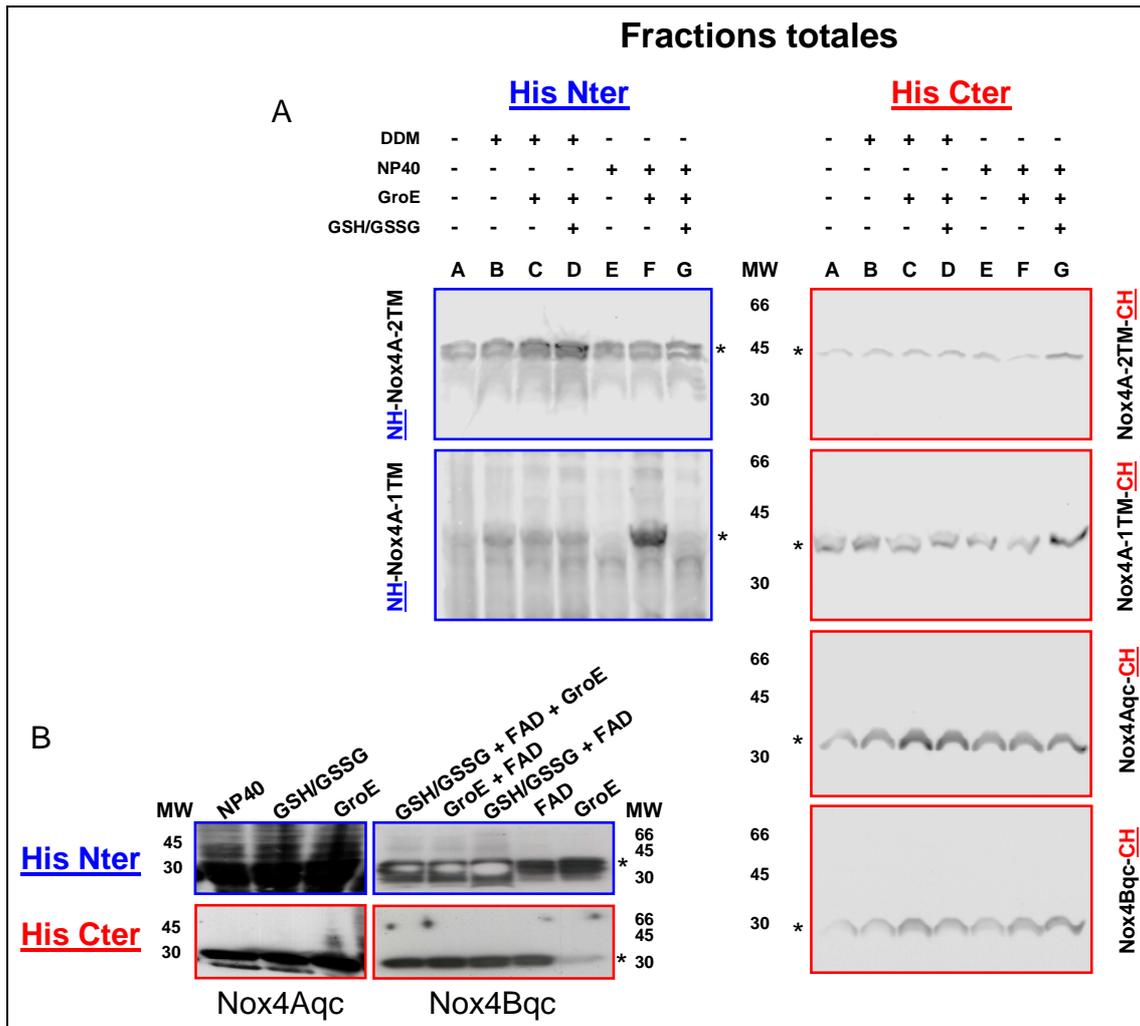


Figure 58. Test d'expression des protéines Nox4A-2TM, Nox4A-1TM, Nox4Aqc et Nox4Bqc par le système RTS®. A) et B) A la fin de la réaction de RTS®, 5µL correspondant aux protéines contenues dans la fraction totale sont analysés par western blot à l'aide d'un anticorps anti-histidines (1 :5000). *, indique les bandes correspondant aux protéines Nox4 ; His Nter, étiquette poly-histidines en position N terminale; His Cter, étiquette poly-histidines en position C terminale. Les additifs utilisés sont : DDM 0,1mM (n-Dodécyl β-D-maltoside) ; NP40 5mM (Nonidet P40) ; GroE ; GSH/GSSG 0,1mM/4mM. Les lettres surlignées correspondent à la position de l'étiquette poly-histidines: CH pour C terminale et NH pour N terminale. MW, marqueur de poids moléculaire.

L'ensemble des observations concernant le niveau d'expression des protéines est représenté dans le *tableau 12*.

Conditions	A	B	C	D	E	F	G
NH-Nox4A-2TM	+	+	++	++	+	+	+
Nox4A-2TM-CH	+	+	+	+	+	+	++
NH-Nox4A-1TM	-	+	+	+	-	++	-
Nox4A-1TM-CH	+	+	+	+	+	+	++
Nox4Aqc-CH	+	+	++	++	+	+	+
Nox4Bqc-CH	+	+	++	++	+	++	++

Tableau 12. Résumé du niveau d'expression des protéines produites par le système RTS® en fonction des différentes conditions (tableau 11). Le niveau d'expression de protéines totales est classé selon trois critères : -, pas d'expression ; +, faible expression ; ++, forte expression.

III.B.1.2 Tests de solubilité des protéines produites.

A la fin de la réaction de synthèse par le RTS[®], on centrifuge 20µL de l'échantillon à 4°C à 14 000rpm pendant 30min pour séparer les protéines insolubles et solubles. Le surnageant correspond à la fraction soluble. Le culot, contenant les protéines insolubles, est repris par 20µL de tampon Tris-Hcl 50mM pH 7,3. On prélève 5µL de chaque fraction pour l'analyse par western blot. Les résultats des tests de solubilité sont montrés dans la *figure 59*.

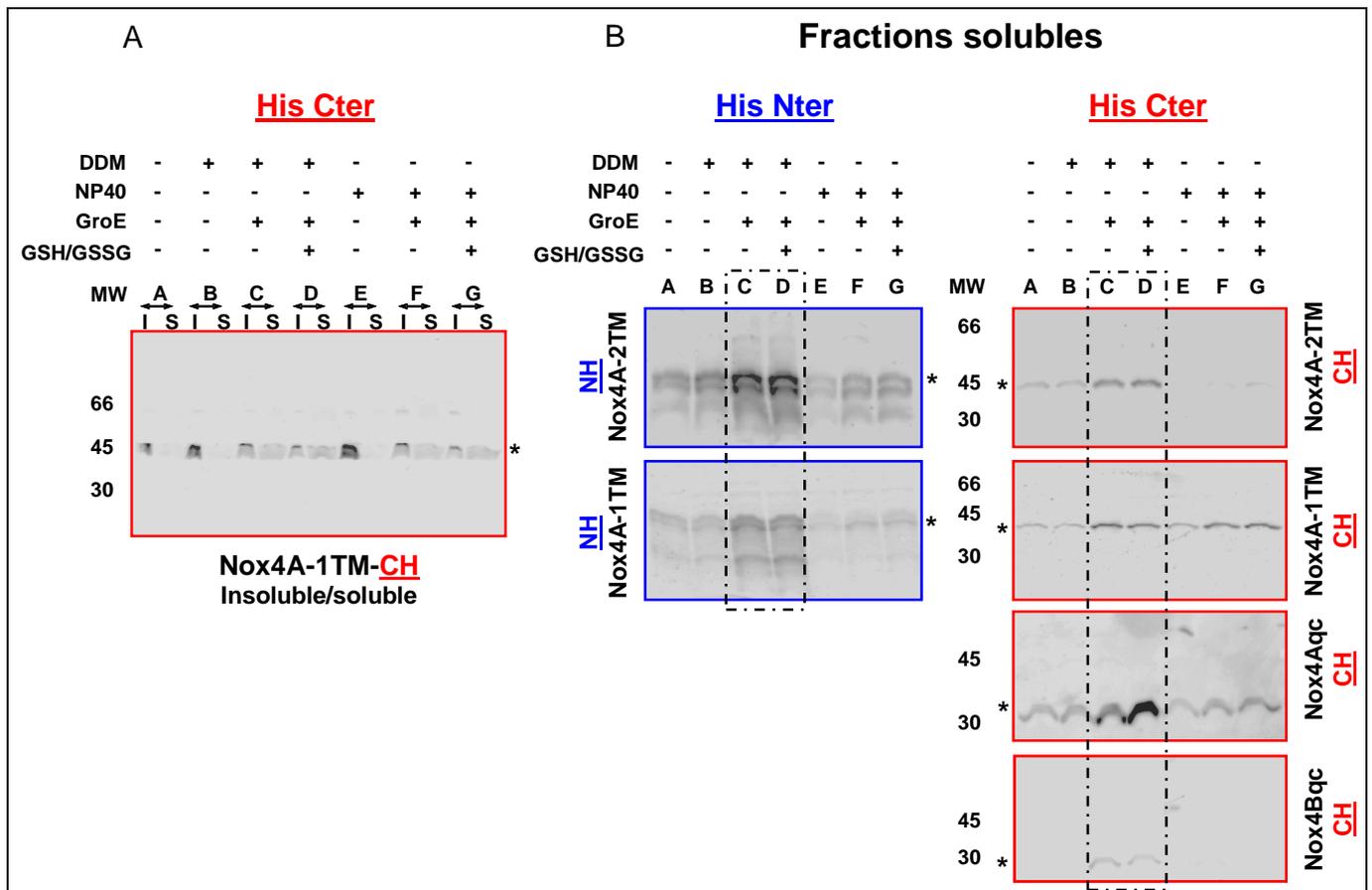


Figure 59. Test de solubilité des protéines Nox4A-1TM, Nox4Aqc et Nox4Bqc par le système RTS[®]. Les protéines synthétisées par RTS[®] sont séparées par centrifugation à 14 000rpm pendant 30min à 4°C en fraction soluble (S, surnageant) et insoluble (I, culot). **A)** Western blot des fractions insolubles et solubles de la protéine Nox4A-1TM-CH. **B)** Western blot de la fraction soluble des protéines produites. Anticorps anti-histidines (1 :5000). *, indique les bandes correspondant aux protéines Nox4. Les conditions permettant l'obtention de la plus grande quantité de protéines solubles sont entourées par un cadre en pointillé.

On observe par exemple pour la protéine Nox4A-1TM-CH que la proportion de protéines insolubles obtenue est toujours plus importante (*figure 59 A ; colonne I, insoluble, par rapport à S, soluble*). L'objectif de cette optimisation est d'obtenir le maximum de protéines solubles.

On constate une bonne solubilité de l'ensemble de toutes les protéines produites en présence du détergent DDM et de la protéine chaperonne GroE (*figure 59 B ; conditions C et D*). L'addition du couple GSH/GSSG augmente la solubilité de la protéine Nox4Aqc-CH (*figure 59 B ; condition D par rapport à C*).

Certaines conditions ne permettent pas d'exprimer des protéines solubles comme par exemple toutes celles en présence du NP40 pour les protéines Nox4A-2TM-CH et Nox4Bqc-CH (*figure 59 B ; Nox4A-2TM-CH, Nox4Bqc-CH ; conditions E, F et G*). Sans optimisation de l'expression par les additifs (DDM et GroE), il n'aurait pas été possible d'obtenir des protéines Nox4Bqc-CH solubles (*figure 59 B, Nox4Bqc, His Cter, conditions C et D comparés à A, B, E, F et G*).

L'ensemble des observations du niveau d'expression des protéines totales et solubles est indiqué dans le *tableau 13*.

Conditions	Expression	A	B	C	D	E	F	G
NH-Nox4A-2TM	Totale	+	+	++	++	+	+	+
	Soluble	+	+	++	++	-	+	+
Nox4A-2TM-CH	Totale	+	+	+	+	+	+	++
	Soluble	+	+	++	++	-	-	+
NH-Nox4A-1TM	Totale	-	+	+	+	-	++	-
	Soluble	+	+	++	++	-	+	+
Nox4A-1TM-CH	Totale	+	+	+	+	+	+	++
	Soluble	+	+	++	++	+	++	++
Nox4Aqc-CH	Totale	+	+	++	++	+	+	+
	Soluble	+	+	++	++	+	+	+
Nox4Bqc-CH	Totale	+	+	++	++	+	++	++
	Soluble	-	-	+	+	-	-	-

Tableau 13. Résumé du niveau d'expression et de solubilité des protéines produites par le système RTS[®] en fonction des différentes conditions (tableau 11). Le niveau d'expression des protéines totales et solubles est classé selon trois critères : -, pas d'expression ; +, faible expression ; ++, forte expression. Les conditions permettant l'obtention de la plus grande quantité de protéines solubles sont entourées par un cadre en pointillé.

Il n'y a pas de corrélations strictes entre le niveau d'expression global et la solubilité des protéines produites. Par exemple, la synthèse de la protéine NH-Nox4A-1TM est fortement induite en présence du NP40 et de la protéine GroE sans qu'il n'y ait de répercussions sur la solubilité de la protéine (*tableau 13 ; NH-Nox4-1TM ; condition F*). Dans d'autre cas, l'augmentation de l'expression de la protéine Nox4Aqc-CH s'accompagne bien d'une augmentation significative des protéines solubles (*tableau 13 ; Nox4Aqc-CH ; condition F*). Ainsi, l'analyse simple de la synthèse protéique totale n'est pas suffisante et seule l'observation conjointe avec les tests de solubilité permet de déterminer les conditions optimales de production. La capacité de solubilisation des additifs doit être privilégiée.

Au regard des résultats obtenus, nous sommes en mesure de choisir les constructions et les conditions de synthèse optimale.

1. Nous avons opté pour la production des protéines contenant l'étiquette poly-histidines en position C terminale. Les raisons qui ont motivé notre choix sont les suivantes:

Le souci d'une homogénéité dans la position de l'étiquette entre les protéines (gène stérique identique pour chaque).

On observe sur les résultats des westerns blot des protéines possédant une étiquette en N terminale la présence de bandes de tailles inférieures révélées avec un anticorps anti-histidines. Il est vraisemblable que ces bandes correspondent aux formes tronquées issues de la synthèse protéique incomplète. Nous sommes ici aussi confrontés aux mêmes problèmes de codons rares décrits précédemment (§II.B.1.5 Résultats II) puisque la nature du lysat utilisé est d'origine bactérienne. La synthèse à une température base (20°C) a permis de produire la forme complète mais les autres formes tronquées sont également présentes. Dans ce cas précis, la position de l'étiquette en position C terminale peut présenter certains avantages. Seule la protéine complète est visible en western blot car les formes tronquées ne possèdent pas l'étiquette poly-histidines. De ce fait, la purification par affinité pour cette étiquette permettra d'éliminer ces formes incomplètes.

2. Les conditions C (0,1mM de DDM, et GroE) et D (0,1mM de DDM, GroE et 0,1mM/4mM de GSH/GSSG) ont retenu notre attention pour l'ensemble des protéines. Ce sont celles qui permettent d'obtenir le plus de protéines solubles.

III.B.1.3 Optimisation des conditions choisies pour la synthèse par RTS[®] des protéines recombinantes

Afin d'améliorer encore notre rendement de protéines solubles, nous avons déterminé l'effet de la concentration du DDM, l'action du composé NV10 et du cofacteur FAD (*figure 60*).

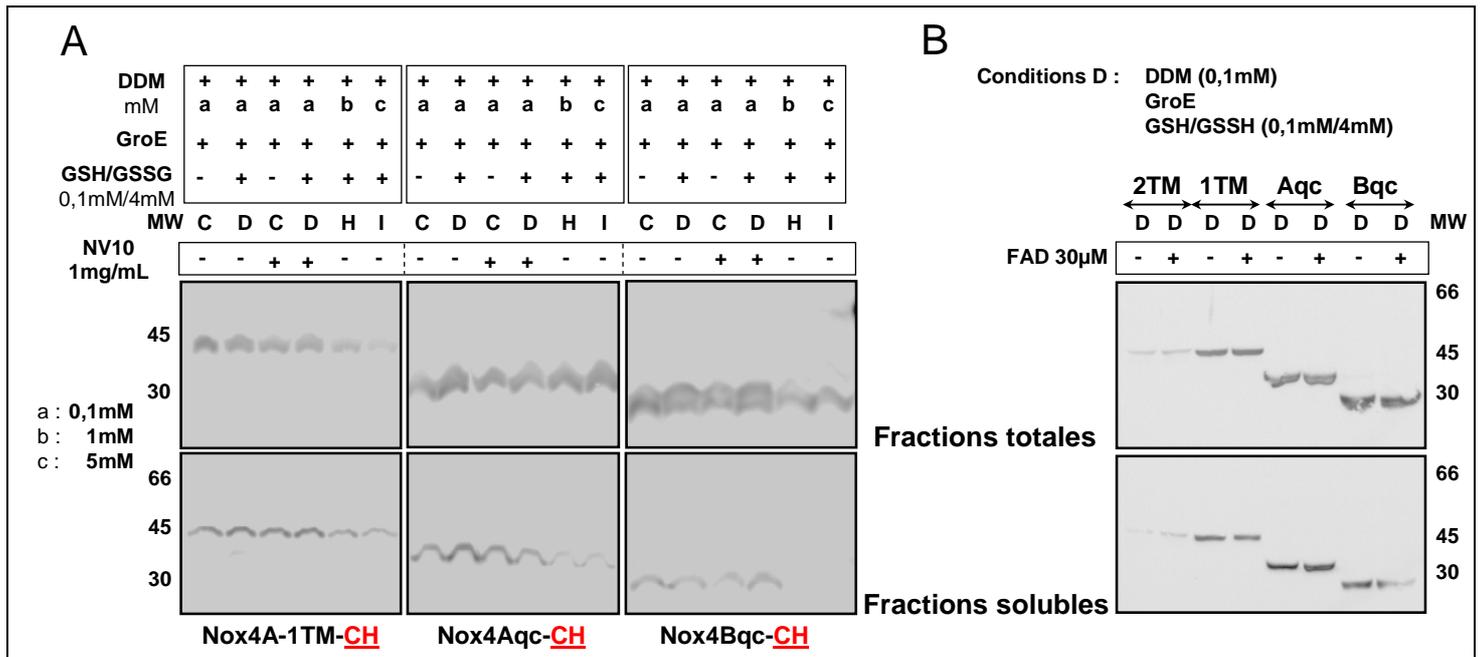


Figure 60. Analyse par western blot des tests d'expression et de solubilité des protéines Nox4 tronquées par le système RTS[®] en fonction de la concentration de DDM, en présence du polymère NV10 (1mg/mL) ou de FAD (30μM). Les protéines synthétisées (fractions totale) par RTS[®] sont séparées par centrifugation à 14 000rpm pendant 30min à 4°C pour obtenir la fraction soluble. **A)** Analyse par western blot des fractions totales et solubles des protéines Nox4A-1TM-CH, Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH produites par le système RTS[®] en fonction de la concentration en DDM (a : 0,1mM ; b : 1mM et c : 5mM) et du polymère NV10 (1mg/mL). **B)** Analyse par western blot des fractions totales et solubles des protéines Nox4A-2TM-CH, Nox4A-1TM-CH, Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH produites par le système RTS[®] en présence de FAD (30μM). Anticorps anti-histidines (1 :5000). MW, marqueur de poids moléculaire.

L'augmentation de la concentration de DDM inhibe la synthèse protéique de la protéine Nox4A-1TM-CH et la solubilisation des protéines Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH (figure 60 A ; Nox4A-1TM-CH, Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH ; conditions C, H et I). La concentration 0,1mM de DDM semble être la plus adaptée pour la synthèse des protéines étudiées.

Le NV10 (Novexin) est un polymère d'hydrate de carbone qui interfère avec l'agrégation des protéines et les aide à prendre une bonne conformation. La synthèse et la solubilité des protéines Nox4A-1TM-CH, Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH en présence de NV10 ne varie pas (figure 60 A, colonne C et D avec ou sans NV10).

La protéine Nox4 possède un site de fixation du FAD qui est l'un de ses centres redox. Nous avons évalué l'effet sur l'expression protéique de l'ajout supplémentaire de FAD (30μM) dans le milieu réactionnel. Le FAD n'as pas d'effet sur la synthèse protéique des protéines Nox4 tronquées (figure 60 B).

L'optimisation des conditions choisies n'a pas fourni de données supplémentaires pour la synthèse de protéines Nox4 tronquées solubles par le système RTS[®], nous avons donc choisi d'exprimer les protéines Nox4-2TM, Nox4-1TM, Nox4Aqc et Nox4Bqc avec une étiquette en position C terminale en présence de 0,1mM de DDM, 0,1mM/4mM de GSH/GSSG et la protéine chaperonne GroE.

III.B.2 Production à grande échelle et purification des protéines Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH

Des productions à grande échelle ont été réalisées dans un volume final de 1mL selon les conditions choisies (0,1mM de DDM, 0,1mM/4mM de GSH/GSSG et 40µL de la chaperonne GroE) dans l'appareil ProteoMaster (§III.B.2.2 Matériels et méthodes). Nous nous sommes concentrés dans un premier temps sur l'étude de l'activité diaphorase de la queue cytosolique produite par la protéine Nox4Aqc-CH comparativement à son isoforme inactive Nox4Bqc-CH.

La fraction soluble (*figure 61 A ; colonne S*) est purifiée sur une colonne avec la résine Talon Superflow[®] (à base de cobalt). Le chargement de la colonne est effectué en circuit fermé pendant toute une nuit. L'éluion est réalisée avec 250mM d'imidazole. Les échantillons sont conservés à -80°C avec 15% de glycérol. L'ensemble de la purification est réalisé en présence de 0,1mM de DDM et est montré dans la *figure 61 (B)*.

On constate qu'une grande partie des protéines n'est pas fixée sur la résine (*figure 61 B ; colonne F, filtrat ; Western blot*). Le lavage a permis d'éliminer beaucoup de contaminants (*figure 61 B ; colonne L1 et L2 ; Coomassie*). L'éluat ne contient que les protéines Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH avec une seule bande résiduelle au alentour des 60kDa (*figure 61 B ; colonne E ; Coomassie*) correspondant à une protéine de nature inconnue. La gène éventuelle de cette protéine pour les mesures d'activité diaphorase est négligeable car elle est présente dans les deux échantillons contenant la protéine Nox4Aqc ou la protéine Nox4Bqc (contrôle négatif).

La quantité des protéines d'intérêt est déterminée par une analyse densitométrique après coloration par le bleu de Coomassie en comparaison avec une gamme étalon d'albumine déposée sur le même gel SDS-PAGE (*figure 61 C*). La quantité de protéines solubles obtenue pour 1mL de réaction de RTS[®] est d'environ 9µg pour la protéine Nox4Aqc-CH et de 5µg pour la protéine Nox4Bqc-CH.

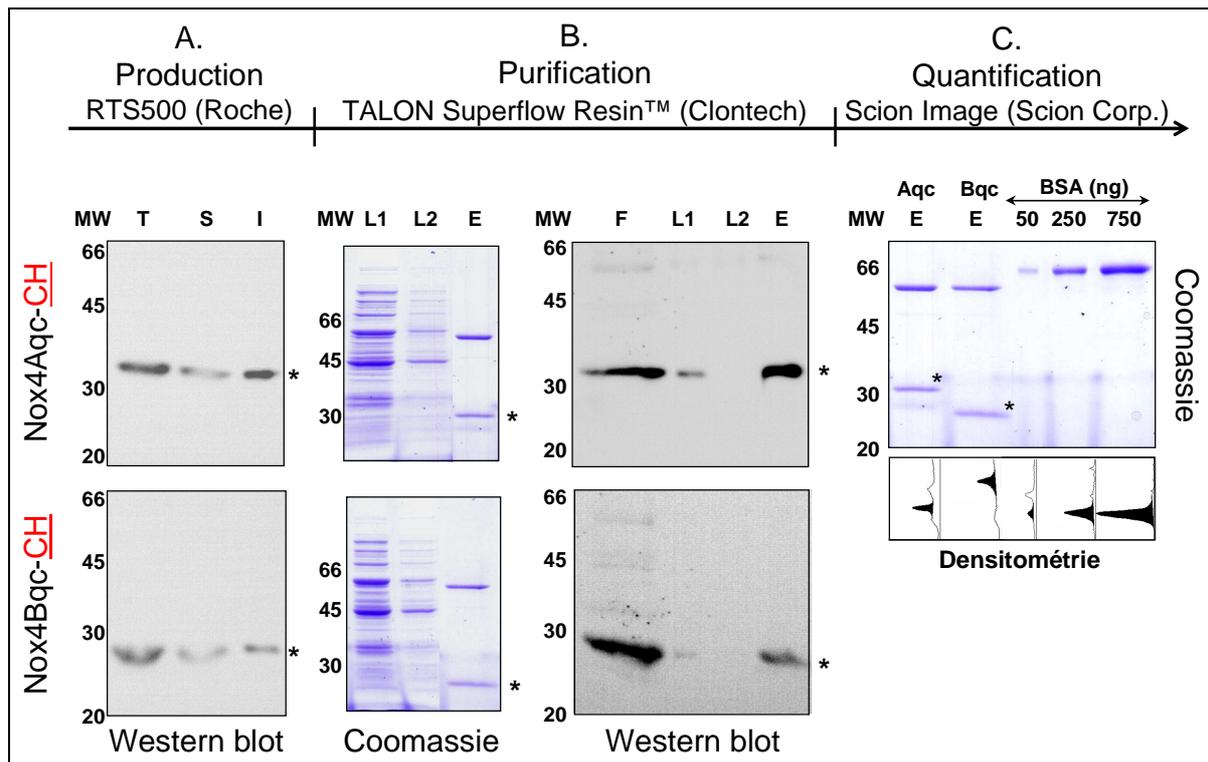


Figure 61. Purification de la protéine Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH produite par le système RTS[®]500. **A)** Identification par western blot des protéines contenues dans les fractions totales (T), solubles (S) et insolubles (I). **B)** Analyse des différentes fractions de la purification des protéines Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH par la résine TALON Superflow Resin[™] par gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie et par western blot. F, filtrat ; L, lavage ; E, élution. **C)** Quantification des protéines Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH purifiées en référence à une gamme de BSA sur gel SDS-PAGE coloré par le bleu de Coomassie. Le gel est scanné et la densitométrie des bandes est mesurée avec le programme Scion Image (Scion Corporation). L'anticorps utilisé est un anti-histidine (1:5000). MW, marqueur de poids moléculaire.

Conclusions : Production de protéines Nox4 recombinantes par le système RTS[®]

- La présence de groupements de codons rares (¹³⁶³AGA AGA CUA¹³⁷¹) de Nox4 affecte aussi la synthèse des protéines Nox4 par RTS[®].

- Nous avons montré que la position de l'étiquette (N terminale ou C terminale) influence le niveau de production protéique.

- L'expression et la solubilisation des protéines Nox4-2TM-CH, Nox4-1TM-CH, Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH sont favorisées en présence de 0,1mM de DDM, 0,1mM/4mM de GSH/GSSG et de la protéine chaperonne GroE.

- La purification des protéines produites à partir d'un mL de réaction de RTS[®] conduit à environ 9µg de protéines pour Nox4Aqc-CH et de 5µg Nox4Bqc-CH.

L'activité diaphorase des protéines Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH purifiées va pouvoir être étudiée.

III.C Mesure de l'activité diaphorase des protéines Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH

La capacité à promouvoir le transfert d'électrons des protéines Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH solubles purifiées a été évaluée. La séquence protéique de ces deux protéines contient les deux domaines prédits de fixation du NADPH et du FAD. La protéine Nox4B est issue d'un épissage alternatif qui a conduit à la suppression du premier domaine de fixation du NADPH. Cette délétion rend la protéine inactive lorsqu'elle est exprimée dans les cellules de mammifère comme les cellules épithéliales pulmonaires humain A549 [Goyal et al, 2005], les cellules C-20/A4 [Grange et al, 2006] et les cellules HEK293E (§II.A.3.2 Résultats II). La protéine Nox4Bqc-CH va nous servir de contrôle négatif d'activité.

Les mesures d'activité diaphorase sont faites avec deux composés différents, l'INT (p-Iodonitrotetrazolium) et le cytochrome c qui sont deux accepteurs d'électrons. Ces deux composés sont usuellement utilisés pour la mesure de l'activité diaphorase [Otsuka-Murakami et Nisimoto, 1995 ; Poinas et al, 2002 ; Nisimoto et al, 2004].

La réduction de l'INT et du cytochrome c est mesurée par spectrophotométrie à 500nm et à 550nm respectivement. Les protéines solubles purifiées Nox4Aqc-CH ou Nox4Bqc-CH, 10pmol, (§II.C.2 Résultats II) sont incubées dans un tampon PBS contenant du FAD 10µM, de l'INT 100µM ou de cytochrome c 100µM. La réaction de transfert d'électrons est initiée par l'addition de NADPH 150µM. La réduction des accepteurs d'électrons est suivie pendant 30min. Une mesure de l'activité non spécifique est réalisée avec le tampon d'élution seul en parallèle. L'activité diaphorase spécifique des protéines est calculée par rapport à celle du contrôle (tampon seul). Les résultats sont exprimés en nmol de molécules réduites (INT ou cytochrome c) par minute et par nmol de protéines solubles purifiées.

La protéine Nox4Aqc-CH présente une activité diaphorase mesurée avec la réduction de l'INT ($26 \pm 2,6$ nmol/min/nmol de protéine) et du cytochrome c ($48 \pm 20,2$ nmol/min/nmol de protéine) par contre la protéine Nox4Bqc-CH n'a pas d'activité diaphorase ni avec l'INT (1 ± 1 nmol/min/nmol de protéine) ni avec le cytochrome c ($8 \pm 5,3$ nmol/min/nmol de protéine). Une plus grande valeur d'activité spécifique est obtenue lorsque l'on utilise le cytochrome c comme accepteur d'électrons comparativement à l'INT (*figure 62*).

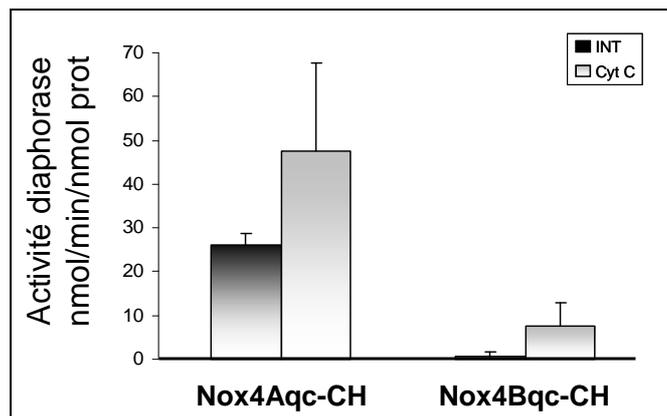


Figure 62. Activité diaphorase de la protéine Nox4Aqc-CH et de la protéine Nox4Bqc-CH solubles purifiées. 10pmol de protéines purifiées sont incubées 5min à 4°C avec 10 μ M de FAD dans 100 μ L de PBS. La lecture s'effectue dans 1mL de milieu PBS, 10 μ M de FAD, 100 μ M d'INT ou de 100 μ M cytochrome c. Le transfert d'électron est initié après l'obtention d'une ligne de base stable par l'addition de 150 μ M de NADPH. La réduction de l'accepteur est suivie par spectrophotométrie à 500nm pour l'INT et 550nm pour le cytochrome c (cyt c). L'activité diaphorase spécifique des protéines est calculée par rapport à celle du contrôle (tampon seul) et exprimée en nmol de molécules réduites (INT ou cytochrome c) par minute et par nmol de protéines solubles purifiées.

L'influence des protéines cytosoliques des cellules HEK293 T-REx sur l'activité diaphorase de Nox4 a été évaluée. L'activité de la protéine Nox4Aqc-CH a été mesurée en présence de 300 μ g de cytosol comme décrit précédemment avec l'INT.

Le cytosol possède une activité réductase par lui-même de $51 \pm 2,55$ nmol/min/nmol de protéines ce qui explique l'augmentation de l'activité diaphorase de la protéine Nox4Aqc-CH en présence du cytosol ($61 \pm 13,5$ nmol/min/nmol de protéines) (*figure 63*). Le cytosol ne stimule pas l'activité diaphorase de Nox4Aqc-CH.

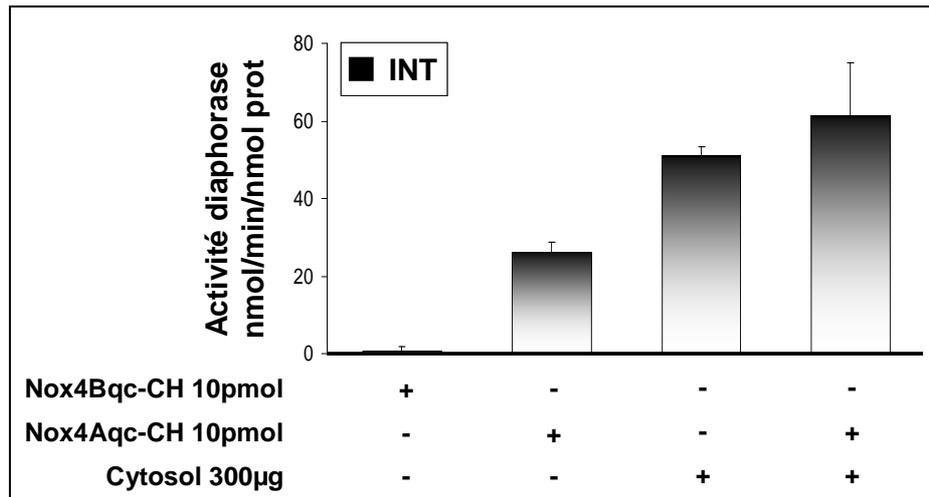


Figure 63. Activité diaphorase de la protéine Nox4Aqc-CH purifiée en présence du cytosol de cellules HEK293 T-REx Nox4. 10pmol de protéines purifiées sont incubées 5min à 4°C avec du 10µM de FAD et 300µg de cytosol. La lecture est initiée par l'addition de 150µM de NADPH et se fait dans 1mL de milieu PBS, 10µM de FAD, 100µM d'INT. La réduction de l'INT est suivie par spectrophotométrie à 500nm. L'activité diaphorase spécifique des protéines est calculée par rapport à celle du contrôle (tampon seul) et exprimée en nmol de molécules d'INT réduites par minute et par nmol de protéines solubles purifiées.

Conclusions : Activité diaphorase de la protéine Nox4 en milieu acellulaire

- La synthèse de protéine Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH par le système RTS[®] conduit à l'obtention de protéines solubles. La conformation de ces protéines est correcte permettant ainsi à la protéine Nox4Aqc-CH d'initier le transfert d'électrons du NADPH vers le FAD. Cette activité diaphorase est caractérisée par la réduction de l'INT ou du cytochrome c.
- L'absence du premier site de fixation du NADPH a de graves conséquences sur l'activité de la protéine Nox4B. La perte de l'activité de la protéine Nox4B entière a été montrée dans les cellules de mammifère et confirmée ici avec la protéine Nox4Bqc-CH purifié dans un système acellulaire.
- Contrairement à la protéine Nox2, l'activité diaphorase de Nox4 dans notre système de mesure n'est pas stimulée par l'addition de cytosol provenant de cellules exprimant naturellement Nox4. Les activités NADPH oxydase et diaphorase de Nox4 sont donc des activités constitutives.

IV L'activité NADPH oxydase de Nox4A est modulable

Comme nous l'avons observé précédemment (§II.A.3.2 Résultats II), Nox4 produit des espèces réactives de l'oxygène (ROS) de manière constitutive indépendamment de la présence de facteurs cytosoliques régulateurs. L'augmentation de l'activité de Nox4 est souvent décrite en association avec une élévation du taux des transcrits, corrélée à l'augmentation de l'expression de la protéine suite à une stimulation par l'angiotensine II [Wingler et al, 2001 ; Touyz et al, 2002], l'urotensine II [Djordjevic et al, 2004], l'interleukine-1 β , la thrombine et PDGF [Ellmark et al, 2005], le 7-ketocholesterol [Pedruzzi et al, 2004], ... Seul un article mentionne une inhibition spécifique de Nox4 par la plumbagine dans un système cellulaire reconstitué [Ding et al, 2005]. Pour l'instant, aucun activateur direct de Nox4 n'a été décrit.

Tout d'abord, nous nous sommes attachés à analyser la spécificité de l'activité oxydase mesurée en terme de production de ROS en cherchant à évaluer la contribution de la 5-lipoxygénase mais aussi l'effet du calcium rapporté comme activateur d'autres membres de la famille des Nox [Bedard et Krause, 2007]. Nous avons utilisé le AA-861, inhibiteur de la 5-lipoxygénase, enzyme impliquée dans la voie de synthèse des leucotriènes à partir de l'acide arachidonique et le tBuBHQ, inhibiteur de la pompe à calcium ATPase dépendante du réticulum endoplasmique. Cette étude a été réalisée dans un premier temps sur le modèle des cellules HEK293E.

IV.A Etude de l'effet des composés AA-861 et tBuBHQ sur l'activité NADPH oxydase de Nox4 dans les cellules HEK293E

IV.A.1 Effet du composé AA-861, inhibiteur de la 5-lipoxygénase

L'acide arachidonique est un activateur bien connu du complexe NADPH oxydase des phagocytes, comprenant la protéine Nox2. L'activation des polynucléaires neutrophiles par des stimuli solubles ou insolubles conduit à un relarguage d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires par la phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂) [Maridonneau-Parini et Tauber, 1986a ; Maridonneau-Parini et Tauber, 1986b ; Dana et al, 1998]. Cette voie métabolique a également été décrite dans les cellules non phagocytaires comme les cellules musculaires lisses des vaisseaux [Zafari et al, 1999]. L'acide

arachidonique est métabolisé par la 5-lipoxygénase en leucotriène (LT) A₄ puis ensuite en LTB₄ par l'enzyme LTA₄ hydrolase (*figure 64*). Le LTB₄ peut stimuler l'activité oxydase phagocytaire soit en activant la PLA₂ [Lindsay et al, 1998 ; Wijkander et al, 1995], soit par l'intermédiaire du calcium [Ito et al, 2002] ou en agissant directement sur la phosphorylation de p47phox [Serezani et al, 2005]. La 5-lipoxygénase est au cœur de cette voie métabolique et son inhibition pourrait potentialiser l'activité NADPH oxydase.

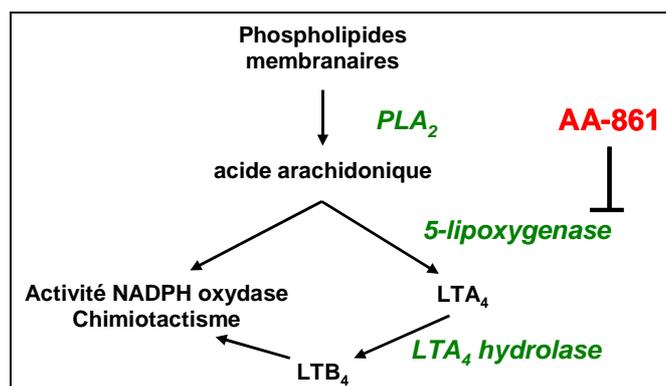


Figure 64. Schéma représentant le rôle de la 5-lipoxygénase dans la voie de synthèse du LTB₄ à partir des phospholipides membranaires.

Nous avons mesuré l'activité NADPH oxydase des cellules HEK293E natives ou surexprimant Nox4A ou Nox4B en présence du composé AA-861 (3,5,6-Di triméthyl 1,4 benzohydroquinone) par chimiluminescence et en utilisant le luminol selon la méthode décrite précédemment (§II.A.3.2 Résultats II). Le composé AA-861 est ajouté dans l'échantillon au début de la mesure.

L'incubation avec le composé AA-861 augmente l'activité NADPH oxydase (d'un facteur 4 environ) dans les cellules sur-exprimant Nox4A par rapport aux cellules natives (*figure 65 ; A*) avec un maximum d'activité entre 10 et 15 minutes (*figure 65 ; B*). La cinétique de stimulation de l'activité oxydase est rapide et semble être incompatible avec une augmentation de la synthèse *de novo* de la protéine Nox4. La spécificité de cette stimulation est contrôlée par des inhibiteurs (le DPI, inhibe les flavoprotéines ; la roténone, inhibe la chaîne respiratoire de la mitochondrie ; la L-NAME, inhibe la NO synthase et le tiron piège les ions superoxyde) : seuls le DPI et le tiron inhibent l'activité stimulée indiquant qu'il s'agit bien d'une activité de type NADPH oxydase d'une part et d'une production d'O₂^{•-} d'autre part (*figure 65 ; C*).

L'activité NADPH oxydase mesurée avec Nox4B est probablement due à l'expression endogène de la protéine Nox4 (*figure 65, D*).

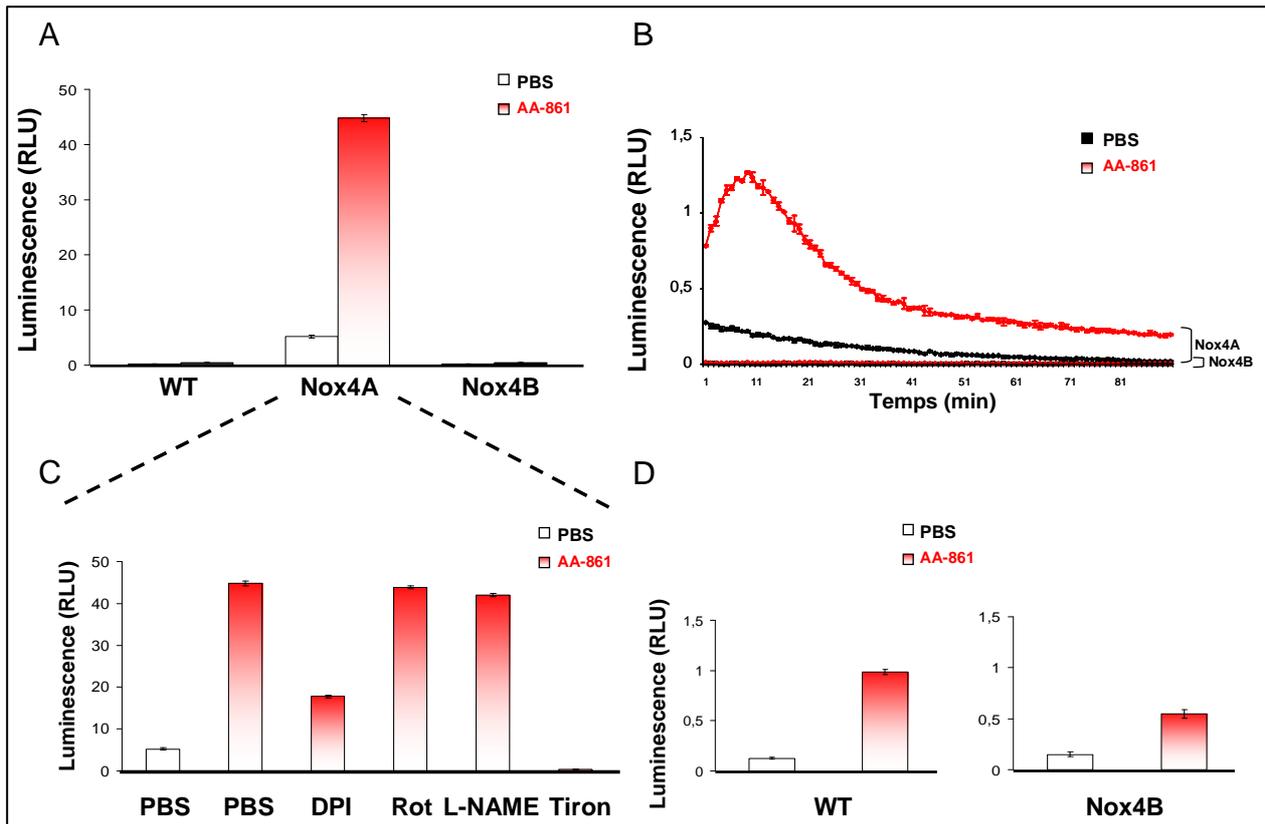


Figure 65. Activité NADPH oxydase des cellules HEK293E natives (WT), surexprimant Nox4A ou Nox4B en présence du composé AA-861. A), C) et D). Les cellules HEK293E sont traitées par la trypsine, lavées puis 5×10^5 cellules sont incubées dans 250 μ L de milieu expérimental à base de PBS contenant 20 μ M de luminol, 10U/mL de Horseradish peroxydase (HRP) avec ou sans la présence du composé AA-861 (10 μ M). L'activité NADPH oxydase est mesurée par chimiluminescence (luminol). Les valeurs sont exprimées en unités relatives de luminescence (RLU) et correspondent à la somme sur 90min des mesures à raison d'une mesure toutes les minutes. Les inhibiteurs utilisés sont : DPI, chlorure de diphenylene iodonium 10 μ M ; Rot, rotenone 0,5 μ M ; L-NAME 100 μ M ; Tiron 0,5 μ M. **B)** Cinétique de stimulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 par le AA-861 (10 μ M).

Nous avons ainsi mis en évidence un composé capable de potentialiser rapidement l'activité NADPH oxydase de Nox4. Le mécanisme d'action reste à déterminer. Le rôle potentiel de la 5-lipoxygénase doit être examiné.

IV.A.2 Effet du composé tBuBHQ, inhibiteur de la pompe à calcium ATPase dépendante du réticulum endoplasmique

Pour étudier l'effet du calcium sur l'activité de Nox4, nous avons utilisé le composé tBuBHQ. Le tBuBHQ (2,5-Di-*tert*-butylhydroquinone) augmente la concentration cytosolique du calcium à partir des stocks intracellulaires puis extracellulaires [Muallem et al, 1991]. Elle inhibe la pompe à calcium ATP dépendante du réticulum endoplasmique, la pompe SERCA, en se fixant sur la sous unité ATPase [Khan et al, 1995]. L'inhibition de la pompe SERCA

empêche la recapture du calcium intracytosolique dans le réticulum conduisant ainsi à une augmentation du taux calcique dans le cytosol.

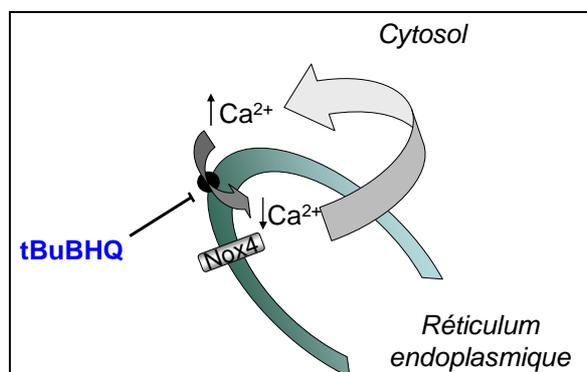


Figure 66. Schéma situant l'action d'inhibition du tBuBHQ sur la pompe SERCA du réticulum endoplasmique (RE). Le calcium intracytosolique qui diffuse dans le cytosol est reconduit en permanence dans la lumière du RE par la pompe à calcium ATP dépendante. Le taux calcique est ainsi régulé. L'inhibition de la pompe par le tBuBHQ empêche cette recapture provoquant ainsi une augmentation des concentrations de calcium dans le cytosol.

Les mesures de l'activité NADPH oxydase par chimiluminescence des cellules HEK293E natives ou surexprimant Nox4A ou Nox4B sont réalisées en présence de tBuBHQ. On observe comme pour le AA-861, une stimulation de l'activité oxydase des cellules HEK293E surexprimant Nox4A comparativement aux cellules natives ou surexprimant Nox4B (*figure 67 ; A*). La spécificité de l'activation est contrôlée par l'utilisation d'inhibiteurs (le DPI, la roténone, la L-NAME et le tiron). Cette stimulation est inhibée seulement par le DPI et le tiron (*figure 67 ; C*). Comme précédemment, une stimulation de la protéine Nox4 endogène est observée dans les cellules natives et surexprimant Nox4B (*figure 67 ; D*). La cinétique d'activation est rapide elle aussi (optimum à 20 minutes de stimulation) (*figure 67 ; B*).

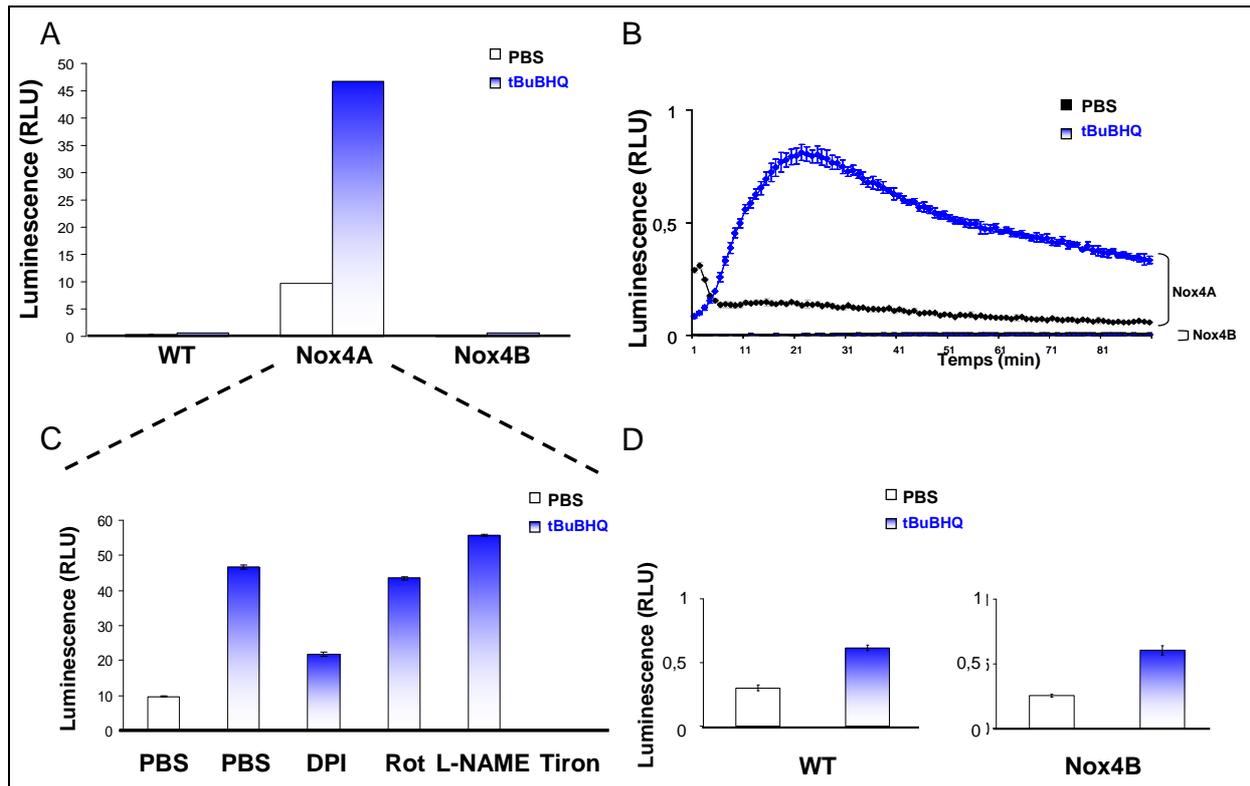


Figure 67. Activité NADPH oxydase des cellules HEK293E natives (WT), ou surexprimant Nox4A ou Nox4B en présence du composé tBuBHQ. A), C) et D) Les cellules HEK293E sont traitées par la trypsine, lavées puis 5×10^5 cellules sont incubées dans 250 μ L de milieu expérimental avec ou sans la présence du composé tBuBHQ (50 μ M). L'activité NADPH oxydase est mesurée par chimiluminescence (luminol). Les valeurs sont exprimées en unités relatives de luminescence (RLU) et correspondent à la somme sur 90min des mesures à raison d'une mesure toutes les minutes. Les inhibiteurs utilisés sont : DPI, diphenyleneiodonium 10 μ M; Rot, rotenone 0,5 μ M; L-NAME 100 μ M; Tiron 0,5 μ M. **B)** Cinétique de stimulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 par le tBuBHQ (50 μ M).

Ainsi, nous observons également une augmentation de l'activité de Nox4 dans les cellules HEK293E sous l'action du tBuBHQ. L'implication du flux calcique dans cet effet doit être étudiée.

IV.A.3 Confirmation de l'effet stimulateur du tBuBHQ et du AA-861 sur l'activité NADPH oxydase de Nox4 dans d'autres modèles cellulaires

Nous avons vu précédemment que le tBuBHQ et le AA-861 pouvaient stimuler l'activité oxydase des cellules HEK293E surexprimant Nox4A. Pour confirmer cet effet, nous avons utilisé deux autres modèles cellulaires validés surexprimant la protéine Nox4A : les cellules HEK293 T-REx et les cellules chondrocytaires C-20/A4.

IV.A.3.1 Modèle cellulaire HEK293 T-REx (Invitrogen)

Les cellules HEK293 T-REx Nox4 ont été fournies par le Dr Léna Serrander (laboratoire PATIM, Pr K.H. Krause, Genève) [Serrander et al, 2007]. Ces cellules possèdent un système d'induction protéique régulé par la tétracycline grâce à la présence de deux plasmides (Invitrogen) (§II.C.2.2.2 Matériels et méthodes). En présence de la tétracycline, l'opérateur TetO₂ est dé-réprimé et le gène d'intérêt est transcrit (figure 68 ; A).

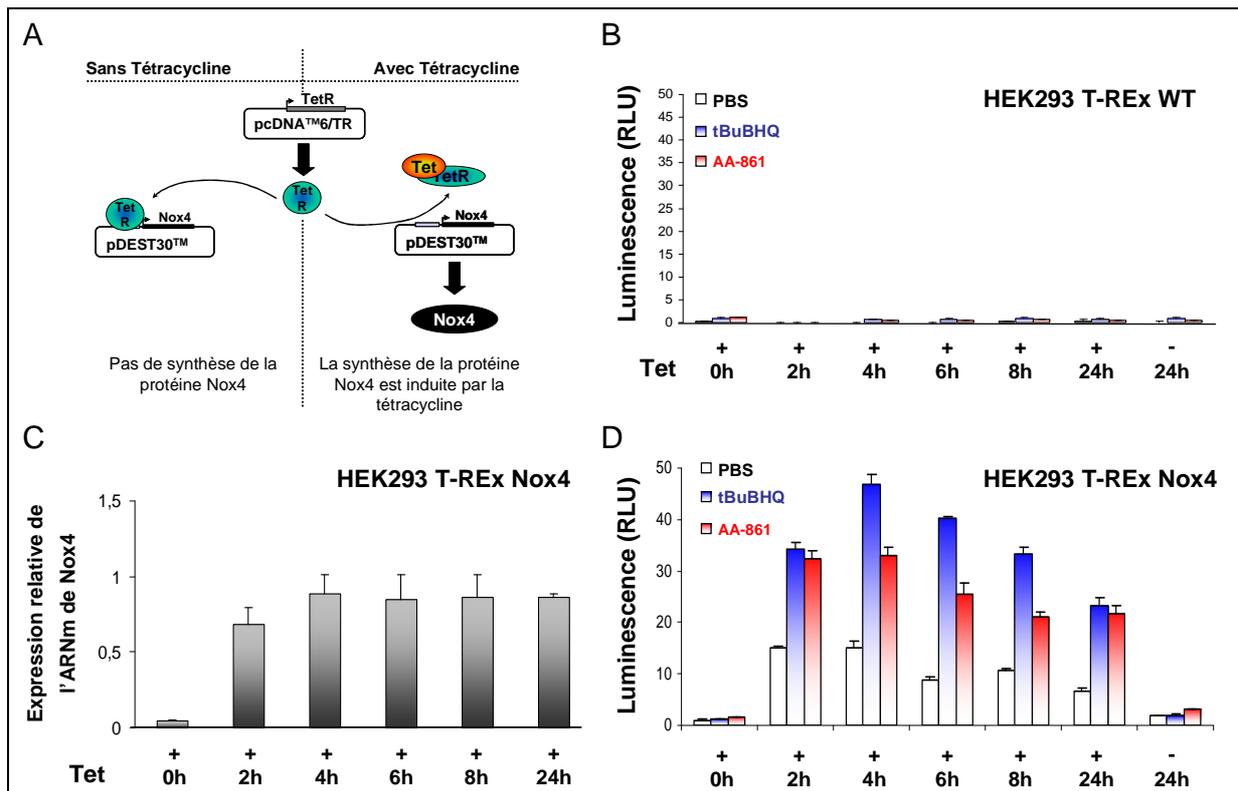


Figure 68. Stimulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 par les composés AA-861 et tBuBHQ avec le modèle cellulaire des cellules HEK293 T-REx natives (WT) ou Nox4. A) Schéma explicatif du système T-REx. **Activité NADPH oxydase des cellules HEK293 T-REx natives, WT, (B) ou Nox4 (D)** en présence du composé AA-861 10µM ou tBuBHQ 50µM. Les cellules sont traitées avec 1µg/mL de tétracycline et les mesures de l'activité oxydase par chimiluminescence (luminol) s'effectuent à différents temps d'induction. Les valeurs sont exprimées en unités relative de luminescence (RLU) et correspondent à la somme sur 90min des mesures à raison d'une mesure toutes les minutes. **C)** RT-PCR en temps réel de Nox4 des cellules HEK293 T-REx Nox4 à différents temps d'induction par la tétracycline. La quantité relative de l'ARNm de Nox4 est calculée par rapport à l'ARNm de la GAPDH.

Le niveau de transcription de l'ARNm de Nox4 est suivi par RT-PCR en temps réel (figure 68 ; C). Lors de l'addition de la tétracycline, on observe une forte synthèse de l'ARNm de Nox4 à partir de 2h et qui se poursuit jusqu'à 24h par rapport aux cellules non induites. En parallèle à cette synthèse, on observe une activité NADPH oxydase constitutive de Nox4. Cette activité est inexistante pour les cellules non induites.

Au même temps d'incubation, les deux composés, tBuBHQ 50 μ M (*figure 68 ; D, barres bleues*) ou AA-86110 μ M (*figure 68 ; D, barres rouges*), stimulent de manière significative l'activité oxydase dans les cellules HEK293 T-REx Nox4 induites par la tétracycline comparativement aux cellules non induites. Ces observations ne sont pas retrouvées pour les cellules HEK293 T-REx WT (ne disposant pas du second plasmide codant pour Nox4) dont l'induction par la tétracycline ne conduit pas à la synthèse de Nox4 (*figure 68, B, barres grises*).

Nous avons donc montré dans trois modèles cellulaires différents (HEK293E, HEK293 T-REx et C-20/A4), l'action spécifique de deux molécules, le tBuBHQ et le AA-861 sur l'activité NADPH oxydase de Nox4A.

IV.A.3.2 Modèle cellulaire chondrocytaire : la lignée C-20/A4

La lignée chondrocytaire C-20/A4 a été transfectée de manière stable à l'aide du transfectant Effectene (Qiagen) (§III.A.1.3 Matériels et méthodes) avec le plasmide pEF6/V5-His contenant l'ADNc codant pour la protéine Nox4AV5/His et sélectionnée avec 10 μ g/mL de blasticidine. Cette lignée stable a été obtenue en partenariat avec le Dr Laurent Grange (GREPI, thèse de sciences 2007) qui a étudié le rôle de Nox4 dans la voie de signalisation conduisant à la synthèse de la collagénase MMP-1 (**M**étallo**p**rotéase **M**atricielle) en réponse à un stress cytokinique (hIL-1 β , interleukine 1 β humaine) [Grange et al, 2006].

Comme on peut le voir sur la *figure 69 (A)*, les cellules transfectées avec le plasmide codant pour la protéine Nox4AV5/His ont un niveau d'ARNm de Nox4 fortement augmenté par rapport aux cellules natives (RT-PCR en temps réel). De ce fait, elles sont capables de générer constitutivement des ROS mesurés par chimiluminescence (*figure 69 ; B*) par rapport aux cellules natives. Lorsque nous incubons ces cellules en présence de 50 μ M de tBuBHQ ou de 10 μ M de AA-861, on observe, comme pour les cellules HEK293E Nox4A, une stimulation de l'activité NADPH oxydase.

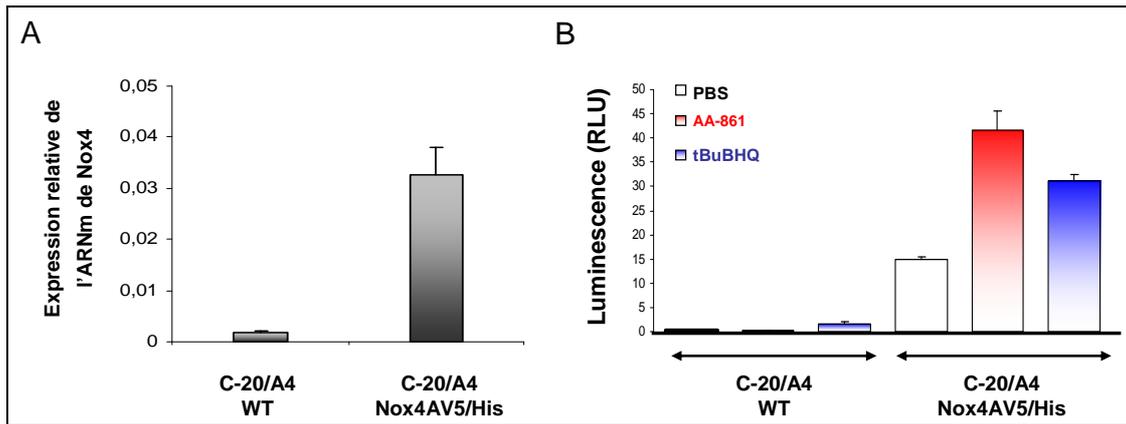


Figure 69. Stimulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 par les composés AA-861 et tBuBHQ avec le modèle cellulaire des chondrocytes. A) RT-PCR en temps réel de Nox4 dans les cellules C-20/A4 natives (WT) ou surexprimant Nox4AV5/His. La quantité relative de l'ARNm de Nox4 est calculée par rapport à l'ARNm de la GAPDH. **B)** Activité NADPH oxydase des cellules chondrocytaires C-20/A4 natives (WT) ou surexprimant Nox4AV5/His en présence des composés AA-861 et du tBuBHQ. Les cellules C-20/A4 sont traitées par la trypsine, lavées puis 5×10^5 cellules sont incubées dans $250 \mu\text{L}$ de milieu expérimental avec ou sans la présence de AA-861 ($10 \mu\text{M}$) ou de tBuBHQ ($50 \mu\text{M}$). L'activité NADPH oxydase est mesurée par chimiluminescence (luminol). Les valeurs sont exprimées en unités relatives de luminescence (RLU) et correspondent à la somme sur 90min des mesures à raison d'une mesure toutes les minutes.

Ainsi, ces composés sont capables d'augmenter l'activité NADPH oxydase de Nox4 surexprimée dans les cellules C-20/A4.

IV.A.4 Spécificité de l'effet stimulateur des composés AA-861 et tBuBHQ sur Nox4 par rapport à Nox2

Nous avons vu précédemment que les deux molécules tBuBHQ et AA-861 étaient capables de stimuler l'activité NADPH oxydase des cellules HEK293E surexprimant Nox4 (inhibée par le DPI, inhibiteur des flavoprotéines). Pour exclure l'intervention de la protéine Nox2 dans ce phénomène, nous avons recherché son expression dans les cellules HEK293E. Par RT-PCR, nous avons constaté que le transcrite de Nox2 n'était pas présent dans ces cellules (§II.A.3.1.1 Résultats II). Par ailleurs, la protéine Nox2 et la protéine p67phox ne sont pas détectées par western blot (*figure 70*).

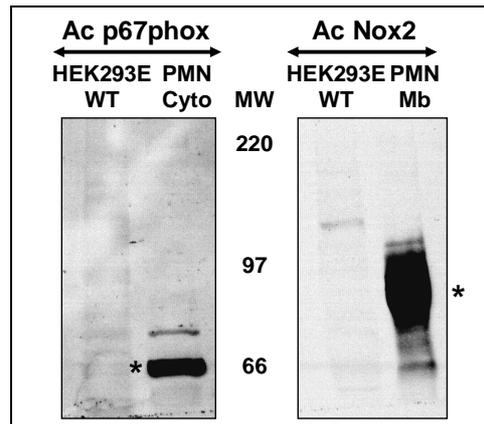


Figure 70. Mise en évidence des protéines p67phox et Nox2 dans les cellules HEK293E. Expérience de western blot avec un anticorps (Ac) dirigé contre la protéine p67phox ou Nox2 sur des lysats de cellules HEK293E et de polynucléaires neutrophiles (PMN). Mb, membrane ; Cyto, cytosol. *, indique la position des protéines d'intérêts (Nox2 et p67phox). MW, marqueur de poids moléculaire.

L'effet des deux inhibiteurs (AA-861 et tBuBHQ) sur la NADPH phagocytaire Nox2 a été contrôlé avec les polynucléaires neutrophiles (PMN). Les PMN ont été purifiés à partir de sang frais et l'activité NADPH oxydase a été réalisée par chimiluminescence sur 5×10^5 cellules.

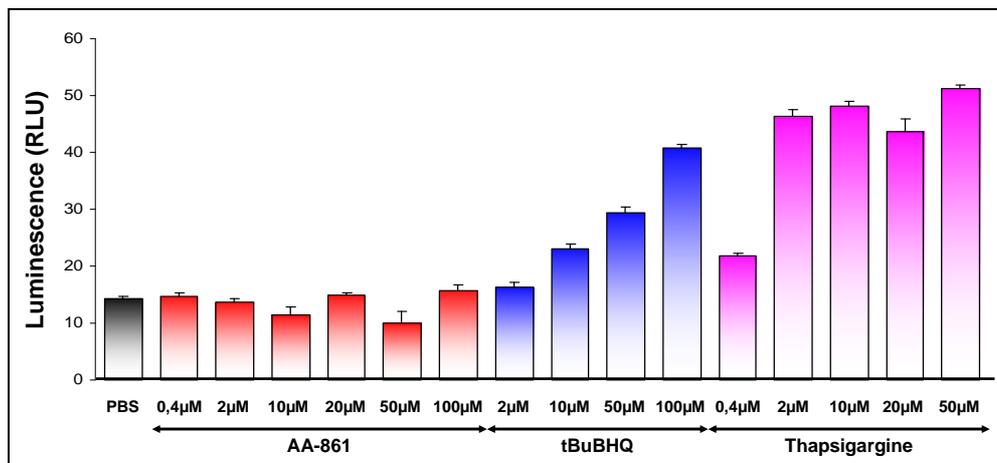


Figure 71. Activité NADPH oxydase des polynucléaires neurophiles (PMN) non stimulés en présence du AA-861, du tBuBHQ ou de la thapsigargine. Les PMN sont purifiés à partir de sang frais et 5×10^5 cellules sont incubées dans 250 μL de milieu expérimental contenant la horseradish peroxydase (HRP) et du luminol en présence ou non de AA-861, de tBuBHQ ou de thapsigargine. L'activité NADPH oxydase est mesurée par chimiluminescence. Les valeurs sont exprimées en unités relative de luminescence (RLU) et correspondent à la somme des mesures sur 90min à raison d'une mesure toutes les minutes.

La thapsigargine, autre inhibiteur de la pompe SERCA a été utilisé à titre de contrôle. Ce composé, en libérant le calcium des stocks intracellulaire, provoque l'activation du complexe NADPH oxydase (Nox2) [Geiszt et al, 1999 ; Granfeldt et al, 2002].

On voit sur la *figure 71* que l'incubation avec la thapsigargine ou le tBuBHQ active Nox2 dans les PMN non stimulés. Par contre, le composé AA-861 n'a aucun effet et n'est donc pas capable d'activer Nox2. En ce qui concerne la tBuBHQ, son action pourrait s'expliquer par la mobilisation du stock calcique comme pour la thapsigargine.

Les 2 composés AA-861 et tBuBHQ stimulent l'activité constitutive de Nox4. La question posée est de savoir s'ils peuvent augmenter l'activité oxydase de Nox2 déjà stimulée. A cet effet, des PMN stimulés avec le PMA (4 β -phorbol 12-myristate 13-acétate) sont mis en présence du AA-861 et du tBuBHQ. Le PMA induit une production de ROS indépendamment du calcium. On observe sur la *figure 72* que quel que soit l'état du complexe NADPH oxydase de Nox2 (stimulé ou non), la molécule AA-861 ne modifie en rien son activité. On remarque également un effet additif du PMA et du tBuBHQ sur l'activité oxydase de Nox2 montrant que le mécanisme d'activation de ces deux composés est différent, l'un activant la protéine kinase C (PMA) et l'autre modifiant le calcium intracellulaire (tBuBHQ).

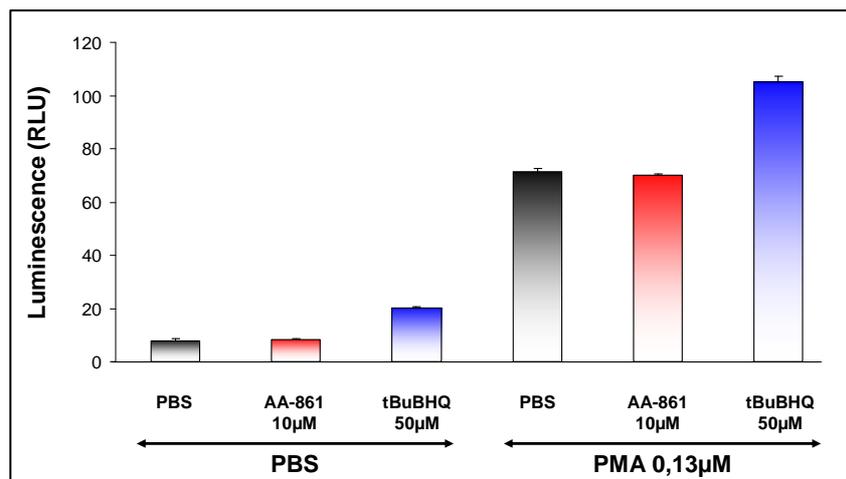


Figure 72. Activité NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles (PMN) en présence du AA-861 ou du tBuBHQ mesurée par chimiluminescence. Les PMN sont purifiées à partir de sang frais et 5×10^5 cellules sont incubées dans 250 μ L de milieu expérimental (PBS contenant 20 μ M de luminol, 10U/mL de Horseradish peroxydase, 20mM de glucose, 0,5mM de MgCl₂ et 0,9mM de CaCl₂) et stimulé par le PMA (0,13 μ M). Les PMN stimulés ou non sont incubés pendant la mesure avec 10 μ M de AA-861, 50 μ M de tBuBHQ. L'activité NADPH oxydase est mesurée par chimiluminescence. Les valeurs sont exprimées en unités relative de luminescence (RLU) et correspondent à la somme sur 90min des mesures à raison d'une mesure toutes les minutes.

Ainsi, l'effet stimulateur de ces composés semble être spécifique de la protéine Nox4.

Conclusions : Stimulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4

- Nous avons pu montrer ici que l'activité NADPH oxydase de Nox4 pouvait être augmentée par deux composés, l'AA-861 et le tBuBHQ.
- Cette activation de Nox4 est confirmée dans trois modèles cellulaires différents, les cellules HEK293E Nox4, les cellules HEK293 T-REx Nox4 et les cellules C-20/A4 Nox4.
- L'augmentation de l'activité oxydase induite par ces composés s'effectue spécifiquement sur Nox4 et non sur Nox2. Cependant, les effets sur les autres Nox (Nox1, Nox3 et Nox5) n'ont pas été analysés.
- Le mécanisme d'action de ces composés reste à déterminer. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées :
 1. La stimulation de l'activité oxydase pourrait être due à une augmentation d'expression de la protéine Nox4, comme il est rapporté dans la littérature pour d'autres composés.
 2. L'implication de l'activité de la 5-lipoxygénase (cible du AA-861).
 3. Le rôle joué par le calcium (cible du tBuBHQ).
 4. La structure quinone commune de ces deux composés (hydroquinone pour le tBuBHQ et benzoquinone pour l'AA-861).

Ces différentes possibilités vont faire l'objet de nos investigations.

IV.A.5 Détermination du mécanisme d'action des composés AA-861 et tBuBHQ**IV.A.5.1 Effets des composés AA-861 et tBuBHQ sur l'expression protéique de Nox4**

Chez les cellules eucaryotes, différentes étapes sont nécessaires au processus allant du gène à la protéine : transcription de l'ADN en ARN, maturation de l'ARN en ARNm, épissage éventuel de l'ARNm, export de l'ARNm du noyau et enfin traduction en protéine par les ribosomes. Tout ceci nécessite un certain temps pour être efficace et fidèle. En ce qui concerne la synthèse de Nox4, Serrander et ses collaborateurs ont observé un décalage

d'environ une heure entre l'apparition de l'ARNm de Nox4 après induction des cellules HEK293 T-REx Nox4 par la tétracycline et l'activité oxydase de la protéine Nox4 [Serrander et al, 2007]. La cinétique d'activation de Nox4 par les composés quinones est trop rapide pour être compatible avec la synthèse *de novo* de la protéine Nox4 (maximum d'activité atteint avec les deux composés vers les 10 à 20 premières minutes).

On ne peut cependant pas exclure le fait que ces composés puissent augmenter la quantité de protéine Nox4 par une augmentation de la vitesse de traduction à partir d'un pool d'ARNm basal ou en stabilisant la protéine ce qui rallonge sa demi-vie.

L'identification de la protéine p22phox a été réalisée par western blot sur des cellules HEK293E natives ou surexprimant Nox4A incubées ou non avec le AA-861 et le tBuBHQ. Les cellules HEK293E en culture sont incubées 10min avec 10µM de AA-861 ou 50µM de tBuBHQ (*figure 73*). Ces temps correspondent approximativement au moment où les cellules stimulées ont le plus d'activité NADPH oxydase.

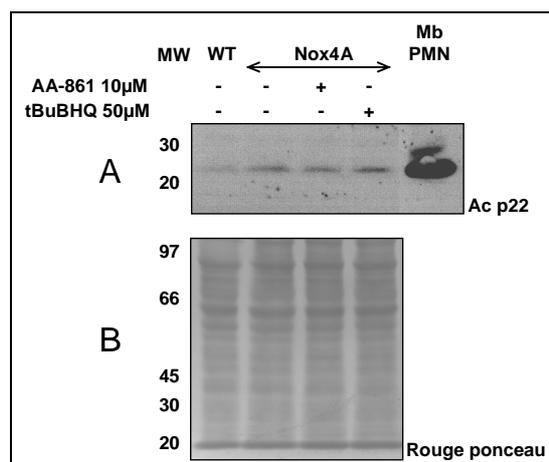


Figure 73. Mise en évidence de la protéine p22phox par western blot dans les cellules HEK293E incubées en présence de AA-861 et tBuBHQ. Les cellules HEK293E Nox4A en culture sont incubées pendant 10min avec 10µM de AA-861 ou avec 50µM de tBuBHQ. Après incubation, les cellules sont rapidement lysées un tampon RIPA (radioimmunoprecipitation assay : PBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10µM TLCK, 1,8µM leupeptine, 1,5µM pepstatine). 75µg de protéines totales sont déposées pour les extraits protéiques des cellules HEK293E ainsi que 25µg de protéines membranaires de PMN servant de témoin positif pour la protéine p22phox. **A)** Western blot avec l'anticorps (Ac) 16G7 (anti-p22phox ; Y. Campion non publié). **B)** Coloration de la membrane au rouge ponceau pour le contrôle de dépôt des échantillons. MW, marqueur de poids moléculaire.

On observe comme précédemment ((§II.A.3.4 Résultats II)) une augmentation du niveau d'expression de la protéine p22phox dans les cellules HEK293E surexprimant Nox4A par rapport aux cellules natives (*figure 73 ; A*). Par contre, il n'y a pas de différence d'expression de la protéine p22phox entre les cellules HEK293E Nox4A non traitées par

rapport à celles ayant été incubées avec les deux molécules AA-861 et tBuBHQ (figure 73 ; A).

Nous avons vu précédemment que la quantité de protéine p22phox était corrélée à celle de la protéine Nox4 (§II.A.3.4 Résultats II). L'absence de la stabilisation de la protéine p22phox réfute l'hypothèse de l'augmentation de la quantité de protéine Nox4A par les quinones.

IV.A.5.2 Rôle de la 5-lipoxygénase dans la stimulation de Nox4

La 5-lipoxygénase (5LOX) a été décrite surtout dans les cellules leucocytaires (neutrophiles, basophiles, éosinophiles, mastocytes, monocytes et macrophages). De récentes études ont montré la présence de la 5-lipoxygénase dans les cellules épithéliales du poumon, de l'intestin et de la peau [Luo et al, 2003]. Les cellules HEK293E ont une morphologie épithéliale et aucune donnée dans la littérature ne décrit la présence de 5-lipoxygénase dans ces cellules.

La présence de la 5-lipoxygénase dans les cellules HEK293E est déterminée par RT-PCR et par western blot (figure 74).

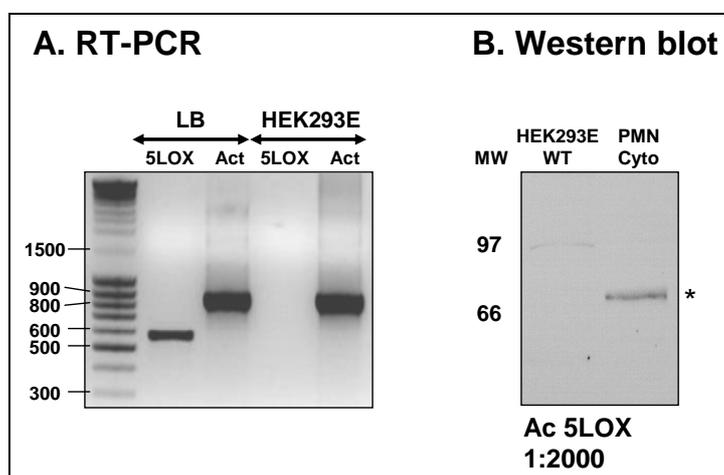


Figure 74. Mise en évidence de la 5-lipoxygénase dans les cellules HEK293E. A) RT-PCR sur les ARNm des cellules HEK293E natives (WT) et des lymphocytes B (LB). 5µg d'ARN totaux de cellules HEK293E et de LB sont retranscrits en ADNc par transcription inverse. Les ADNc sont utilisés pour les réactions de PCR avec les amorces spécifiques de la 5-lipoxygénase (5LOX) et un couple d'amorces spécifiques de l'actine (Act). Le contrôle positif du transcrite de la 5-lipoxygénase est réalisé avec l'ADNc de LB. **B)** Western blot avec un anticorps (Ac) dirigé contre la protéine 5-lipoxygénase (1:2000, fourni par le docteur Stanke, laboratoire Pharmacologie/Toxicologie DBPC, Grenoble) sur des lysats de cellules HEK293E et de polynucléaires neutrophiles (PMN). Le contrôle positif de l'expression de la 5-lipoxygénase est le cytosol de PMN. *, indique la protéine 5-lipoxygénase. MW, marqueur de poids moléculaire.

Ni le transcrit de la 5-lipoxygénase (comparé au contrôle positif lymphocytaire), ni la protéine 5-lipoxygénase (comparée au contrôle positif du cytosol de PMN) ne sont retrouvés dans le modèle cellulaire HEK293E (*figure 74, A et B*). De plus, l'utilisation d'un autre inhibiteur de la 5-lipoxygénase, le MK886, n'a aucun effet sur l'activité constitutive de Nox4.

Ainsi, l'augmentation de l'activité oxydase de Nox4 par l'AA-861 n'implique pas la 5-lipoxygénase.

IV.A.5.3 Rôle du calcium dans la stimulation de Nox4

De nombreux articles ont décrit une localisation subcellulaire de Nox4 au niveau du réticulum endoplasmique [Goyal et al, 2005 ; Pedruzzi et al, 2004]. Pedruzzi et ses collaborateurs ont montré que suite à une exposition au 7-kétocholesterol, les cellules musculaires lisses des vaisseaux présentent une oscillation calcique au niveau du réticulum endoplasmique concomitante à une augmentation d'expression et d'activité de Nox4. Due à sa localisation subcellulaire, l'activité de Nox4 pourrait être sensible à un changement environnemental tel qu'une variation du taux de calcium. De plus, le composé AA-861 a été décrit comme pouvant augmenter la concentration intracellulaire du calcium [Huang et Jan, 1999]. Le calcium libéré par ce composé pourrait provenir de différents compartiments comme la mitochondrie, les lysosomes ou le réticulum endoplasmique. Cependant, cette relation n'est pas clairement établie puisque qu'un récent travail en partenariat avec le Dr Grange (GREPI, Grenoble) a montré que l'utilisation de l'ionomycine, ionophore calcique, n'entraîne pas d'augmentation de l'activité de Nox4A surexprimée dans les chondrocytes C-20/A4 [Grange et al, 2006].

L'implication du calcium dans la stimulation de l'activité de Nox4 a été étudiée. Le flux calcique intracellulaire sous l'action des différents composés est mesuré à l'aide d'une sonde à calcium Fluo-3/AM sur des cellules HEK293E surexprimant Nox4A par cytométrie en flux (FACS). Une cinétique de la variation du calcium intracellulaire a été établie pour chaque composé (AA-861, tBuBHQ). Le contrôle positif du flux calcique a été obtenu en utilisant l'ionomycine et de la thapsigargine qui est un autre inhibiteur reconnu de la pompe SERCA [Treiman et al, 1998]. Ce composé inhibe la sous unité ATPase en se fixant [Xu et al, 2004] sur un site différent du tBuBHQ [Khan et al, 1995]. La spécificité de la mesure calcique est démontrée par l'utilisation d'un « piègeur » de calcium, le BAPTA. Un exemple de cinétique observée au FACS est montré dans la *figure 75* avec la thapsigargine. L'augmentation du

calcium libre intracellulaire se traduit par une élévation de la fluorescence de la cellule. Le BAPTA qui piège le calcium, inhibe cette fluorescence.

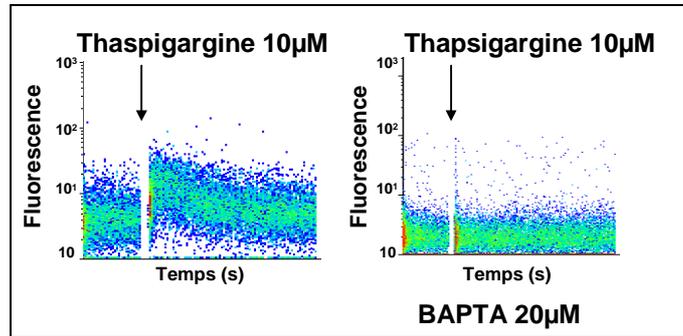


Figure 75. Flux calcique, mesuré par cytométrie en flux avec la sonde Fluo-3-AM, dans les cellules HEK293E Nox4 sous l'action de la thapsigargine en présence ou non de BAPTA. Les cellules HEK293E sont incubées avec 10 µM de composé Fluo-3-AM en présence ou non de 20 µM BAPTA pendant 30 minutes à 37°C. Elles sont ensuite lavées puis la fluorescence est lue à l'aide d'un cytomètre en flux. Le graphique représente la fluorescence en fonction du temps. La flèche indique le moment où la thapsigargine 10µM est ajoutée.

L'effet sur l'activité oxydase de Nox4 du flux calcique provenant uniquement des stocks intracellulaires ou également d'un influx supplémentaire de calcium extracellulaire est évalué en présence d'EGTA 1mM (piège le calcium extracellulaire) et en présence de CaCl₂ 1,5mM respectivement.

Les variations de la concentration en calcium sont montrées dans la *figure 76*.

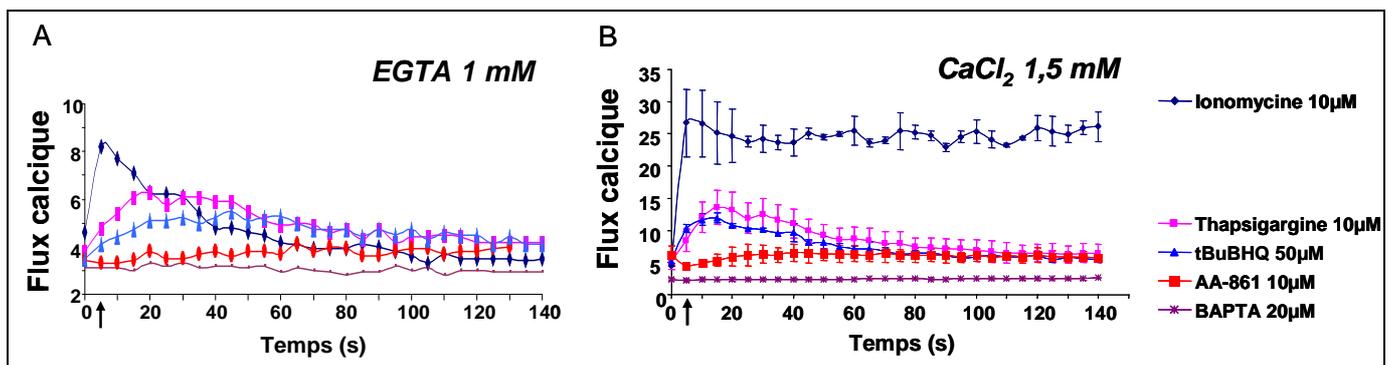


Figure 76. Flux calcique mesuré par cytométrie en flux avec la sonde Fluo-3-AM dans les cellules HEK293E surexprimant Nox4 sous l'action des composés ionomycine, thapsigargine, AA-861, et tBuBHQ. Les cellules sont resuspendues dans un milieu contenant 1mM d'EGTA (A) ou 1,5mM de NaCl (B) sont incubées en présence de 10 µM Fluo-3-AM et avec ou sans le BAPTA 20 µM pendant 30 minutes à 37°C. Puis elles sont lavées et la fluorescence est lue à l'aide d'un cytomètre en flux. La flèche indique le moment où ces composés sont ajoutés : ionomycine 10µM, AA-861 10µM, tBuBHQ 50µM, ou thapsigargine 10µM. Les graphiques représentent la fluorescence en fonction du temps (seconde). Chaque point correspond à la moyenne de la fluorescence pendant un laps de temps de 5 secondes.

Une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire est observée dans les deux cas (EGTA ou CaCl_2) pour la ionomycine, la thapsigargine et le tBuBHQ (l'amplitude est plus grande en présence de 1,5mM de CaCl_2). Par contre, le AA-861 ne modifie pas la concentration intracellulaire du calcium contrairement aux observations faites par Huang et Jan. Ces auteurs ont remarqué un flux calcique dans des cellules rénales de chiens en utilisant des concentrations très fortes de AA-861 allant jusqu'à 200 μM [Huang et Jan, 1999]. Ils observent néanmoins une faible variation du calcium avec 10 μM de AA-861 ce qui n'est pas notre cas. L'utilisation du BAPTA avec ou sans les différents composés (la thapsigargine, la tBuBHQ et la AA-861) annule complètement le signal calcique. Ceci permet de dire que les variations observées correspondent bien à celles du calcium.

En ce qui concerne la mesure de l'activité NADPH oxydase de Nox4A dans les mêmes conditions (en présence d'EGTA 1mM ou de CaCl_2 1,5mM), seuls le AA-861 et le tBuBHQ augmentent la production de ROS par les cellules HEK293E surexprimant Nox4A (figure 77 ; A et B). L'ionomycine et la thapsigargine demeurent sans effet quelque soit la concentration utilisée (figure 77 ; C).

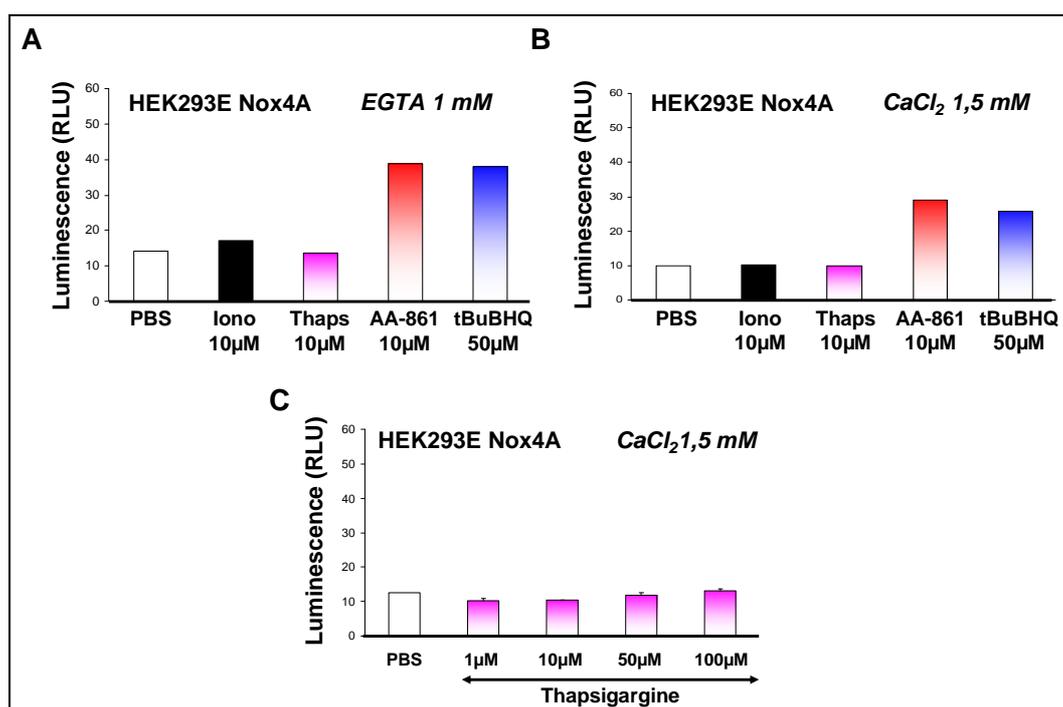


Figure 77. Activité NADPH oxydase des cellules HEK293E surexprimant Nox4A en présence de ionomycine, de thapsigargine, du AA-861 et du tBuBHQ. Les cellules HEK293E Nox4A sont traitées par la trypsine, lavées puis 5×10^5 cellules sont incubées dans 250 μL de milieu expérimental contenant la horseradish peroxydase (HRP) et du luminol en présence de 1mM d'EGTA (**A**) ou 1,5mM de CaCl_2 (**B**) avec 10 μM de ionomycine, 10 μM de thapsigargine, 10 μM de AA-861 ou 50 μM de tBuBHQ. L'activité NADPH oxydase est mesurée par chimiluminescence (luminol). Les valeurs sont exprimées en unités relatives de luminescence (RLU) et correspondent à la somme sur 90min des mesures à raison d'une mesure toutes les minutes. **C**) Effet d'une gamme de concentration de thapsigargine (1 μM , 10 μM , 50 μM et 100 μM) sur l'activité NADPH oxydase de Nox4A mesurée par chimiluminescence.

Les résultats des variations calciques et des activités NADPH oxydases de Nox4A en présence des différents composés ne sont pas corrélés et sont résumés dans le tableau 14.

	ionomycine	thapsigargine	tBuBHQ	AA-861
↑ flux Ca ²⁺	+	+	+	-
↑ activité Nox4A	-	-	+	+

Tableau 14. Résumé de l'effet des composés ionomycine, thapsigargine, tBuBHQ et AA-861 sur le flux calcique et sur l'activité oxydase de Nox4A. -, sans effet ; +, effet positif.

Dans le cas de la ionomycine et de la thapsigargine, ces deux composés augmentent le taux de calcium dans la cellule mais n'ont aucun effet sur l'activité de Nox4A. Inversement, l'AA-861 n'influence pas la concentration intracellulaire du calcium mais en revanche stimule l'activité oxydase. Le tBuBHQ change la concentration du calcium tout en stimulant l'activité de Nox4. Bien que la cinétique de variation du calcium sous l'action de la thapsigargine et de la tBuBHQ semble être la même (même vitesse, même niveau de fluorescence), ces composés agissent de façon différente sur l'activité oxydase de Nox4A. Il semble donc qu'il n'y ait aucune cohérence ni concordance entre ces deux phénomènes.

IV.A.5.4 Effet de deux analogues structuraux quinones, le tBuBHQ et le tBuBQ sur l'activité oxydase de Nox4A

Les composés AA-861 et tBuBHQ ont tous les deux un squelette quinone. Nous avons examiné l'impact de la structure quinone sur l'activité de Nox4 en utilisant une autre quinone, la tBuBQ (2,5-Di-*tert*-butyl-1,4-benzoquinone) similaire au tBuBHQ.

Les quinones sont des composés diphénoliques possédant des propriétés redox. Les benzoquinones peuvent être réduites en hydroquinones par gain de 2 électrons et de deux hydrogènes (*figure 78 ; A*) en passant par une forme de semiquinone. Le tBuBQ n'a pas été décrit contrairement à sa forme réduite comme pouvant agir sur le flux du calcium intracellulaire. Nous montrons ici que le flux calcique en présence du tBuBQ demeure inchangé à l'inverse du tBuBHQ (*figure 78 ; B*). Ce composé qui partage exactement la même structure que le tBuBHQ est également capable d'augmenter l'activité de Nox4 (*figure 78 ; C*).

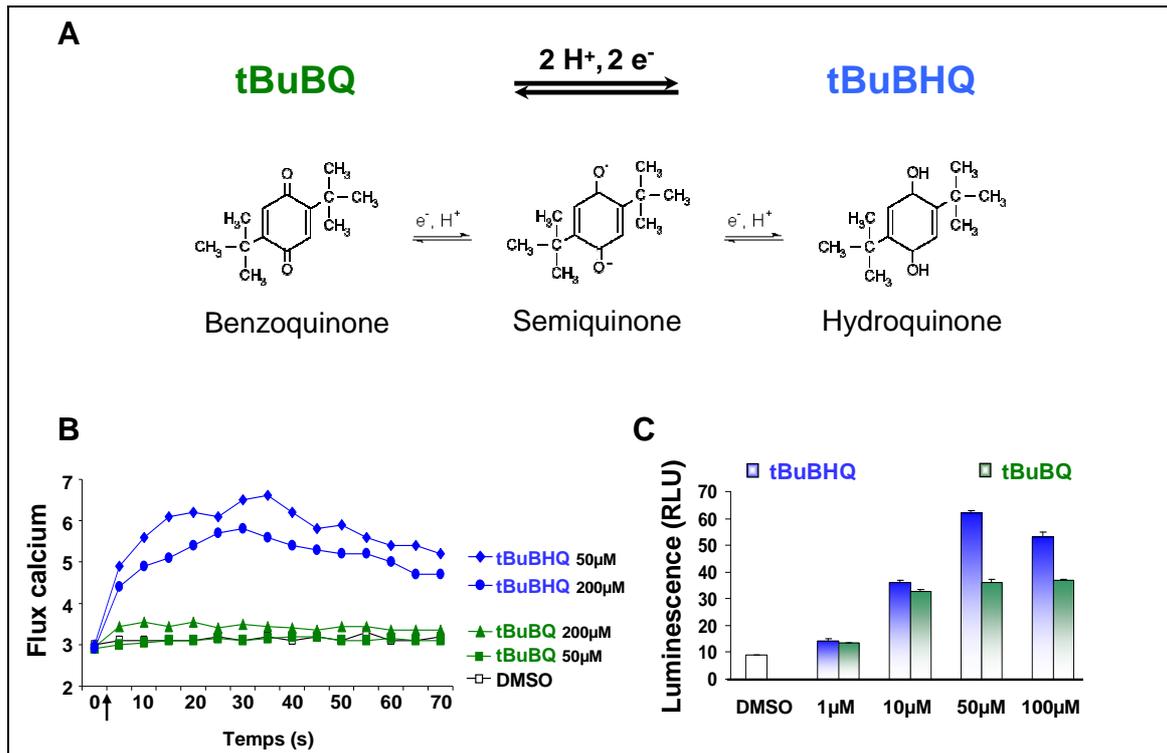


Figure 78. Flux calcique et activité oxydase dans les cellules HEK293E surexprimant Nox4 sous l'action des composés tBuBHQ et tBuBQ. A) Schéma représentant la réaction d'oxydoréduction entre la forme benzoquinone et hydroquinone du composé tBuBQ. **B)** Graphique représentant la fluorescence en fonction du temps (seconde). Chaque point représente la moyenne de la fluorescence pendant un laps de temps de 5 secondes. Des cellules sont incubées avec 10 µM Fluo-3-AM pendant 30 minutes à 37°C. Elles sont lavées puis la fluorescence est lue avec un cytomètre en flux. La flèche indique le moment de l'addition des composés : 50 µM et 200µM de tBuBHQ ou de tBuBQ. **C)** Activité NADPH oxydase des cellules HEK293E Nox4A. Les cellules HEK293E Nox4A sont traitées par la trypsine, lavées puis 5x10⁵ cellules sont incubées dans 250µL de milieu expérimental contenant la horseradish peroxydase (HRP) et du luminol en présence ou non de tBuBHQ ou de tBuBQ. L'activité NADPH oxydase est mesurée par chimiluminescence (luminol). Les valeurs sont exprimées en unités relatives de luminescence (RLU) et correspondent à la somme sur 90min des mesures à raison d'une mesure toutes les minutes.

Nous retrouvons ici encore une discordance entre le flux calcique et l'activité oxydase de Nox4. Il semblerait donc que la structure quinone de ces composés (AA-861, tBuBHQ et tBuBQ) soit impliquée dans l'activation de Nox4.

IV.A.6 Rôle potentiel des groupements alkyls des quinones dans la stimulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4

IV.A.6.1 Activité NADPH oxydase de Nox4 en présence des différents composés quinones

Le rôle potentiel de différentes quinones sur l'activité de Nox4, la tMetBQ (2,5-Di-tert-methyl-1,4-benzoquinone), la Duroquinone (2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-benzoquinone), la BQ (p-benzoquinone) et la HQ (Hydroquinone) a été étudié. La structure de ces composés est représentée sur la *figure 79*. La différence entre ces quinones vient de la nature de leur groupement en position R2, R3, R5 et R6, mais aussi de leur état oxydé ou réduit.

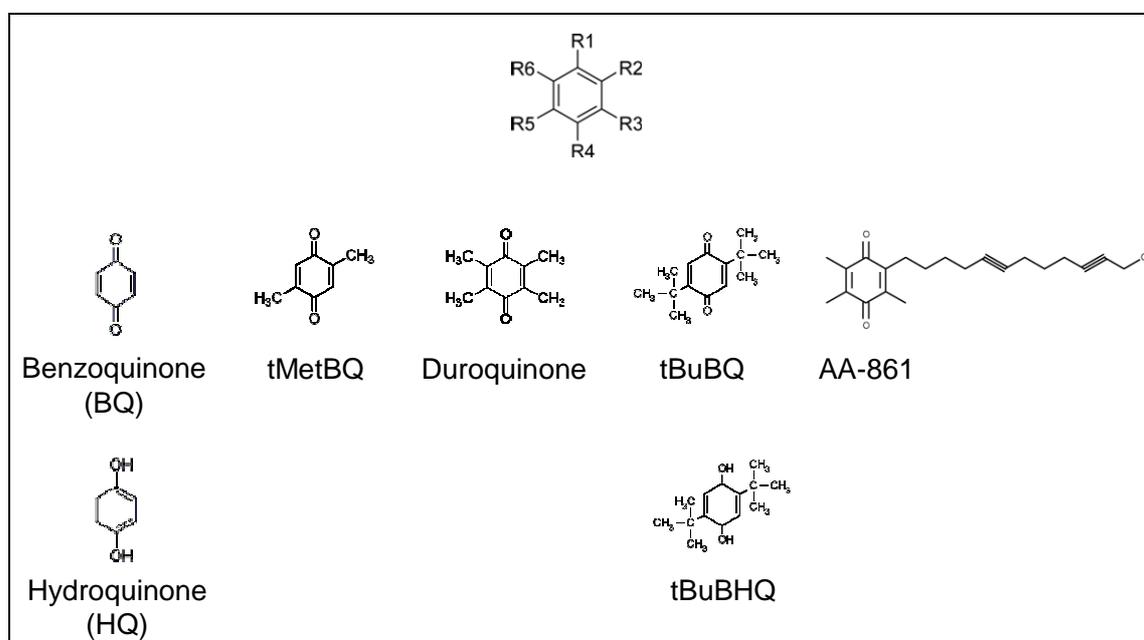


Figure 79. Schéma des structures des différentes quinones utilisées dans cette étude.

L'effet de ces différents composés sur l'activité NADPH oxydase de Nox4 est représenté sur la *figure 80*. La duroquinone, qui possède 4 groupements méthyles en position R2, R3, R5 et R6, stimule l'activité NADPH oxydase de Nox4 dès la concentration de 1 μ M (*figure 80, D*). Les composés benzoquinones et hydroquinones non substitués par des groupements carbonés ne modifient pas l'activité de Nox4 à une concentration inférieure à 2 μ M. En revanche, au delà de cette concentration, l'activité NADPH oxydase de Nox4 diminue (*figure 80, A et B*). Ce même phénomène est également observé pour le composé tMetBQ, substitué en position R2 et R5 par un groupement méthyle, à une concentration

plus élevée, 100 μ M (figure 80 ; C). Cet effet inhibiteur est surprenant et provient surtout de composés faiblement substitués (BQ, HQ, et tMetBQ).

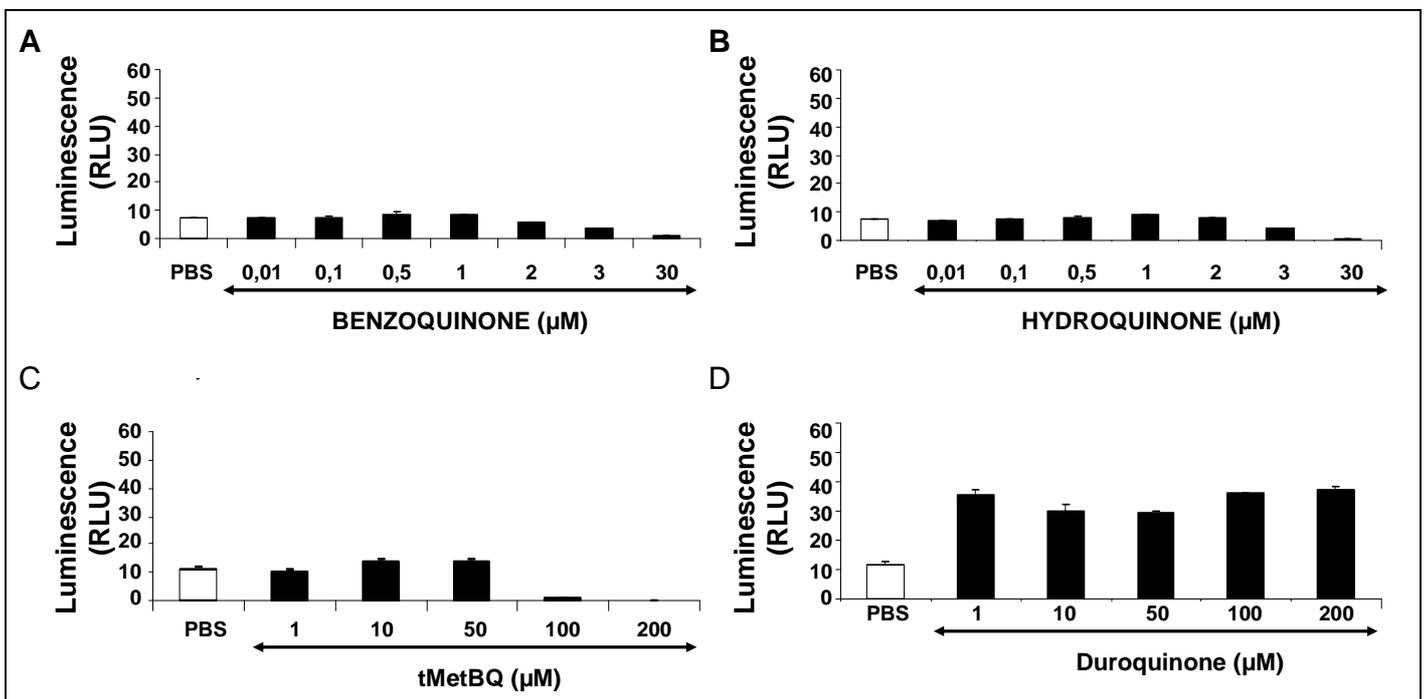


Figure 80. Activité NADPH oxydase des cellules HEK293E Nox4 en présence de 4 composés quinones. Les cellules HEK293E Nox4A sont traitées par la trypsine, lavées puis 5×10^5 cellules sont incubées dans 250 μ L de milieu expérimental contenant la horseradish peroxydase (HRP) et du luminol en présence ou non de benzoquinone, d'hydroquinone, de tMetBQ et de duroquinone. L'activité NADPH oxydase est mesurée par chimiluminescence (luminol). Les valeurs sont exprimées en unités relative de luminescence (RLU) et correspondent à la somme sur 90min des mesures à raison d'une mesure toutes les minutes.

La figure 81 résume les effets observés de ces différents homologues de quinones sur l'activité NADPH oxydase des cellules HEK293E Nox4A (activités normalisées par rapport à l'activité constitutive non stimulée de Nox4A). Différentes commentaires peuvent être faits :

1. On ne remarque pas de différence d'effet sur l'activité NADPH oxydase de Nox4 entre la forme oxydée (benzoquinone) et réduite (hydroquinone) : inhibition par le BQ et le HQ ; stimulation par le tBuBQ et le tBuBHQ.
2. L'augmentation de la taille du groupement alkyle en position R2 et R5 entraîne une stimulation de l'activité de Nox4 (tBuBQ comparé à tMetBQ)

3. Enfin, l'addition d'un groupement méthyle en position R3 et R6 sur le composé tMetBQ rend le composé efficace pour une stimulation de l'activité de Nox4 (duroquinone par rapport à la tMetBQ) alors qu'une suppression se concrétise par une inhibition de l'activité NADPH oxydase de Nox4 (BQ, HQ et tMetBQ par rapport aux quinones tBuBQ, tBuBHQ et AA-861).

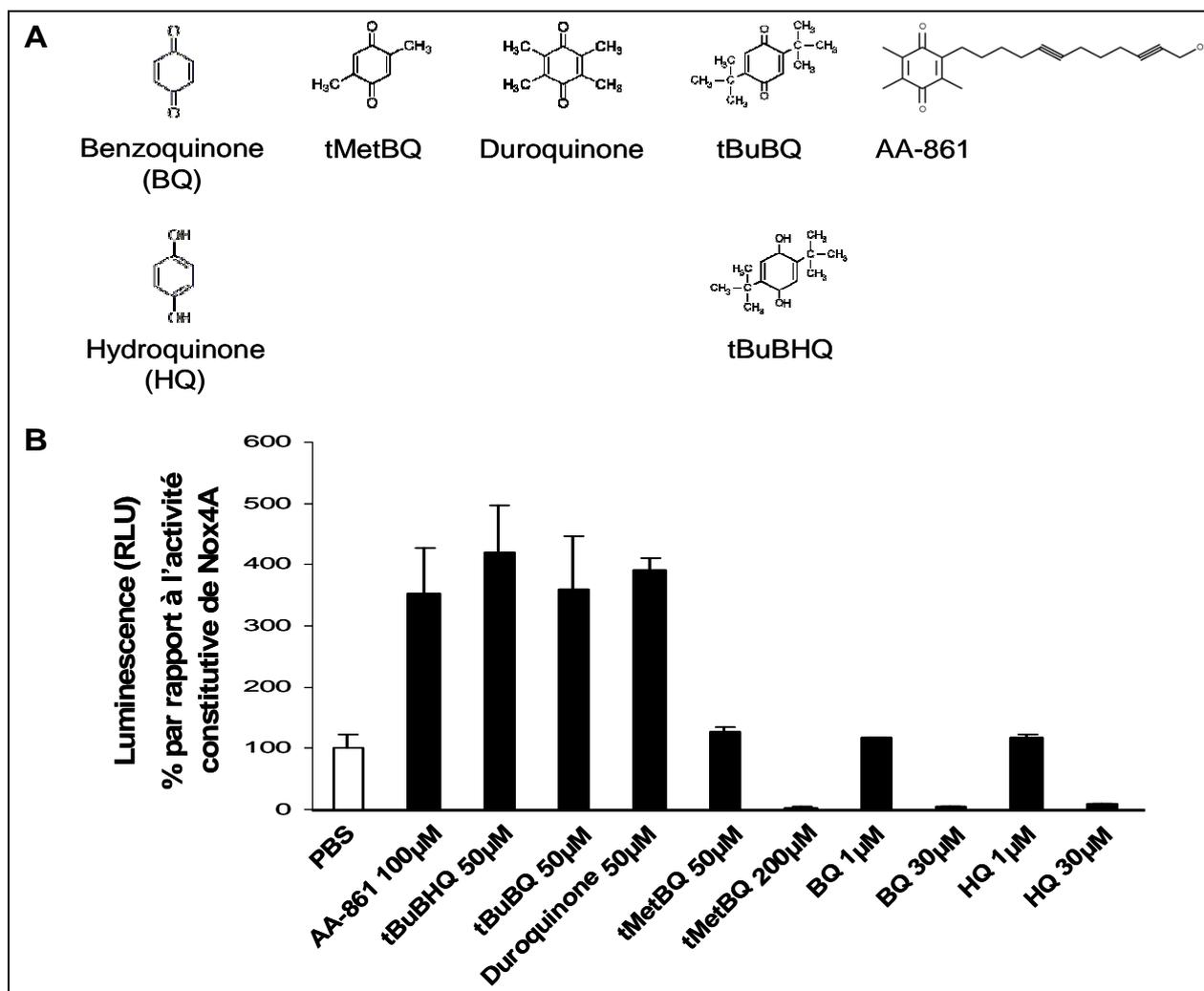


Figure 81. Rôle potentiel des groupements alkyls des quinones dans la stimulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4. **A)** Schéma des structures des différentes quinones utilisées. **B)** Effet des différents composés quinones BQ, HQ, tMetBQ, duroquinone, tBuBQ, tBuBHQ et AA-861 sur l'activité NADPH oxydase de Nox4. L'activité NADPH oxydase des cellules HEK293E Nox4 mise en présence des composés quinones est mesurée par chimiluminescence. Les cellules HEK293E Nox4A sont traitées par la trypsine, lavées puis 5×10^5 cellules sont incubées dans 250µL de milieu expérimental contenant la horseradish peroxydase (HRP) et du luminol en présence ou non des différentes quinones. Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport à l'activité constitutive de Nox4A surexprimée dans les cellules HEK293E.

Ainsi, il semblerait que le nombre substitution et la taille du groupement alkyl puissent jouer un rôle dans la modulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4.

IV.A.6.2 Activité oxydase engendrée par les composés quinones en présence des phosphatidylcholines

Tsukii et ses collaborateurs, en 1996, ont conclu que la production de ROS dans les cellules HL-60 différenciées en présence de la tBuBHQ était due à une réaction spontanée entre la tBuBHQ et les phospholipides membranaires. Leur hypothèse est étayée par une augmentation de la production de ROS mesurée en milieu acellulaire par la tBuBHQ uniquement en présence de phosphatidylcholine (25 μ g) [Tsukii et al, 1996]. Le fait que nous n'observons pas d'augmentation flagrante de la production de ROS avec les cellules HEK293E natives ou surexprimant Nox4B (l'isoforme inactive de Nox4) mise en présence de la tBuBHQ, exclut cette hypothèse dans notre modèle cellulaire. Néanmoins, afin d'invalider l'éventualité d'un effet non spécifique des quinones avec les phospholipides, des mesures de production de ROS de ces composés quinones ont été réalisées en présence de 25 μ g de phosphatidylcholine (figure 82).

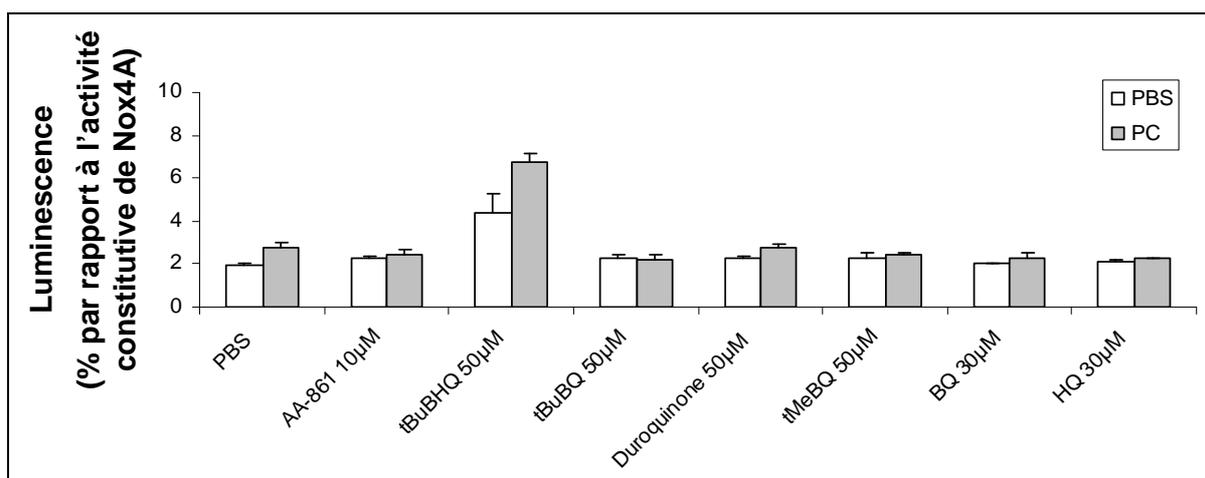


Figure 82. Production intrinsèque de ROS par les différents composés quinones BQ, HQ, tMetBQ, duroquinone, tBuBQ, tBuBHQ et AA-861 en présence uniquement de phosphatidylcholine (25 μ g). La production de ROS des composés quinones est mesurée par chimiluminescence (luminol) en présence ou non de phosphatidylcholine (PC, 25 μ g) dans 250 μ L de milieu expérimental contenant la horseradish peroxydase (HRP) et du luminol. Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport à l'activité constitutive de Nox4 surexprimée dans les cellules HEK293E.

La phosphatidylcholine ajoutée dans le milieu expérimental ne change pas la production basale de ROS par les composés AA-861 (10 μ M), tBuBQ (50 μ M), Duroquinone (50 μ M), tMetBQ (50 μ M), BQ (30 μ M) et HQ (30 μ M). En ce qui concerne la molécule tBuBHQ, nous observons, comme Tsukii et ses collaborateurs, un niveau de production basale de ROS plus élevé par rapport aux autres composés, l'addition de phosphatidylcholine (25 μ g)

augmentant légèrement ce niveau basal. Cependant, l'amplitude de l'augmentation n'est en rien comparable avec celle observée pour les cellules HEK293E surexprimant Nox4A.

IV.A.6.3 Composés quinones et cytotoxicité

Comme les dérivés quinones peuvent provoquer des dommages cellulaires [Decaprio, 1999 ; Winn, 2003], nous avons réalisé des tests de cytotoxicité sur les cellules HEK293E en évaluant l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant cellulaire. La libération de cette enzyme est un indicateur classique de lésion membranaire. Les cellules HEK293E sont traitées avec la trypsine puis lavées au PBS. 5×10^5 de cellules sont déposées dans 250 μ L de PBS dans une plaques 96 puits. Ces cellules sont incubées pendant 60min avec les composés quinones aux concentrations indiquées sur la *figure 83*.

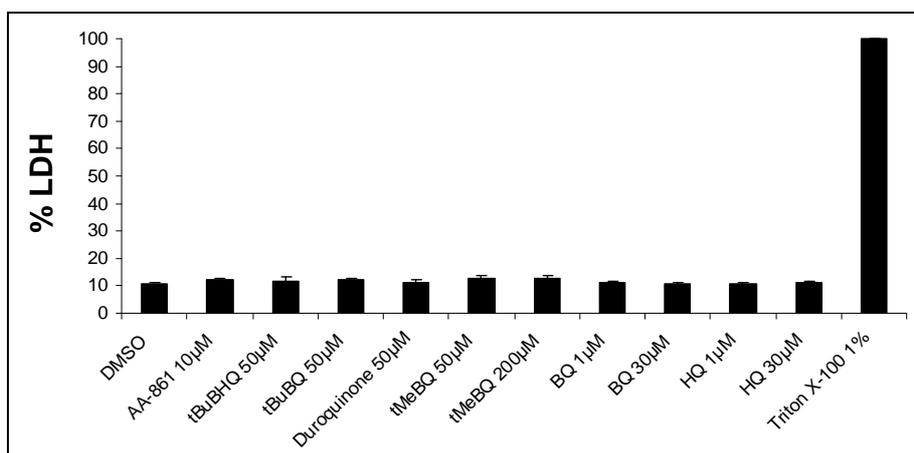


Figure 83. Test de toxicité des différents composés quinones BQ, HQ, tMetBQ, duroquinone, tBuBQ, tBuBHQ et AA-861 sur les cellules HEK293E. Les cellules HEK293E (5×10^5) sont incubées en présence de différentes quinones pendant 60 minutes puis le milieu de culture est prélevé et utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase. Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport aux cellules lysées par un traitement au Triton X-100.

L'activité enzymatique de la LDH est mesurée par spectrophotométrie (§V Matériels et méthodes). Les valeurs de l'activité de la LDH des cellules exposées aux quinones sont comparées à un contrôle négatif (cellules seules sans quinones) et à la valeur maximale correspondant à l'activité de la LDH lorsque les cellules sont lysées par le Triton X-100, 1%. L'incubation avec les quinones à différentes concentrations ne modifie pas la libération de la LDH par les cellules HEK293E dans le milieu extracellulaire par rapport au contrôle négatif sans quinones (*figure 83 ; B*). Ceci démontre l'intégrité de la membrane plasmique de ces cellules pendant le temps d'incubation (au moins 60 minutes). Ainsi, la modification de

l'activité de Nox4 sous l'action des quinones ne résulte pas de l'effet toxique de ces composés sur les cellules HEK293E.

IV.B Effet des composés AA-861 et tBuBHQ sur l'activité diaphorase de la protéine Nox4Aqc-CH en milieu acellulaire reconstitué

L'activité diaphorase de la protéine Nox4Aqc-CH (10pmol) a été mesurée en présence de 10 μ M de FAD, de 300 μ g de cytosol et de 10 μ M de AA-861 ou de 50 μ M de tBuBHQ selon le protocole décrit auparavant (§II.D Résultats II). Les résultats sont montrés dans la *figure 84*.

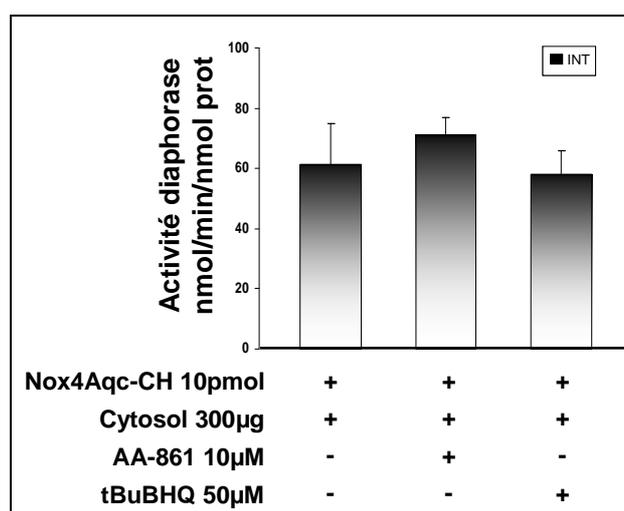


Figure 84. Activité diaphorase de la protéine Nox4Aqc-CH purifiée en présence du cytosol de cellules HEK293 T-REx Nox4, et du AA-861 ou du tBuBHQ. 10pmol de protéines Nox4Aqc-CH solubles purifiées sont incubées 5min à 4°C dans un milieu contenant 10 μ M de FAD et 300 μ g de cytosol avec ou sans 10 μ M de AA-861 ou 50 μ M de tBuBHQ. La lecture est initiée par l'addition de 150 μ M de NADPH et se fait dans 1mL de milieu PBS, 10 μ M de FAD, 100 μ M d'INT avec ou sans 10 μ M de AA-861 ou 50 μ M de tBuBHQ. La réduction de l'INT est suivie par spectrophotométrie à 500nm. L'activité diaphorase spécifique de Nox4Aqc-CH est calculée par rapport à celle du contrôle (tampon seul) et exprimée en nmol de molécules d'INT réduites par minute et par nmol de protéines solubles purifiées.

L'activité diaphorase de la protéine Nox4Aqc-CH en présence du cytosol (61 \pm 13,5 nmol/min/nmol de protéines) ne varie significativement pas avec l'addition de 10 μ M de AA-861 (71 \pm 5,7 nmol/min/nmol de protéines) ou de 50 μ M de tBuBHQ (58 \pm 7,7 nmol/min/nmol de protéines).

L'absence de modification de l'activité diaphorase par la AA-861 et la tBuBHQ en présence du cytosol de cellules HEK293 T-REx indique que l'action de ces deux quinones

n'intervient pas sur les premières étapes du transfert d'électrons jusqu'au centre redox du FAD de la protéine Nox4A.

Conclusions : Modulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4

Au cours de ce travail, nous avons montré que l'activité NADPH oxydase de Nox4 est non seulement constitutive mais peut également être régulée indépendamment de son niveau d'expression.

- En utilisant le modèle d'étude des cellules HEK293E mis en place, nous avons caractérisé deux groupes de composés quinones jouant un rôle d'inhibiteurs ou d'activateurs de l'activité NADPH oxydase de Nox4. L'effet de ces différents composés est résumé dans le tableau 14.

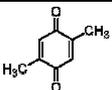
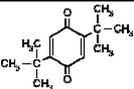
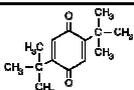
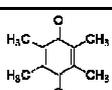
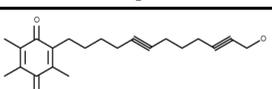
Effet	Composés quinones	Formule	[C] μ M	Toxicité %LDH	Production de ROS		
					PBS	PC	Nox4A
-	-	-	-	10,80 \pm 0,29	1,9 \pm 0.1	2,7 \pm 0.2	100 \pm 23
Inhibiteurs	p-Benzoquinone (BQ)		1	11,37 \pm 0,53	ND	ND	116 \pm 1
			30	10,72 \pm 0,53	2,0 \pm 0.1	2,3 \pm 0.2	5 \pm 1
	Hydroquinone (HQ)		1	10,73 \pm 0,53	ND	ND	118 \pm 4
			30	10,99 \pm 0,80	2,1 \pm 0.1	2,3 \pm 0.1	9 \pm 1
	tMeBQ		50	12,79 \pm 0,97	2,3 \pm 0.3	2,4 \pm 0.1	128 \pm 6
200			12,66 \pm 1,00	ND	ND	4 \pm 1	
Activateurs	tBuBQ		50	12,44 \pm 0,42	2,3 \pm 0.1	2,2 \pm 0.2	359 \pm 88
	tBuBHQ		50	11,93 \pm 1,41	4,4 \pm 0.9	6,8 \pm 0.4	420 \pm 76
	Duroquinone		50	11,03 \pm 1,13	2,3 \pm 0.1	2,8 \pm 0.2	392 \pm 18
	AA-861		10	12,00 \pm 0,84	2,3 \pm 0.1	2,4 \pm 0.3	352 \pm 74

Tableau 15. Tableau résumant l'activité oxydase et la toxicité en présence des différents composés quinones. Les valeurs d'activités oxydase sont exprimées en pourcentage par rapport à l'activité constitutive des cellules HEK293E Nox4 regroupant différentes expériences ($n \geq 3$). La toxicité des composés quinones est obtenue par la mesure de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase (LDH) des surnageants des cellules HEK293E incubées pendant 60 min avec les quinones. Les valeurs de l'activité de la LDH sont exprimées en pourcentage par rapport à l'activité des LDH totales (intra et extracellulaire) après une lyse cellulaire par 1% de triton X-100.

-
- La première catégorie regroupe les composés quinones BQ, HQ et tMetBQ qui ont une action inhibitrice sur l'activité de Nox4. La deuxième catégorie est celle des composés stimulant l'activité NADPH oxydase de Nox4. Elle est constituée des quinones AA-861, Duroquinone, tBuBHQ et tBuBQ.

 - Nous avons pu écarter les hypothèses impliquant la 5-lipoxygénase ou le calcium et mis en lumière l'importance de la nature des groupements carbonés de ces composés dans la modulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4. Nous avons déterminé le seuil à partir duquel ces composés sont inhibiteurs et ce en absence de tout effet toxique.

 - L'absence de stimulation de l'activité diaphorase de la protéine Nox4Aqc-CH (queue cytosolique) par les deux composés AA-861 et tBuBHQ en milieu acellulaire suggère que la région en amont de la partie cytosolique correspondant à la partie N terminale de Nox4 pourrait être sensible à ces dérivés quinoniques.

DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES

L'activité NADPH oxydase de Nox4 est mal caractérisée comparativement aux autres Nox et plus particulièrement à la NADPH oxydase des phagocytes. L'activité oxydase de Nox1, Nox2 et Nox3 est régulée par l'assemblage de facteurs cytosoliques ou par des agents stimulants spécifiques (PMA ou acide arachidonique). Nox5 et les Duox 1/2 sont activées par le calcium. Par contre, l'activité constitutive de Nox4 est dictée par le niveau d'expression de la protéine. Nous avons montré le caractère inductible de cette activité dans les chondrocytes humains [Grange et al, 2006]. Aucun agent stimulant spécifique de Nox4 n'a été identifié.

La détermination d'un mécanisme de régulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 nécessite au préalable de caractériser l'activité constitutive de Nox4 en d'autre terme de caractériser sa capacité de transférer les électrons.

1. La surexpression de Nox4A a conduit à la formation d'un hétérodimère fonctionnel constitué de la protéine p22phox endogène et de Nox4 surexprimée. Le complexe est visible grâce à la stabilisation mutuelle de ces protéines. En effet, la surexpression de Nox4A entraîne une augmentation de l'expression protéique de p22phox indépendamment de son niveau de transcription. La stabilisation du complexe membranaire NADPH oxydase, bien connue pour la protéine Nox2 [Yu et al, 1999], est aussi décrite pour Nox1 [Ambasta et al, 2004], Nox3 [Nakano et al, 2007] et Nox4A [Martyn et al, 2006]. Nous montrons ici que l'isoforme Nox4B stabilise aussi p22phox suggérant que l'effet inhibiteur dominant négatif décrit par Goyal pourrait être la conséquence d'une compétition entre la protéine Nox4A endogène et Nox4B pour l'interaction avec p22phox.

2. Afin de décrypter le mécanisme de transfert d'électrons de Nox4 en particulier l'activité diaphorase, nous avons produit des protéines Nox4 tronquées recombinantes par un système bactérien. Cette approche est originale car aucune donnée n'existe à l'heure actuelle concernant la caractérisation de cette activité. L'expression dans un premier temps des formes tronquées de Nox4 recombinant par les bactéries BL21(λ DE3) a permis de déterminer l'effet inhibiteur d'un groupement de codons rares (nucléotides 1363 AGA AGA CUA 1371) sur la synthèse protéique ce qui explique la présence de formes incomplètes visibles en SDS-PAGE. Par ailleurs, les protéines (Nox4A-1TM, Nox4Aqc et Nox4Bqc) sont produites uniquement sous formes de corps d'inclusion ce qui est retrouvé pour la synthèse de la queue cytosolique de Nox2 [Han et al, 2001 ; Nisimoto et al, 2004].

L'étude fonctionnelle de Nox4 nécessite la production de protéines solubles qui est possible avec le système de traduction *in vitro*, RTS[®]. Ce système a l'avantage d'être totalement ouvert offrant une vraie alternative par rapport à l'induction bactérienne classique

en apportant des options pour s'abstraire des difficultés liées à la synthèse de protéines membranaires (toxicité, solubilité). L'étude fonctionnelle des récepteurs couplés aux protéines G humaines [Ishihara et al, 2005] ou encore du canal mécano-sensible MscL des bactéries [Berrier et al, 2004] a été réalisée à l'aide d'un tel système d'expression. Les nombreuses possibilités d'optimisation notamment par utilisation de détergents sont exploitées par beaucoup d'auteurs pour produire des protéines membranaires solubles [Ishihara et al, 2005 ; Liguori et al, 2007]. L'utilisation du système RTS[®] a permis après optimisation d'obtenir des protéines Nox4 tronquées solubles (Nox4A-2TM-CH, Nox4A-1TM-CH, Nox4Aqc-CH et Nox4Bqc-CH) en présence de n-dodécyl β -D-maltoside (0,1mM), du couple redox GSH/GSSG (0,1mM/4mM) et de la protéine chaperonne GroE. L'expression à grande échelle conduit à l'obtention d'une quantité suffisante de protéines Nox4Aqc-CH (9 μ g/mL) et Nox4Bqc-CH (5 μ g/mL) pour permettre une étude fonctionnelle. Cette approche a également été mise en place au laboratoire avec Nox2 [Marques et al, 2007]

L'activité diaphorase spécifique de Nox4 est de $26 \pm 2,6$ nmol/min/nmol de protéine pour l'INT et $48 \pm 20,2$ nmol/min/nmol de protéine pour le cytochrome c. L'isoforme Nox4Bqc-CH n'est pas capable d'avoir une activité diaphorase pointant l'importance du premier site de fixation prédit du NADPH délété. C'est la première fois qu'une telle activité est décrite pour la protéine Nox4. Comme pour Nox2 cette activité est intrinsèque. Par contre, elle est indépendante de la présence des constituants cytosoliques à l'inverse de Nox2 où l'addition de cytosol ou de facteurs cytosoliques (Rac1 et p67phox) la potentialise [Marques et al, 2007 ; Nisimoto et al, 2004]. Ceci confirme les données de la littérature montrant que l'activité de Nox4 ne nécessite pas la présence de facteurs cytosoliques [Martyn et al, 2006]. Le système RTS[®] est un outil puissant ouvrant la porte à l'étude de la protéine Nox4 non seulement au niveau fonctionnel mais aussi structural. La bonne conformation des protéines solubles produites permettra également l'analyse des sites d'interaction entre Nox4 et son partenaire membranaire p22phox.

3. L'originalité et l'intérêt de ce travail résultent du fait que l'activité NADPH oxydase de Nox4 est susceptible d'être modulée indépendamment de son niveau d'expression. Deux catégories de composés quinoniques agissent de manière opposée sur cette activité. Les quinones benzoquinone, hydroquinone et tMetBQ l'inhibent alors que d'autres quinones plus fortement substituées (AA-861, Duroquinone, tBuBHQ et tBuBQ) la stimulent. Le mécanisme d'action de ces composés semble être en rapport avec la nature des substituants de ces quinones. Les modalités de régulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 restent encore à déterminer mais les données de la littérature permettent de proposer un mécanisme potentiel.

Les composés quinones possèdent des propriétés d'oxydoréduction et se lient sur des sites de fixation spécifiques appelés Q sites dont une séquence consensus a été identifiée [Fisher et Rich, 2000] :

Acide aminé aliphatique-(X)₃-His-(X)₂₋₃-(Leu/Thr/Ser). Les acides aminés aliphatiques possèdent une chaîne latérale carbonée saturée (leucine, alanine, valine et l'isoleucine), X représente n'importe quel acide aminé.

Une analyse des séquences protéiques montre l'existence d'une séquence similaire, ²⁰³LLTLHVS²⁰⁹ sur Nox4 et non sur Nox2 (figure 85). L'histidine contenue dans cette séquence est supposée coordiner une molécule d'hème.

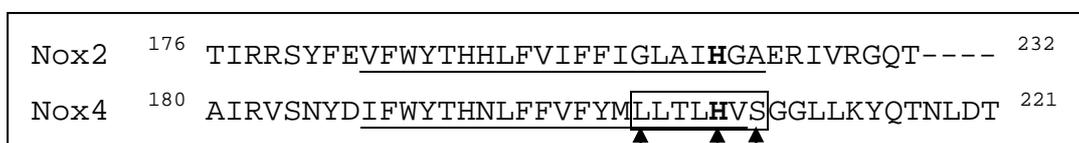


Figure 85. Alignement de la séquence protéique de Nox4 avec Nox2 (CLUSTAL W v1.83, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Les acides aminés soulignés correspondent au 5^{ème} domaine transmembranaire prédit. L'histidine (H) en gras correspond à l'histidine pouvant potentiellement coordiner une molécule d'hème. Les acides aminés encadrés correspondent à la séquence consensus des Q sites et les flèches indiquent les acides aminés conservés de cette séquence.

La proximité du Q site avec celui de l'hème favorise le transfert électronique entre la quinone et l'hème. Un des sites de fixation des quinones le mieux caractérisé est celui de l'enzyme succinate quinone oxidoreductase (SQR) chez la bactérie *E.coli*. Elle est impliquée dans le transfert d'électrons du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le catabolisme du succinate en fumarate permet de transférer des électrons sur le FAD. Ce transfert se poursuit au travers de groupements successifs de molécules de fer organisés en trois compartiments. Ensuite, le transfert des électrons continue vers l'ubiquinone au niveau du Q site dont la séquence consensus correspond à la description de Fisher et Rich. Une molécule d'hème coordonnée par deux histidines se trouve à proximité du Q site (11,4Å) et non loin du dernier groupement des molécules de fer (13,3Å) [Sun et al, 2005]. Ces distances sont compatibles avec la distance effective pour le transfert d'électrons (14 Å).

Tran et ses collaborateurs, par des expériences de mutagenèse dirigée, ont montré que le site de fixation des quinones est nécessaire pour que le transfert des électrons se poursuive vers l'hème. Par contre, la présence de l'hème n'est pas nécessaire au fonctionnement habituel de l'enzyme pour la réduction de l'ubiquinone. Il semble que l'hème dans ce système joue un rôle de soupape en recevant les surplus d'électrons [Tran et al,

2006]. On remarque que l'organisation entre les Q sites et l'hème de la SQR est proche de celle décrite pour Nox4 (figure 86).

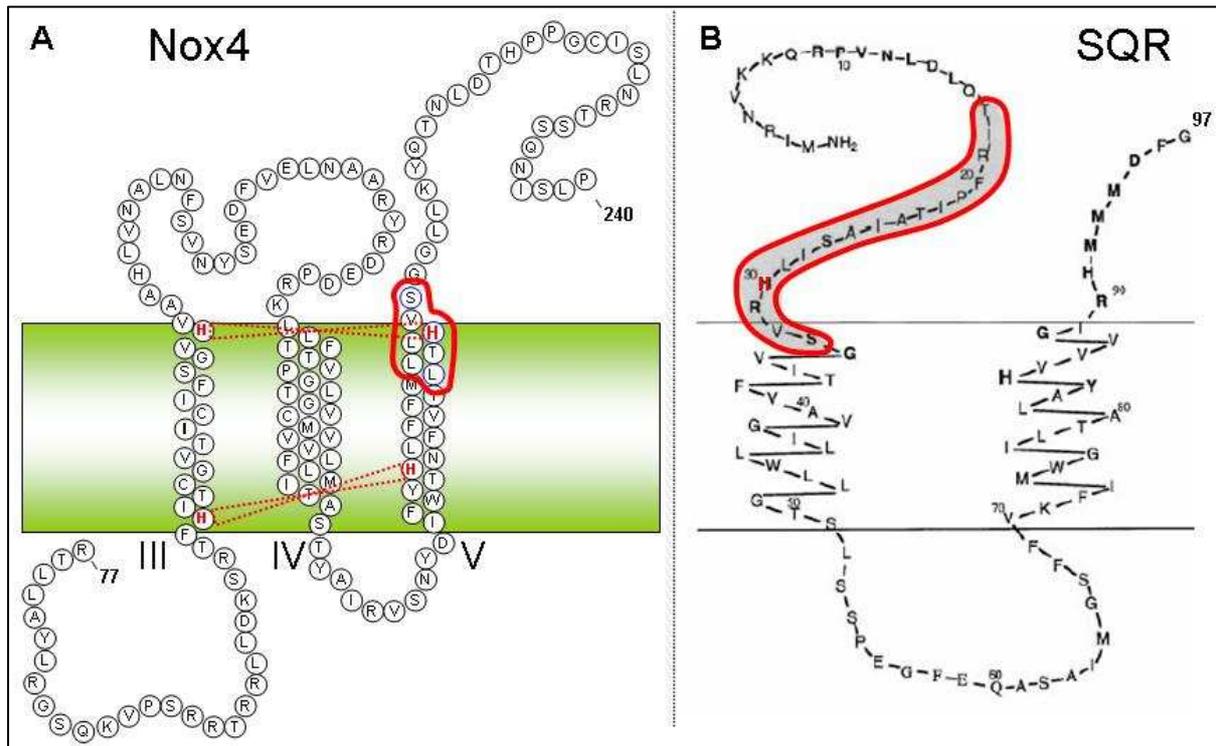


Figure 86. Schéma montrant la similitude entre l'organisation du Q site potentiel de Nox4 avec celui de la succinate quinone oxidoreductase. A) structure secondaire de l'enchaînement des acides aminés de la protéine Nox4 (acide aminé 77 à 240) et **B)** de la protéine SdhC entière (d'après Yang et al, 1988 modifié). Les chiffres romains indiquent le numéro du passage transmembranaire prédit pour la protéine Nox4. Les histidines participant à la coordination des hèmes sont représentées en rouge. Les pointillés schématisent la coordination d'une même molécule d'hème par les histidines. Les régions montrant les domaines de fixation des quinones (prédit dans le cas de Nox4) sont entourées.

Le transfert d'électrons entre l'hème et la quinone constaté chez la protéine SQR pourrait hypothétiquement se produire au sein de la protéine Nox4. Le Q site potentiel de Nox4 se localiserait au niveau du 5^{ème} passage transmembranaire et le manque d'effet observé dans cette étude du AA-861 et du tBuBHQ sur l'activité diaphorase de la protéine purifiée Nox4Aqc-CH en système acellulaire s'expliquerait par l'absence du Q site dans sa séquence. Ceci suggérant que la stimulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 par ces composés agirait sur le flux électronique en aval du centre redox du FAD.

L'hypothèse du Q site sur Nox4 est renforcée par le fait que la plumbagine, une naphthoquinone analogue du menaquinol, est capable de se fixer dans le Q site de la SQR entraînant une inversion de la réaction enzymatique de l'enzyme qui se comporte comme une fumarate réductase [Tran et al, 2006]. La plumbagine a été décrite par Ding et ses collaborateurs comme un inhibiteur spécifique de l'activité oxydase de Nox4 surexprimée dans les cellules COS-7 [Ding et al, 2005]. Cet effet a été reproduit par Rossary et ses

collaborateurs sur l'activité de Nox4 dans les fibroblastes humains [Rossary et al, 2007]. La plumbagine pourrait agir directement au sein du Q site potentiel sur Nox4.

L'ensemble de ces observations suggère que les quinones pourraient agir sur Nox4 au niveau de leur site potentiel de fixation, "203LLTLHVS209". La modulation d'une activité enzymatique par différentes quinones n'est pas une chose inédite et a été montrée pour l'enzyme ETF-ubiquinone oxidoreductase avec des analogues structuraux de l'ubiquinone [Simkovic et Frerman, 2004] ou pour la pompe SERCA avec des analogues structuraux du tBuBHQ [Lape et al, 2007].

Ainsi, l'ancrage de ces quinones pourrait changer le mécanisme de transfert des électrons soit en l'accélérant, soit en l'inhibant selon la nature de la structure de la quinone et de sa capacité à se fixer sur son site. Un mécanisme d'intervention possible des quinones peut être envisagé (figure 87).

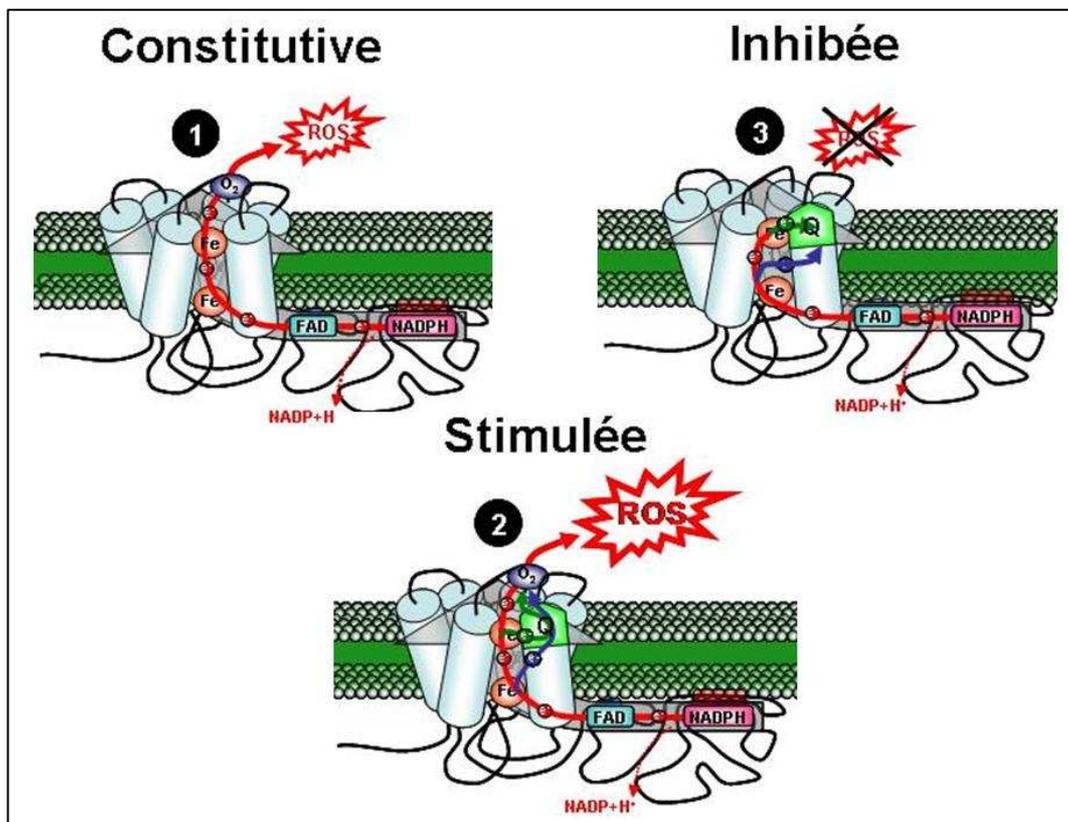


Figure 87. Proposition d'un mécanisme de régulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 par les composés quinones. 1) Parcours normal des électrons au sein de la protéine Nox4 lors de la production constitutive d'ions superoxyde. 2) Potentialisation de la production des ions superoxyde avec un transfert d'électrons relayé par les quinones. 3) Blocage du transfert d'électrons par les quinones inhibitrices.

La fixation des quinones stimulatrices favoriserait l'évacuation des électrons du centre redox du FAD où du premier hème accélérant ainsi le mécanisme de transfert

d'électrons. Pour Nox2, le NADPH transfère 2 électrons vers le FAD qui doit ensuite attendre que l'hème interne revienne à l'état oxydé pour favoriser le transfert du 2^{ème} électron (§III.B.2 Introduction). La présence de la quinone pourrait potentialiser cette étape et permettrait une production plus rapide d'ions superoxyde (*figure 87 ; 2*). Dans le cas d'une inhibition, la présence de la quinone interférerait avec le processus de transfert d'électron comme le ferait la plumbagine pour la succinate deshydrogénase (*figure 87 ; 3*).

La suite de notre travail va se focaliser sur la caractérisation du mécanisme d'action de ses composés quinones sur l'activité NADPH oxydase de Nox4. La pertinence du Q site potentiel sera vérifiée par des expériences de mutagenèse dirigée (contre les résidus conservés du site de fixation potentiel des quinones) et étayé par les mesures d'activité en milieu acellulaire sur différentes portions de protéines Nox4 recombinantes tronquées produites par RTS[®] pour cibler l'étape de transfert électronique concernée. Une analyse plus étendue de différentes molécules quinones pourrait conduire à la mise en évidence d'un inhibiteur ou activateur spécifique de l'activité de Nox4. Une telle molécule pourrait être stratégique au plan thérapeutique modulant fonctionnement de la protéine Nox4, à l'origine de nombreuses pathologies.

Un travail d'expression de formes tronquées de la protéine Nox4 et de p22phox a été initié dans les cellules eucaryotes pour rechercher les domaines d'interaction entre ces deux partenaires. Cette recherche sera appuyée aussi par des expériences d'interaction protéine/protéine à partir des protéines recombinantes produites par le système bactérien (bactéries entières ou RTS[®]). La caractérisation des anticorps monoclonaux produits permettra d'aborder une étude conformationnelle et topologique de la protéine Nox4.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abate, C., L. Patel, F. J. Rauscher, 3rd, and T. Curran. 1990. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity *in vitro*. *Science* **249**:1157-1161.

Abe, J., M. Kusuhara, R. J. Ulevitch, B. C. Berk, and J. D. Lee. 1996. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* **271**:16586-16590.

Adams, S. R., R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, and R. Y. Tsien. 2002. New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling *in vitro* and *in vivo*: synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc* **124**:6063-6076.

Ago, T., T. Kitazono, J. Kuroda, Y. Kumai, M. Kamouchi, H. Ooboshi, M. Wakisaka, T. Kawahara, K. Rokutan, S. Ibayashi, and M. Iida. 2005. NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells. *Stroke* **36**:1040-1046.

Ago, T., T. Kitazono, H. Ooboshi, T. Iyama, Y. H. Han, J. Takada, M. Wakisaka, S. Ibayashi, H. Utsumi, and M. Iida. 2004. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* **109**:227-233.

Ago, T., R. Takeya, H. Hiroaki, F. Kuribayashi, T. Ito, D. Kohda, and H. Sumimoto. 2001. The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module. *Biochem Biophys Res Commun* **287**:733-738.

Amaya, Y., K. Yamazaki, M. Sato, K. Noda, T. Nishino, and T. Nishino. 1990. Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O²-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *J Biol Chem* **265**:14170-14175.

Ambasta, R. K., P. Kumar, K. K. Griendling, H. H. Schmidt, R. Busse, and R. P. Brandes. 2004. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem* **279**:45935-45941.

Ameziane-El-Hassani, R., S. Morand, J. L. Boucher, Y. M. Frapart, D. Apostolou, D. Agnandji, S. Gnidehou, R. Ohayon, M. S. Noel-Hudson, J. Francon, K. Lalaoui, A. Virion, and C. Dupuy. 2005. Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity. *J Biol Chem* **280**:30046-30054.

Arakawa, N., M. Katsuyama, K. Matsuno, N. Urao, Y. Tabuchi, M. Okigaki, H. Matsubara, and C. Yabe-Nishimura. 2006. Novel transcripts of Nox1 are regulated by alternative promoters and expressed under phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells. *Biochem J* **398**:303-310.

B

Bae, Y. S., S. W. Kang, M. S. Seo, I. C. Baines, E. Tekle, P. B. Chock, and S. G. Rhee. 1997. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **272**:217-221.

Bae, Y. S., J. Y. Sung, O. S. Kim, Y. J. Kim, K. C. Hur, A. Kazlauskas, and S. G. Rhee. 2000. Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **275**:10527-10531.

Baldrige and Gerard. 1932. The extra respiration of phagocytosis. *Am J of Physiol* **103**:235-236.

Banfi, B., R. A. Clark, K. Steger, and K. H. Krause. 2003. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* **278**:3510-3513.

Banfi, B., A. Maturana, S. Jaconi, S. Arnaudeau, T. Laforge, B. Sinha, E. Ligeti, N. Demaurex, and K. H. Krause. 2000. A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science* **287**:138-142.

- Banfi, B., G. Molnar, A. Maturana, K. Steger, B. Hegedus, N. Demareux, and K. H. Krause.** 2001. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* **276**:37594-37601.
- Banfi, B., F. Tirone, I. Durussel, J. Knisz, P. Moskwa, G. Z. Molnar, K. H. Krause, and J. A. Cox.** 2004. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem* **279**:18583-18591.
- Baniulis, D., Y. Nakano, W. M. Nauseef, B. Banfi, G. Cheng, D. J. Lambeth, J. B. Burritt, R. M. Taylor, and A. J. Jesaitis.** 2005. Evaluation of two anti-gp91phox antibodies as immunoprobes for Nox family proteins: mAb 54.1 recognizes recombinant full-length Nox2, Nox3 and the C-terminal domains of Nox1-4 and cross-reacts with GRP 58. *Biochim Biophys Acta* **1752**:186-196.
- Beckman, K. B., and B. N. Ames.** 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**:547-581.
- Bedard, K., and K. H. Krause.** 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* **87**:245-313.
- BelAiba, R. S., T. Djordjevic, A. Petry, K. Diemer, S. Bonello, B. Banfi, J. Hess, A. Pogrebniak, C. Bickel, and A. Gorkach.** 2007. NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **42**:446-459.
- Berendes, H., R. A. Bridges, and R. A. Good.** 1957. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minn Med* **40**:309-312.
- Berrier, C., K. H. Park, S. Abes, A. Bibonne, J. M. Betton, and A. Ghazi.** 2004. Cell-free synthesis of a functional ion channel in the absence of a membrane and in the presence of detergent. *Biochemistry* **43**:12585-12591.
- Berthier, S., M. H. Paquet, S. Lerouge, F. Roux, S. Vergnaud, A. W. Coleman, and F. Morel.** 2003. Changing the conformation state of cytochrome *b*₅₅₈ initiates NADPH oxidase activation: MRP8/MRP14 regulation. *J Biol Chem* **278**:25499-25508.
- Betton, J. M.** 2004. High throughput cloning and expression strategies for protein production. *Biochimie* **86**:601-605.
- Bevers, L. M., B. Braam, J. A. Post, A. J. van Zonneveld, T. J. Rabelink, H. A. Koomans, M. C. Verhaar, and J. A. Joles.** 2006. Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension* **47**:87-94.
- Biberstine-Kinkade, K. J., F. R. DeLeo, R. I. Epstein, B. A. LeRoy, W. M. Nauseef, and M. C. Dinauer.** 2001. Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem* **276**:31105-31112.
- Biberstine-Kinkade, K. J., L. Yu, and M. C. Dinauer.** 1999. Mutagenesis of an arginine- and lysine-rich domain in the gp91(phox) subunit of the phagocyte NADPH-oxidase flavocytochrome *b*₅₅₈. *J Biol Chem* **274**:10451-10457.
- Block, K., Y. Gorin, P. Hoover, P. Williams, T. Chelmicki, R. A. Clark, T. Yoneda, and H. E. Abboud.** 2007. NAD(P)H oxidases regulate HIF-2alpha protein expression. *J Biol Chem* **282**:8019-8026.
- Bonello, S., C. Zahringer, R. S. BelAiba, T. Djordjevic, J. Hess, C. Michiels, T. Kietzmann, and A. Gorkach.** 2007. Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:755-761.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.

Brar, S. S., T. P. Kennedy, A. B. Sturrock, T. P. Huecksteadt, M. T. Quinn, A. R. Whorton, and J. R. Hoidal. 2002. An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**:C1212-1224.

Burritt, J. B., F. R. DeLeo, C. L. McDonald, J. R. Prigge, M. C. Dinauer, M. Nakamura, W. M. Nauseef, and A. J. Jesaitis. 2001. Phage display epitope mapping of human neutrophil flavocytochrome b558. Identification of two juxtaposed extracellular domains. *J Biol Chem* **276**:2053-2061.

Burritt, J. B., T. R. Foubert, D. Baniulis, C. I. Lord, R. M. Taylor, J. S. Mills, T. D. Baughan, D. Roos, C. A. Parkos, and A. J. Jesaitis. 2003. Functional epitope on human neutrophil flavocytochrome b558. *J Immunol* **170**:6082-6089.

Burritt, J. B., M. T. Quinn, M. A. Jutila, C. W. Bond, and A. J. Jesaitis. 1995. Topological mapping of neutrophil cytochrome b epitopes with phage-display libraries. *J Biol Chem* **270**:16974-16980.

C

Cadenas, E., and A. Boveris. 1980. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. *Biochem J* **188**:31-37.

Campion, Y., M. H. Paclet, A. J. Jesaitis, B. Marques, A. Grichine, S. Berthier, J. L. Lenormand, B. Lardy, M. J. Stasia, and F. Morel. 2007. New insights into the membrane topology of the phagocyte NADPH oxidase: characterization of an anti-gp91-phox conformational monoclonal antibody. *Biochimie* **89**:1145-1158.

Carr, A. C., M. R. McCall, and B. Frei. 2000. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:1716-1723.

Chamulitrat, W., W. Stremmel, T. Kawahara, K. Rokutan, H. Fujii, K. Wingler, H. H. Schmidt, and R. Schmidt. 2004. A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **122**:1000-1009.

Cheng, G., Z. Cao, X. Xu, E. G. van Meir, and J. D. Lambeth. 2001. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* **269**:131-140.

Cheng, G., B. A. Diebold, Y. Hughes, and J. D. Lambeth. 2006. Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J Biol Chem* **281**:17718-17726.

Cheng, G., and J. D. Lambeth. 2005. Alternative mRNA splice forms of NOXO1: differential tissue expression and regulation of Nox1 and Nox3. *Gene* **356**:118-126.

Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-159.

Clempus, R. E., D. Sorescu, A. E. Dikalova, L. Pounkova, P. Jo, G. P. Sorescu, H. H. Schmidt, B. Lassegue, and K. K. Griendling. 2007. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:42-48.

Colston, J. T., S. D. de la Rosa, J. R. Strader, M. A. Anderson, and G. L. Freeman. 2005. H₂O₂ activates Nox4 through PLA2-dependent arachidonic acid production in adult cardiac fibroblasts. *FEBS Lett* **579**:2533-2540.

Commoner, B., J. Townsend, and G. E. Pake. 1954. Free radicals in biological materials. *Nature* **174**:689-691.

Cross, A. R., and A. W. Segal. 2004. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* **1657**:1-22.

Cucoranu, I., R. Clempus, A. Dikalova, P. J. Phelan, S. Ariyan, S. Dikalov, and D. Sorescu. 2005. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res* **97**:900-907.

D

Dahan, I., I. Issaeva, Y. Gorzalczany, N. Sigal, M. Hirshberg, and E. Pick. 2002. Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by "peptide walking". *J Biol Chem* **277**:8421-8432.

Dai, X., X. Cao, and D. L. Kreulen. 2006. Superoxide anion is elevated in sympathetic neurons in DOCA-salt hypertension via activation of NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**:H1019-1026.

Dana, R., T. L. Leto, H. L. Malech, and R. Levy. 1998. Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* **273**:441-445.

Davies, K. J. 1987a. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* **262**:9895-9901.

Davies, K. J., M. E. Delsignore, and S. W. Lin. 1987b. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem* **262**:9902-9907.

DeCaprio, A. P. 1999. The toxicology of hydroquinone--relevance to occupational and environmental exposure. *Crit Rev Toxicol* **29**:283-330.

De Deken, X., D. Wang, M. C. Many, S. Costagliola, F. Libert, G. Vassart, J. E. Dumont, and F. Miot. 2000. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* **275**:23227-23233.

De Deken, X., D. Wang, J. E. Dumont, and F. Miot. 2002. Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H(2)O(2)-generating system. *Exp Cell Res* **273**:187-196.

De Duve C, Baudhuin P. 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* **46**:323-57.

DeCoursey, T. E., D. Morgan, and V. V. Cherny. 2002. The gp91phox component of NADPH oxidase is not a voltage-gated proton channel. *J Gen Physiol* **120**:773-779.

Del Bello, B., A. Paolicchi, M. Comporti, A. Pompella, and E. Maellaro. 1999. Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *Faseb J* **13**:69-79.

DeLeo, F. R., J. B. Burritt, L. Yu, A. J. Jesaitis, M. C. Dinauer, and W. M. Nauseef. 2000. Processing and maturation of flavocytochrome *b*₅₅₈ include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem* **275**:13986-13993.

DeLeo, F. R., L. Yu, J. B. Burritt, L. R. Loetterle, C. W. Bond, A. J. Jesaitis, and M. T. Quinn. 1995. Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7110-7114.

Deliri, H., and C. A. McNamara. 2007. Nox 4 regulation of vascular smooth muscle cell differentiation marker gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:12-14.

Denu, J. M., and K. G. Tanner. 1998. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* **37**:5633-5642.

Didion, S. P., C. A. Hathaway, and F. M. Faraci. 2001. Superoxide levels and function of cerebral blood vessels after inhibition of CuZn-SOD. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**:H1697-1703.

Diekmann, D., A. Abo, C. Johnston, A. W. Segal, and A. Hall. 1994. Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* **265**:531-533.

Ding, Y., Z. J. Chen, S. Liu, D. Che, M. Vetter, and C. H. Chang. 2005. Inhibition of Nox-4 activity by plumbagin, a plant-derived bioactive naphthoquinone. *J Pharm Pharmacol* **57**:111-116.

Djordjevic, T., R. S. BelAiba, S. Bonello, J. Pfeilschifter, J. Hess, and A. Gorlach. 2005. Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**:519-525.

Doussiere, J., F. Bouzidi, and P. V. Vignais. 2001. A phenylarsine oxide-binding protein of neutrophil cytosol, which belongs to the S100 family, potentiates NADPH oxidase activation. *Biochem Biophys Res Commun* **285**:1317-1320.

Doussiere, J., G. Buzenet, and P. V. Vignais. 1995. Photoaffinity labeling and photoinactivation of the O₂(-)-generating oxidase of neutrophils by an azido derivative of FAD. *Biochemistry* **34**:1760-1770.

Doussiere, J., F. Laporte, and P. V. Vignais. 1986. Photolabeling of a O₂⁻ generating protein in bovine polymorphonuclear neutrophils by an arylazido NADP⁺ analog. *Biochem Biophys Res Commun* **139**:85-93.

Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**:47-95.

Drozd, R., C. Parmentier, H. Hachad, P. Leroy, G. Siest, and M. Wellman. 1998. gamma-Glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. *Free Radic Biol Med* **25**:786-792.

Dupuy, C., R. Ohayon, A. Valent, M. S. Noel-Hudson, D. Deme, and A. Virion. 1999. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem* **274**:37265-37269.

E

Edderkaoui, M., P. Hong, E. C. Vaquero, J. K. Lee, L. Fischer, H. Friess, M. W. Buchler, M. M. Lerch, S. J. Pandol, and A. S. Gukovskaya. 2005. Extracellular matrix stimulates reactive oxygen species production and increases pancreatic cancer cell survival through 5-lipoxygenase and NADPH oxidase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**:G1137-1147.

Ellmark, S. H., G. J. Dusting, M. N. Fui, N. Guzzo-Pernell, and G. R. Drummond. 2005. The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res* **65**:495-504.

Ema, M., K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger, and Y. Fujii-Kuriyama. 1999. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo J* **18**:1905-1914.

Etoh, T., T. Inoguchi, M. Kakimoto, N. Sonoda, K. Kobayashi, J. Kuroda, H. Sumimoto, and H. Nawata. 2003. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment. *Diabetologia* **46**:1428-1437.

F

Ferrari, D. M., and H. D. Soling. 1999. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J* **339** (Pt 1):1-10.

Finegold, A. A., K. P. Shatwell, A. W. Segal, R. D. Klausner, and A. Dancis. 1996. Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J Biol Chem* **271**:31021-31024.

Finger, F., C. Schorle, S. Soder, A. Zien, M. B. Goldring, and T. Aigner. 2004. Phenotypic characterization of human chondrocyte cell line C-20/A4: a comparison between monolayer and alginate suspension culture. *Cells Tissues Organs* **178**:65-77.

Fisher, N., and P. R. Rich. 2000. A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J Mol Biol* **296**:1153-1162.

Freeman, J. L., and J. D. Lambeth. 1996. NADPH oxidase activity is independent of p47phox *in vitro*. *J Biol Chem* **271**:22578-22582.

Fuchs, B., K. Zhang, M. G. Rock, M. E. Bolander, and G. Sarkar. 1999. High temperature cDNA synthesis by AMV reverse transcriptase improves the specificity of PCR. *Mol Biotechnol* **12**:237-240.

G

Galter, D., S. Mihm, and W. Droge. 1994. Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1. *Eur J Biochem* **221**:639-648.

Geiszt, M., J. B. Szeberenyi, K. Kaldi, and E. Ligeti. 1999. Role of different Ca²⁺ sources in the superoxide production of human neutrophil granulocytes. *Free Radic Biol Med* **26**:1092-1099.

Geiszt, M., J. B. Kopp, P. Varnai, and T. L. Leto. 2000. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:8010-8014.

Geiszt, M., K. Lekstrom, and T. L. Leto. 2004. Analysis of mRNA transcripts from the NAD(P)H oxidase 1 (Nox1) gene. Evidence against production of the NADPH oxidase homolog-1 short (NOH-1S) transcript variant. *J Biol Chem* **279**:51661-51668.

Geiszt, M., K. Lekstrom, J. Witta, and T. L. Leto. 2003. Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem* **278**:20006-20012.

Genestra, M. 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* **19**:1807-1819.

Goldring, M. B., J. R. Birkhead, L. F. Suen, R. Yamin, S. Mizuno, J. Glowacki, J. L. Arbiser, and J. F. Apperley. 1994. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* **94**:2307-2316.

Goldring, M. B. 2004. Immortalization of human articular chondrocytes for generation of stable, differentiated cell lines. *Methods Mol Med* **100**:23-36.

Gopalakrishna, R., and W. B. Anderson. 1987. Susceptibility of protein kinase C to oxidative inactivation: loss of both phosphotransferase activity and phorbol diester binding. *FEBS Lett* **225**:233-237.

Gopalakrishna, R., and W. B. Anderson. 1989. Ca²⁺- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:6758-6762.

Gordeeva, A. V., R. A. Zvyagilskaya, and Y. A. Labas. 2003. Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochemistry (Mosc)* **68**:1077-1080.

Gorin, Y., K. Block, J. Hernandez, B. Bhandari, B. Wagner, J. L. Barnes, and H. E. Abboud. 2005. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J Biol Chem* **280**:39616-39626.

Gorin, Y., J. M. Ricono, N. H. Kim, B. Bhandari, G. G. Choudhury, and H. E. Abboud. 2003. Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**:F219-229.

Gorlach, A., I. Diebold, V. B. Schini-Kerth, U. Berchner-Pfannschmidt, U. Roth, R. P. Brandes, T. Kietzmann, and R. Busse. 2001. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* **89**:47-54.

Gorsky, L. D., D. R. Koop, and M. J. Coon. 1984. On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction. *J Biol Chem* **259**:6812-6817.

Govindarajan, B., J. E. Sligh, B. J. Vincent, M. Li, J. A. Canter, B. J. Nickoloff, R. J. Rodenburg, J. A. Smeitink, L. Oberley, Y. Zhang, J. Slingerland, R. S. Arnold, J. D. Lambeth, C. Cohen, L. Hilenski, K. Griendling, M. Martinez-Diez, J. M. Cuezva, and J. L. Arbiser. 2007. Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *J Clin Invest* **117**:719-729.

Goyal, P., N. Weissmann, F. Rose, F. Grimminger, H. J. Schafers, W. Seeger, and J. Hanze. 2005. Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **329**:32-39.

Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**:59-74.

Granfeldt, D., M. Samuelsson, and A. Karlsson. 2002. Capacitative Ca²⁺ influx and activation of the neutrophil respiratory burst. Different regulation of plasma membrane- and granule-localized NADPH-oxidase. *J Leukoc Biol* **71**:611-617.

Grange, L., M. V. Nguyen, B. Lardy, M. Derouazi, Y. Campion, C. Trocme, M. H. Paclet, P. Gaudin, and F. Morel. 2006. NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxid Redox Signal* **8**:1485-1496.

Greenlund, L. J., T. L. Deckwerth, and E. M. Johnson, Jr. 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* **14**:303-315.

Griendling, K. K., C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw, and R. W. Alexander. 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **74**:1141-1148.

Griffin, B. A., S. R. Adams, and R. Y. Tsien. 1998. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**:269-272.

Grover, A. K., and S. E. Samson. 1988. Effect of superoxide radical on Ca²⁺ pumps of coronary artery. *Am J Physiol* **255**:C297-303.

Gruenke, L. D., K. Konopka, M. Cadieu, and L. Waskell. 1995. The stoichiometry of the cytochrome P-450-catalyzed metabolism of methoxyflurane and benzphetamine in the presence and absence of cytochrome b5. *J Biol Chem* **270**:24707-24718.

Guichard, C., E. Pedruzzi, M. Fay, S. Ben Mkaddem, N. Coant, F. Daniel, and E. Ogier-Denis. 2006. [The Nox/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases]. *Med Sci (Paris)* **22**:953-959.

Gurvich, O. L., P. V. Baranov, R. F. Gesteland, and J. F. Atkins. 2005. Expression levels influence ribosomal frameshifting at the tandem rare arginine codons AGG_AGG and AGA_AGA in Escherichia coli. *J Bacteriol* **187**:4023-4032.

Gutierrez, P. L. 2000. The metabolism of quinone-containing alkylating agents: free radical production and measurement. *Front Biosci* **5**:D629-638.

H

Halliwell, B., and S. Chirico. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* **57**:715S-724S; discussion 724S-725S.

- Han, C. H., J. L. Freeman, T. Lee, S. A. Motalebi, and J. D. Lambeth. 1998. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* **273**:16663-16668.
- Han, C. H., Y. Nisimoto, S. H. Lee, E. T. Kim, and J. D. Lambeth. 2001. Characterization of the flavoprotein domain of gp91phox which has NADPH diaphorase activity. *J Biochem (Tokyo)* **129**:513-520.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**:298-300.
- Hasebe, T., J. Hua, A. Someya, P. Morain, F. Checler, and I. Nagaoka. 2001. Involvement of cytosolic prolyl endopeptidase in degradation of p40-phox splice variant protein in myeloid cells. *J Leukoc Biol* **69**:963-968.
- Hasebe, T., A. Someya, and I. Nagaoka. 1999. Identification of a splice variant mRNA of p40phox, an NADPH oxidase component of phagocytes. *FEBS Lett* **455**:257-261.
- Heidari, Y., A. M. Shah, and C. Gove. 2004. NOX-2S is a new member of the NOX family of NADPH oxidases. *Gene* **335**:133-140.
- Henderson, L. M., and R. W. Meech. 2002. Proton conduction through gp91phox. *J Gen Physiol* **120**:759-765.
- Hilenski, L. L., R. E. Clempus, M. T. Quinn, J. D. Lambeth, and K. K. Griendling. 2004. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**:677-683.
- Hiroaki, H., T. Ago, T. Ito, H. Sumimoto, and D. Kohda. 2001. Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nat Struct Biol* **8**:526-530.
- Hockenbery, D. M., Z. N. Oltvai, X. M. Yin, C. L. Milliman, and S. J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**:241-251.
- Hoidal, J. R., S. S. Brar, A. B. Sturrock, K. A. Sanders, B. Dinger, S. Fidone, and T. P. Kennedy. 2003. The role of endogenous NADPH oxidases in airway and pulmonary vascular smooth muscle function. *Antioxid Redox Signal* **5**:751-758.
- Holmes, B., A. R. Page, and R. A. Good. 1967. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest* **46**:1422-1432.
- Holmgren, A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* **264**:13963-13966.
- Hu, T., S. P. Ramachandrarao, S. Siva, C. Valancius, Y. Zhu, K. Mahadev, I. Toh, B. J. Goldstein, M. Woolkalis, and K. Sharma. 2005. Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF-beta-induced cytoskeletal alterations in endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**:F816-825.
- Huang, J. K., and C. R. Jan. 1999. AA-861-induced Ca(2+) mobilization in Madin Darby canine kidney cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **161**:202-208.
- Huang, J., N. D. Hitt, and M. E. Kleinberg. 1995. Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558. *Biochemistry* **34**:16753-16757.
- I**
- Imajoh-Ohmi, S., K. Tokita, H. Ochiai, M. Nakamura, and S. Kanegasaki. 1992. Topology of cytochrome *b*₅₅₈ in neutrophil membrane analyzed by anti-peptide antibodies and proteolysis. *J Biol Chem* **267**:180-184.

Ishihara, G., M. Goto, M. Saeki, K. Ito, T. Hori, T. Kigawa, M. Shirouzu, and S. Yokoyama. 2005. Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors. *Protein Expr Purif* **41**:27-37.

Ito, T., R. Nakamura, H. Sumimoto, K. Takeshige, and Y. Sakaki. 1996. An SH3 domain-mediated interaction between the phagocyte NADPH oxidase factors p40phox and p47phox. *FEBS Lett* **385**:229-232.

Ito, N., T. Yokomizo, T. Sasaki, H. Kurosu, J. Penninger, Y. Kanaho, T. Katada, K. Hanaoka, and T. Shimizu. 2002. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B₄-induced enzyme release. *J Biol Chem* **277**:44898-44904.

J

Jaakkola, P., D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe. 2001. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**:468-472.

Janiszewski, M., L. R. Lopes, A. O. Carmo, M. A. Pedro, R. P. Brandes, C. X. Santos, and F. R. Laurindo. 2005. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **280**:40813-40819.

Jayaraman, L., K. G. Murthy, C. Zhu, T. Curran, S. Xanthoudakis, and C. Prives. 1997. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev* **11**:558-570.

Jenner, P., D. T. Dexter, J. Sian, A. H. Schapira, and C. D. Marsden. 1992. Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol* **32 Suppl**:S82-87.

Jezek, P., and L. Hlavata. 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:2478-2503.

Johnson, T. M., Z. X. Yu, V. J. Ferrans, R. A. Lowenstein, and T. Finkel. 1996. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11848-11852.

Junn, E., K. N. Lee, H. R. Ju, S. H. Han, J. Y. Im, H. S. Kang, T. H. Lee, Y. S. Bae, K. S. Ha, Z. W. Lee, S. G. Rhee, and I. Choi. 2000. Requirement of hydrogen peroxide generation in TGF- β 1 signal transduction in human lung fibroblast cells: involvement of hydrogen peroxide and Ca²⁺ in TGF- β 1-induced IL-6 expression. *J Immunol* **165**:2190-2197.

K

Kamata, H., and H. Hirata. 1999. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* **11**:1-14.

Kanai, F., H. Liu, S. J. Field, H. Akbary, T. Matsuo, G. E. Brown, L. C. Cantley, and M. B. Yaffe. 2001. The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol* **3**:675-678.

Kawahara, T., D. Ritsick, G. Cheng, and J. D. Lambeth. 2005. Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J Biol Chem* **280**:31859-31869.

Kehrer, J. P. 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**:43-50.

Khan, Y. M., M. Wictome, J. M. East, and A. G. Lee. 1995. Interactions of dihydroxybenzenes with the Ca(2+)-ATPase: separate binding sites for dihydroxybenzenes and sesquiterpene lactones. *Biochemistry* **34**:14385-14393.

Kikuchi, H., M. Hikage, H. Miyashita, and M. Fukumoto. 2000. NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* **254**:237-243.

Kim-Park, W. K., M. A. Moore, Z. W. Hakki, and M. J. Kowolik. 1997. Activation of the neutrophil respiratory burst requires both intracellular and extracellular calcium. *Ann N Y Acad Sci* **832**:394-404.

Kirkman, H. N., and G. F. Gaetani. 2007. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci* **32**:44-50.

Klatt, P., and S. Lamas. 2000. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* **267**:4928-4944.

Knebel, A., H. J. Rahmsdorf, A. Ullrich, and P. Herrlich. 1996. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *Embo J* **15**:5314-5325.

Koga, H., H. Terasawa, H. Nuno, K. Takeshige, F. Inagaki, and H. Sumimoto. 1999. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* **274**:25051-25060.

Konishi, H., M. Tanaka, Y. Takemura, H. Matsuzaki, Y. Ono, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka. 1997. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:11233-11237.

Krause, K. H. 2004. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* **57**:S28-29.

Kreck, M. L., J. L. Freeman, A. Abo, and J. D. Lambeth. 1996. Membrane association of Rac is required for high activity of the respiratory burst oxidase. *Biochemistry* **35**:15683-15692.

Kretz-Remy, C., E. E. Bates, and A. P. Arrigo. 1998. Amino acid analogs activate NF-kappaB through redox-dependent IkappaB-alpha degradation by the proteasome without apparent IkappaB-alpha phosphorylation. Consequence on HIV-1 long terminal repeat activation. *J Biol Chem* **273**:3180-3191.

Kretz-Remy, C., P. Mehlen, M. E. Mirault, and A. P. Arrigo. 1996. Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. *J Cell Biol* **133**:1083-1093.

Krieger-Brauer, H. I., and H. Kather. 1992. Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest* **89**:1006-1013.

Kukreja, R. C., H. A. Kontos, M. L. Hess, and E. F. Ellis. 1986. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* **59**:612-619.

Kuroda, J., K. Nakagawa, T. Yamasaki, K. Nakamura, R. Takeya, F. Kuribayashi, S. Imajoh-Ohmi, K. Igarashi, Y. Shibata, K. Sueishi, and H. Sumimoto. 2005. The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes Cells* **10**:1139-1151.

Kuthan, H., and V. Ullrich. 1982. Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system. *Eur J Biochem* **126**:583-588.

Kwong, C. H., H. L. Malech, D. Rotrosen, and T. L. Leto. 1993. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins. *Biochemistry* **32**:5711-5717.

L

Laemmli, U. K., and M. Favre. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol* **80**:575-599.

- Lambeth, J. D., T. Kawahara, and B. Diebold. 2007. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med* **43**:319-331.
- Lando, D., D. J. Peet, J. J. Gorman, D. A. Whelan, M. L. Whitelaw, and R. K. Bruick. 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* **16**:1466-1471.
- Lape, M., C. Elam, M. Versluis, R. Kempton, and S. Paula. 2007. Molecular determinants of sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase inhibition by hydroquinone-based compounds. *Proteins*.
- Lapouge, K., S. J. Smith, P. A. Walker, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon, and K. Rittinger. 2000. Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP. *Mol Cell* **6**:899-907.
- Li, A., J. Segui, S. H. Heinemann, and T. Hoshi. 1998. Oxidation regulates cloned neuronal voltage-dependent Ca^{2+} channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* **18**:6740-6747.
- Li, J., M. Stouffs, L. Serrander, B. Banfi, E. Bettiol, Y. Charnay, K. Steger, K. H. Krause, and M. E. Jaconi. 2006. The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol Biol Cell* **17**:3978-3988.
- Liacini, A., J. Sylvester, W. Q. Li, and M. Zafarullah. 2002. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol* **21**:251-262.
- Lindsay, M. A., R. S. Perkins, P. J. Barnes, and M. A. Giembycz. 1998. Leukotriene B4 activates the NADPH oxidase in eosinophils by a pertussis toxin-sensitive mechanism that is largely independent of arachidonic acid mobilization. *J Immunol* **160**:4526-4534.
- Liguori, L., B. Marques, A. Villegas-Mendez, R. Rothe, and J. L. Lenormand. 2007. Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *Expert Rev Proteomics* **4**:79-90.
- Liu, G., and I. N. Pessah. 1994. Molecular interaction between ryanodine receptor and glycoprotein triadin involves redox cycling of functionally important hyperreactive sulfhydryls. *J Biol Chem* **269**:33028-33034.
- Liu, H., R. Colavitti, Rovira, II, and T. Finkel. 2005. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* **97**:967-974.
- Lo, Y. Y., J. M. Wong, and T. F. Cruz. 1996. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* **271**:15703-15707.
- Lo, Y. Y., J. A. Conquer, S. Grinstein, and T. F. Cruz. 1998. Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species. *J Cell Biochem* **69**:19-29.
- Luo, M., S. Lee, and T. G. Brock. 2003. Leukotriene synthesis by epithelial cells. *Histol Histopathol* **18**:587-595.

M

- Mahadev, K., H. Motoshima, X. Wu, J. M. Ruddy, R. S. Arnold, G. Cheng, J. D. Lambeth, and B. J. Goldstein. 2004. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H_2O_2 and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* **24**:1844-1854.
- Mahadev, K., A. Zilbering, L. Zhu, and B. J. Goldstein. 2001. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b *in vivo* and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem* **276**:21938-21942.

- Maranchie, J. K., and Y. Zhan.** 2005. Nox4 is critical for hypoxia-inducible factor 2-alpha transcriptional activity in von Hippel-Lindau-deficient renal cell carcinoma. *Cancer Res* **65**:9190-9193.
- Maridonneau-Parini, I., and A. I. Tauber.** 1986a. Activation of NADPH-oxidase by arachidonic acid involves phospholipase A2 in intact human neutrophils but not in the cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun* **138**:1099-1105.
- Maridonneau-Parini, I., S. M. Tringale, and A. I. Tauber.** 1986b. Identification of distinct activation pathways of the human neutrophil NADPH-oxidase. *J Immunol* **137**:2925-2929.
- Marques, B., L. Liguori, M. H. Paclet, A. Villegas-Mendez, R. Rothe, F. Morel, and J. L. Lenormand.** 2007. Liposome-mediated cellular delivery of active gp91. *PLoS ONE* **2**:e856.
- Martyn, K. D., L. M. Frederick, K. von Loehneysen, M. C. Dinauer, and U. G. Knaus.** 2006. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* **18**:69-82.
- Mathews, D. H., J. Sabina, M. Zuker, and D. H. Turner.** 1999. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* **288**:911-940.
- Maxwell, P. H.** 2005. The HIF pathway in cancer. *Semin Cell Dev Biol* **16**:523-530.
- McCormack, J. G., and R. M. Denton.** 1993. Mitochondrial Ca²⁺ transport and the role of intramitochondrial Ca²⁺ in the regulation of energy metabolism. *Dev Neurosci* **15**:165-173.
- McKallip, R. J., W. Jia, J. Schlomer, J. W. Warren, P. S. Nagarkatti, and M. Nagarkatti.** 2006. Cannabidiol-induced apoptosis in human leukemia cells: A novel role of cannabidiol in the regulation of p22phox and Nox4 expression. *Mol Pharmacol* **70**:897-908.
- Meier, B., H. H. Radeke, S. Selle, M. Younes, H. Sies, K. Resch, and G. G. Habermehl.** 1989. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochem J* **263**:539-545.
- Milne, L., P. Nicotera, S. Orrenius, and M. J. Burkitt.** 1993. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch Biochem Biophys* **304**:102-109.
- Miroux, B., and J. E. Walker.** 1996. Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**:289-298.
- Mittal, C. K., and F. Murad.** 1977. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:4360-4364.
- Mizuki, K., R. Takeya, F. Kuribayashi, I. Nobuhisa, D. Kohda, H. Nunoi, K. Takeshige, and H. Sumimoto.** 2005. A region C-terminal to the proline-rich core of p47phox regulates activation of the phagocyte NADPH oxidase by interacting with the C-terminal SH3 domain of p67phox. *Arch Biochem Biophys* **444**:185-194.
- Mochizuki, T., S. Furuta, J. Mitsushita, W. H. Shang, M. Ito, Y. Yokoo, M. Yamaura, S. Ishizone, J. Nakayama, A. Konagai, K. Hirose, K. Kiyosawa, and T. Kamata.** 2006. Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells. *Oncogene* **25**:3699-3707.
- Moe, K. T., S. Aulia, F. Jiang, Y. L. Chua, T. H. Koh, M. C. Wong, and G. J. Dusting.** 2006. Differential upregulation of Nox homologues of NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha in human aortic smooth muscle and embryonic kidney cells. *J Cell Mol Med* **10**:231-239.

Mouche, S., S. B. Mkaddem, W. Wang, M. Katic, Y. H. Tseng, S. Carnesecchi, K. Steger, M. Foti, C. A. Meier, P. Muzzin, C. R. Kahn, E. Ogier-Denis, and I. Szanto. 2007. Reduced expression of the NADPH oxidase NOX4 is a hallmark of adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1773**:1015-1027.

Moulton, P. J., T. S. Hiran, M. B. Goldring, and J. T. Hancock. 1997. Detection of protein and mRNA of various components of the NADPH oxidase complex in an immortalized human chondrocyte line. *Br J Rheumatol* **36**:522-529.

Morel, F., J. Doussiere, and P. V. Vignais. 1991. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* **201**:523-546.

Muallem, S., P. Loessberg, G. Sachs, and L. A. Wheeler. 1991. Agonist-sensitive and -insensitive intracellular Ca²⁺ pools. Separate Ca(2+)-releasing mechanisms revealed by thapsigargin and benzoyhydroquinone. *Biochem J* **279 (Pt 2)**:367-375.

Murillo, M. M., I. Carmona-Cuenca, G. Del Castillo, C. Ortiz, C. Roncero, A. Sanchez, M. Fernandez, and I. Fabregat. 2007. Activation of NADPH oxidase by transforming growth factor-beta in hepatocytes mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor ligands through a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Biochem J* **405**:251-259.

N

Nakamura, K., T. Hori, N. Sato, K. Sugie, T. Kawakami, and J. Yodoi. 1993. Redox regulation of a src family protein tyrosine kinase p56lck in T cells. *Oncogene* **8**:3133-3139.

Nakamura, R., H. Sumimoto, K. Mizuki, K. Hata, T. Ago, S. Kitajima, K. Takeshige, Y. Sakaki, and T. Ito. 1998. The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40phox and p67phox, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Biochem* **251**:583-589.

Nakano, Y., B. Banfi, A. J. Jesaitis, M. C. Dinauer, L. A. Allen, and W. M. Nauseef. 2007. Critical roles for p22phox in the structural maturation and subcellular targeting of Nox3. *Biochem J* **403**:97-108.

Nishino, T., and T. Nishino. 1997. The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *J Biol Chem* **272**:29859-29864.

Nisimoto, Y., S. Motalebi, C. H. Han, and J. D. Lambeth. 1999. The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* **274**:22999-23005.

Nisimoto, Y., H. Ogawa, K. Miyano, and M. Tamura. 2004. Activation of the flavoprotein domain of gp91phox upon interaction with N-terminal p67phox (1-210) and the Rac complex. *Biochemistry* **43**:9567-9575.

Nobuhisa, I., R. Takeya, K. Ogura, N. Ueno, D. Kohda, F. Inagaki, and H. Sumimoto. 2006. Activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase requires co-operation between the tandem SH3 domains of p47phox in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent alpha-helix of p22phox. *Biochem J* **396**:183-192.

O

Ohba, M., M. Shibamura, T. Kuroki, and K. Nose. 1994. Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor-beta 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells. *J Cell Biol* **126**:1079-1088.

Otsuka-Murakami, H., and Y. Nisimoto. 1995. Purification of an NADPH-dependent diaphorase from membrane of DMSO-induced differentiated human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *FEBS Lett* **361**:206-210.

P

- Paclet, M. H., A. W. Coleman, S. Vergnaud, and F. Morel.** 2000. P67-phox-mediated NADPH oxidase assembly: imaging of cytochrome b558 liposomes by atomic force microscopy. *Biochemistry* **39**:9302-9310.
- Paclet, M. H., S. Berthier, L. Kuhn, J. Garin, and F. Morel.** 2007. Regulation of phagocyte NADPH oxidase activity: identification of two cytochrome b558 activation states. *Faseb J* **21**:1244-1255.
- Paclet, M. H., L. M. Henderson, Y. Campion, F. Morel, and M. C. Dagher.** 2004. Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. *Biochem J* **382**:981-986.
- Paolicchi, A., G. Minotti, P. Tonarelli, R. Tongiani, D. De Cesare, A. Mezzetti, S. Dominici, M. Comporti, and A. Pompella.** 1999. Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent iron reduction and LDL oxidation--a potential mechanism in atherosclerosis. *J Investig Med* **47**:151-160.
- Park, H. S., H. Y. Jung, E. Y. Park, J. Kim, W. J. Lee, and Y. S. Bae.** 2004. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol* **173**:3589-3593.
- Park, H. S., D. K. Jin, S. M. Shin, M. K. Jang, N. Longo, J. W. Park, D. S. Bae, and Y. S. Bae.** 2005. Impaired generation of reactive oxygen species in leprechaunism through downregulation of Nox4. *Diabetes* **54**:3175-3181.
- Park, H. S., J. N. Chun, H. Y. Jung, C. Choi, and Y. S. Bae.** 2006. Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res* **72**:447-455.
- Pedruzzi, E., C. Guichard, V. Ollivier, F. Driss, M. Fay, C. Prunet, J. C. Marie, C. Pouzet, M. Samadi, C. Elbim, Y. O'Dowd, M. Bens, A. Vandewalle, M. A. Gougerot-Pocidallo, G. Lizard, and E. Ogier-Denis.** 2004. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* **24**:10703-10717.
- Pelletier, J. P., and J. Martel-Pelletier.** 1989. Evidence for the involvement of interleukin 1 in human osteoarthritic cartilage degradation: protective effect of NSAID. *J Rheumatol Suppl* **18**:19-27.
- Pessach, I., T. L. Leto, H. L. Malech, and R. Levy.** 2001. Essential requirement of cytosolic phospholipase A(2) for stimulation of NADPH oxidase-associated diaphorase activity in granulocyte-like cells. *J Biol Chem* **276**:33495-33503.
- Pessach, I., Z. Shmelzer, T. L. Leto, M. C. Dinauer, and R. Levy.** 2006. The C-terminal flavin domain of gp91phox bound to plasma membranes of granulocyte-like X-CGD PLB-985 cells is sufficient to anchor cytosolic oxidase components and support NADPH oxidase-associated diaphorase activity independent of cytosolic phospholipase A2 regulation. *J Leukoc Biol* **80**:630-639.
- Piccoli, C., R. Ria, R. Scrima, O. Cela, A. D'Aprile, D. Boffoli, F. Falzetti, A. Tabilio, and N. Capitanio.** 2005. Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. *J Biol Chem* **280**:26467-26476.
- Poinas, A., J. Gaillard, P. Vignais, and J. Doussiere.** 2002. Exploration of the diaphorase activity of neutrophil NADPH oxidase. *Eur J Biochem* **269**:1243-1252.
- Pou, S., L. Keaton, W. Surichamorn, and G. M. Rosen.** 1999. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **274**:9573-9580.

Q

- Quie, P. G., J. G. White, B. Holmes, and R. A. Good.** 1967. *In vitro* bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J Clin Invest* **46**:668-679.

Quinn, M. T., and K. A. Gauss. 2004. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* **76**:760-781.

R

Rhee, S. G., H. Z. Chae, and K. Kim. 2005. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* **38**:1543-1552.

Rinaldi, M., P. Moroni, M. J. Paape, and D. D. Bannerman. 2007. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. *Vet Immunol Immunopathol* **115**:107-125.

Rossary, A., K. Arab, and J. P. Steghens. 2007. Polyunsaturated fatty acids modulate NOX 4 anion superoxide production in human fibroblasts. *Biochem J* **406**:77-83.

Rotrosen, D., C. L. Yeung, T. L. Leto, H. L. Malech, and C. H. Kwong. 1992. Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* **256**:1459-1462.

Royer-Pokora, B., L. M. Kunkel, A. P. Monaco, S. C. Goff, P. E. Newburger, R. L. Baehner, F. S. Cole, J. T. Curnutte, and S. H. Orkin. 1986. Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* **322**:32-38.

S

Sanchez, A., A. M. Alvarez, M. Benito, and I. Fabregat. 1996. Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* **271**:7416-7422.

Sanders, S. A., R. Eisenthal, and R. Harrison. 1997. NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion. *Eur J Biochem* **245**:541-548.

Sbarra, A. J., and M. L. Karnovsky. 1959. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* **234**:1355-1362.

Schoonbroodt, S., V. Ferreira, M. Best-Belpomme, J. R. Boelaert, S. Legrand-Poels, M. Korner, and J. Piette. 2000. Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I kappa B alpha in NF-kappa B activation by an oxidative stress. *J Immunol* **164**:4292-4300.

Schrader, M., and H. D. Fahimi. 2006. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* **1763**:1755-1766.

Segal, A. W., I. West, F. Wientjes, J. H. Nugent, A. J. Chavan, B. Haley, R. C. Garcia, H. Rosen, and G. Scrace. 1992. Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J* **284 (Pt 3)**:781-788.

Serezani, C. H., D. M. Aronoff, S. Jancar, and M. Peters-Golden. 2005. Leukotriene B4 mediates p47phox phosphorylation and membrane translocation in polyunsaturated fatty acid-stimulated neutrophils. *J Leukoc Biol* **78**:976-984.

Serrander, L., L. Cartier, K. Bedard, B. Banfi, B. Lardy, O. Plastre, A. Sienkiewicz, L. Forro, W. Schlegel, and K. H. Krause. 2007. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J* **406**:105-114.

Shiose, A., J. Kuroda, K. Tsuruya, M. Hirai, H. Hirakata, S. Naito, M. Hattori, Y. Sakaki, and H. Sumimoto. 2001. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem* **276**:1417-1423.

Shirokov, V. A., A. Kommer, V. A. Kolb, and A. S. Spirin. 2007. Continuous-exchange protein-synthesizing systems. *Methods Mol Biol* **375**:19-55.

Simkovic, M., and F. E. Frerman. 2004. Alternative quinone substrates and inhibitors of human electron-transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase. *Biochem J* **378**:633-640.

Sommer, D., S. Coleman, S. A. Swanson, and P. M. Stemmer. 2002. Differential susceptibilities of serine/threonine phosphatases to oxidative and nitrosative stress. *Arch Biochem Biophys* **404**:271-278.

Spanjaard, R. A., and J. van Duin. 1988. Translation of the sequence AGG-AGG yields 50% ribosomal frameshift. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:7967-7971.

Spanjaard, R. A., K. Chen, J. R. Walker, and J. van Duin. 1990. Frameshift suppression at tandem AGA and AGG codons by cloned tRNA genes: assigning a codon to argU tRNA and T4 tRNA(Arg). *Nucleic Acids Res* **18**:5031-5036.

Stark, A. A., E. Zeiger, and D. A. Pagano. 1993. Glutathione metabolism by gamma-glutamyltranspeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **14**:183-189.

Studier, F. W. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**:207-234.

Sturrock, A., T. P. Huecksteadt, K. Norman, K. Sanders, T. M. Murphy, P. Chitano, K. Wilson, J. R. Hoidal, and T. P. Kennedy. 2007. Nox4 mediates TGF-beta1-induced retinoblastoma protein phosphorylation, proliferation, and hypertrophy in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**:L1543-1555.

Suh, Y. A., R. S. Arnold, B. Lassegue, J. Shi, X. Xu, D. Sorescu, A. B. Chung, K. K. Griendling, and J. D. Lambeth. 1999. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**:79-82.

Sumimoto, H., K. Hata, K. Mizuki, T. Ito, Y. Kage, Y. Sakaki, Y. Fukumaki, M. Nakamura, and K. Takeshige. 1996. Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. *J Biol Chem* **271**:22152-22158.

Sun, F., X. Huo, Y. Zhai, A. Wang, J. Xu, D. Su, M. Bartlam, and Z. Rao. 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* **121**:1043-1057.

Sundaresan, M., Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Irani, and T. Finkel. 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270**:296-299.

Suzukawa, K., K. Miura, J. Mitsushita, J. Resau, K. Hirose, R. Crystal, and T. Kamata. 2000. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J Biol Chem* **275**:13175-13178.

Suzuki, Y. J., and G. D. Ford. 1992. Superoxide stimulates IP₃-induced Ca²⁺ release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* **262**:H114-116.

T

Takeya, R., M. Taura, T. Yamasaki, S. Naito, and H. Sumimoto. 2006. Expression and function of Noxo1gamma, an alternative splicing form of the NADPH oxidase organizer 1. *Febs J* **273**:3663-3677.

Takeya, R., N. Ueno, K. Kami, M. Taura, M. Kohjima, T. Izaki, H. Nuno, and H. Sumimoto. 2003. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* **278**:25234-25246.

Talley, A. K., S. Dewhurst, S. W. Perry, S. C. Dollard, S. Gummuluru, S. M. Fine, D. New, L. G. Epstein, H. E. Gendelman, and H. A. Gelbard. 1995. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crmA. *Mol Cell Biol* **15**:2359-2366.

Tamura, M., I. Shiozaki, S. Ono, K. Miyano, S. Kunihiro, and T. Sasaki. 2007. p40phox as an alternative organizer to p47phox in Nox2 activation: a new mechanism involving an interaction with p22phox. *FEBS Lett* **581**:4533-4538.

Taylor, R. M., J. B. Burritt, D. Baniulis, T. R. Foubert, C. I. Lord, M. C. Dinauer, C. A. Parkos, and A. J. Jesaitis. 2004. Site-specific inhibitors of NADPH oxidase activity and structural probes of flavocytochrome b: characterization of six monoclonal antibodies to the p22phox subunit. *J Immunol* **173**:7349-7357.

Touyz, R. M., X. Chen, F. Tabet, G. Yao, G. He, M. T. Quinn, P. J. Pagano, and E. L. Schiffrin. 2002. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* **90**:1205-1213.

Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**:145-149.

Tran, Q. M., R. A. Rothery, E. Maklashina, G. Cecchini, and J. H. Weiner. 2006. The quinone binding site in Escherichia coli succinate dehydrogenase is required for electron transfer to the heme b. *J Biol Chem* **281**:32310-32317.

Treiman, M., C. Caspersen, and S. B. Christensen. 1998. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases. *Trends Pharmacol Sci* **19**:131-135.

Tsukii, K., N. Nakahata, K. Watanabe, S. Tsurufuji, and Y. Ohizumi. 1996. Comparison of tBuBHQ with chemotactic peptide and phorbol ester in O₂- production in HL-60 cells. *Eur J Pharmacol* **298**:87-95.

Tucker, K. A., M. B. Lilly, L. Heck, Jr., and T. A. Rado. 1987. Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood* **70**:372-378.

U

Ueno, M., H. Masutani, R. J. Arai, A. Yamauchi, K. Hirota, T. Sakai, T. Inamoto, Y. Yamaoka, J. Yodoi, and T. Nikaido. 1999. Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol Chem* **274**:35809-35815.

Ueno, N., R. Takeya, K. Miyano, H. Kikuchi, and H. Sumimoto. 2005. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem* **280**:23328-23339.

Ueyama, T., M. Geiszt, and T. L. Leto. 2006. Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol* **26**:2160-2174.

Ueyama, T., K. Lekstrom, S. Tsujibe, N. Saito, and T. L. Leto. 2007. Subcellular localization and function of alternatively spliced Nox1 isoforms. *Free Radic Biol Med* **42**:180-190.

V

Valente, A. J., A. El Jamali, T. K. Epperson, M. J. Gamez, D. W. Pearson, and R. A. Clark. 2007. NOX1 NADPH oxidase regulation by the NOXA1 SH3 domain. *Free Radic Biol Med* **43**:384-396.

Vallet, P., Y. Charnay, K. Steger, E. Ogier-Denis, E. Kovari, F. Herrmann, J. P. Michel, and I. Szanto. 2005. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience* **132**:233-238.

Van Buul, J. D., M. Fernandez-Borja, E. C. Anthony, and P. L. Hordijk. 2005. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* **7**:308-317.

Vaquero, E. C., M. Edderkaoui, S. J. Pandol, I. Gukovsky, and A. S. Gukovskaya. 2004. Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* **279**:34643-34654.

Varenne, S., and C. Lazdunski. 1986. Effect of distribution of unfavourable codons on the maximum rate of gene expression by an heterologous organism. *J Theor Biol* **120**:99-110.

Vasquez-Vivar, J., P. Martasek, J. Whitsett, J. Joseph, and B. Kalyanaraman. 2002. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *Biochem J* **362**:733-739.

Verchier, Y., B. Lardy, M. V. Nguyen, F. Morel, S. Arbault, and C. Amatore. 2007. Concerted activities of nitric oxide synthases and NADPH oxidases in PLB-985 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **361**:493-498.

W

Wada, K., Y. Wada, F. Ishibashi, T. Gojobori, and T. Ikemura. 1992. Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Res* **20 Suppl**:2111-2118.

Wallach, T. M., and A. W. Segal. 1997. Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation *in vitro*. *Biochem J* **321 (Pt 3)**:583-585.

Wang, G. L., and G. L. Semenza. 1993. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:4304-4308.

Wang, X., V. C. Culotta, and C. B. Klee. 1996. Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature* **383**:434-437.

Watanabe, N., D. A. Dickinson, R. M. Liu, and H. J. Forman. 2004. Quinones and glutathione metabolism. *Methods Enzymol* **378**:319-340.

Wijkander, J., J. T. O'Flaherty, A. B. Nixon, and R. L. Wykle. 1995. 5-Lipoxygenase products modulate the activity of the 85-kDa phospholipase A2 in human neutrophils. *J Biol Chem* **270**:26543-26549.

Wingler, K., S. Wunsch, R. Kreutz, L. Rothermund, M. Paul, and H. H. Schmidt. 2001. Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med* **31**:1456-1464.

Winn, L. M. 2003. Homologous recombination initiated by benzene metabolites: a potential role of oxidative stress. *Toxicol Sci* **72**:143-149.

X

Xia, D., C. A. Yu, H. Kim, J. Z. Xia, A. M. Kachurin, L. Zhang, L. Yu, and J. Deisenhofer. 1997. Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**:60-66.

Xu, C., H. Ma, G. Inesi, M. K. Al-Shawi, and C. Toyoshima. 2004. Specific structural requirements for the inhibitory effect of thapsigargin on the Ca²⁺ ATPase SERCA. *J Biol Chem* **279**:17973-17979.

Y

Yamauchi, A., L. Yu, A. J. Potgens, F. Kuribayashi, H. Nunoi, S. Kanegasaki, D. Roos, H. L. Malech, M. C. Dinauer, and M. Nakamura. 2001. Location of the epitope for 7D5, a monoclonal antibody raised against human flavocytochrome b558, to the extracellular peptide portion of primate gp91phox. *Microbiol Immunol* **45**:249-257.

Yan, Y., C. L. Wei, W. R. Zhang, H. P. Cheng, and J. Liu. 2006. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin* **27**:821-826.

Yang, S., P. Madyastha, S. Bingel, W. Ries, and L. Key. 2001. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol Chem* **276**:5452-5458.

Yon, J., and M. Fried. 1989. Precise gene fusion by PCR. *Nucleic Acids Res* **17**:4895.

Yu, L., F. R. DeLeo, K. J. Biberstine-Kinkade, J. Renee, W. M. Nauseef, and M. C. Dinauer. 1999. Biosynthesis of flavocytochrome b558 . gp91(phox) is synthesized as a 65-kDa precursor (p65) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **274**:4364-4369.

Yuzawa, S., K. Ogura, M. Horiuchi, N. N. Suzuki, Y. Fujioka, M. Kataoka, H. Sumimoto, and F. Inagaki. 2004. Solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox in an autoinhibited form. *J Biol Chem* **279**:29752-29760.

Z

Zafari, A. M., M. Ushio-Fukai, C. A. Minieri, M. Akers, B. Lassegue, and K. K. Griendling. 1999. Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal* **1**:167-179.

Zangar, R. C., D. R. Davydov, and S. Verma. 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**:316-331.

Zhen, L., A. A. King, Y. Xiao, S. J. Chanock, S. H. Orkin, and M. C. Dinauer. 1993. Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:9832-9836.

Zhou, J., T. Schmid, and B. Brune. 2003. Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *Mol Biol Cell* **14**:2216-2225.

Zhu, X., A. K. Raina, H. G. Lee, G. Casadesus, M. A. Smith, and G. Perry. 2004. Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res* **1000**:32-39.

Zhu, Y., C. C. Marchal, A. J. Casbon, N. Stull, K. von Lohneysen, U. G. Knaus, A. J. Jesaitis, S. McCormick, W. M. Nauseef, and M. C. Dinauer. 2006. Deletion mutagenesis of p22phox subunit of flavocytochrome b558: identification of regions critical for gp91phox maturation and NADPH oxidase activity. *J Biol Chem* **281**:30336-30346.

Zhu, X., B. Su, X. Wang, M. A. Smith, and G. Perry. 2007. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* **64**:2202-2210.

**ANNEXES
ET
PUBLICATIONS**

ANNEXE 1

TABLEAUX DES AMORCES UTILISEES

Tableaux des amorces utilisées dans cette étude

Tableau 16. Liste des amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR semi-quantitative et en temps réel.

RT-PCR	Gène	Amorces	Séquence 5'-3'	Taille du fragment amplifié (pb)	Température d'hybridation
RT-PCR	Nox1	Nox1F Nox1R	GTACAAATTCCAGTGTGCAGACCAC AGACTGGAATATCGGTGACAGCA	248	58°C
	Nox2	Nox2F Nox2R	CCTCTGCCACCATGGGGAAC GACTTCAAAGTAAGACCTCCGGATG	620	60°C
	Nox4A et B	Nox4F Nox4R	CAGCAAGATACCGAGATG CTGGCTTATTGCTCCGGA	600	60°C
	p22phox	p22F p22R	AGCAGTGGACGCCATCGAGCCCAAG ATTGCAGGTGGGTGCACCTGGTGGGAG	246	55°C
	5LOX	5LOXF 5LOXR	AAAGAACTGGAAACACGTCAGAAA AACTGGTGTGTACAGGGGTCAGTT	515	55°C
	GAPDH	GAPDHF GAPDHR	Clontech Clontech	450	55°C
	Nox4AV5/His Nox4BV5/His	Nox4F6 V5/HisR	GTTTGGATCCCCAGTCACCATCATTTCGGTC CGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGG	940 820	55°C
RT-PCR en temps réel	Nox4A et B	qNox4F qNox4R	CTGAATGCAGCAAGATACCGAGAT CTGGCTTATTGCTCCGGA	507	66°C
	p22phox	qp22F qp22R	CCTGATCCTCATCACCGGGGGC CGGTCATGTACTTCTGTCCCCAGCG	170	70°C
	GAPDH	qGAPDHF qGAPDHR	GTGGTGGACCTGACCTGC CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCG	247	70°C

Tableau 17. Liste des amorces utilisées pour les expériences de clonages. Les sites de restriction sont soulignés.

Clonage	Gène	Amorces	Séquence 5'-3'	Site de restriction	Plasmide
Mammifère	Nox4-5'	Nox4F8	GTTT <u>GGTACCATGGCTGTGTCCTGGAGG</u>	KpnI	Topo
		Nox4R2	GCAGACCCCTGTCAGGCCAGG	-	
	Nox4-3'	Nox4F3	CTGAATGCAGCAAGATAACCGAGAT	-	Topo
		Nox4R4	GTTTACTAGTTCAGCTGAAAGACTCTTTATTGTATTC	SpeI	
	Nox4A-V5/His Nox4B-V5His	Nox4F8	GTTT <u>GGTACCATGGCTGTGTCCTGGAGG</u>	KpnI	pEF6/V5-His b
Nox4R5		GTTTACTAGTGCAGCTGAAAGACTCTTTATTGTATTC	SpeI		
Nox4AFIAsH	Nox4F8	GTTT <u>GGTACCATGGCTGTGTCCTGGAGG</u>	KpnI	pEF6/V5-His b	
	FIAsHR5 FlaAsHR6	ACAGCCAGGACAACAGCCACCAGCGCTGAAAGACTCTTTATTGTATTC GTTT <u>GCGGCCGCCATCGATGCCGCCACCGCAACAGCCAGGACAACAGCC</u>	- ClaI/NotI		
Nox4AFIAsH- V5/His	Nox4F8	GTTT <u>GGTACCATGGCTGTGTCCTGGAGG</u>	KpnI	pEF6/V5-His b	
	FIAsHR5 FIAsHR7	ACAGCCAGGACAACAGCCACCAGCGCTGAAAGACTCTTTATTGTATTC GTTT <u>GCGGCCGCCATCGATTCAGCCGCCACCGCAACAGCCAGGACAACAGCC</u>	- ClaI/NotI		
Bactérien	Nox4AqcFIAsH	Nox4F5-N	GGAATTCTCCATGGTTCACCATCATTTCCGGTCATAAGTC	NcoI	pET30b
		FIAsHR5	ACAGCCAGGACAACAGCCACCAGCGCTGAAAGACTCTTTATTGTATTC	-	
		FlaAsHR6	GTTT <u>GCGGCCGCCATCGATGCCGCCACCGCAACAGCCAGGACAACAGCC</u>	ClaI/NotI	
	Nox4Aqc-His Nox4B-His	Nox4F6-C	GGATGAGCGGCCGCCAGTCACCATCATTTCCGGTC	NotI	pIVEX 3.1MCS
		Nox4R4-C	GCGTACTCGAGTTGCTGAAAGACTCTTTATTGTATTC	XhoI	
	Nox4A-1TM-His	Nox4F9-C	GGATGAGCGGCCGCCGCTTGCATGTTTCAGGAGGGCTGC	NotI	pIVEX 3.1MCS
		Nox4R4-C	GCGTACTCGAGTTGCTGAAAGACTCTTTATTGTATTC	XhoI	
Nox4A-2TM-His	Nox4F7-C	GGATGAGCGGCCGCCGCTTACATATGCAATAAGAG	NotI	pIVEX 3.1MCS	
	Nox4R4-C	GCGTACTCGAGTTGCTGAAAGACTCTTTATTGTATTC	XhoI		
His-Nox4Aqc His- Nox4B	Nox4F5-N	GGAATTCTCCATGGTTCACCATCATTTCCGGTCATAAGTC	NcoI	pIVEX 2.4NdeI pET30b	
	Nox4R2-N	GCGTACTCGAGTCAGCTGAAAGACTCTTTATTGTATTC	XhoI		
His-Nox4A-1TM	Nox4F10-N	GGAATTCTCCATGGTCTTGCATGTTTCAGGAGGGCTGC	NcoI	pIVEX 2.4NdeI pET30b	
	Nox4R2-N	GCGTACTCGAGTCAGCTGAAAGACTCTTTATTGTATTC	XhoI		
His-Nox4A-2TM	Nox4F8-N	GGAATTCTCCATGGCTTACATATGCAATAAGAG	NcoI	pIVEX 2.4NdeI pET30b	
	Nox4R2-N	GCGTACTCGAGTCAGCTGAAAGACTCTTTATTGTATTC	XhoI		

ANNEXE 2

MISE AU POINT DE LA RT-PCR EN
TEMPS REEL DE NOX4 ET DE P22PHOX

Mise au point de la RT-PCR en temps réel pour les transcrits de Nox4 et p22phox

La technique de RT-PCR en temps réel permet d'estimer de manière précise le nombre relatif d'ARNm d'un gène en comparaison avec un gène de ménage. Elle combine une étape de transcription inverse classique suivie d'une réaction de PCR en présence de fluorochrome dont la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Le principe repose sur l'existence d'une relation quantitative entre la quantité de la séquence cible de départ (ici l'ADNc issu de la réaction de transcription inverse) et la quantité du produit amplifié à n'importe quel cycle. La cinétique de fluorescence de la réaction de PCR a une forme exponentielle. L'augmentation du nombre d'amplicons à chaque cycle est exponentielle à partir du point d'inflexion (Ct, cycle seuil). Au bout d'un certain temps, cette augmentation devient linéaire car la réaction d'amplification est gênée par une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces. A partir de cette étape, la fiabilité de l'amplification n'est plus suffisante pour permettre son exploitation. Il est donc important de prendre en compte le moment de l'apparition du point d'inflexion pour les calculs. En effet, plus il y a de séquence cible au départ et moins de cycles d'amplification seront nécessaires pour atteindre le cycle seuil.

La qualité des résultats de la technique repose en grande partie sur la conception des amorces spécifiques qui doivent tenir compte de plusieurs critères comme la température d'hybridation (aussi élevée que possible), la séquence du gène cible (réalisation d'une comparaison avec une banque de séquence nucléotidique, Blastn), la formation de dimères d'amorces (qu'il convient d'éviter). Ceci a pour but d'obtenir une amplification spécifique de l'ADNc cible et d'améliorer l'efficacité de la PCR. Des amorces spécifiques de Nox4, de p22phox et de la GAPDH ont été conçues et sont indiquées dans le tableau de l'annexe 1.

Les cellules HEK293 T-REx Nox4 induites par la tétracycline pendant 4h sont lysées et les ARNm totaux sont extraits par la technique du phénol/chloroforme (§II.A.1 Matériels et méthodes). Ces ARN sont dosés et stockés à -80° jus qu'à leur utilisation. 5 µg d'ARN totaux extraits sont retranscrits en ADNc par l'enzyme l'AMV-Rtase. Les produits de la transcription réverse sont dilués au dixième et 5 µL sont alors utilisés pour la réaction de PCR quantitative.

La quantité d'ARNm de Nox4 et de p22phox mesurée est rapportée à une courbe standard établie au préalable pour chaque gène et également à celle du gène de ménage, la

GAPDH. L'efficacité et la reproductibilité de la PCR pour chaque gène sont évaluées grâce aux courbes standards. L'établissement de la courbe standard se fait par dilutions successives des échantillons allant du dixième au millionième. Les mesures sont réalisées en 4 exemplaires. Les courbes représentant l'amplification de l'ADN à chaque cycle de PCR sont montrées sur la *figure 88*. Une droite modélisant la régression linéaire des valeurs moyennes de cycles seuils à chaque dilution permet d'estimer l'efficacité de la PCR (pente de la droite) et aussi de calculer la correspondance entre le niveau de fluorescence et le nombre d'amplicons.

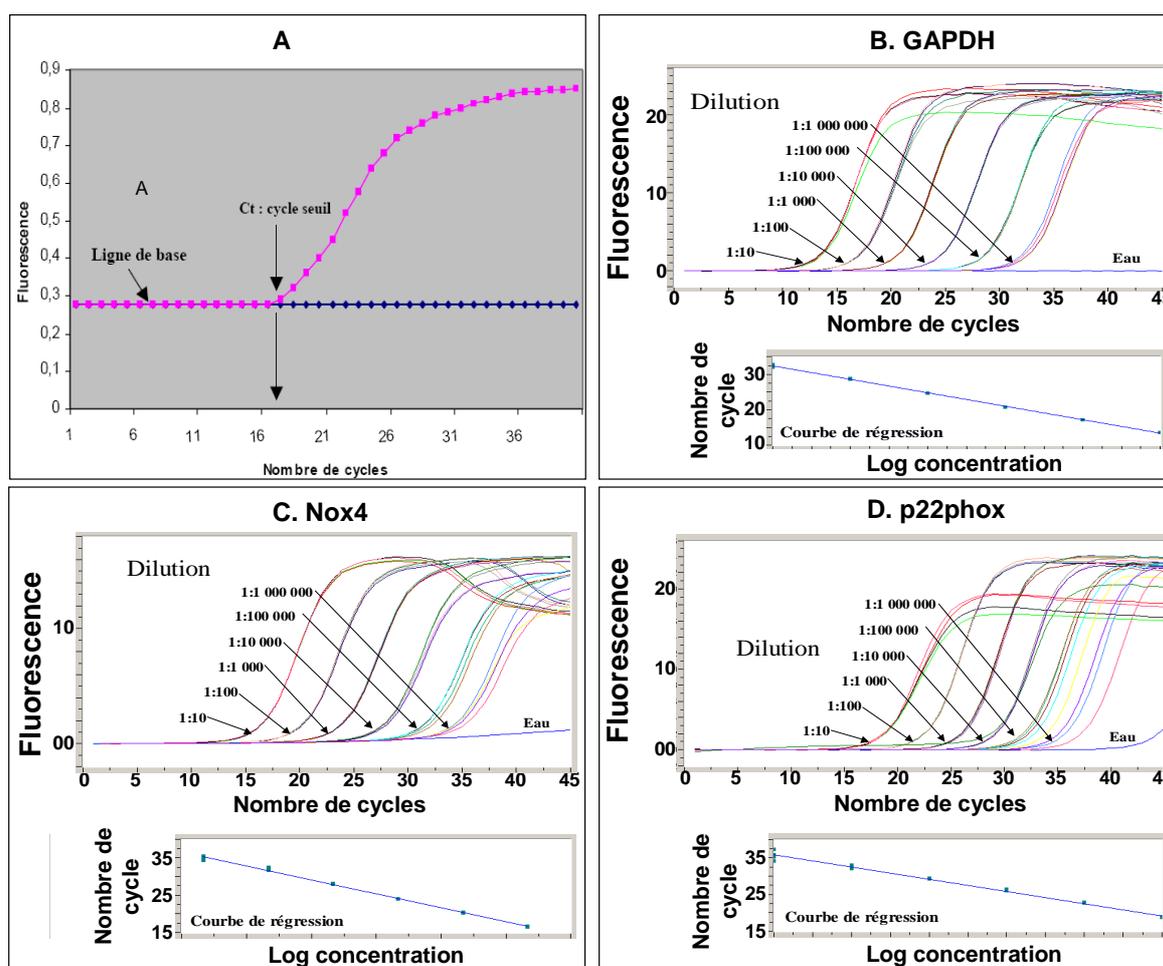


Figure 88. Mise au point de la PCR en temps réel. A) Graphique représentant le déroulement théorique d'une PCR en temps réel avec la fluorescence en ordonnée et le nombre de cycles en abscisse. La fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN présent à chaque cycle de PCR. Ct (cycle seuil) représente le seuil d'inflexion à partir duquel la fluorescence est statistiquement différente du niveau de base (en bleu). Le nombre de cycles permettant d'atteindre ce seuil est pris en compte pour la quantification relative. B), C), D) Courbes standards pour la GAPDH, p22 et Nox4. Les courbes sont obtenues par dilutions successives des échantillons d'ADNc. Pour chaque dilution, 4 mesures sont effectuées dans le même temps.

La spécificité de chaque fragment amplifié est vérifiée par dépôt sur gel agarose et par l'étape de "melting cuve" (*figure 89*). La "melting curve" est réalisée à la fin de la réaction de qPCR. Les doubles brins présents dans l'échantillon sont totalement déshybridés à 95°C

puis tous rehybridés à une basse température 65°C pendant 15 secondes. On remarque alors une forte fluorescence correspondant à la totalité des ADN en double brin. Ensuite, l'appareil augmente progressivement la température de 0,1°C toutes les secondes. On observe ainsi une baisse progressive de la fluorescence. Lorsque la température atteint celle correspondant à la température de fusion du fragment d'intérêt, on assiste à la séparation du double brin de ce fragment et donc à une chute massive de la fluorescence. Ainsi, chaque chute brutale de la fluorescence correspond à la dénaturation d'un fragment d'ADN double brin amplifié.

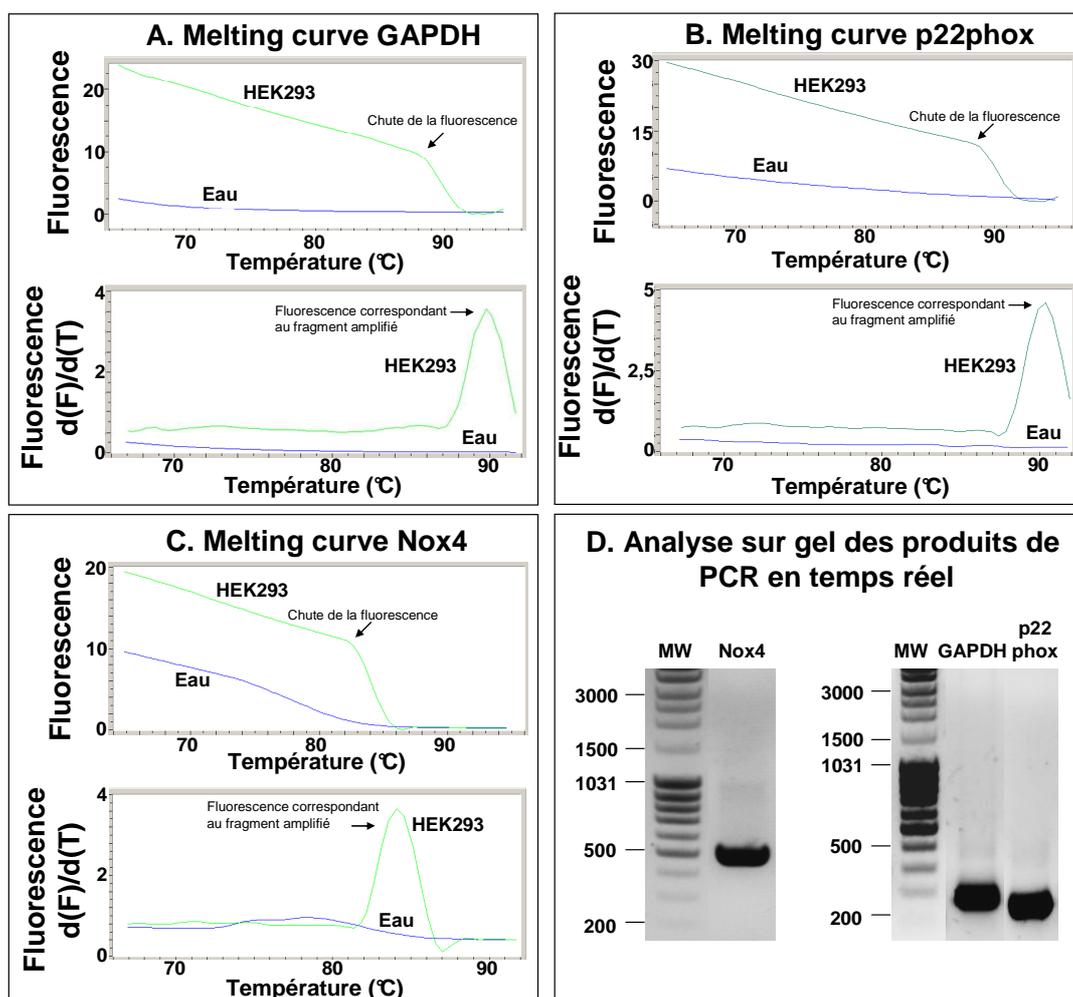


Figure 89. Contrôle de la spécificité des fragments amplifiés par PCR en temps réel. A), B) et C) Représentation de l'analyse par « melting cuve » des fragments amplifiés en fin de PCR en temps réel. D) Analyse sur gel agarose des produits en fin de qPCR.

Une fois les conditions de mise au point déterminées (décrites dans le paragraphe §II.B Matériels et méthodes), nous avons pu alors effectuer la mesure avec les ARNm totaux de tous nos types cellulaires. Afin de pouvoir comparer les différentes expériences entre-elles, nous avons toujours utilisé le même échantillon d'ADNc servant de calibrateur interne dans chaque groupe de mesures.

ANNEXE 3

LISTE DE PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Liste de publications

Hiriart, E., Farjot, G., Gruffat, H., Nguyen, M.V., Sergeant, A. and Manet, E. 2003. A novel nuclear export signal and a REF interaction domain both promote mRNA export by the Epstein-Barr virus EB2 protein. *J Biol Chem* **278**:335-342.

Grange, L.*, Nguyen, M.V.*, Lardy, B., Derouazi, M., Champion, Y., Trocme, C., Pacllet, M.H., Gaudin, P. and Morel, F. 2006. NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxid Redox Signal* **8**:1485-1496. * equal contribution

Nguyen, M.V., Pouvreau, S., El Hajjaji, F.Z., Denavit-Saubie, M. and Pequignot, J.M. 2007. Desferrioxamine enhances hypoxic ventilatory response and induces tyrosine hydroxylase gene expression in the rat brainstem *in vivo*. *J Neurosci Res* **85**:1119-1125.

Verchier, Y., Lardy, B., Nguyen, M.V., Morel, F., Arbault, S. and Amatore, C. 2007. Concerted activities of nitric oxide synthases and NADPH oxidases in PLB-985 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **361**:493-498.

Nguyen, M.V., Lardy, B., Zhang, L., Serrander, L., ..., Morel F. Quinones reagents are activation partners of Nox4. *En preparation*

Communications par posters

21-22 avril 2006 Journées de la Recherche Médicale, Grenoble, France.

Nguyen M.V., Lardy B., Morel F. Dynamique d'activation de la NADPH oxydase Nox4.

15-20 octobre 2006 Gordon Research Conference Nox Family NADPH Oxidases, Les Diablerets, Suisses / 20-21 avril 2007 Journée de la Recherche Médicale, Grenoble, France.

Nguyen M.V., Lardy B., Grange L., Serrander L., and Morel F. Nox4 NADPH oxidase activity is inducible.

3-6 décembre 2006 19e Congrès Français de Rhumatologie CNIT, Paris, France / 7-10 décembre 2006 OARSI Osteoarthritis Research Society International Prague, République tchèque

Grange L., Nguyen M.V., Lardy B., Champion Y., Derouazi M., Pacllet M.H., Trocme C., Gaudin P., Juvin R., Morel F. Influence des dérivés réactifs de l'oxygène sur l'expression d'une métalloprotéase dans une lignée de chondrocytes : rôle de la NADPH OXYDASE Nox 4. *Revue du Rhumatisme* Volume 73, Issues 10-11, November 2006, Pages 1031-1032

11-14 septembre 2007 Meeting of the Slovak Physiological Society, the Physiological Society and the Federation of European Physiological Societies. Bratislava, Slovaquie.

Pequignot J.M., El Hajjaji F.Z., Nguyen M.V., Denavit-Saubié M. Hypoxia and cardiorespiratory control. *Acta Physiologica*, 2007, Vol 191, Suppl. 658, 20.

Communications orales

V^{ème} Club oxydase 31 mai-1^{er} juin 2007, Grenoble, France.

Nguyen M.V., Lardy B., Grange L., Serrander L., and Morel F. L'activité de la NADPH oxydase Nox4 est stimulable par deux quinones, la AA-861 et la tBuBHQ.

ANNEXE 4

ARTICLE 1 : Grange, Nguyen et al (2006)

NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression.

Antioxidants & redox signaling 8:1485-1496.

Correction

In the Forum Original Research Communication “NAD(P)H Oxidase Activity of Nox4 in Chondrocytes Is Both Inducible and Involved in Collagenase Expression” by L. Grange *et al.*, published in Volume 8, Numbers 9 & 10, 2006, pp. 1485–1496, the affiliation for the authors listed was incorrect. Here is the list of authors and corresponding affiliations/footnotes as they should have appeared:

LAURENT GRANGE,^{1,2*} MINH VU CHUONG NGUYEN,^{1*} BERNARD LARDY,¹
MADIHA DEROUAZI,¹ YANNICK CAMPION,¹ CANDICE TROCME,¹
MARIE-HELENE PACLET,¹ PHILIPPE GAUDIN,^{1,2} and FRANCOISE MOREL¹

¹GREPI EA 2938 UJF, Lab Enzymology/DBPC, University Hospital A. Michallon, Grenoble, Cedex, France.

²Rheumatology Department, University Hospital A. Michallon, Grenoble, Cedex, France.

*Both authors contributed equally to this article.

Forum Original Research Communication

NAD(P)H Oxidase Activity of Nox4 in Chondrocytes Is Both Inducible and Involved in Collagenase Expression

LAURENT GRANGE,^{1,2*} MINH VU CHUONG NGUYEN,^{1*} BERNARD LARDY,¹
MADIHA DEROUAZI,¹ YANNICK CAMPION,¹ CANDICE TROCME,¹
MARIE-HELENE PACLET,¹ PHILIPPE GAUDIN,^{1,2} and FRANCOISE MOREL¹

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are regulators of redox-sensitive cell signaling pathways. In osteoarthritis, human interleukin-1 β is implicated in cartilage destruction through an ROS-dependent matrix metalloproteinase production. To determine the molecular source of ROS production in the human IL-1 β (hIL-1 β)-sensitive chondrocyte immortalized cell line C-20/A4, transfected cells were constructed that overexpress NAD(P)H oxidases. First, RT-PCR analysis showed that the C-20/A4 cell line expressed Nox2, Nox4, p22^{phox}, and p67^{phox}, but not p47^{phox}. It was found that ROS production by C-20/A4 chondrocytes does not depend on PMA and ionomycin activation. This indicates that Nox2 was not involved in the production of ROS. In C-20/A4 cells that overexpress Nox4, hIL-1 β stimulated ROS production three times more than the normal production of C-20/A4 cells. Moreover, there was a fourfold increase in the production of collagenase (MMP-1) by chondrocytes that overexpress Nox4. Interestingly, MMP-1 production in cells that overexpress Nox2 was not sensitive to hIL-1 β . These data suggest that under hIL-1 β stimulation, C-20/A4 chondrocytes produce MMP-1 through a Nox4-mediated, ROS-dependent pathway. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1485–1496.

INTRODUCTION

IN RECENT YEARS it has become evident that reactive oxygen species (ROS), such as superoxide and hydrogen peroxide, act as important regulators of redox-sensitive cell signaling pathways. ROS are involved in diverse cellular processes, such as host defense, oxygen sensing, proliferation, apoptosis, and response to mechanical strain. However, in a pathological sense, overproduction of ROS has been associated with inflammation, vascular atherosclerosis, diabetes, hypertension, tumorigenesis, and osteoarthritis (OA) (26). Osteoarthritis represents one of the most frequent musculoskeletal diseases, affecting over 60% of the elderly population. The pathogenesis of primary osteoarthritis involves an intrinsic and progressive erosion of articular cartilage, leading to incapacity of movement and chronic pain. An imbalance between anabolic and catabolic pathways by chondrocytes occurs in OA (2). These catabolic pathways are characterized by an excessive production of proteolytic enzymes, the matrix metalloproteinases (MMPs), which are directly involved in cartilage resorption.

Articular chondrocytes actively produce ROS, released in response to interleukin-1 β (26–42). It has been suggested that ROS act as secondary messengers in bovine chondrocytes and are involved in mitogen-activated protein kinase (MAPK) stimulation, and c-jun and NF-kappaB activation required for transcription of cytokine-induced MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3) metalloproteinases (22, 25, 28, 48).

Recent studies indicate that NAD(P)H oxidases play a major role in ROS production in many nonphagocytic cells (14, 15). It has been proposed that NAD(P)H oxidase Nox2 (gp91^{phox}) could produce superoxide anions in the immortalized chondrocyte cell line C-20/A4, similar to those found in phagocyte cells (15, 30, 31). However, the involvement of Nox2 in superoxide production in osteoarthritis has not been proven. In porcine chondrocytes, no production of ROS was seen after addition of phorbol ester (PMA), a Nox2 activator (15). Indeed, p47^{phox} and gp91^{phox}-deficient mice have the same tissue damage as wild type mice in experimental arthritis models (another joint disease) (45). Recent efforts to identify oxidases responsible for ROS generation in nonphagocytic cells led to the discovery of

Center for Biomedical EPR Spectroscopy and Imaging, and Comprehensive Wound Care Center, Davis Heart and Lung Research Institute, The Ohio State University, Columbus, Ohio.

gp91^{phox} isoforms. To date, the Nox family consists of five members, all of which are structurally similar to the Nox2 protein (20). One member of this family, Nox4, is the major source of ROS in kidneys (9, 11) and is also abundant in the vascular system and in many others tissues (19). In osteoclast cells, Nox4 has been identified and shown to produce superoxide that directly contributes to bone resorption (49). Strong evidence indicates that superoxide production in chondrocytes could be responsible for the overexpression of metalloproteinases.

To address these questions, we studied the effect of the expression of the Nox family and its partners in chondrocyte immortalized cell lines. We focused our study on Nox4 and Nox2, and used the C-20/A4 chondrocyte cell line, which provides a stable expression of both protein types to compare their roles under cytokinetic stress and their impact on MMP-1 expression. In this study, we report that Nox4 is the main NAD(P)H oxidase involved in ROS production under human interleukin-1 β (hIL-1 β) stimulation in the C-20/A4 chondrocyte cell line, and that ROS are directly related to MMP-1 production.

MATERIALS AND METHODS

Materials and cells

Human chondrocyte cell lines immortalized by SV40, C-20/A4, T/C-28a2, or C-28/I2, are a gift from M.B. Goldring (Harvard Institutes of Medicine, Boston, MA). Monoclonal antibodies anti-p22^{phox} 44.1 and monoclonal antibodies anti-Nox2 (54.1 & NL7) were from A.J. Jesaitis (Montana State University, Bozeman, MT) monoclonal antibodies anti-Nox2 7D5 were purchased at MBL Medical & Biological Laboratories Co., Ltd (NaKa-ku Nagoya, Japan) and monoclonal antibodies antihistidine from Qiagen (Courtaboeuf, France). Irrelevant monoclonal IgG1 was obtained from Immunotech (Marseille, France) and phycoerythrin-conjugated secondary antibodies from Dianova (Hamburg, Germany). Penicillin, streptomycin, L-glutamine, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin, EBSS, geneticin, and TRIzol[®] were obtained from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Human IL-1 β (hIL-1 β) and LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green I kit were purchased from Roche Applied Science (Meylan, France), blasticidin from Funakoshi Co (Japan), and AMV reverse transcriptase from QBiogene (Illkirch, France). ProMMP-1 ELISA kits were obtained from R&D Systems (Lille, France) and Effectene Transfection reagent from Qiagen. Luminol, ionomycin, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), horseradish peroxidase, and dihydroethidium were from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

Chondrocyte cell line culture

C-20/A4, T/C-28a2, and C-28/I2 chondrocyte cell lines were maintained in DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Blasticidin, 10 μ g/ml, was added to the culture medium of cells transfected with the mammalian expression plasmid pEF₆ (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and 1 μ g/ml geneticin was added to the culture medium of Nox2 transfected cells. All experiments were performed within cell passages 3 to 10 at 60–90% confluency.

Generation of plasmid constructs for the expression of Nox4 isoforms and Nox2

Human Nox4 and Nox2 were cloned: two Nox4 cDNA ESTs were characterized by PCR using UNI-ZAP human kidney lambda cDNA library (Stratagene, La Jolla, CA) as a template. Nox4A corresponds to the full-length Nox4 usually described in Genbank No.AF254621, and Nox4B is an exon 14 spliced isoform (Genbank No.AJ704726). N-terminal V5-His-tagged Nox4A and Nox4B were produced with the forward primer Nox4 F4'' (5'-GTTTGGTACCATGGCTGTGTC-CTGGAGG-3') including a Kpn I site (shown in **bold type**) and the reverse primer Nox4 R4' (5'-GTTTACTAGTGCT-GAAAGACTCTTATTGTATTC-3') comprising a Spe I restriction site (shown in **bold type**) instead of the stop codon. Both purified PCR products were subcloned into the pCR Blunt II-TOPO vector according to the manufacturing protocol (Zero Blunt TOPO PCR cloning kit, Invitrogen). pCR-BluntII-TOPO plasmid containing Nox4A or Nox4B was digested by Kpn I and Spe I, and the insert was ligated into a linearized pEF6V5/HisB vector (Invitrogen). Dominant-negative pCDNA 3.1 Nox4 Δ FAD/NADPH plasmid was constructed using the forward primer Nox4 F4 and the reverse primer Nox4 R4'' (5'-GTTTGGCGCCGCTCAAATGATG-GTGACTGGCTTATTGC-3') containing a Not I restriction site (shown in **bold type**). This purified PCR product was digested by Kpn I and Not I and ligated into linearized pCDNA 3.1 V5/HisB vector (Invitrogen). The construction that expressed Nox2 in pEF-PGK neo plasmid was obtained from Stasia *et al.* (39). All inserts were verified by sequencing (Genome Express, Grenoble, France) on an Abi Prism automatic sequencer (Perkin Elmer, France Office).

Transfection of mammalian expression plasmids

Stable transfection. C-20/A4 chondrocyte cells were trypsinized and counted. 4×10^5 C-20A/4 cells were seeded in 6-well plates and allowed to grow for 24 h to reach a 60% confluency in a 2 ml DMEM culture medium. Cells were transfected with 0.4 μ g of pEF6V5HisB vectors, which encoded the Nox4A-V5/His, or the Nox4B-V5/His, or with pEF-PGK neo, which encoded Nox2 according to the manufacturing protocol (Effectene Transfection reagent, Quiagen, Courtaboeuf, France). After 24 h, stable transfected cells were selected with either 10 μ g/ml blasticidin for Nox4A-V5/His, Nox4B-V5/His, and luciferase, or 1 mg/ml geneticin for Nox2 for 3 weeks (37).

Transient transfection. C-20/A4 chondrocyte cells were seeded in a 25 cm² flask to obtain 50% confluency on the day of transfection. Five μ g of plasmid of pCDNA 3.1 V5/His empty vector (Invitrogen) or pCDNA 3.1 Nox4 Δ FAD/NADPH were diluted in 200 μ l of CaCl₂ (250 mM) buffer and 200 μ l of HEPES-phosphate buffer (140 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.4 mM NaH₂PO₄, pH 7.05) was added. After 60 sec of incubation at room temperature, the transfection solution was added to cells immersed in 1.8 ml of complete DMEM culture medium. Four hours after transfection, the medium was replaced. Forty-eight hours after transfection, the quantity of MMP-1 was measured as described below.

RNA and RT-PCR

Chondrocytes were harvested and resuspended in TRIzol® at approximately 10⁸ cells/ml, as described in the manufacturer's instructions. RNA concentrations were determined spectrophotically at 260 nm. Reverse transcription reactions were performed from 5 µg of RNA with 20 U of AMV reverse transcriptase, as described in Trocme *et al.* (44). All PCRs were processed during 35 cycles from 2.5 µl cDNA with 2.5 U of *Taq* polymerase and primer sets spanning intron/exon boundaries to avoid genomic DNA amplification (Table 1). Two primer sets were used to characterize Nox4, the first—F4/R4—amplifying a 500 bp sequence in the 5' part of the transcript (40) and the second—F4'/R4'—differentiating the two Nox4 isoforms at 1317 bp for Nox4A and 1197 bp for Nox4B. cDNA integrity and quantity were checked by amplification of a housekeeping gene G3PDH using commercial primers (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France).

Quantitative real-time RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from C-20/A4 cells using Trizol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Two µg of RNA were converted to cDNA by reverse transcription with 40 U of AMV reverse transcriptase (Roche). Expression levels of human Nox-4 and housekeeping G3PDH mRNAs were determined using the specific primers as follows: forward Nox-4 F4''' (5'-CTGAATGCAGCAAGATAACCGAGAT-3') and reverse Nox-4 R4''' (5'-CTGGCTTATTGCTCCGGA-3'), and forward G3PDH F9 (5'-GTGGTGGACCTGACCTGC-3') and reverse G3PDH R9 (5'-CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCG-3'). Real-time quantitative Nox4 and G3PDH PCRs of each reverse-transcribed cDNA sample were made on the Light Cycler 1.5 apparatus using the LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green I kit (Roche). The incubation conditions were as follows: 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec, annealing at 66°C for 10 sec for Nox4 or G3PDH, and extension at 72°C for 21 sec for Nox4, or 10 sec for G3PDH. PCRs of each sample were done in duplicate. Nox4 mRNA expression was quantified by relating the PCR cycle obtained from samples to a standard curve and was then normalized to the G3PDH mRNA expression level. Product specificity was confirmed for each fragment by a melting curve analysis and gel electrophoresis.

FACS analysis

Protein expression of p22^{phox}, Nox2 (gp91^{phox}), Nox4A-V5/His, and Nox4B-V5/His in the human C-20/A4 chondrocyte cell line was assessed by flow cytometry analysis, according to Stasia *et al.* (38) and Palet *et al.* (34), and was modified as follows: 5 × 10⁵ cells were fixed with 1% (w/v) paraformaldehyde for 15 min at 0°C and labeled with antibodies immediately or after membrane permeabilization by saponin 0.01% (w/v) for 10 min at 0°C. Nox2 expression was evaluated with monoclonal antibodies 7D5 (5 µg/5 × 10⁵cells), NL7 (5 µg/5 × 10⁵cells), 54.1 (5 µg/5 × 10⁵cells) (32), and p22^{phox} expression was characterized with monoclonal antibodies 44.1 (5 µg/5 × 10⁵cells) (6).

Nox4A-V5/His and Nox4B-V5/His expression were assessed by two polyclonal antibodies, the former raised against the polyhistidine tail (5 µg/5 × 10⁵cells), and the latter against the Nox4 peptide ⁸⁸KVPSRRTRRLDKSR¹⁰², synthesized by Neosystem (Strasbourg, France) (5 µg/5 × 10⁵cells) (35).

TABLE 1. PRIMER SEQUENCES USED IN THIS STUDY

Name	Primers (5'... 3')
F1	GTACAAATCCAGTGTGCAGACCAC Nox1
R1	AGACTGGAATATCGGTGACAGCA
F2	ATAAGCAGGA GTTCAAGAT Nox2
R2	GTTTTCTAGACTGAAAGTTTTTCCTTGTGAAAATGAAATG
F3	ATGAACACCTCTGGGGTCAGCTGA Nox3
R3	GGATCGGAGTCACTCCCTTCGCTG
F4	CAGCAAGATACCGAGATG Nox4
R4	CTGGCTTATTGCTCCGGA
F4'	CTGAATGCAGCAAGATACCGAGATG
R4'	GTTTACTAGTGTGAAAGACTCTTTATTGTATTC
R4''	GTTTGGCGCGCTCAAATGATGGTGACTGGCITTATTGC
F4'''	CTGAATGCAGCAAGATACCGAGAT
R4'''	CTGGCTTATTGCTCCGGA
F5	ATCAAGCGCCCCCTTTTTTTCAC Nox5
R5	CTCATTGTCACACTCCTCGAC
F6	CAGTGTCCCAGCCGGTTCGTGC p22^{phox}
R6	ATTGCAGGTGGGTGCACCTGGTGGGAG
F7	TGTCITTTGCTTTGAAGAAGGGC p67^{phox}
R7	GACTTCTCTCCGAGTGTCTTC
F8	GAGCACTGGGGCCACCCAGTC p47^{phox}
R8	GTTTTATGGAAGTGTAGATCTCCG
F9	TGGCAGCTCCGAGAGCAGAG p40^{phox}
R9	GGCATCGTGTGTAGACCCCTG
F10	GTGGTGGACCTGACCTGC G3PDH
R10	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCG

Monoclonal IgG1 (5 µg/5 × 10⁵cells) was used as a control. The antibody-labeled cells were stained with phycoerythrin-conjugated secondary antibodies (dilution 1:200), and the fluorescence emission was measured at 578 nm after excitation at 488 nm on a FACS Calibur apparatus (BD Bioscience). All experiments were performed in triplicate.

Cytochrome b spectroscopy

The cytochrome b absorption spectra were performed with the C-20/A4 chondrocyte cell line WT, or transfected with the Nox4 gene resuspended in a PBS buffer containing 1% of triton ×100. They were recorded at room temperature with a DU 640 spectrophotometer (Beckman Coulter, Roissy, France). Reduction was achieved in the cuvette by addition of

a few grains of sodium dithionite, and reduced minus oxidized difference spectra were recorded. The amount of reduced cytochrome b_{558} was determined by absorbance at 426 nm using an $\epsilon_{426\text{ nm}}$ value of $106\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, or at 558 nm ($\epsilon_{558\text{ nm}} = 21.3\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A positive control was performed on cytochrome b_{558} purified from human neutrophils (33).

Measurement of NADPH oxidase activity in intact cells by luminescence assay

Hydrogen peroxide production was measured as described in Bionda *et al.* (3). Briefly, cells were washed twice with PBS, detached with trypsin and collected by centrifuge. The viability of the suspended cells was over 90%, as determined by the trypan blue exclusion method. In a 96-well plate, 5×10^5 live chondrocytes per well were resuspended in 250 μl of PBS containing 0.9 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 , 16 mM glucose, 16 μM luminol, and 8 units/ml horseradish peroxidase. In some experiments, a final concentration of 80 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA) or 2.5 μM ionomycin was added to initiate the reaction. Relative luminescence unit (RLU) counts were recorded every 30 sec for a total of 90 min at 37°C, using a Luminescan® luminometer (Labsystems, Helsinki, Finland).

Measurement of superoxide production in intact cells by fluorescence microscopy

Cell cultures were made in a 6-well plate until 80% confluency. Cells were rinsed twice with EBSS and incubated in 1 ml of the complete culture medium (DMEM-10% FBS) containing 5 μM final dihydroethidium (DHE) with or without hIL-1 β (500 pg/ml) for 20 min at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere protected from light. In some experiments, *N*-acetylcysteine 30 nM (NAC) final was added. Fluorescence was recorded with a Nikon digital sight DS-1QM (Nikon, Rollay, France), mounted on a Nikon eclipse TE2000-E fluorescence microscope (Nikon). Dihydroethidium fluorescence was analyzed using a filter with an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 580 nm. Images were acquired 20 min after DHE addition using identical exposure times, and analyzed with the Lucia software (Lucia Imaging systems, Laboratory Imaging Ltd, Prague, Czech Republic). Relative superoxide levels between cells were quantified by determining the integral gray values using Lucia Imaging systems. The integral gray value is defined as the sum of intensity in every pixel of the object. A minimum of 50 cells were analyzed per experiment. Results were expressed in arbitrary units.

MMP-1 assays

Cells cultured at 90% confluency in a 75 cm² flask were washed three times in EBSS and incubated for 23 h in 15 ml of FBS-free DMEM with or without 500 pg/ml hIL-1 β , in the presence or not of 5 mM Tiron. For inhibition experiments using the dominant-negative construct pCDNA Nox4 deltaFAD/NADPH, cells cultured at 50% confluency in a 25 cm² flask for 48 h after transient transfection were washed three times in EBSS and incubated for 23 h in 2 ml of FBS-free DMEM, with or without 500 pg/ml hIL-1 β . At the end of the incubation, proMMP-1 (the precursory form of MMP-1) concentration was measured in the supernatant culture by a commercial ELISA assay. The detection limit was 0.021 ng/ml. Results are

expressed as ng proMMP-1/g of supernatant protein, measured by the Bradford technique (4).

Statistical methods

The variations are expressed as mean \pm S.E.; *p* values were calculated by Student's paired *t* test.

RESULTS

Superoxide production is involved in hIL-1 β stimulation of MMP-1 expression

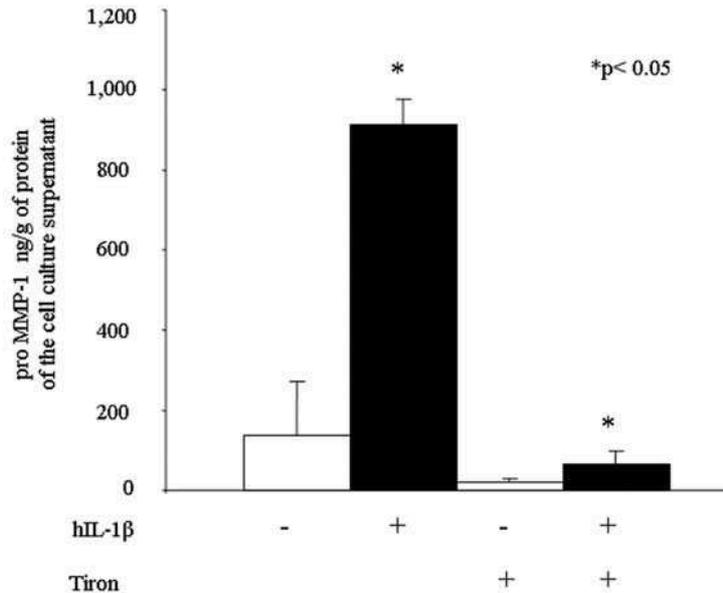
Treatment of the C-20/A4 chondrocyte cell line with hIL-1 β for 23 h significantly increased the secretion of collagenase MMP-1 in the culture medium from 136.28 ng/g of supernatant protein \pm 63.54 to 913.36 ng/g of supernatant protein \pm 64.54, suggesting an effect of hIL-1 β on metalloproteinase expression (Fig. 1). Since it has been proposed that ROS may act as secondary messengers in cytokine signaling (23, 27), antioxidants that can inactivate ROS would be expected to prevent MMP-1 induction by hIL-1 β . We therefore examined whether Tiron, a superoxide scavenger, can inhibit hIL-1 β -induced MMP-1 expression. Indeed, the release of MMP-1 was considerably decreased by Tiron to 13.75 times in cells activated by hIL-1 β and even by 6.97 times in control cells. We verified that neither Tiron nor hIL-1 β affected cell integrity through the LDH measurement in the cell culture medium at the end of each experiment (data not shown).

Expression of Nox and partners in chondrocyte cell lines

In most cell types, the Nox family is the main system involved in superoxide production. There are five human NADPH oxidases, namely Nox1 to Nox5. To determine if C-20/A4, C-28/I2, and T/C-28a2 chondrocyte cell lines express genes encoding components of NADPH oxidases, the presence of the relevant mRNA was estimated by RT-PCR. cDNA integrity was checked simultaneously by amplification of the housekeeping gene G3PDH (results not shown). The cDNAs corresponding to Nox4, Nox2, p22^{phox}, and p67^{phox} were highlighted in the three chondrocyte cell lines (Fig. 2A). Data showed that Nox5 mRNA was also present in C-28/I2 and T/C-28a2, but not in the C-20/A4 cell line. None of the chondrocyte types expressed Nox1, Nox3, or p47^{phox} mRNA (Fig. 2A).

For the remaining experiments, the C-20/A4 cell line, which expresses only two Nox isoforms, was used. To assess the presence of Nox2 and p22^{phox} proteins, FACS experiments were carried out in both intact and permeabilized C-20A/4 chondrocytes with monoclonal antibodies directed against Nox2 (7D5) or p22^{phox} (44.1) (Fig. 2B) (5). There was no binding of either antibody 7D5 (Nox2) or 44.1 (p22^{phox}) on intact C-20/A4 cells, suggesting that the epitopes are not accessible. On the contrary, following permeabilization of chondrocytes with 0.01% (w/v) saponin, the mAb44.1 binding was significantly increased in comparison with results obtained with mAb7D5. The labeling on permeabilized but not on intact chondrocytes by mAb44.1 suggested a cytosolic accessible epitope for 44.1(p22^{phox}) in chondrocytes, as is reported in neutrophils (43). Finally, as shown with mAb7D5, there was a slight expression of gp91^{phox} (Nox2) in chondrocytes (Fig. 2B).

FIG. 1. Effect of cytokinic stress on MMP-1 expression in the C-20/A4 chondrocyte cell line. Monolayer-cultivated cells at 90% confluency were incubated with 500 pg/ml hIL-1 β in the presence (or not) of 5 mM Tiron. After 23 h incubation, the supernatant was recovered for MMP-1 quantification by ELISA. Results are expressed as ng MMP-1/g of supernatant protein (measured by the Bradford technique). In addition, cell viability was verified by measurement of the LDH in the supernatant culture by an automated method (Hitachi automat). Values represent the mean \pm S.E. of four experiments. * p < 0.05 versus nonstimulated cells; ** p < 0.05 versus Tiron-free hIL-1 β stimulated cells.



Overexpression of Nox4 isoforms (Nox4A and Nox4B) and Nox2

p22^{phox} and Nox2 are present in the C-20/A4 chondrocyte cell line. To ascertain if the protein Nox4 was also present in these cells and to investigate functions of both Nox2 and Nox4, we generated a C-20/A4 chondrocyte cell line that provided a stable expression of Nox2 (Genbank No.NM000397), Nox4A (Nox4A-V5/His) (Genbank No.AF254621), or Nox4B (Nox4B-V5/His) (Genbank No. AY288918), in which the splicing of the exon 14 led to the lack of the first NAD(P)H binding site in the protein. Indeed, a previous study has shown that Nox4B was not able to produce ROS, and acted as a dominant-negative molecule for Nox4 (12).

Plasmid expression was checked in the C-20/A4 cell line by RT-PCR and results are shown in Fig. 3A. The data showed a slight mRNA expression of Nox2 and Nox4 in nontransfected C-20/A4 that was markedly increased in Nox2, Nox4A, and Nox4B overexpressing cell lines. PCR Nox4 mRNA expression in these cells was investigated in real time using primers that amplify a region commonly shared by Nox4A and Nox4B (Fig. 3B). This experiment revealed that Nox4 mRNA in C-20/A4 Nox4A-V5/His and C-20/A4 Nox4B-V5/His increased 22-fold and 5-fold, respectively. We confirmed that the amount of Nox4 mRNA remained unchanged in C-20/A4 cells expressing Nox2 or luciferase as a negative control (Fig. 3B).

Protein expression was assessed by FACS analysis in permeabilized cell lines. Nox2 expression is documented by two different types of monoclonal antibodies NL7 and 54.1 (Fig. 4A). The overexpressing cell line seems to have a weak, but significant, expression of Nox2 compared to baseline. Nox4A-V5His and Nox4B-V5His protein expression was checked by FACS analysis with two different antihistidine and anti-Nox4 polyclonal antibodies. The results show an increased expression of Nox4A and Nox4B in the two different cell lines (Fig. 4B). Absorption spectra confirmed the expression of Nox4A in C-20/A4 cell lines. Reduced minus oxidized differential spectra show the presence of a specific band at 426 nm in chondrocytes (Fig. 4B). The concentration of Nox4A increased significantly with overexpression (Fig. 3B).

Superoxide production

Since NAD(P)H oxidases are ROS-generating enzymes, it was of interest to investigate the effects of Nox2 and Nox4 variants on ROS generation. Because of its sensitivity, the chemiluminescence agent, luminol, was used to quantify hydrogen peroxide production in cells (for review, cf. Miller and Griendling, Ref. 29). Oxygen derivatives were quantified in experiments in which PMA and ionomycin stimulated C-20/A4 chondrocytes. Results illustrated in Fig. 5 showed a significant hydrogen peroxide synthesis in Nox4A-V5His transfected cells (14.87 RLU \pm 0.44) compared with the control C-20/A4 (0.17 RLU \pm 0.011) and with cells that express Nox4B (0.17 RLU \pm 0.024). Moreover, no significant difference was observed after PMA and/or ionomycin stimulation, suggesting that neither Nox2 nor calcium is implicated in this H₂O₂ production. This reflects a constitutive generation of ROS mediated by Nox4 in C-20/A4 chondrocytes.

Intracellular levels of superoxide production were investigated in C-20/A4 cells with the DHE dye by fluorescence microscopy (Fig. 6). Nox4A overexpressing cells stimulated by 500 pg/ml hIL-1 β produced significantly more superoxide (71,824 arbitrary units) than stimulated control C-20/A4 cells (7,993). Nox4A overexpressing cells that were not stimulated showed approximately a twofold reduction in fluorescence (35, 54). Moreover, the Nox4-mediated superoxide production was significantly reduced by the ROS scavenger *N*-acetylcysteine (NAC) (Fig. 6). Interestingly, Nox4B overexpressing cells produced less superoxide than control C-20/A4 cells after stimulation with hIL-1 β . Indeed, in this case, the integral gray quantification was not possible as it appeared below the detection threshold of the software. These results confirm the dominant negative effect of Nox4B, as previously described (12, 17, 24).

MMP-1 production by hIL-1 β stimulated C-20/A4 through Nox4

We and others have shown that hIL-1 β increases MMP-1 production and excretion in C-20/A4 cell line (Fig. 1). To determine whether Nox4 or Nox2 have a role in this pathway, we

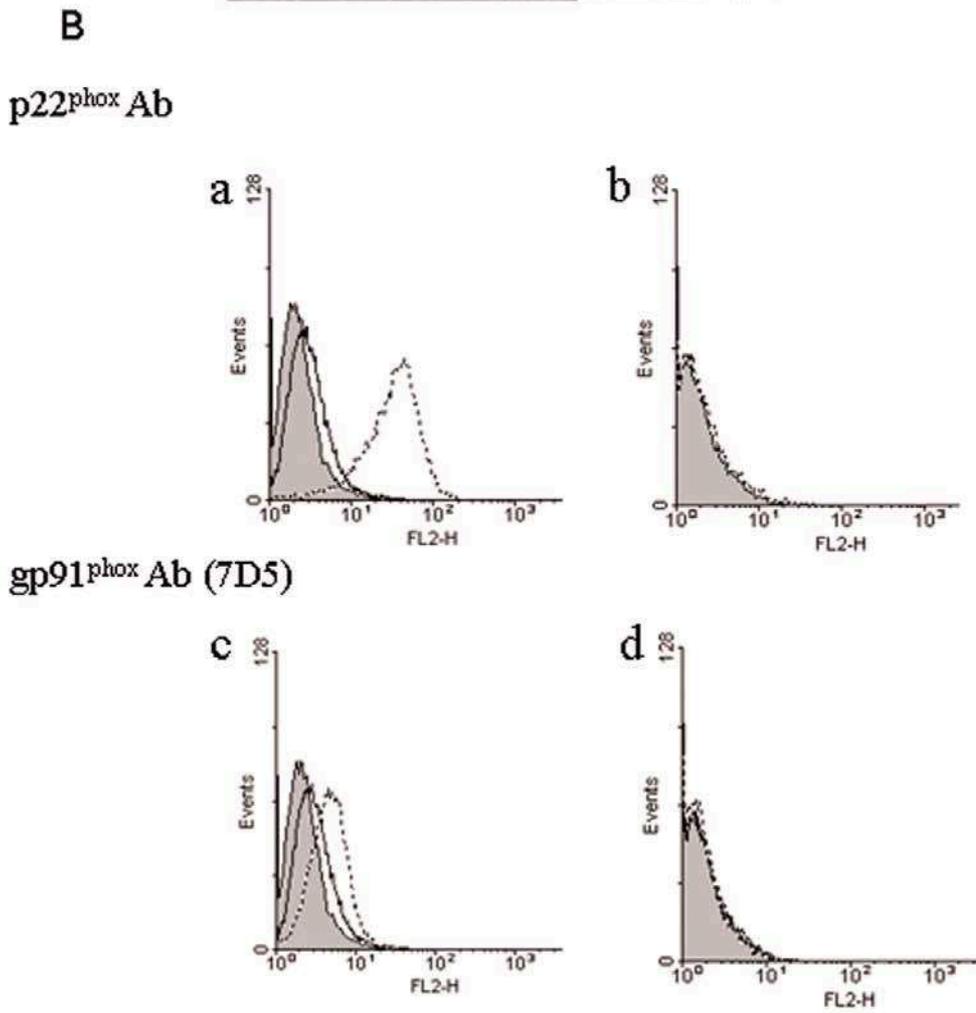
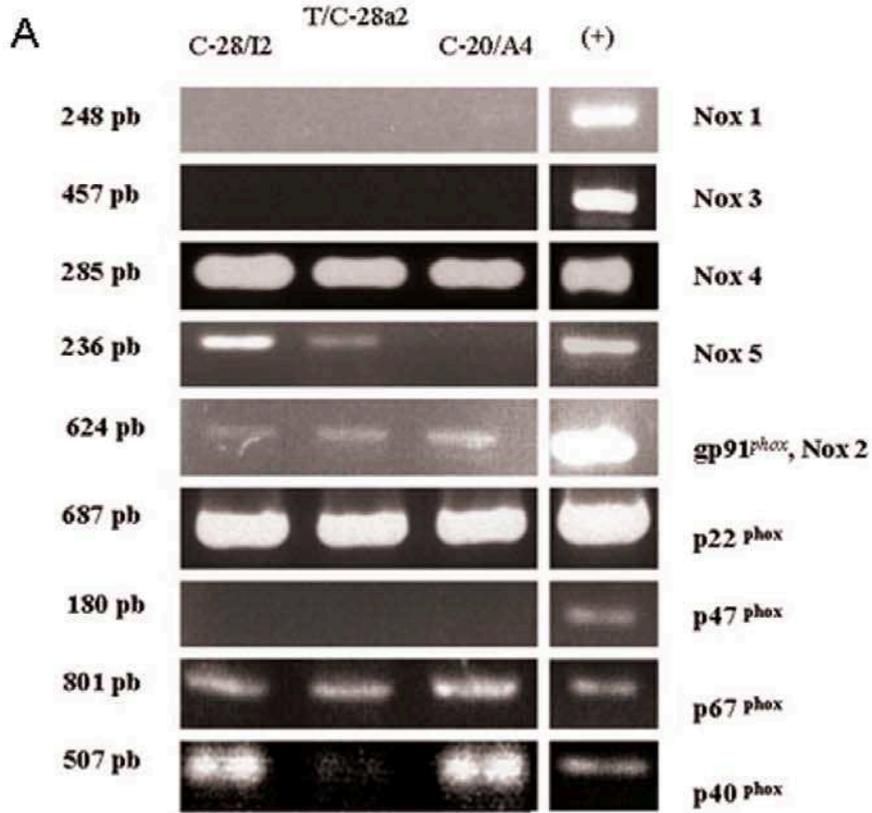
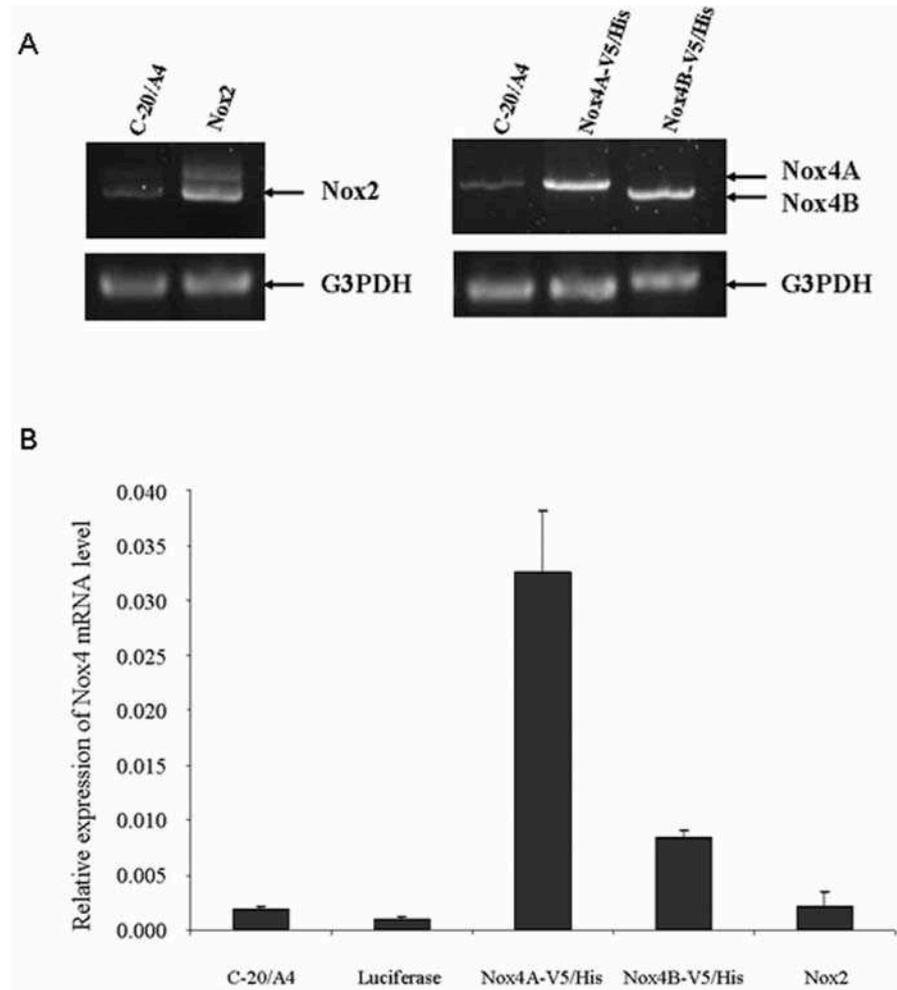


FIG. 3. Efficiency of plasmidic expression in transfected cells.

(A) Total RNA was extracted from nontransfected C-20/A4 chondrocytes or Nox4A-V5/His, Nox4B-V5/His, or Nox2 transfected cells. PCRs for each plasmid were performed as previously described, using the primer sets F4'/R4' for Nox4 (characterizing both Nox4 isoforms), F2/R2 for Nox2, and commercial primers for G3PDH. (B) Nox4 mRNA expression by real-time RT-PCR. Total RNA was extracted from nontransfected C-20/A4 chondrocytes, Nox4A-V5/His, Nox4B-V5/His, luciferase, or Nox2 transfected cells. qRT-PCRs for each sample were performed as previously described, using the primer sets F4'''/R4''' (characterizing both Nox4 isoforms). Bars indicate the relative expression of Nox4 versus G3PDH mRNA levels.



measured MMP-1 secretion under cytokinetic stress in C-20/A4 cells that express both NAD(P)H oxidases. MMP-1 production by chondrocytes expressing Nox4A-V5His was increased by 3.6 (3,296.55 ng/g protein \pm 1,789.11) compared with MMP-1 synthesis by control C-20/A4 cells (913.36 ng/g protein \pm 64.54) (Fig. 7). However, there was no significant rise in MMP-1 secretion by cells expressing Nox2 or the Nox4B-V5His isoform. To demonstrate the specificity of MMP-1 production induced by Nox4, we used a truncated Nox4 Δ FAD/NADPH protein described as a dominant-negative by Mahadev (17, 24). C-20/A4 cells expressing Nox4A-V5/His were transfected by an empty vector pCDNA 3.1 or by a pCDNA 3.1 Nox4 Δ FAD/NADPH and exposed (or not) with hIL-1 β (500 ng/ml) 48 h after transfection. The amount of MMP-1 was assessed in the cultured medium 23 h later. MMP-1 production by

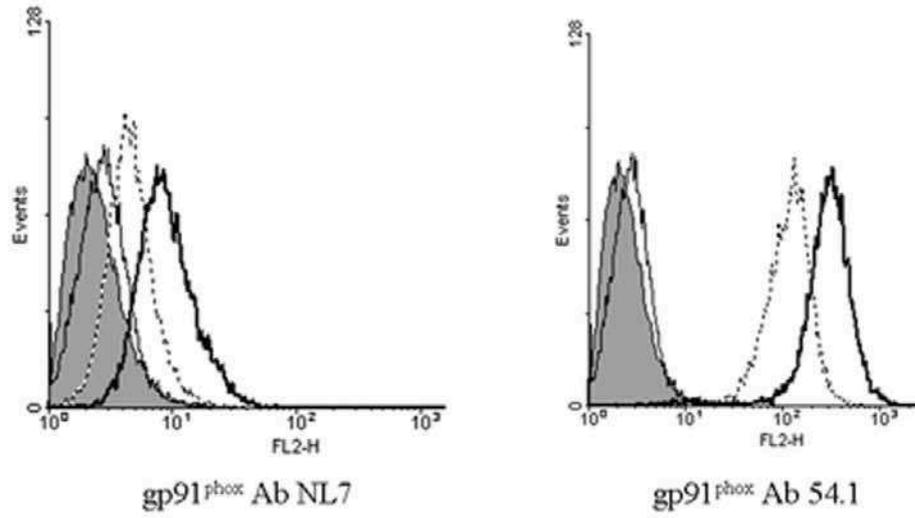
cells transfected by Nox4 dominant-negative (74 μ g/g protein) was reduced by 66% compared to cells that had been transfected by the empty vector (215 μ g/g protein) but not exposed to hIL-1 β . The range of MMP-1 inhibition was the same between cells expressing Nox4 Δ FAD/NADPH (102 μ g/g protein) and cells containing the empty vector (305 μ g/g protein) incubated with hIL-1 β . We verified that the construct gave rise to the functional protein Nox2 in PLB cells (data not shown).

DISCUSSION

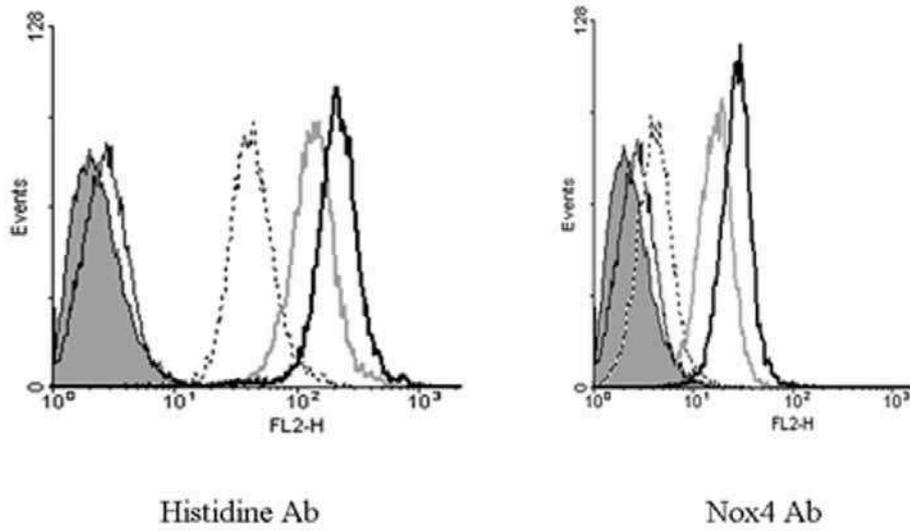
In this study, we have described the presence of Nox4, one of the members of the NAD(P) H oxidase family, in chondrocytes. Moreover, we have demonstrated that Nox4 is directly

FIG. 2. mRNA and protein expression analysis of Nox and partners. (A) mRNA transcription analysis by RT-PCR. RNA was extracted from C-20/A4, T/C-28a2, and C-28/12 chondrocyte cell lines, and reverse transcribed to cDNA as described in the Materials and Methods section. Specific primer sets (*in parentheses*) were used to study the expression of Nox2 (F2/R2) p22^{phox} (F6/R6), p40^{phox} (F9/R9), p47^{phox} (F8/R8), p67^{phox} (F7/R7), Nox1 (F1/R1), Nox3 (F3/R3), Nox4 (F4/R4), and Nox5 (F5/R5). Positive controls (+) assess the efficiency of PCR experiments. They were performed on PLB8985, EBV-8 lymphocytes, or on plasmids that were encoded with Nox3 or Nox5. (B) Protein expression analysis by FACS, 5×10^5 C-20/A4 chondrocytes were fixed with 1% (w/v) paraformaldehyde and labeled with p22^{phox} and gp91^{phox} antibodies either immediately (*b, d*) or after saponin permeabilization (*a, c*), as described in the text. The antibodies used were: nonimmune immunoglobulin (*black solid line*; 5μ g/ 5×10^5 cells), anti-gp91^{phox}7D5, or anti-p22^{phox} 44.1 (*black dotted line*, 5×10^5 cells), and phycoerythrine-conjugated secondary antibodies (dilution 1:200), no AB (*gray area*).

A



B



C

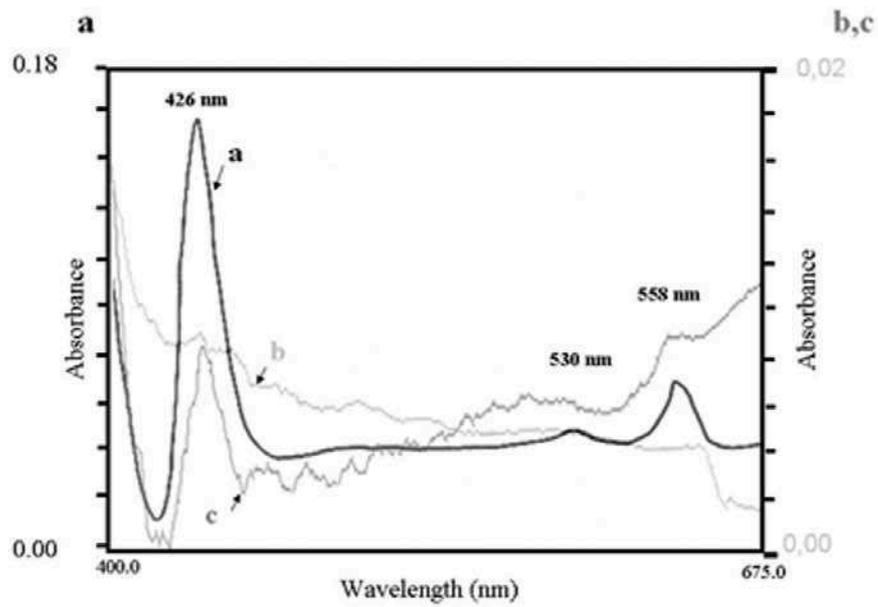
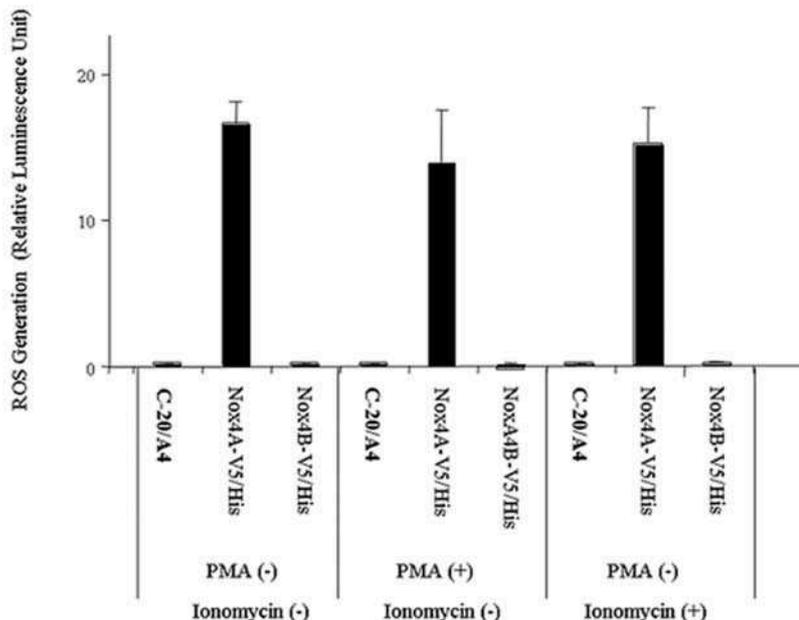


FIG. 5. Measurement of reactive oxygen species generation. ROS production was measured by chemiluminescence method from 5×10^5 intact C-20/A4 cells, Nox4A-V5/His, or Nox4B-V5/His transfected chondrocytes. Cells were stimulated or not with 80 ng/ml PMA and/or 2.5 μ M ionomycin. Results expressed the sum of all RLU measurements for 90 min for each condition. Values represent the mean \pm S.E. of triplicate determinations obtained the same day.



involved in the expression of collagenase MMP-1, through the generation of ROS in response to the cytokinetic stress, hIL-1 β .

Human articular chondrocyte cell lines (C-20/A4, T/C-28a2, or C-28/I2) were developed to obtain reproducible cellular models, and used to study differentiated chondrocyte functions, and in particular, the cartilage-specific modulation induced by hIL-1 β (7, 10, 36). All our experiments were carried out in the C-20/A4 cell line that expresses only Nox2 and Nox4 isoforms.

Oxidative stress was reported to increase the risk of osteoarthritis, but the precise mechanism remains unclear. It has been shown that it may lead to chondrocyte and cartilage senescence (50), and that cartilage degeneration can be mediated by locally produced matrix metalloproteinases (13). Finally, it was found that NAD(P)H oxidase-driven ROS production determines chondrocyte death and aggravates MMP-mediated cartilage destruction during osteoarthritis (46). There is now clear evidence that hIL-1 β initiates inflammation (13, 18, 21), but it is necessary to investigate the specific pathway between the stimulus (hIL-1 β) and the downstream inflammatory gene induction. The active phagocyte NADPH oxidase is a multi-protein complex in which the membrane-integrated protein gp91^{phox} (Nox2) closely associates with p22^{phox}. Its activation requires assembly with p47^{phox}, p67^{phox}, and Rac.

p47^{phox}, which is a regulatory adaptor protein, is not present in the chondrocyte cell line C-20/A4: there is no possibility of oxidase activation, even if Nox2 is slightly expressed, as the complex does not assemble in the absence of p47^{phox} (not shown) (47).

The close association of the Nox2 isoform with p22^{phox} has recently been reported to be necessary for their enzymatic activity (1, 41). Our results demonstrate a significant coexpression of Nox4 and p22^{phox}, suggesting the presence of a functional Nox4 in chondrocytes. In all cell types where Nox4 has been identified, oxidase activity was shown to be constitutive. In this study, we have demonstrated that C-20/A4 chondrocyte oxidase activity of Nox4 was inducible. As expected, there was no significant increase in ROS production in Nox4B-V5/His overexpressing C-20/A4 cells. In fact, the truncated isoform Nox4 B has been reported to act as a dominant negative for Nox4 activity (12).

We have found that hIL-1 β increases ROS production within 20 min after stimulation, which does not support a Nox neosynthesis. This suggests that Nox4 not only functions in a constitutive manner, but can also be activated by hIL-1 β . The fact that the culture medium of hIL-1 β stimulated C-20/A4 chondrocytes and the increase in MMP-1 argues in favor of a direct involvement of ROS as a secondary messenger leading to gene transcription of metalloproteinases. Further investigation into

FIG. 4. Nox2 and Nox4 expression analysis by FACS and cytochrome b spectroscopy. (A) gp91^{phox} FACS analysis. 5×10^5 C-20/A4 WT or C-20/A4 Nox2 chondrocytes were fixed with 1% (w/v) paraformaldehyde and labeled with gp91^{phox} (NL7 or 54.1) antibodies after saponin permeabilization, as described in the text. The following antibodies were used: nonimmune immunoglobulin (black solid line; 5 μ g/ 5×10^5 cells), no Ab (gray area), and phycoerythrine-conjugated secondary antibodies (dilution 1:200). The C-20/A4 WT and C-20/A4 Nox2 were represented, respectively, by black dotted line and black bold solid line. (B) Nox4 FACS analysis. 5×10^5 C-20/A4 WT, C-20/A4 Nox4A-V5/His, or C-20/A4 Nox4B-V5/His chondrocytes were fixed with 1% (w/v) paraformaldehyde and labeled with antihistidine or anti-Nox4 antibodies after saponin permeabilization, as described in the text. The antibodies used were as in (A). The C-20/A4 WT were represented by a black dotted line; C-20/A4 Nox4A-V5/His and C-20/A4 Nox4B-V5/His, respectively, by gray solid line and black bold solid line. (C) The reduced minus oxidized difference spectra of C-20/A4 chondrocyte cell line WT (line b in gray), transfected with Nox4 gene (line c in gray) were performed as described in the text, (positive control: cytochrome b558 purified from human neutrophils, absorbance at 426 nm using an ϵ 426 nm value of 106 $mM^{-1}.cm^{-1}$ or at 558 nm (ϵ 558 nm = 21.3 $mM^{-1}.cm^{-1}$). The absorbance of the cytochrome b558 purified from human neutrophils (line A) was read at the left side of the figure, and the absorbance of the C-20/A4 chondrocyte cell line WT or transfected with Nox4 gene were read at the right side of the figure.

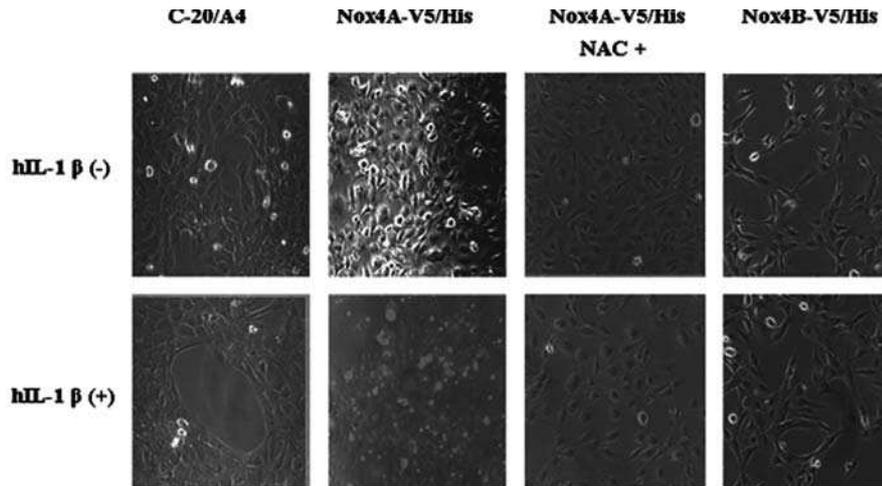


FIG. 6. Measurement of superoxide generation. Nontransfected chondrocytes C-20/A4, Nox4A-V5/His, or Nox4B-V5/His, or Nox2 transfected C-20/A4 were incubated with or without 500 pg/ml hIL-1 β in the complete DMEM medium containing 5 μ M dihydroethidium (DHE) for 20 min in 6-well plates with or without 30 nM final NAC. Fluorometric measurements of the DHE oxidation in cell layers were carried out using a fluorescence microscope. Three replicates per treatment group were run for each experiment.

the specificity and modality of the signal transduction pathway is needed and this research opens a new area for therapeutic exploration.

Furthermore, we know that excessive and continuous cyclic mechanical stress and high magnitude cyclic tensile induce a production of IL-1 β , MMP-1, and other MMPs, causing a quantitative imbalance between catabolic and anabolic pathways, ultimately resulting in cartilage degradation (8, 16).

What, then, is the role of ROS? Mechanical stress may increase a Nox4-mediated ROS production and activate matrix metalloproteinase expression: this question is currently being investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge M. B. Goldring, A.L. Jesaitis, and M. J. Stasia for their generous gift of immortalized chondrocyte cell lines and monoclonal antibodies, and the Nox2 pEF-PGK neoplasmid, respectively. We thank S. Vergnaud, M. Guillot, and S. Papacatzis, for their helpful discussions, and G. Butt for his English revision. This work was supported by grants from the Ministère de l'enseignement supérieur de la recherche et technologie, MENRT, Paris; the Région Rhône-Alpes, programme Emergence; the Délégation Régionale à la Recherche Clinique – CHU Grenoble DRRC-CHU, Grenoble.

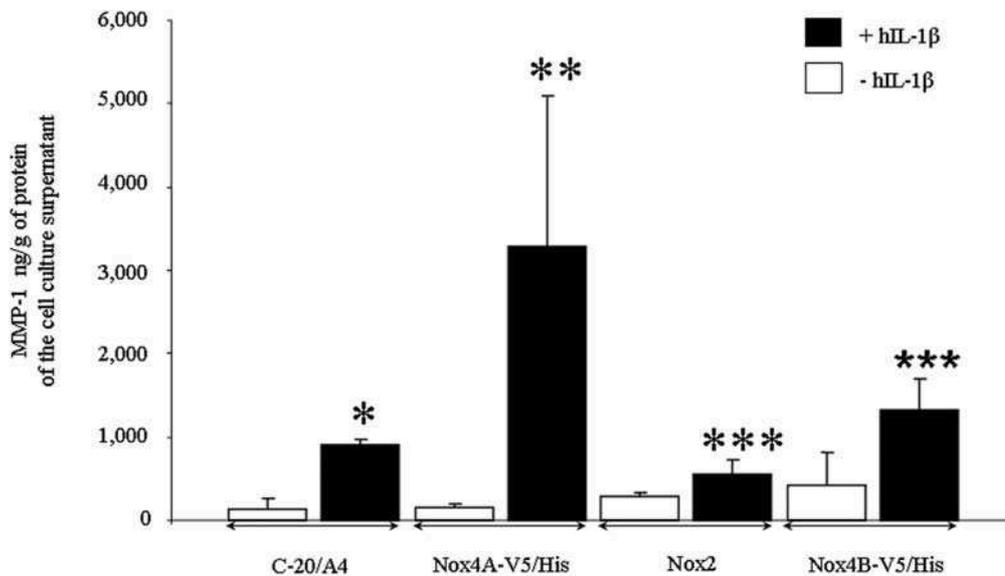


FIG. 7. Modulation of MMP-1 expression by Nox4 in C-20/A4 chondrocytes, Nox4A-V5/His, Nox4B-V5/His, and Nox2 transfected cells. C-20/A4 cells were incubated for 23 h with or without 500 pg/ml hIL-1 β . The culture medium was then recovered for MMP-1 quantification by ELISA. Results are expressed as ng MMP-1/g of supernatant protein (determined by the Bradford technique). In addition, cell viability was checked by measurement of the LDH in the supernatant culture. Values represent the mean \pm S.E. of four determinations. * p < 0.05 versus nonstimulated cells; ** p < 0.05 versus nontransfected hIL-1 β stimulated cells; and *** p < 0.05 versus Nox4A-V5/His transfected hIL-1 β stimulated cells.

ABBREVIATIONS

DHE, dihydroethidium; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EBSS, Earle's balanced salts; FBS, fetal bovine serum; hIL-1 β , human interleukin-1 beta; IgG1, immunoglobulin G1; LDH, lactate dehydrogenase; mAb, monoclonal antibody; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NAC, *N*-acetylcysteine; OA, osteoarthritis; PBS, phosphate buffer saline; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; MMP-1, metalloproteinase 1; ROS, reactive oxygen species; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.

REFERENCES

- Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R, and Brandes RP. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22^{phox} is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem* 279: 45935–45941, 2004.
- Benton HP and Tyler JA. Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 421–428, 1988.
- Bionda C, Li XJ, Bruggen RV, Eppink M, Roos D, Morel F, and Stasia MJ. Functional analysis of two-amino acid substitutions in gp91^{phox} in a patient with X-linked flavocytochrome b558-positive chronic granulomatous disease by means of transgenic PLB-985 cells. *Hum Genet* 115: 418–427, 2004.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254, 1976.
- Burritt JB, DeLeo FR, McDonald CL, Prigge JR, Dinauer MC, Nakamura M, Nauseef WM, and Jesaitis AJ. Phage display epitope mapping of human neutrophil flavocytochrome b558. Identification of two juxtaposed extracellular domains. *J Biol Chem* 276: 2053–2061, 2001.
- Burritt JB, Quinn MT, Jutila MA, Bond CW, and Jesaitis AJ. Topical mapping of neutrophil cytochrome *b* epitopes with phage-display libraries. *J Biol Chem* 270: 16974–16980, 1995.
- Finger F, Schörle C, Soder S, Zien A, Goldring MB, and Aigner T. Phenotypic characterization of human chondrocyte cell line C-20/A4: a comparison between monolayer and alginate suspension culture. *Cells Tissues Organs* 178: 65–77, 2004.
- Fujisawa T, Hattori T, Takahashi K, Kuboki T, Yamashita A, and Takigawa M. Cyclic mechanical stress induces extracellular matrix degradation in cultured chondrocytes via gene expression of matrix metalloproteinases and interleukin-1. *J Biochem (Tokyo)* 125: 966–975, 1999.
- Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, and Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8010–8014, 2000.
- Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, Arbisser JL, and Apperley JF. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* 94: 2307–2316, 1994.
- Gorin Y, Block K, Hernandez J, Bhandari B, Wagner B, Barnes JL, and Abboud HE. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J Biol Chem* 280:39616–39626, 2005.
- Goyal P, Weissmann N, Rose F, Grimminger F, Schafers HJ, Seeger W, and Hanze J. Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 32–39, 2005.
- Gowen M, Wood DD, Ihrle EJ, Meats JE, and Russell RG. Stimulation by human interleukin-1 of cartilage breakdown and production of collagenase and proteoglycanase by human chondrocytes but not by human osteoblasts *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 797: 186–193, 1984.
- Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* 90: 491–493, 2004.
- Hiran TS, Moulton PJ, and Hancock JT. Detection of superoxide and NAD(P)H oxidase in porcine articular chondrocytes. *Free Radic Biol Med* 23: 736–743, 1997.
- Honda K, Ohno S, Tanimoto K, Ijuin C, Tanaka N, Doi T, Kato Y, and Tanne K. The effects of high magnitude cyclic tensile load on cartilage matrix metabolism in cultured chondrocytes. *Eur J Cell Biol* 79: 601–609, 2000.
- Hu T, Ramachandrarao SP, Siva S, Valancius C, Zhu Y, Mahadev K, Toh I, Goldstein BJ, Woolkalis M, and Sharma K. Reactive oxygen species production via NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta-induced cytoskeletal alterations in endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F816–F825, 2005.
- Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, and Werb Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 280: 898–902, 1998.
- Krause KH. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NAD(P)H oxidases. *Jpn J Infect Dis* 57: S28–S29, 2004.
- Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4: 181–189, 2004.
- Le Maitre CL, Freemont AJ, and Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 7: R732–R745, 2005.
- Liacini A, Sylvester J, Li WQ, and Zafarullah M. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol* 21: 251–262, 2002.
- Lo YY, Conquer JA, Grinstein S, and Cruz TF. Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species. *Cell Biochem* 69: 19–29, 1998.
- Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, and Goldstein BJ. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* 24: 1844–1854, 2004.
- Martin G, Bogdanowicz P, Domagala F, Flicheux H, and Pujol JP. Rhein inhibits interleukin-1 beta-induced activation of MEK/ERK pathway and DNA binding of NF-kappa B and AP-1 in chondrocytes cultured in hypoxia: a potential mechanism for its disease-modifying effect in osteoarthritis. *Inflammation* 27: 233–246, 2003.
- Mendes AF, Carvalho AP, Caramona MM, and Lopes MC. Diphenylethylideneiodonium inhibits NF-kappaB activation and iNOS expression induced by IL-1beta: involvement of reactive oxygen species. *Mediators Inflamm* 10: 209–215, 2001.

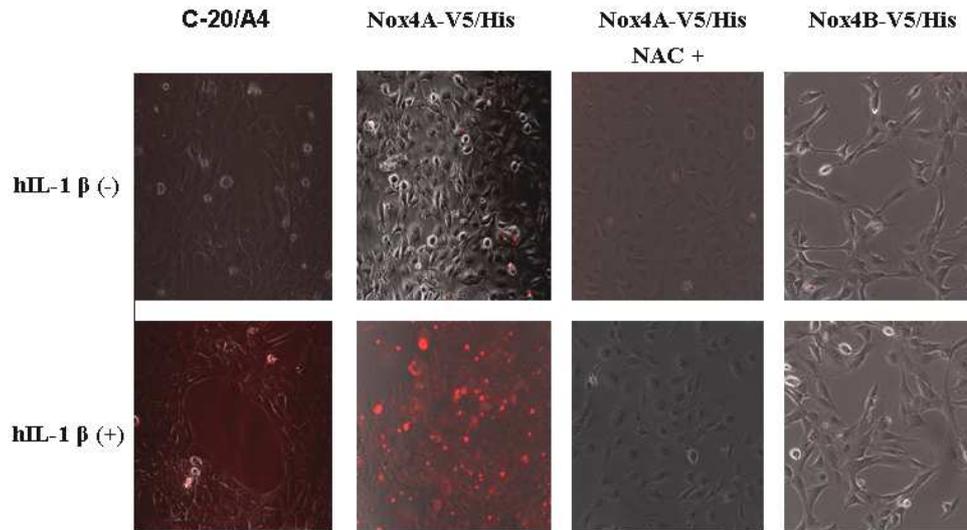
27. Mendes AF, Carvalho AP, Caramona MM, and Lopes MC. Differential roles of hydrogen peroxide and superoxide in mediating IL-1-induced NF-kappa B activation and iNOS expression in bovine articular chondrocytes. *J Cell Biochem* 88: 783–793, 2003.
28. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, and Brinckerhoff CE: Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 43: 801–811, 2000.
29. Miller FJ and Griendling KK. Functional evaluation of non phagocytic NAD(P)H oxidases. *Methods Enzymol* 74: 220–233, 2002.
30. Moulton PJ, Hiran TS, Goldring MB, and Hancock JT. Detection of protein and mRNA of various components of the NADPH oxidase complex in an immortalized human chondrocyte line. *Br J Rheumatol* 36: 522–529, 1997.
31. Moulton PJ, Goldring MB, and Hancock JT. NADPH oxidase of chondrocytes contains an isoform of the gp91phox subunit. *Biochem J* 329: 449–451, 1998.
32. Nakamura M, Murakami M, Koga T, Tanaka Y, and Minakami S. Monoclonal antibody 7D5 raised to cytochrome *b*₅₅₈ of human neutrophils: immunocytochemical detection of the antigen in peripheral phagocytes of normal subjects, patients with chronic granulomatous disease, and their carrier mothers. *Blood* 69: 1404–1408, 1987.
33. Paclet MH, Coleman AW, Vergnaud S, and Morel F. P67-phox-mediated NADPH oxidase assembly: imaging of cytochrome *b*₅₅₈ liposomes by atomic force microscopy. *Biochemistry* 39: 9302–9310, 2000.
34. Paclet MH, Henderson LM, Campion Y, Morel F, and Dagher MC. Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. *Biochem J* 382: 981–986, 2004.
35. Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Eblin C, O'Dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gougerot-Pocidallo MA, Lizard G and Ogier-Denis E. NAD(P)H Oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 24:10703–10717, 2004.
36. Robbins JR, Thomas B, Tan L, Choy B, Arbiser JL, Berenbaum F, and Goldring MB. Immortalized human adult articular chondrocytes maintain cartilage-specific phenotype and responses to interleukin-1 β . *Arthritis Rheum* 43: 2189–2201, 2000.
37. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T (Eds). *Molecular Cloning—A Laboratory Manual (2nd Ed.)* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
38. Stasia MJ, Brion JP, Boutonnat J, and Morel F. Severe clinical forms of cytochrome b-negative chronic granulomatous disease (X91-) in 3 brothers with a point mutation in the promoter region of CYBB. *J Infect Dis* 188: 1593–1604, 2003.
39. Stasia MJ, Lardy B, Maturana A, Rousseau P, Martel C, Bordigoni P, Demareux N, Morel F. Molecular and functional characterization of a new X-linked chronic granulomatous disease variant (X91+) case with a double missense mutation in the cytosolic gp91phox C-terminal tail. *Biochim Biophys Acta* 1586: 316–330, 2002.
40. Suliman HB, Ali M, and Piantadosi CA. Superoxide dismutase-3 promotes full expression of the EPO response to hypoxia. *Blood* 104: 43–50, 2004.
41. Sumimoto H, Miyano K, and Takeya R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun.* 338: 677–686, 2005.
42. Tawara T, Shingu M, Nobunaga M, and Naono T. Effects of recombinant human IL-1 beta on production of prostaglandin E2, leukotriene B4, NAG, and superoxide by human synovial cells and chondrocytes. *Inflammation* 15: 145–157, 1991.
43. Taylor RM, Burritt JB, Baniulis D, Foubert TR, Lord CI, Dinauer MC, Parkos CA, and Jesaitis AJ. Site-specific inhibitors of NADPH oxidase activity and structural probes of flavocytochrome b: characterization of six monoclonal antibodies to the p22^{phox} subunit. *J Immunol* 173: 7349–7357, 2004.
44. Trocme C, Gaudin P, Berthier S, Barro C, Zaoui P, and Morel F. Human B lymphocytes synthesize the 92-kDa gelatinase, matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 273: 20677–20684, 1998.
45. Van de Loo FA, Bennink MB, Arntz OJ, Smeets RL, Lubberts E, Joosten LA, van Lent PL, Coenen-de Roo CJ, Cuzzocrea S, Segal BH, Holland SM, and van den Berg WB. Deficiency of NADPH oxidase components p47phox and gp91phox caused granulomatous synovitis and increased connective tissue destruction in experimental arthritis models. *Am J Pathol* 163: 1525–1537, 2003.
46. Van Lent PL, Nabbe KC, Blom AB, Sloetjes A, Holthuisen AE, Kolls J, Van De Loo FA, Holland SM, and Van Den Berg WB. NADPH-oxidase-driven oxygen radical production determines chondrocyte death and partly regulates metalloproteinase-mediated cartilage matrix degradation during interferon-gamma-stimulated immune complex arthritis. *Arthritis Res Ther* 7: R885–895, 2005.
47. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59: 1428–1459, 2002.
48. Vincenti MP and Brinckerhoff CE. Early response genes induced in chondrocytes stimulated with the inflammatory cytokine interleukin-1beta. *Arthritis Res* 3: 381–388, 2001.
49. Yang S, Zhang Y, Ries W, and Key L. Expression of Nox4 in osteoclasts. *J Cell Biochem* 92: 238–248, 2004.
50. Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, and Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 7: R380–391, 2005.

Address reprint requests to:
 Laurent Grange, M.D., Ph.D. student
 GREPI EA 2938 UJF
 Lab Enzymology/DBPC
 Hospital A. Michallon
 Grenoble 38043 Cedex 09, France

E-mail: LGrange@chu-grenoble.fr

Date of first submission to ARS Central, April 24, 2006; date of acceptance, April 26, 2006.

Fig. 6



ANNEXE 5

ARTICLE 2 : Verchier et al (2007)

Concerted activities of nitric oxide synthases
and NADPH oxidases in PLB-985 cells.

*Biochemical and biophysical research
communications* 361:493-498.



Concerted activities of nitric oxide synthases and NADPH oxidases in PLB-985 cells

Yann Verchier, Bernard Lardy, Minh Vu Chuong Nguyen, Françoise Morel, Stéphane Arbault, Christian Amatore *

Laboratoire PASTEUR, Ecole Normale Supérieure, CNRS UMR 8640, Département de Chimie, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France

Laboratoire GrepI Timc/Imag, CNRS UMR 5525 & IFR 130, Laboratoire D'enzymologie/DBPC, CHU Grenoble, BP 217, 38000 Grenoble, France

Received 10 July 2007

Available online 20 July 2007

Abstract

Oxidative stress is a metabolic situation used by immune cells to provide protection against infection. Under activation by threatening elements, phagocytes produce chemically toxic molecules, namely the reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). This mechanism involves two types of enzymes: NADPH oxidases (NOX) and NO synthases (NOS), which activities are versatile and not fully understood yet. In this regard, we studied in real-time the release of bursts of ROS and RNS by single PLB-985 cells, originating from a myeloid cell line prone to differentiate into neutrophil or monocyte-like phagocytes. A selective electrochemical detection of each ROS or RNS was conducted at platinized carbon fiber microelectrodes positioned at micrometric distances from single cells. Our results show (1) the existence of a NO synthase activity in PLB-985 cells and (2) the ability of NO synthases to provide a NOX activity in cells where NADPH oxidase (NOX2) is knocked out.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: PLB-985; Nitric oxide synthase; NADPH oxidase; Oxidative burst; Electrochemistry; Microelectrode; Nitric oxide; Superoxide; Reactive oxygen species; Reactive nitrogen species

PLB-985 is a myeloid cell line able to mature into granulocyte (neutrophil like) cells or monocyte (macrophage like) cells as function of different inducing agents [1]. Their ability to differentiate in culture into several types of phagocytes offers the opportunity of investigating the role of oxidative stress at different levels of the host defense mechanisms. In response to immunological activations or during phagocytosis, phagocytes are able to produce, through the reduction of oxygen, chemically toxic molecules: the reactive oxygen species (ROS) and the reactive nitrogen species (RNS) [2,3]. Though this phenomenon plays a key role in the host defense, uncontrolled produc-

tion of such reactive species may also induce inflammatory or carcinogenic processes [3–6] among many other diseases.

It has been shown that the ROS and RNS productions by phagocytes stem from the activation of NADPH oxidase (NOX) and/or nitric oxide synthase (NOS) enzymes (Fig. 1A). The first type is devoted to the transformation of oxygen into superoxide ion, $O_2^{\cdot-}$ [6–8], which rapidly disproportionates, spontaneously or via SOD-catalysis, into hydrogen peroxide H_2O_2 (and oxygen). NO synthases (comprising a constitutive form and an inducible form in phagocytes) produce nitric oxide NO^{\cdot} [9–11]. When they are produced concomitantly within the same cellular environment, $O_2^{\cdot-}$ and NO^{\cdot} react extremely fast to form peroxynitrite anion $ONOO^-$, a potent deleterious reagent towards tyrosine residues. The spontaneous decomposition of peroxynitrite generates stable nitrite and nitrate ions. Moreover, it has been established *in vitro* that under specific circumstances NO synthases may also produce

* Corresponding author. Address: Laboratoire PASTEUR, Ecole Normale Supérieure, CNRS UMR 8640, Département de Chimie, 24 rue Lhomond, 75231 Paris cedex 05, France. Fax: +33 1 4432 3863.

E-mail address: Christian.Amatore@ens.fr (C. Amatore).

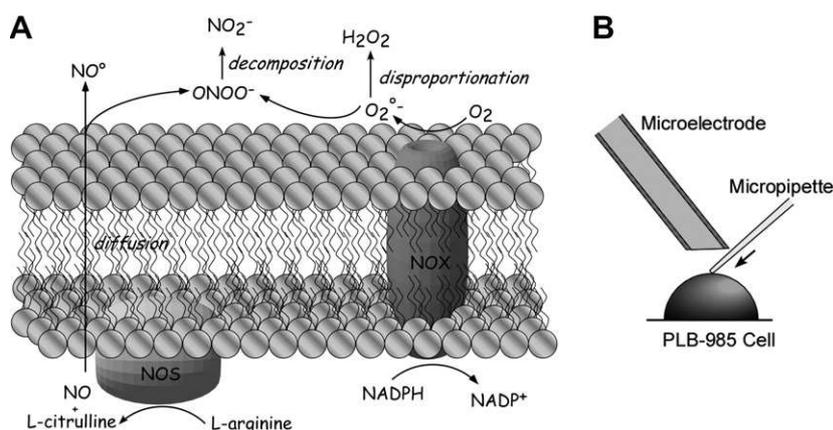


Fig. 1. (A) Sketch of NOX and NOS enzymes in the cell membrane and their cross activity in producing main ROS and RNS. (B) Principle of detection by a microelectrode of the oxidative bursts released by a living isolated cell. The micropipette is used to trigger physically the cell response.

superoxide anion at either their reductase or oxidase domain [12,13]. One may then question the effective origin of peroxynitrite *in vivo* [14,15].

Studies on the activity of each enzyme type (NOX or NOS) are generally performed without considering the activity of the other enzyme and possible mechanistic relationships between them. In the present work, we wish to report about the relative importance and the relations between constitutive NOX and NOS in oxidative stress responses of PLB-985 cells. This is based on a series of investigations performed at the single cell level using a quantitative characterization of oxidative bursts with platinized carbon fiber microelectrodes [16,17].

The oxidative electrochemical characterization of major ROS and RNS, i.e., H₂O₂, ONOO⁻, NO[•], and NO₂⁻, is performed at the surface of a platinized carbon fiber microelectrode (10 μm diameter) positioned at micrometric distance from the membrane of a single cell. Following the cell stimulation by a local stress and depolarization of its membrane with a glass microcapillary (Fig. 1B), the fast production of ROS and RNS is detected as a spike of current, which directly reports on the dynamic and amplitude of the phenomenon. Moreover, poisoning the electrode at specific potentials (850 mV, 650 mV, 450 mV or 300 mV/SSCE) makes possible the characterization and quantification of the produced species. Henceforth, this methodology directly informs on the superoxide vs. nitric oxide initial production by a single cell after its activation.

Investigations were achieved based on the comparison of responses from “wild type” PLB-985 cells (WT) and “knockout” PLB-985 cells (KO). In these latter transgenic cells, the gene encoding for the β sub-unit of cytochrome b₅₅₈ of NOX2 was invalidated [18]. Knockout cells were used to evidence the role played by each type of enzymatic system (NOS, NOX) in the oxidative response. Indeed, one expects a production of both ROS and RNS by WT cells whereas KO cells should produce only NO and its decay products, unless NOS yield simultaneously comparable fluxes of NO and O₂^{•-}.

The present results evidence the existence of a strong NO synthase activity in WT PLB-985 cells. More surprisingly, the analysis of oxidative responses detected on KO PLB-985 cells demonstrates a significant contribution of ROS, which suggests that under certain circumstances, NOS may acquire an activity of superoxide production. To the best of our knowledge, this has never been reported before on living cells. This hypothesis has been validated through the use of two selective NOS inhibitors (L-NAME and 1400 W for constitutive and inducible NOS, respectively) on the response of KO PLB-985 cells. It confirmed the NOX behavior of NO synthases in the KO PLB-985 cells and enlightened the tight relationship which links the activity of both enzymes, NOX and NOS.

Experimental section

Microelectrodes fabrication. Procedure for carbon fiber microelectrode fabrication has been described elsewhere [16]. In order to increase the microelectrode sensitivity and selectivity vs. the reactive oxygen and nitrogen species released by the cells [17], the polished carbon surface was platinized by reducing (−60 mV vs. SSCE) hydrogen hexachloroplatinate (Sigma, USA) in the presence of lead acetate (Sigma) in PBS.

Cells culture and treatments. PLB-985 cell lines (WT and KO) were cultured at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere in RPMI 1640 medium containing glutamax (Invitrogen, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (Invitrogen) and with 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma). For the experiments, PLB-985 cells were suspended in 35 mm Petri dishes (Nunc, USA) and treated by PMA (1-phorbol-12-myristate-13-acetate, Sigma) for priming [1]. Cells were incubated during 40–60 min with 50 nM PMA (8 mM stock solution was prepared in ethanol and then diluted in culture medium), favoring their adhesion to plastic dish surfaces. Then, Petri dishes were washed and refilled with culture medium. Single-cell measurements were performed at least 15 h after priming. The effects of NO synthases inhibitors were investigated on cells incubated either during 3 h with a 10 mM solution of L-NAME (Cayman, USA) in culture medium supplemented with 50 mM HEPES buffer [19] or for 18 h with a 400 nM solution of 1400 W (Cayman) prepared in culture medium [20].

Single-cell measurements. Amperometric measurements were performed at controlled room temperature (22 ± 1 °C) on the stage of an inverted microscope (Axiovert 135, Zeiss, Germany) in a Faraday cage. Petri dishes containing adherent PLB-985 cells were washed three times and filled with PBS immediately prior to measurements. The platinized

carbon microelectrode tip was precisely positioned with a micromanipulator (MHW-103, Narishige, Japan) at 5 μm above the surface of an isolated cell. The tip of a sealed glass microcapillary (1 μm diameter, obtained by pulling a glass rod; GR100-10, Clark Electromedical Instruments, UK) was then positioned with a second micromanipulator between the microelectrode surface and the cell. The microcapillary was used to apply a local stress on the cell membrane and induce its depolarization [17]. Released electroactive compounds were detected and quantified by amperometry (PRG-DEL potentiostat, Radiometer-Taccussel, Denmark) at a fixed potential vs. a SSCE reference electrode. Current transients were monitored (D/A converter powerlab 4SP and Chart 5.0 software, ADInstruments, USA) and stored on a computer.

Results and discussion

Oxidative stress responses detected on WT and KO PLB-985 cells

By affording a direct, selective and real-time detection of important reactive oxygen or reactive nitrogen species (i.e., $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , ONOO^- , NO^{\cdot} , and NO_2^-), electrochemical methods offer a high advantage for studies of oxidative or nitrosative stress processes [21]. Though a series of works on a large variety of cells including immune cells (viz., lymphocytes, monocytes or macrophages) [17,22], we established that bursts of superoxide and nitric oxide derivatives could be analyzed kinetically and quantitatively at the level of a single cell by amperometry at platinized carbon fiber ultramicroelectrodes (scheme in Fig. 1B).

In the present work, oxidative bursts released by single PLB-985 cells were monitored by amperometry to characterize quantitatively, kinetically, and discriminate the nature of the different species released. Isolated PLB-985 cells were stimulated by local depolarization of their membrane with a microcapillary. This process has been shown to elicit within less than a second the active responses of constitutive NADPH oxidases and NO synthases of the cell membrane [17]. Amperometric measurements at four different potentials allowed assessing the chemical nature of the bursts released by WT PLB-985 or KO PLB-985 cells. At the surface of platinized carbon fiber microelectrodes, hydrogen peroxide (H_2O_2) and peroxynitrite (ONOO^-) are simultaneously oxidized at a potential value of 300 and 450 mV/SSCE, whereas nitric oxide (NO^{\cdot}) is oxidized at 650 mV/SSCE and nitrite ion (NO_2^-) is oxidized at 850 mV/SSCE. Determination of the amounts of released H_2O_2 and ONOO^- is obtained by comparing the currents observed at 300 mV and 450 mV/SSCE since each species contributes in different proportions at each of these potentials [17].

Because of cellular variability, each result presented here at any given potential represents the average of 30–40 individual experiments performed at different cells. Upon comparing the responses detected at these four distinct potentials (Fig. 2A and B), one notices immediately that the detected currents are larger in the case of WT cells than for knockout cells. The maximum current detected at 850 mV (i.e., featuring the oxidation of all the electroactive

compounds released) on WT PLB-985 is about 1.5 times larger than that measured on KO PLB-985. This is in total agreement with the fact that knocked out PLB cells are lacking of NOX2 enzymes, responsible for the normal production of superoxide in PLB cells [23]. Deactivation of NADPH oxidase enzymes suppresses this source for ROS production and should consequently eliminate the formation of peroxynitrite and nitrite ions, since these result ultimately from the reaction of $\text{O}_2^{\cdot-}$ with NO^{\cdot} (Fig. 1A). However, a precise understanding of the oxidative stress responses of WT and KO PLB-985 cells and of their differences requires determining the flux of each electroactive compound released. This was achieved based on measurements at specific potential values.

Detection of individual fluxes of ROS and RNS

Fluxes of NO^{\cdot} and NO_2^- produced during the time of the oxidative response may be precisely determined by comparing the current values at 450, 650 and 850 mV/SSCE. The electrochemical signal amplitude related to nitrite ion is obtained by subtracting the amperometric response recorded at 850 mV (where all species are oxidized) from the one detected at 650 mV (where NO_2^- is not oxidized). The current due to nitric oxide is obtained by subtracting the amperometric signal recorded at 650 mV from the one at 450 mV (where NO^{\cdot} is not oxidizable). Owing to Faraday's law which takes into account the number of electrons exchanged per molecule of compound during its oxidation, this affords each species flux:

$$\varphi(\text{NO}_2^-) = \frac{I(\text{NO}_2^-)}{2 \times F} = \frac{I^{850 \text{ mV}} - I^{650 \text{ mV}}}{2 \times F} \quad (1)$$

$$\varphi(\text{NO}^{\cdot}) = \frac{I(\text{NO}^{\cdot})}{1 \times F} = \frac{I^{650 \text{ mV}} - I^{450 \text{ mV}}}{1 \times F} \quad (2)$$

This reasoning cannot be applied directly to peroxynitrite and hydrogen peroxide since their oxidation waves are not well separated. Their fluxes may be reconstructed though linear combinations of the currents monitored at 300 and 450 mV/SSCE [17]. Then, the fraction of each species in the current detected on cells at 450 mV and consequently its flux, is calculated as following:

$$\varphi(\text{H}_2\text{O}_2) = \frac{I(\text{H}_2\text{O}_2)}{2 \times F} = \frac{I^{450 \text{ mV}}}{2 \times F} \alpha \quad (3)$$

$$\varphi(\text{ONOO}^-) = \frac{I(\text{ONOO}^-)}{1 \times F} = \frac{I^{450 \text{ mV}}}{1 \times F} \beta \quad (3')$$

where α and β equal, 0.01 and 0.99 for WT PLB, and 0.88 and 0.12 for KO PLB cells. Fig. 2C and D report the ensuing mean fluxes for each electroactive species detected on WT PLB and KO PLB cells, respectively. One notices immediately that for both cell type, the main species released is NO^{\cdot} and that its maximum flux in WT cells is 1.5 times larger than in KO cells. Surprisingly, the H_2O_2 production is undetectable at wild type cells whereas a quite important amount of this species is detected at

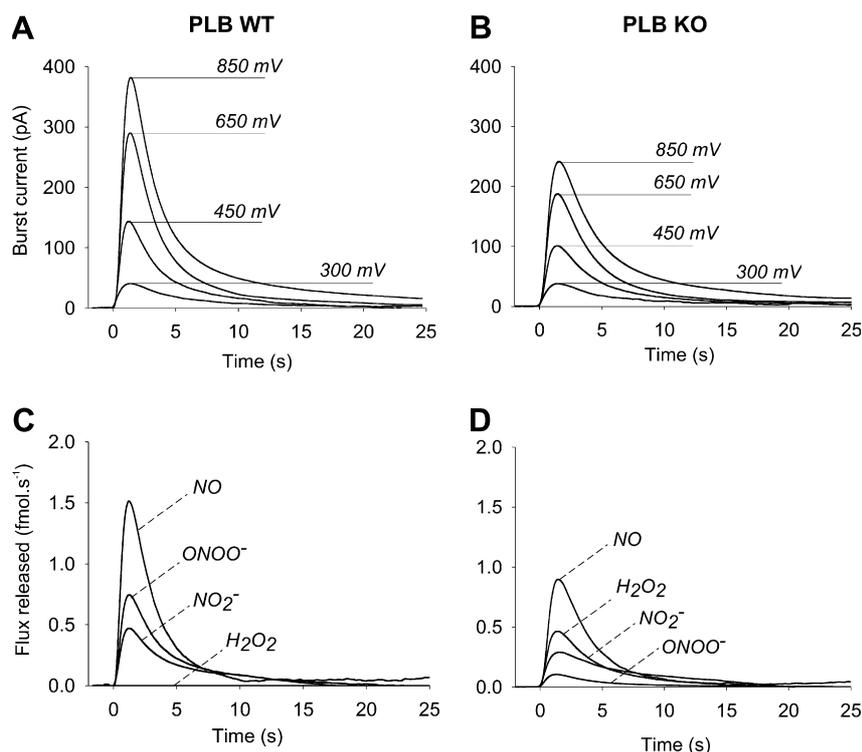


Fig. 2. Amperometric responses detected at 850, 650, 450 and 300 mV vs. SSCE during oxidative bursts of (A) WT PLB-985 and (B) KO PLB-985 cells. Characterization from the amperometric measurements of the individual fluxes of the ROS and RNS released by (C) WT and (D) KO PLB-985 cells. Each curve is the average of 30–40 measurements performed on different cells.

knockout cells. H_2O_2 formation results normally from the production of superoxide by NADPH oxidases. Results in Fig. 2D demonstrate, however, that the production of $O_2^{\cdot-}$ is still efficient in KO PLB cells despite they are deprived of active NOX2 enzymes. The negligible flux of hydrogen peroxide detected on PLB WT cells evidences that the entire production of $O_2^{\cdot-}$ is exclusively used to form peroxynitrite and nitrite (the decomposition product of $ONOO^-$) ions detected in significant amounts (Fig. 2C).

The surprising origin of the superoxide production in KO PLB cells was revealed by quantifying the amount of NO^{\cdot} and $O_2^{\cdot-}$ primary species produced during an oxidative burst. As depicted in Fig. 1, several paths must be considered involving each primary species: $O_2^{\cdot-}$ may (1) follow a spontaneous or SOD-catalyzed disproportionation to form hydrogen peroxide, or it may (2) undergo a reaction with NO^{\cdot} leading to the formation of peroxynitrite. Finally, peroxynitrite may be degraded into nitrite. The primary flux of $O_2^{\cdot-}$ sustaining an oxidative stress response is thus reconstructed from the different fluxes of its outcome species, according to the equation:

$$\Phi_{(O_2^{\cdot-})} = 2\varphi_{(H_2O_2)} + \varphi_{(ONOO^-)} + \varphi_{(NO_2^-)} \quad (4)$$

Conversely, NO^{\cdot} may evolve into peroxynitrite (and its decay products) before being detected. Therefore, the primary flux of NO is given by:

$$\Phi_{(NO)} = \varphi_{(NO)} + \varphi_{(ONOO^-)} + \varphi_{(NO_2^-)} \quad (5)$$

Both reconstructed primary fluxes of NO^{\cdot} and $O_2^{\cdot-}$ are represented in Fig. 3. WT PLB-985 cells produce twice more nitric oxide than superoxide ion as measured by the total amounts obtained by integrating each curve in Fig. 3A: 14 fmol of NO^{\cdot} vs. 7 fmol of $O_2^{\cdot-}$. This evidences the existence of a strong constitutive NO synthase activity in the PLB-985 cell line.

For KO PLB-985 cells (Fig. 3B), the primary fluxes of nitric oxide and superoxide result very close (7 and 8 fmol, respectively). This establish that there is an intense production of $O_2^{\cdot-}$ by these transgenic cells, though they contain an inactivate form of NOX2. This surprising result may be explained by two hypotheses. One amounts to consider that different NOX types are present in the PLB-985 cell line. In this case, whenever NOX2 enzymes alone are deactivated, other types of NOX enzymes may still be able to produce ROS. This may be ruled out since NOX2 is the major NOX enzyme of phagocytes and no other NOX has been reported in PLB-985 cells. A more pertinent rationalization amounts to consider that all NOX enzymes are effectively inactivated but that NO synthases are able to produce superoxide in KO PLB-985 cells, simultaneously to their normal production of NO. This explanation is theoretically valid since the ability of NOS to produce superoxide under specific metabolic conditions has been demonstrated *in vitro* [12,24]. If this applies also to cells in culture, one may suggest that NOX and NOS are performing in tight relation so that NOS enzymes switch

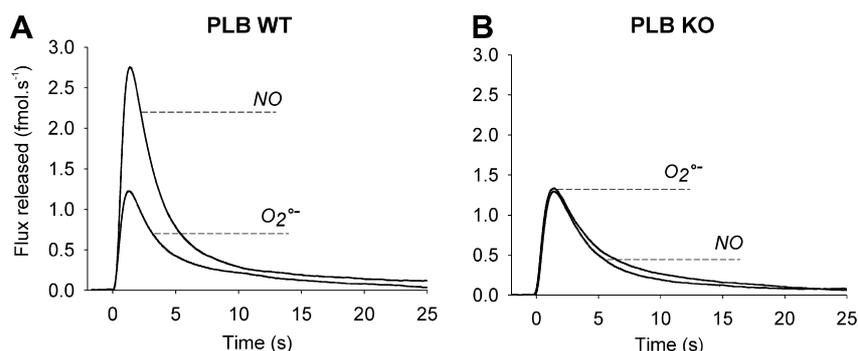


Fig. 3. Primary fluxes of the father species NO^{\bullet} and $\text{O}_2^{\bullet-}$ produced by (A) WT PLB-985 and (B) KO PLB-985 cells during oxidative bursts. They were calculated by applying Eqs. (4) and (5) to individual fluxes in Fig. 2.

between their basic NOS activity to a dual NOS and “NOX-like” activity depending on the cell requirement.

In order to confirm this assumption, let us focus on the global fluxes represented in Fig. 3. It can be noticed that the global amount of $\text{O}_2^{\bullet-}$ produced (8 fmol) in KO PLB cells is roughly equal to the amount produced by WT PLB cells (7 fmol). Moreover, in the WT cells, the production of nitric oxide is twice larger (14 fmol) than that of superoxide (7 fmol). These specific values corroborate our above hypotheses. Indeed, the half-decrease of the amount of NO detected on KO cells vs. WT ones suggests that about half of the NOS enzymes activity is derived to provide a NOX behavior. This may rest on induced specialization or temporal switching of activities.

To confirm this hypothesis, we tested the effect of specific inhibitors of NO synthases on the oxidative stress responses of KO PLB cells. Indeed, considering that in these cells the whole production of ROS and RNS arises from NO synthases dual activities, specific inhibitors of NOS might decrease strongly the cell oxidative stress responses.

Inhibition of constitutive NO synthases by L-NAME

L-NAME is a common and selective inhibitor of constitutive NO synthases [19]. KO PLB cells were incubated for 3 h with L-NAME 10 mM prior to measurements. Amper-

ometric responses were recorded at a potential of 450 mV to quantify specifically the cell production of ROS. Results in Fig. 4A demonstrate that the mean KO PLB-985 response strongly decreases after L-NAME incubation, showing that the production of H_2O_2 and ONOO^- (both deriving from $\text{O}_2^{\bullet-}$) is almost abolished. This result strengthens our above consideration that NO synthases (constitutive types) may assume an activity of superoxide production in phagocytes lacking NOX2, in parallel with their normal activity.

Inhibition of inducible NO synthases by 1400W

A second series of experiments was designed to test the possible implication of inducible NO synthases (iNOS) in the oxidative responses of KO PLB Cells. In monocyte or macrophage cell lines, inducible NOS are usually expressed and activated in response to immunological factors. In the present work, PLB-985 cells were pre-treated with PMA 50 nM to induce their maturation into monocytes. One may accept that this chemical treatment provokes also the activation of inducible NO synthase enzymes. If so, these inducible enzymes may be partially responsible for $\text{O}_2^{\bullet-}$ production in KO PLB-985 cells. Consequently, KO PLB cells were analyzed (at 450 mV/SSCE) after their incubation with 1400W, a selective inhibitor of iNOS [20]. The absence of effect (see Fig. 4B) rules out unambiguously the

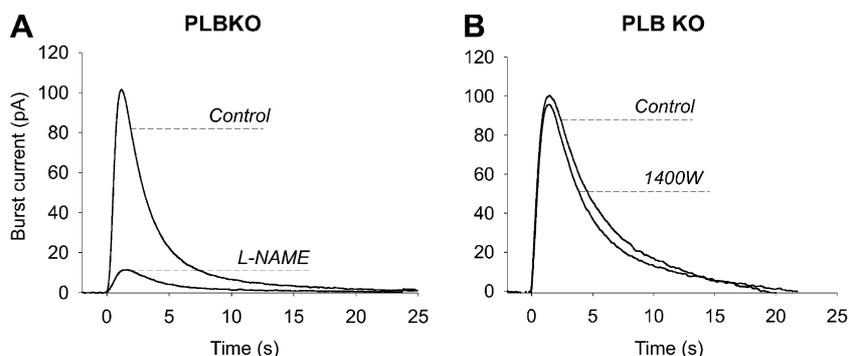


Fig. 4. Effect of NOS inhibitors, (A) L-NAME and (B) 1400W, on the oxidative stress responses detected at 450 mV/SSCE on KO PLB-985 cells. Each curve is the average of 30–35 measurements on different cells.

hypothesis that inducible NOS are involved in the $O_2^{\cdot-}$ production observed in KO PLB-985 cells.

Conclusion

In this work, the ability of PLB-985 cells to produce superoxide and nitric oxide derivatives was investigated. Oxidative bursts released by single cells were triggered by the mean of a physical depolarization of the cell membrane and electrochemically detected and quantified using a platinumized carbon fiber microelectrode placed near the cell membranes.

Analysis of responses from “wild type” PLB-985 and “knockout” PLB-985 cells, a mutant presenting a lack of NOX2, demonstrated that (1) a strong NO synthase activity is always present in both PLB-985 cell lines and that (2) KO PLB-985 cells still afford high yields of $O_2^{\cdot-}$. This observation has been rationalized upon considering that NOS enzymes may acquire a significant pseudo-NOX activity. To our knowledge, such property is reported for the first time on living cells.

Acknowledgments

Authors thank the Dinauer laboratory for kindly providing gp91phox deficient PLB-985 cells. This work was supported by CNRS (UMR 8640), Ecole Normale Supérieure, Université Pierre et Marie Curie, the French Ministry of Research, Rhône-Alpes Region (programs MIRA 2001 and Emergence 2003) and the delegation regionale de la recherche clinique from Grenoble Hospital.

References

- [1] K.A. Tucker, M.B. Lilly, L. Heck, T.A. Rado, Characterization of a new human-diploid myeloid-leukemia cell-line (Plb-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity, *Blood* 70 (1987) 372–378.
- [2] C. Nathan, M.U. Shiloh, Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000) 8841–8848.
- [3] L. Fialkow, Y.C. Wang, G.P. Downey, Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function, *Free Radical Biology and Medicine* 42 (2007) 153.
- [4] D. Fukumura, S. Kashiwagi, R.K. Jain, The role of nitric oxide in tumour progression, *Nature Reviews Cancer* 6 (2006) 521.
- [5] P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet, Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiological Reviews* 87 (2007) 315.
- [6] K. Bedard, K.H. Krause, The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiological Reviews* 87 (2007) 245.
- [7] A.W. Segal, A. Abo, The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes, *Trends in Biochemical Sciences* 18 (1993) 43–47.
- [8] T.L. Leto, M. Geiszt, Role of Nox family NADPH oxidases in host defense, *Antioxidants & Redox Signaling* 8 (2006) 1549–1561.
- [9] H.M. Abusoud, P.L. Feldman, P. Clark, D.J. Stuehr, Electron-transfer in the nitric-oxide synthases—characterization of L-arginine analogs that block heme iron reduction, *The Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) 32318–32326.
- [10] T. Michel, O. Feron, Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *Journal of Clinical Investigation* 100 (1997) 2146–2152.
- [11] D.J. Stuehr, J. Santolini, Z.Q. Wang, C.C. Wei, S. Adak, Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases, *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 36167.
- [12] J. Vasquez-Vivar, B. Kalyanaraman, P. Martasek, N. Hogg, B.S. Masters, H. Karoui, P. Tordo, K.A. Pritchard Jr., Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998) 9220–9225.
- [13] S. Pou, L. Keaton, W. Surichamorn, G.M. Rosen, Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase, *The Journal of Biological Chemistry* 274 (1999) 9573.
- [14] Y. Xia, V.L. Dawson, T.M. Dawson, S.H. Snyder, J.L. Zweier, Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996) 6770.
- [15] Y. Xia, J.L. Zweier, Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997) 6954.
- [16] S. Arbault, P. Pantano, J.A. Jankowski, M. Vuillaume, C. Amatore, Monitoring an oxidative stress mechanism at a single human fibroblast, *Analytical Chemistry* 67 (1995) 3382–3390.
- [17] C. Amatore, S. Arbault, C. Bouton, K. Coffi, J.C. Drapier, H. Ghandour, Y.H. Tong, Monitoring in real time with a microelectrode the release of reactive oxygen and nitrogen species by a single macrophage stimulated by its membrane mechanical depolarization, *ChemBiochem* 7 (2006) 653–661.
- [18] T.E. DeCoursey, V.V. Cherny, D. Morgan, B.Z. Katz, M.C. Dinauer, The gp91phox component of NADPH oxidase is not the voltage-gated proton channel in phagocytes, but it helps, *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 36063–36066.
- [19] G.A. Joly, M. Ayres, F. Chelly, R.G. Kilbourn, Effects of NG-methyl-L-arginine, NG-nitro-L-arginine, and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199 (1994) 147–154.
- [20] E.P. Garvey, J.A. Oplinger, E.S. Furfine, R.J. Kiff, F. Laszlo, B.J. Whittle, R.G. Knowles, 1400 W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo, *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 4959–4963.
- [21] C. Amatore, S. Arbault, Oxidative stress at the single cell level, in: A. Sydney, A.L. Miguel, M.D. Nicoletis (Eds.), *Electrochemical Methods for Neuroscience*, CRC Press, 2007, pp. 261–283.
- [22] A. Lachgar, N. Sojic, S. Arbault, D. Bruce, A. Sarasin, C. Amatore, B. Bizzini, D. Zagury, M. Vuillaume, Amplification of the inflammatory cellular redox state by human immunodeficiency virus type 1-immunosuppressive tat and gp160 proteins, *Journal of Virology* 73 (1999) 1447–1452.
- [23] P.V. Vignais, The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism, *Cellular and Molecular Life Sciences* 59 (2002) 1428–1459.
- [24] W. Wang, S. Wang, L. Yan, P. Madara, A. Del Pilar Cintron, R.A. Wesley, R.L. Danner, Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase, *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 16899–16903.

RÉSUMÉ

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) sont ubiquitaires et sont considérés comme des messagers intracellulaires. A l'origine de leur production, on trouve les NADPH oxydases (Nox) principalement dédiées à cette fonction. Nox4 est l'un des représentants de cette famille qui comprend 7 membres dont la NADPH oxydase des phagocytes. Le dysfonctionnement de Nox4 est relié à de nombreuses pathologies incluant certains cancers (du pancréas, du rein et de la peau), l'athérosclérose, l'hypertension pulmonaire ou encore l'arthrose. Cette enzyme catalyse une activité constitutive qui à l'inverse des autres Nox ne semble pas être stimuable. Le processus de transfert d'électrons aboutissant à la formation d'ions superoxyde, dénommé activité NADPH oxydase, peut être fragmenté et l'initiation de ce transfert dans la partie C terminale cytosolique est appelée activité diaphorase. La régulation de l'activité NADPH oxydase de Nox4 est encore peu connue. L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité NADPH oxydase et diaphorase de Nox4 et plus précisément de caractériser un mécanisme de stimulation ou d'inhibition de ces activités.

Le clonage du gène de Nox4 a mis en évidence deux isoformes protéiques (Nox4A, forme entière et Nox4B, forme délétée d'un domaine de fixation du NADPH). La mise en place de deux modèles d'études (cellulaire avec la surexpression des protéines Nox4 dans les cellules HEK293E et acellulaire avec la production de protéines recombinantes Nox4 tronquées par un système de traduction *in vitro*, RTS®) a permis d'obtenir les résultats suivants:

Premièrement, l'activité NADPH oxydase de Nox4A surexprimée dans les cellules HEK293E est constitutive et la partie C terminale cytosolique en milieu acellulaire possède une activité diaphorase (réduction de l'INT et du cytochrome c). Par contre, Nox4B est inactive car sa portion cytosolique est incapable d'initier le processus de transfert d'électrons. Ces deux isoformes surexprimés augmentent la quantité protéique de p22phox suggérant une stabilisation mutuelle des protéines Nox4 avec leur partenaire p22phox.

Deuxièmement, l'activité NADPH oxydase de Nox4 est régulée par des composés quinoniques. Une série de composés quinones faiblement substitués (benzoquinone, hydroquinone, tMetBQ) inhibe l'activité NADPH oxydase de Nox4 alors qu'une autre série (tBuBQ, tBuBHQ, duroquinone, AA-861) au contraire la stimule. L'implication du calcium et de la 5-lipoxygénase dans le mécanisme d'action des composés AA-861 et tBuBHQ a été écartée. Ces deux composés n'affectent pas l'activité diaphorase mesurée en milieu acellulaire reconstitué. Nos données convergent vers l'hypothèse d'une action directe des molécules quinones sur la protéine Nox4 au niveau de la partie N terminale membranaire de Nox4.

Nous avons dans ce travail démontré que l'activité NADPH oxydase de Nox4 n'est pas seulement constitutive mais qu'elle peut être modulée par une famille de composés quinoniques. Le mécanisme moléculaire précis reste à définir.

Mots clés: NADPH oxydase ; quinones ; traduction *in vitro* (RTS) ; protéines recombinantes ; 5-lipoxygénase ; calcium