



HAL
open science

Régulation de l'activité NADPH oxydase phagocytaire -Mécanismes moléculaires de la super-activité oxydase du cytochrome b558 D-loopNox4-Nox2

Laure Carrichon

► **To cite this version:**

Laure Carrichon. Régulation de l'activité NADPH oxydase phagocytaire -Mécanismes moléculaires de la super-activité oxydase du cytochrome b558 D-loopNox4-Nox2. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00406428

HAL Id: tel-00406428

<https://theses.hal.science/tel-00406428>

Submitted on 22 Jul 2009

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 JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1
Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble 1

Discipline : Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Laure CARRICHON

Le 07 juillet 2009

Régulation de l'activité NADPH oxydase phagocytaire

Mécanismes moléculaires de la super-activité oxydase

du cytochrome *b*₅₅₈ D-loop_{Nox4}-Nox2

Composition du jury :

Rapporteurs :	Docteur Véronique WITKO-SARSAT
	Professeur Karl-Heinz KRAUSE
Invité :	Professeur Jean-Luc LENORMAND
Directeur de thèse :	Docteur Marie-José STASIA
Président :	Professeur Benoît POLACK

Thèse préparée au sein du **Centre Diagnostic et Recherche CGD**

Laboratoire TIMC-Imag UMR CNRS 5525 – CHU Michallon

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1
Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble 1

Discipline : Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Laure CARRICHON

Le 07 juillet 2009

Régulation de l'activité NADPH oxydase phagocytaire

Mécanismes moléculaires de la super-activité oxydase

du cytochrome *b*₅₅₈ D-loop_{Nox4}-Nox2

Composition du jury :

Rapporteurs :	Docteur Véronique WITKO-SARSAT Professeur Karl-Heinz KRAUSE
Invité :	Professeur Jean-Luc LENORMAND
Directeur de thèse :	Docteur Marie-José STASIA
Président :	Professeur Benoît POLACK

Thèse préparée au sein du **Centre Diagnostic et Recherche CGD**

Laboratoire TIMC-Imag UMR CNRS 5525 – CHU Michallon

Ce travail a été réalisé au sein du Centre Diagnostic et Recherche de la granulomatose septique chronique CGD, et au sein du Groupe de Recherche et d'Etude du Processus Inflammatoire GREPI, sous la direction de Madame le Docteur Marie José Stasia. Je tiens à la remercier chaleureusement pour son investissement tout au long de ma thèse et pour son infinie patience. Je lui serais toujours reconnaissante de m'avoir soutenue malgré les difficultés.

Je remercie Monsieur le Professeur Benoît Polack d'avoir accepté la Présidence de mon jury de thèse. Je remercie Monsieur le Professeur Karl-Heinz Krause et Madame le Directeur de Recherche Véronique Witko-Sarsat d'avoir accepté d'être membre de mon jury et de corriger ce travail. Je remercie Monsieur le Docteur Jean-Luc Lenormand de participer à mon jury de thèse.

Je remercie également Madame le Professeur Françoise Morel de m'avoir accueillie au sein du laboratoire GREPI.

Je tiens à remercier très sincèrement toute l'équipe CGD auprès de qui je me suis sentie en famille. Merci à Michelle, Cécile et Elisabeth pour leurs conseils et leur gentillesse. Merci aux « jeunes » : Sylvain, Franck, Antoine, et Federica. Loin de vous, ma culture footballistique va en prendre un coup... Bienvenue à Marie-Claire, que j'ai peu connue mais qui a sans conteste l'âme d'une « CGD ». Dans notre « petit labo », j'ai trouvé une chaleur et une sérénité que je vais regretter. Conservez toujours précieusement cette bonne ambiance et votre bonne humeur.

Je remercie l'ensemble des chercheurs du GREPI et de TheREx que j'ai côtoyés toutes ces années, Marie-Hélène, Sylvie, Chuong, Candice, Olivier, Bruno, Sébastien...je ne peux les citer tous mais le cœur y est. Un grand merci aux techniciennes, secrétaires et agents du laboratoire d'Enzymologie, qui ont été sans le savoir ma boussole pour ne pas perdre le Nord. J'ai apprécié de vous retrouver au café, au self ou dans le placard!

Une pensée particulière à mes amis et compagnons d'armes des associations de jeunes chercheurs 38Globule et BioDocs-Lyon : Marion, Béa, Sébastien, Jackie, Karine et tous les autres... Mon implication à 38Globule a été une réelle source d'épanouissement.

Enfin, je tiens à exprimer toute mon affection à ma famille et à mes « potes ». Merci à mon frère et à mes parents qui ont toujours été présents à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Merci à Marc, Vincent, Matthew et à Simon, le Troll le plus fréquentable, dont l'amitié compte beaucoup malgré les distances. Je serais toujours là pour vous quoi qu'il advienne.

Résumé

L'activité NADPH oxydase, responsable de la production d'anions superoxydes microbicides, résulte de l'assemblage des protéines cytosoliques p47*phox*, p67*phox*, p40*phox* et Rac1/2 avec le cytochrome *b*₅₅₈, l'élément membranaire redox formé par les protéines Nox2 (gp91*phox*) et p22*phox*. L'étude de « variants » CGDX⁺, caractérisés par une expression normale de Nox2 mutée non fonctionnelle, permet d'établir un lien direct entre une région et une fonction spécifique de cette protéine. Cependant, la modélisation cellulaire de ces variants est nécessaire pour l'obtention d'un matériel biologique suffisamment abondant afin d'aborder la compréhension des mécanismes d'activation du complexe NADPH oxydase au niveau moléculaire. Ce modèle est une lignée myélomonoblastique humaine inductible en granulocytes (« neutrophil-like ») dont le gène *CYBB*, codant Nox2, a été inactivé par recombinaison homologue (lignée PLB-985 X-CGD). L'approche expérimentale consiste à reproduire ces variants dans ce modèle par mutagenèse dirigée, transfection stable et sélection clonale. Afin de comprendre le rôle joué par la boucle D intracytosolique de Nox2 ¹⁹¹TSSTKTIRRS²⁰⁰ dans le fonctionnement du complexe NADPH oxydase, une approche par modélisation cellulaire identique à celle explicitée plus haut a été entreprise. Nous avons mis en évidence que le remplacement de la boucle D de Nox2 par celle de son homologue Nox4 (mutant PLB-985 **D-loop_{Nox4}-Nox2**) était à l'origine d'une « super-activité » NADPH oxydase (Li et al., 2005).

Le présent travail consiste à élucider les mécanismes moléculaires à l'origine de la super-activité oxydase de ce mutant. Le mutant D-loopNox4-Nox2 présente une activité NADPH oxydase *ex vivo* de 2 à 8 fois supérieure à celle de cellules PLB-985 transgéniques WT-Nox2 (transfectées par l'ADNc sauvage) en réponse à divers stimuli. Cette suractivité oxydase est plus importante en réponse aux stimuli solubles, et notamment aux deux activateurs ionomycine et FMLF, impliquant une augmentation du taux de calcium intracellulaire. Cette suractivité a également été mise en évidence dans un système simplifié *in vitro* contenant uniquement les protéines purifiées du complexe oxydase et activé par l'acide phosphatidique. Par contre, aucune suractivité NADPH oxydase n'est observée dans les mêmes conditions *in vitro* en activant par l'acide arachidonique.

L'activité NADPH oxydase du mutant *ex vivo* présente une sensibilité accrue au calcium libre intracellulaire, et elle est moins dépendante de certains événements de phosphorylation lors de son activation comparée aux cellules WT-Nox2. Ainsi, la suractivité du mutant D-loopNox4-Nox2 pourrait provenir d'une modification de la conformation de Nox2, induite par les mutations de la boucle D, favorisant l'activation et/ou la stabilisation de l'état activé du complexe NADPH oxydase. L'état conformationnel actif de Nox2 mutée serait indépendant de certains événements de phosphorylation/déphosphorylation des facteurs cytosoliques et/ou de Nox2. Il reste à présent à mettre en évidence ce changement conformationnel et à préciser les protéines et les acides aminés phosphorylés impliqués.

Nous avons également démontré que la surproduction d'O₂⁻ par le mutant D-loopNox4-Nox2 améliore son pouvoir bactéricide vis-à-vis de la souche atténuée de *P. aeruginosa* PAO1. De plus, nous avons pu mettre en évidence l'existence de deux phases distinctes et interdépendantes dans le processus de bactéricidie de ce microorganisme par les phagocytes. La première phase est oxydase-dépendante (production d'O₂⁻ directement bactéricides) et est nécessaire à l'optimisation de la seconde phase (activation de protéases et enzymes granulaires microbicides).

Mots-clés : NADPH oxydase ; CGD ; Nox2 (gp91*phox*) ; cellules PLB-985 X-CGD transgéniques ; cytochrome *b*₅₅₈ ; microbicidie

Abstract

The NADPH oxidase of professional phagocytes is a crucial component of the innate immune response due to its fundamental role in the production of microbicidal superoxide anions. NADPH oxidase becomes activated after assembly of cytosolic proteins p47*phox*, p67*phox*, p40*phox*, and Rac1/2 with cytochrome *b*₅₅₈, the transmembrane redox core composed of proteins Nox2 (gp91*phox*) and p22*phox*. Study of X⁺-CGD “variants”, characterized by a normal expression of mutated Nox2 which is non-functional, permits to ascertain a direct relation between a region and a specific function of Nox2. However, modelization of these variants in a cellular model is necessary to obtain an abundant biological material in order to investigate molecular mechanisms of NADPH oxidase activation. This cellular model is a human myelomonoblastic line inducible in granulocytes (“neutrophil-like”) which lack endogenous Nox2 expression because of *CYBB* gene targeting (X-CGD PLB-985 cells). Experimental procedure consists in reproducing these variants into this model by means of directed mutagenesis, stable transfection and clonal selection. In order to understand the role played by the intracytosolic D-loop of Nox2 ¹⁹¹TSSTKTIRRS²⁰⁰ in NADPH oxidase function, a similar approach as described hereinbefore has been applied. We have observed that replacement of the D-loop of Nox2 with D-loop of its homolog Nox4 (mutant PLB-985 **D-loop_{Nox4}-Nox2**) induced a NADPH oxidase super-activity (Li *et al.*, 2005).

We have investigated molecular mechanisms responsible for overproduction of superoxide anions by the D-loopNox4-Nox2 mutant. The super-mutant exhibits an *ex vivo* oxidase activity which is 2 to 8 times higher than that of the transgenic PLB-985 cells WT-Nox2 (transfected with wild cDNA) after stimulation by a range of agonists. This superoxide anions overproduction is more important during soluble agonist-dependent activation, especially with ionomycin and fMLF, two activators involving an increase of intracellular calcium concentration. This overproduction is also observed *in vitro* in a cell free system using only purified proteins of the oxidase complex, and activated by phosphatidic acid. In contrast, no NADPH oxidase super-activity is observed *in vitro* in the same conditions after activation with arachidonic acid.

Ex vivo NADPH oxidase activity of D-loopNox4-Nox2 cells manifests an enhanced sensitivity to free intracellular calcium, and is less dependent on some phosphorylation events occurring during activation compared with WT-Nox2 cells. Then, the super-activity of the D-loopNox4-Nox2 mutant could come from a modification of Nox2 conformation, induced by D-loop mutation, improving activation and/or stabilization of the NADPH oxidase activated state. The activated conformational state of mutated Nox2 could be independent of some phosphorylation/dephosphorylation events of the cytosolic factors and/or Nox2. Now, we have to demonstrate this conformational change, and to specify the phosphorylated proteins and amino acid residues implicated.

We have also proved that superoxide anions overproduction by the D-loopNox4-Nox2 mutant improves its killing activity against attenuated strain of *P. aeruginosa* PAO1. Moreover, we have found that the bactericidal process of this microorganism by phagocytes consists in two distinct and interdependent phases. The first phase is oxidase-dependent (O₂⁻ production directly bactericidal), and necessary to optimize the second phase (activation of microbicidal granular proteases and enzymes).

Key words: NADPH oxidase; CGD; Nox2 (gp91*phox*); transgenic X-CGD PLB-985 cells; cytochrome *b*₅₅₈; killing

Liste des abréviations

AA	acide arachidonique
Ca ²⁺	ion calcium
CGD	chronic granulomatous disease
DMF	diméthylformamide
DOPA	dioleoyl phosphatidic acid
DPI	diphénylène iodonium
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescence activated cell sorter (cytométrie en flux)
FAD	flavin adenine dinucleotide
fMLF	formyl-méthyl-leucyl-phénylalanine
GDP	guanosine diphosphate
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GTP γ S	guanosine 5'-[gamma-thio]triphosphate
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HRPO	horse radish peroxidase
Ig G	immunoglobuline G
INT	iodonitrotetrazolium
mAb	monoclonal antibody
MAPK	mitogen activated protein kinase
MPO	myéloperoxydase
NADPH	nicotinamide adénine dinucleotide phosphate réduit
O ₂ ⁻	anion superoxyde
OpZ	zymosan opsonisé
PA	acide phosphatidique
Phox	« phagocyte oxidase »
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	protéine kinase C
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
RLU	relative luminescence unit
SOCE	store-operated calcium entry
SOD	superoxyde dismutase
TNF α	tumor necrosis factor α
WT	wild-type

Table des matières

INTRODUCTION	1
I. Processus de phagocytose et microbicidie par le polynucléaire neutrophile.....	1
I.1. Description générale de la phagocytose	1
I.2. Les granules cytoplasmiques du polynucléaire neutrophile	3
I.3. Activation du métabolisme oxydatif du neutrophile	4
I.3.1. Les dérivés toxiques de l'oxygène	4
I.3.2. Rôle des anions superoxydes	6
I.4. La microbicidie par le neutrophile	7
II. La NADPH oxydase phagocytaire.....	10
II.1. Le flavocytochrome <i>b₅₅₈</i>	11
II.1.1. Nox2/gp91 <i>phox</i>	12
II.1.2. Sous-unité p22 <i>phox</i>	14
II.1.3. Le processus de transfert d'électrons	15
II.2. Rap1A	16
II.3. Les facteurs cytosoliques du complexe oxydase phagocytaire	17
II.3.1. Sous-unité p47 <i>phox</i>	17
II.3.2. Sous-unité p67 <i>phox</i>	20
II.3.3. Sous-unité Rac	21
II.3.4. Sous-unité p40 <i>phox</i>	23
III. Les homologues de l'oxydase phagocytaire : Nox et Duox	25
III.1. Caractéristiques des Nox et Duox	25
III.1.1. Structure des Nox et Duox	25
III.1.2. Fonction des oxydases non phagocytaires	27
III.1.3. Régulation des oxydases de la famille Nox	27
III.2. Zoom sur Nox4	28
IV. Granulomatose septique chronique : CGD	29
V. Activation du complexe NADPH oxydase	32
V.1. Généralités	32
V.2. Les voies d'activation de la NADPH oxydase du neutrophile	35
V.2.1. Voies d'activation par le PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate	35
V.2.2. Voies d'activation par le fMLF: formyl méthyl-leucyl-phénylalanine	37
V.2.3. Voies d'activation par les microorganismes et particules opsonisés	41
V.2.4. Voies d'activation par l'ionomycine	43
V.3. Rôles des événements de phosphorylation des sous-unités du complexe NADPH oxydase	43

V.3.1. Phosphorylation de Nox2	43
V.3.2. Phosphorylation de p22 <i>phox</i>	44
V.3.3. Phosphorylation de p40 <i>phox</i>	44
V.3.4. Phosphorylation de p67 <i>phox</i>	44
V.3.5. Phosphorylation de p47 <i>phox</i>	45
VI. Assemblage de la NADPH oxydase : modèles d'interactions protéines- protéines et protéines-lipides	49
VI.1. Interactions potentielles des facteurs cytosoliques	49
VI.2. Interaction des facteurs cytosoliques avec le cytochrome <i>b₅₅₈</i>	50
VI.3. Modèle d'assemblage du complexe NADPH oxydase	53
VII. Modèle cellulaire PLB-985	53
OBJECTIFS	57
MATERIEL ET METHODES	59
I. Préparations Biologiques	59
I.1. Culture de la lignée cellulaire PLB-985 sauvage et X-CGD	59
I.2. Différentiation des cellules PLB-985	59
I.3. Congélation et décongélation	59
I.3.1. Congélation	59
I.3.2. Décongélation	60
I.4. Purification des neutrophiles humains à partir de sang frais	60
I.5. Morphologie cellulaire par coloration May-Grünwald Giemsa	61
I.6. Préparations cellulaires	61
I.6.1. Traitement des cellules au diisopropylfluorophosphate	61
I.6.2. Séparation des fractions membranaires et cytosoliques	61
I.6.3. Préparation d'un extrait membranaire soluble	62
II. Synthèse et purification des protéines recombinantes	63
III. Analyses protéiques	63
III.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	63
III.2. Dosage des protéines par l'acide bicinchonique BCA	64
III.3. Séparation des protéines en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)	64
III.3.1. Préparation du gel de polyacrylamide	65
III.3.2. Préparation des échantillons et migration électrophorétique	65
III.3.3. Révélation des protéines sur gel de polyacrylamide	65
III.4. Western blot	66

III.4.1. Transfert des protéines sur membrane	66
III.4.2. Révélation des protéines	67
III.5. Spectre d'absorption différentiel du cytochrome <i>b</i> ₅₅₈	67
IV. Purification du cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ de membranes de PLB-985	68
IV.1. Purification du cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ par immunoaffinité	68
IV.2. Reconstitution fonctionnelle du cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ purifié	69
V. Mesures de l'activité NADPH oxydase	70
V.1. Cytométrie en flux : expression de Nox2 et activité NADPH oxydase	70
V.1.1. Evaluation de l'expression de Nox2 : simple marquage	70
V.1.2. Evaluation simultanée de l'expression de Nox2 et de l'activité NADPH oxydase : double marquage	71
V.2. Activité NADPH oxydase par chemiluminescence	71
V.2.1. Principe et protocole	71
V.2.2. Préparation des agonistes opsonisés	73
V.3. Activité NADPH oxydase en système reconstitué par réduction du cytochrome c	74
V.3.1. Sur la fraction membranaire purifiée	74
V.3.2. Sur le cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ purifié	75
VI. Bactéricidie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	75
VII. Statistiques	76
RESULTATS	77
I. Caractérisation <i>ex vivo</i> de la super-activité NADPH oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2	77
I.1. Contrôle du phénotype des cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées	78
I.1.1. Mise au point des conditions de différenciation des cellules PLB-985	78
I.1.2. Contrôle de l'expression de Nox2 et des autres facteurs du complexe NADPH oxydase	80
I.1.3. Mise au point d'une technique de mesure simultanée de l'expression de Nox2 et de l'activité oxydase des cellules PLB-985 X-CGD transfectées	82
I.2. Activité NADPH oxydase des cellules intactes D-loopNox4-Nox2 en réponse à divers stimuli solubles et particuliers.	84
I.3. Localisation de la surproduction de H ₂ O ₂ du super-mutant D-loopNox4-Nox2	92
II. Caractérisation de l'activité NADPH oxydase <i>in vitro</i> du mutant D-loopNox4-Nox2	94
II.1. Activité NADPH oxydase en système reconstitué à partir de membranes purifiées	94

II.2. Activité NADPH oxydase du cytochrome <i>b₅₅₈</i> du mutant D-loopNox4-Nox2 en système simplifié	96
II.2.1. Purification du cytochrome <i>b₅₅₈</i>	96
II.2.2. Purification des protéines recombinantes <i>p67phox</i> , <i>p47phox</i> et Rac1	99
II.2.3. Turnover du cytochrome <i>b₅₅₈</i> du mutant D-loopNox4-Nox2	99
III. Etude des mécanismes moléculaires responsables de la super-activité NADPH oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2.....	101
III.1. Sensibilité du mutant D-loopNox4-Nox2 aux influx calciques induits lors de l'activation de la NADPH oxydase	101
III.2. Sensibilité du mutant D-loopNox4-Nox2 aux événements de phosphorylation induits lors de la stimulation de l'activité NADPH oxydase	104
III.3. Analyse du « priming » de l'activité NADPH oxydase du super-mutant D-loopNox4-Nox2	110
IV. Pouvoir bactéricide du super-mutant D-loopNox4-Nox2 vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i>	113
IV.1. Bactéricidie de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 par le super-mutant D-loopNox4-Nox2	113
IV.2. Bactéricidie de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 par les cellules PLB-985 en fonction de leur activité NADPH oxydase	115
IV.3. Contrôles de viabilité des cellules PLB-985 au cours de la bactéricidie	119
IV.4. Rôle de la MPO dans la mesure par chemiluminescence de l'activité NADPH oxydase des cellules PLB-985	119
DISCUSSION et PERSPECTIVES	123
BIBLIOGRAPHIE	137
PUBLICATIONS et COMMUNICATIONS	160

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Schéma de la migration chimiotactique des neutrophiles vers le site inflammatoire et infectieux depuis la circulation sanguine	1
Figure 2 : Représentation schématique du phagolysosome de neutrophile	2
Figure 3 : Modèle d'activation du complexe NADPH oxydase phagocytaire	11
Figure 4 : Modèle structural de Nox2	13
Figure 5 : Modèles structuraux de p22 <i>phox</i>	15
Figure 6 : Mécanisme de transfert d'électrons par le cytochrome <i>b₅₅₈</i>	16
Figure 7 : Domaines structuraux de p47 <i>phox</i>	18
Figure 8 : Modèle de p47 <i>phox</i> dans sa configuration auto-inhibée (au repos) et activée	19
Figure 9 : Domaines structuraux de p67 <i>phox</i>	20
Figure 10 : Modèle de régulation de l'activité du cytochrome <i>b₅₅₈</i> en deux étapes par Rac2	22
Figure 11 : Domaines structuraux de p40 <i>phox</i>	24
Figure 12 : Modèle structural des différents sous-types d'enzymes Nox et Duox	26
Figure 13 : Mutations CGDX ⁺ sur le modèle structural de Nox2	32
Figure 14 : Schéma non exhaustif des voies de signalisation induites par le PMA menant à l'activation de la NADPH oxydase	36
Figure 15 : Schéma non exhaustif des multiples voies de signalisation induites par le fMLF ou l'OpZ menant à l'activation de la NADPH oxydase	38
Figure 16 : Modèle de régulation de l'influx calcique SOCE-dépendant dans le neutrophile humain activé par les chemoattractants	39
Figure 17 : Modèle de conversion de p47 <i>phox</i> dans sa configuration active via les événements de phosphorylations	46
Figure 18 : Représentation schématique des interactions possibles entre les facteurs cytosoliques p47 <i>phox</i> , p67 <i>phox</i> et p40 <i>phox</i>	49
Figure 19 : Régions du cytochrome <i>b₅₅₈</i> impliquées dans l'assemblage et l'interaction avec les facteurs cytosoliques	51
Figure 20 : Modèle d'assemblage et d'activation de la NADPH oxydase durant la phagocytose	53
Figure 21 : Morphologie des cellules PLB-985 en microscopie électronique en transmission	54
Figure 22 : Construction de la lignée de cellules PLB-985 X-CGD	55
Figure 23 : Structure moléculaire et perméabilité membranaire du luminol et de l'isoluminol	72
Figure 24 : Mutagenèse de la boucle cytosolique D ¹⁹¹ TSSTKTIRRS ²⁰⁰ de Nox2	77

Figure 25 : Activité NADPH oxydase des cellules différenciées PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 en fonction du milieu de différenciation	79
Figure 27 : Expression des facteurs cytosoliques dans les cellules PLB-985 X-CGD transfectées	80
Figure 28 : Expression de la protéine Nox2 sauvage et mutée dans les cellules PLB-985 X-CGD transfectées.	81
Figure 29 : Spectres d'absorption différentiels du cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ sur extraits membranaires solubles (Triton X-100 1%) de cellules PLB-985	82
Figure 30 : Mesure simultanée de l'expression de Nox2 et de l'activité NADPH oxydase des cellules intactes PLB-985 X-CGD, WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées	83
Figure 31 : Production de H ₂ O ₂ dans les cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées et dans le neutrophile humain après stimulation par le PMA	86
Figure 32 : Production de H ₂ O ₂ dans les cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées et dans le neutrophile humain après stimulation par le fMLF	87
Figure 33 : Production de H ₂ O ₂ dans les cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées et dans le neutrophile humain après stimulation par l'ionomycine	89
Figure 34 : Production de H ₂ O ₂ dans les cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées et dans le neutrophile humain après stimulation par le zymosan opsonisé	90
Figure 35 : Production de H ₂ O ₂ dans les cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées et dans le neutrophile humain après stimulation par des billes de latex opsonisées	91
Figure 36 : Production de H ₂ O ₂ externe, induite par divers agonistes, dans les cellules intactes différenciées PLB-985 et le neutrophile humain	93
Figure 37 : Activité NADPH oxydase des cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 en système acellulaire par réduction du cytochrome c sensible à la SOD, et activité diaphorase par réduction de l'INT	95
Figure 38 : Contrôle de la purification du cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ des cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2	98
Figure 39 : Electrophorèse SDS-PAGE des protéines recombinantes p47 <i>phox</i> , p67 <i>phox</i> et Rac1 révélées après coloration au bleu de Coomassie	99
Figure 40 : Production d'O ₂ ⁻ du cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ purifié de WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 en système reconstitué activé par l'AA en présence des protéines recombinantes p47 <i>phox</i> , p67 <i>phox</i> et Rac1	100
Figure 41 : Production d'O ₂ ⁻ du cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ purifié de WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 en système reconstitué activé par le PA en présence des protéines recombinantes p47 <i>phox</i> , p67 <i>phox</i> et Rac1.	101
Figure 42 : Influence du métabolisme calcique sur l'activité NADPH oxydase des cellules intactes PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées	102
Figure 43 : Effet des événements de phosphorylation sur l'activité NADPH oxydase des cellules intactes PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées	108

Figure 44 : « Priming » de l'activité NADPH oxydase des cellules intactes PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées	111
Figure 45 : Activité bactéricide des cellules différenciées PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 et du neutrophile humain vis-à-vis de la souche PAO1 de <i>P. aeruginosa</i>	114
Figure 46 : Analyse de l'implication de la NADPH oxydase dans le pouvoir bactéricide des cellules PLB-985 vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	116
Figure 47 : Analyse de l'implication de la NADPH oxydase dans le pouvoir bactéricide de neutrophiles humains vis-à-vis de la souche PAO1 de <i>P. aeruginosa</i>	118
Figure 48 : Viabilité des cellules PLB-985 vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 au cours de la bactéricidie	119
Figure 49 : Production de H ₂ O ₂ mesurée avec et sans HRPO dans les cellules différenciées PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 et dans le neutrophile humain après stimulation par l'OpZ	120
Figure 50 : Production de H ₂ O ₂ mesurée avec et sans HRPO dans les cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées et dans le neutrophile humain après stimulation par le PMA	121

Tables

Table 1 : Les différentes formes de granulomatoses septiques chroniques	30
Table 2 : Taux de cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ et activité NADPH oxydase des cellules PLB-985 sauvages et X-CGD transfectées	78
Table 3 : Activité NADPH oxydase de cellules intactes PLB-985 et du neutrophile humain, induite par divers agonistes solubles ou particuliers	85
Table 4 : Tableaux de purification du cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ à partir de cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées	97
Table 5 : Influence des événements de phosphorylation sur l'activité NADPH oxydase des cellules intactes PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées	105
Table 6 : Activité NADPH oxydase des cellules PLB-985 différenciées H490D-Nox2, induite par divers agonistes solubles et particuliers	115

Introduction

I. Processus de phagocytose et microbicidie par le polynucléaire neutrophile

(pour revue voir Underhill et Ozinsky, 2002)

I.1. Description générale de la phagocytose

Le processus de phagocytose a été décrit pour la première fois par Metchnikoff en 1883. Les cellules phagocytaires constituent la première ligne de défense de l'hôte contre les microorganismes. Ces phagocytes professionnels, que sont les macrophages, les monocytes et les polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles, sont capables de phagocyter, tuer et digérer les bactéries et champignons lors d'épisodes infectieux. Les polynucléaires neutrophiles sont les principaux représentants du système immunitaire inné et constituent plus de 60% des leucocytes circulants.

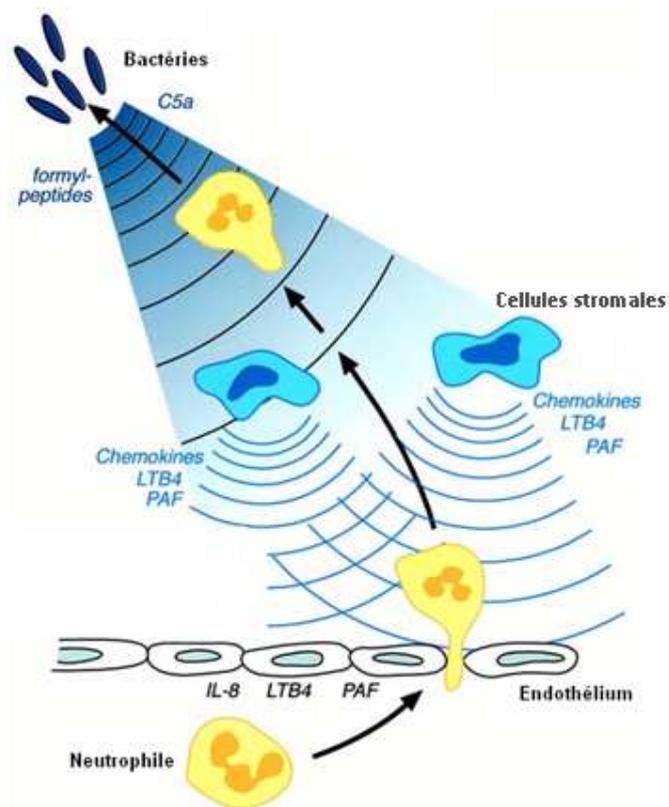


Figure 1: Schéma de la migration chimiotactique des neutrophiles vers le site inflammatoire et infectieux depuis la circulation sanguine. Molécules chimiotactiques : formyl peptides bactériens, dérivé du complément C5a, et chemokines, interleukine-8 (IL-8), leukotriène B4 (LTB4), platelet activating factor (PAF) produits par les cellules stromales. (D'après Witko-Sarsat et *al.*, 2000 ; adapté de Foxman et *al.*, 1999)

Lors d'une infection, les neutrophiles circulants sont mobilisés au niveau du foyer infectieux par chimiotactisme grâce à des molécules et peptides produits *in situ* qui diffusent dans les capillaires voisins (Figure 1). Les composés chimiotactiques sont notamment les formyl-peptides produits par les bactéries dégradées tel que le formyl-méthyl-leucyl-phénylalanine (fMLF), le dérivé C5a du complément, l'interleukine-8 (IL-8), et les leukotriènes, comme le LTB4, produits par les cellules avoisinantes. A partir de la circulation sanguine, les neutrophiles traversent par diapédèse la paroi des capillaires pour rejoindre le lieu de l'infection où ils reconnaissent la bactérie par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques localisés sur leurs membranes plasmiques (récepteurs aux dérivés du complément et aux immunoglobulines).

La phagocytose peut alors débuter : les neutrophiles émettent des pseudopodes qui englobent la bactérie pour former un phagosome ou vacuole de phagocytose. La phagocytose est suivie de l'étape de dégranulation. Les granules cytoplasmiques du neutrophile fusionnent avec le phagosome pour former le phagolysosome dans lequel ils déversent leur contenu en enzymes et protéines lytiques (protéases et hydrolases). Simultanément, la NADPH oxydase membranaire est activée et produit une énorme quantité d'anions superoxydes (O_2^-) convertis en dérivés toxiques de l'oxygène, dont notamment l'acide hypochloreux (HOCl). Le HOCl est synthétisé par la myéloperoxydase (MPO) à partir du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) provenant de la dismutation des O_2^- . L'action conjointe des dérivés de l'oxygène et des enzymes lytiques conduit à la dégradation du pathogène (Figure 2).

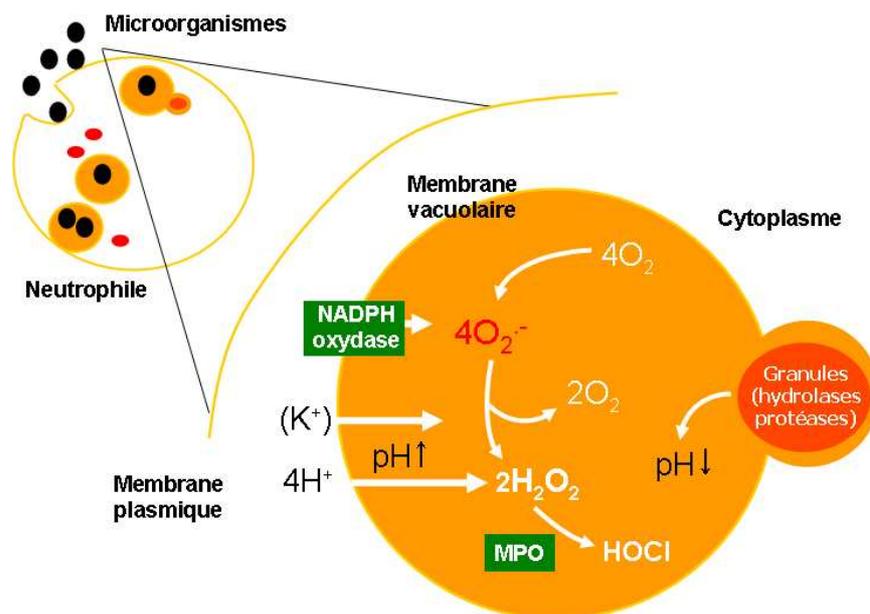


Figure 2: Représentation schématique du phagolysosome de neutrophile. (D'après Roos et Winterbourn, 2002)

I.2. Les granules cytoplasmiques du polynucléaire neutrophile

(pour revue voir Gullberg et *al.*, 1999)

Les premières observations ont montré la présence de nombreux granules cytoplasmiques déchargeant leur contenu dans la vacuole phagocytaire contenant le microorganisme internalisé (Cohn et Hirsch, 1960). Ces granules sont formés à partir de l'étape promyélocytaire de maturation du neutrophile. Ils sont classés en quatre catégories selon leur contenu protéique et enzymatique : les granules primaires ou azurophiles, secondaires ou spécifiques, tertiaires ou à gélatinase, et les vésicules sécrétoires.

Les granules azurophiles (ou primaires) contiennent principalement des enzymes et peptides impliqués dans la mort et la dégradation du microorganisme. Ils possèdent entre autres de la MPO, les protéases cathepsine G et élastase, ainsi que des défensines et du lysozyme. La cathepsine G est une sérine protéase « chymotrypsin-like » catalysant l'hydrolyse de liaisons peptidiques au niveau d'acides aminés hydrophobes volumineux. L'élastase est aussi une sérine protéase, qui clive les peptides au niveau d'acides aminés neutres. Les défensines sont des peptides cationiques riches en cystéine, qui peuvent s'insérer dans les membranes microbiennes et former des pores. Le lysozyme est une hydrolase acide hydrolysant les glycosaminoglycans de la paroi bactérienne.

Les granules spécifiques renferment également des protéines de dégradation telles que le lysozyme et la gélatinase (enzyme catalysant le clivage du collagène de la matrice extracellulaire) mais aussi de la lactoferrine, protéine aux propriétés bactéricides qui fixe le fer. En outre, les granules spécifiques contiennent de nombreux constituants des récepteurs membranaires impliqués dans l'adhérence et l'activation du neutrophile (intégrines, récepteur au fMLF...etc).

Les granules tertiaires contiennent des enzymes lytiques telles que la gélatinase qui, en dégradant le collagène de la matrice extracellulaire, favorise la migration du neutrophile sur le site de l'infection. Enfin, les vésicules sécrétoires sont formées de nombreux constituants des récepteurs membranaires impliqués dans le chimiotactisme et l'adhérence du neutrophile tels que les intégrines et le récepteur au fMLF.

Les granules spécifiques, les granules tertiaires et les vésicules sécrétoires sont surtout un important réservoir de cytochrome *b₅₅₈*, la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase phagocytaire (plus de 80 % de la quantité totale).

I.3. Activation du métabolisme oxydatif du neutrophile

La phagocytose s'accompagne d'une intense consommation d'oxygène communément appelée explosion respiratoire (« respiratory burst ») (Baldrige and Gerard, 1932). Cette activité fut d'abord attribuée à la respiration mitochondriale mais il a été démontré par la suite que cette explosion respiratoire était insensible aux inhibiteurs des mitochondries (cyanure et antimycine), puis associée à une accélération du cycle des hexoses mono-phosphates et enfin qu'elle conduisait en réalité à la production d'anions superoxydes O_2^- (Sbarra et *al.*, 1959 ; Rossi et *al.*, 1964 ; Babior et *al.*, 1973).

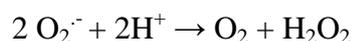
L'enzyme responsable de la synthèse d' O_2^- est la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit). La NADPH oxydase est un complexe multi-protéique catalysant le transfert d'électrons depuis une molécule de NADPH, issue du « shunt » des hexoses mono-phosphates, vers une molécule d'oxygène réduite en anion superoxyde:



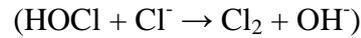
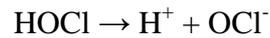
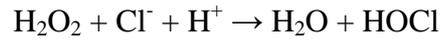
La NADPH oxydase du neutrophile est activée par des stimuli solubles tels que le PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate), le fMLF et l'ionomycine, ou par des stimuli particuliers tels que des bactéries opsonisées. L'activation de la NADPH oxydase est transitoire et la cinétique de production d' O_2^- diffère profondément selon l'agoniste employé (Dahlgren et Karlsson, 1999).

I.3.1. Les dérivés toxiques de l'oxygène

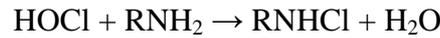
➤ L'anion superoxyde O_2^- est une molécule très instable qui peut traverser la membrane plasmique (Mao et Poznansky, 1992). Les anions superoxydes ont peu d'effet toxique direct sur les microorganismes car ils subissent rapidement une dismutation, spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase (SOD), en peroxyde d'hydrogène :



➤ Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est relativement stable et peut diffuser à travers les membranes. Il a un pouvoir bactéricide mais il peut être converti en ion hypochlorite OCl^- , oxydant très puissant également bactéricide. Cette réaction est réalisée par la MPO, libérée lors de la dégranulation des granules azurophiles.



L'acide hypochloreux HOCl peut réagir avec des amines et former des chloramines dont la durée de vie est plus longue et la toxicité très importante pour certaines d'entre elles :



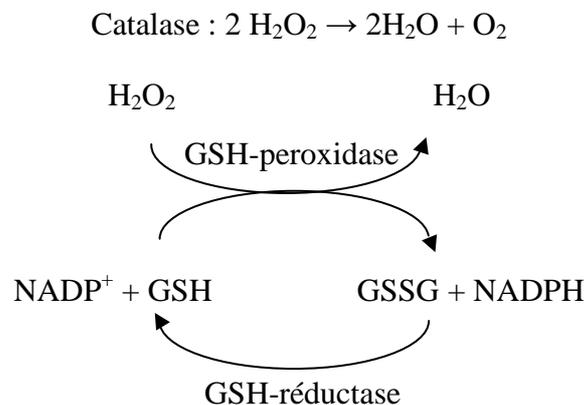
➤ H_2O_2 peut aussi être réduit en radical hydroxyl OH^\cdot qui est un composé extrêmement toxique : $\text{O}_2^- + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$



Cependant, dans le phagolysosome, la présence de lactoferrine fixant le fer empêche sa formation.

➤ Enfin, l'association de H_2O_2 et OCl^- produit un oxygène singulet $^1\text{O}_2$ qui réagit notamment avec les lipides membranaires, initiant ainsi leur peroxydation.

Les dérivés toxiques de l'oxygène sont hautement bactéricides mais tout aussi cytotoxiques et peuvent être à l'origine de pathologies inflammatoires chez l'hôte. L'organisme possède des systèmes de régulation afin de lutter contre un excès d'agents oxydants et en particulier des systèmes d'élimination du H_2O_2 via la catalase ou la glutathion (GSH) peroxydase au niveau du cytosol :



I.3.2. Rôle des anions superoxydes

(pour revue voir Rada et *al.*, 2008)

L'activité NADPH oxydase est requise dans les neutrophiles pour une microbicidie efficace (Selvaraj et *al.*, 1966). Un défaut de fonctionnement de la NADPH oxydase résulte en un syndrome d'immunodéficience grave : la granulomatose septique chronique (Chronic Granulomatous Disease, CGD) (Holmes et *al.*, 1967 ; voir § IV). Les dérivés oxygénés de l'O₂⁻, énumérés dans le paragraphe précédent, sont généralement reconnus comme hautement toxiques et bactéricides par eux-mêmes. Bien que leur réel pouvoir *in vivo* ait pu être remis en question (Reeves et *al.*, 2003), la participation des dérivés de l'oxygène et de la MPO en tant qu'agents toxiques dans le neutrophile semble confirmée par de nombreuses observations.

Tout d'abord, parmi les pathogènes responsables des infections observées chez les patients CGD, les microorganismes au phénotype « catalase-négative » sont rarement observés (Winkelstein et *al.*, 2000 ; van den Berg et *al.*, 2009). Il se produit probablement un phénomène de compensation par le H₂O₂ généré par le pathogène dans le phagolysosome des neutrophiles CGD qui permet son élimination. De même, des bactéries *E.coli* OxyR-déficientes, c'est-à-dire incapables d'activer leur fonction enzymatique catalase, sont éliminées par le neutrophile plus efficacement que des bactéries sauvages (Staudinger et *al.*, 2002).

D'autre part, la production phagosomale de HOCl, réalisée par la MPO à partir du H₂O₂, serait suffisante en elle-même pour tuer des bactéries phagocytées (Jiang et *al.*, 1997 ; Hampton et *al.*, 1998). Des neutrophiles déficients en MPO, mais possédant une activité oxydase normale, ne peuvent pas normalement éliminer *ex vivo* tous les microorganismes, notamment certaines espèces de *Candida* (Lehrer et Cline, 1969 ; Diamond et *al.*, 1980 ; Decleva et *al.*, 2006). Cependant, les personnes déficientes en MPO sont couramment asymptomatiques (Kutter, 1998). De ce fait, la MPO paraît nécessaire au processus d'élimination de microorganismes mais son absence peut être plus ou moins compensée par les autres éléments impliqués dans la microbicidie.

L'activité oxydase est à l'origine d'un autre phénomène primordial dans l'élimination des pathogènes : la compensation de la charge induite par le transfert d'électrons dans le phagolysosome et la libération de H⁺ dans le cytosol. En effet, la NADPH oxydase est électrogénique, ce qui signifie que le transfert d'électrons à travers la paroi vacuolaire génère une charge au niveau de la membrane. Cette variation du potentiel de membrane stoppe rapidement le flux d'électrons à moins que la charge ne soit compensée par le passage d'ions chargés positivement du cytosol au phagolysosome ou d'ions négativement chargés dans le

sens opposé (Henderson et *al.*, 1987 ; DeCoursey et *al.*, 2003). Or, dans le neutrophile, la compensation de charge induite par l'activité NADPH oxydase est réalisée jusqu'à 95% par transfert de protons H^+ dans le phagosome, via des canaux protons spécifiques (VSOP ou Hv1) et/ou via la NADPH oxydase elle-même (Maturana et *al.*, 2002 ; Murphy et DeCoursey, 2006 ; Okochi et *al.*, 2009). Ce flux massif de H^+ dans le phagolysosome permet de maintenir l'activité oxydase, de fournir les protons essentiels à la conversion de O_2^- en H_2O_2 et HOCl, de prévenir les écarts de pH dans le cytoplasme et le phagolysosome, et ainsi fournir un environnement optimal au neutrophile.

Plus récemment, le cation K^+ a également été proposé dans le processus de compensation de charge dans le neutrophile à hauteur de 5% environ (Reeves et *al.*, 2002 ; Rada et *al.*, 2004 et 2008 ; Segal, 2005), ainsi que l'anion Cl^- (Ahluwalia, 2008). L'existence d'un faible flux potassique dans le neutrophile n'est pas remise en cause mais son importance dans la microbicidie est controversée. Selon les travaux du Pr Segal et de ses collaborateurs, le maintien d'un pH alcalin et la force ionique dus à l'entrée de K^+ dans le phagolysosome permettent la dissociation des protéases cationiques attachées à la membrane granulaire négativement chargée. Après solubilisation dans le compartiment phagolysosomal, elles sont activées et peuvent dégrader les bactéries. L'oxydase a dès lors pour principale fonction de fournir un environnement alcalin et hypertonique afin d'activer les protéases qui seraient les agents bactéricides majeurs. Or, de nombreuses observations vont à l'encontre d'une hypothèse aussi réductrice sur le rôle de la NADPH oxydase (pour revue voir : Murphy et DeCoursey, 2006 ; Rada et *al.*, 2008). Notamment, on peut noter le fait que ce flux de K^+ , également observé par l'équipe du Dr Ligeti, se produit quasiment intégralement durant la phase initiale de production d' O_2^- alors que la bactéricidie n'est pas encore totalement efficace. En effet, il a été observé que 70% des mouvements de K^+ ont déjà eu lieu lorsque l'activité oxydase du neutrophile n'est qu'à 20-25% de son taux maximal et pourtant le taux de bactéricidie de *S. aureus* n'est alors que de 10% (Rada et *al.*, 2004).

I.4. La microbicidie par le neutrophile

L'élimination de microorganismes pathogènes est un processus complexe qui requiert la migration du neutrophile, la phagocytose du pathogène, la production de dérivés de l'oxygène et la dégranulation avec libération des enzymes et peptides antimicrobiens. Le fonctionnement correct de chacune de ces étapes est nécessaire à une microbicidie efficace de tous les pathogènes. Comme indiqué précédemment, la microbicidie intraphagolysosomale est

le résultat de l'action concertée des espèces réactives de l'oxygène, des enzymes et peptides antimicrobiens, et du flux ionique de compensation de charge qui soutient l'activité oxydase et maintient un environnement optimal. Cependant, l'importance de chacun des éléments microbicides dépend de la nature du microorganisme.

Ainsi, des neutrophiles de patients CGD sont quasiment incapables d'éliminer des microorganismes tels que *S. aureus* et *C. albicans* mais peuvent tuer *E. coli* presque aussi efficacement que des neutrophiles normaux (Weiss et al., 1985 ; Rada et al., 2004 ; Decleva et al., 2006). Les microorganismes responsables de la majorité des infections dans la CGD sont *S. aureus*, *Aspergillus* spp., *Candida* spp. et des enterobacilles Gram-négatif dont notamment *Serratia marcescens*, *Salmonella* spp. et *Burkholderia cepacia* (Winkelstein et al., 2000 ; van den Berg et al., 2009). Les bactéries « catalase-négative » sont rarement observées dans les infections CGD. Il est supposé l'existence d'un phénomène de compensation par le H₂O₂ généré par le pathogène dans le phagolysosome des neutrophiles CGD (Winkelstein et al., 2000). Cependant, certains pathogènes « catalase-positif » impliqués dans la CGD restent virulents même en cas de déficience de leur catalase (Chang et al., 1998 ; Messina et al., 2002). Ainsi, d'autres facteurs de virulence peuvent être à l'origine de la pathogénicité observée chez les patients CGD.

Concernant *S. aureus* et *C. albicans*, leur élimination peut aussi être inhibée *ex vivo* dans des neutrophiles déficients en MPO. Sachant que ces neutrophiles ont une activité oxydase normale, voire augmentée, et sont doués du processus de dégranulation, on peut supposer que des mécanismes MPO-dépendants sont absolument requis pour une destruction optimale de *S. aureus* et *C. albicans* (Diamond et al., 1980 ; Decleva et al., 2006).

Des expériences réalisées sur des souris transgéniques dépourvues d'élastase et/ou de cathepsine G ont confirmé que la combinaison de l'activité NADPH oxydase et des enzymes antimicrobiennes est absolument requise pour éliminer efficacement tous les microorganismes. Des souris KO pour l'élastase sont sensibles aux infections par *C. albicans* et par des bactéries Gram négatif mais pas par des germes Gram positif tels que *S. aureus*. A l'inverse, avec un défaut en cathepsine G, les souris résistent à *C. albicans* mais pas à *S. aureus*. Finalement, un défaut simultané en cathepsine G et élastase conduit à un défaut de microbicidie équivalent à celui obtenu avec des neutrophiles CGD (Reeves et al., 2002 ; Belaaouaj et al., 1998 ; Tkalcevic et al., 2000).

Les enterobacilles *Pseudomonas* sont des pathogènes opportunistes à Gram négatif et « catalase-positif », fréquemment rencontrés dans les infections nosocomiales. Des *Pseudomonas spp* sont responsables d'infections observées chez les patients CGD et plus particulièrement *Pseudomonas cepacia*, reclassée en *Burkholderia cepacia* (Winkelstein et al., 2000 ; van den Berg et al., 2009). L'espèce *P. aeruginosa*, phénotypiquement apparentée à *B. cepacia*, est responsable d'infections pulmonaires opportunistes principalement chez les patients atteints de mucoviscidose (fibrose kystique du poumon). *P. aeruginosa* possède un système de sécrétion de type III qui peut lui permettre d'accomplir la lyse cytotoxique des cellules de l'hôte dont celle des neutrophiles (Dacheux et al., 1999). Ce système de sécrétion de type III est généralement très actif dans les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose. Au contraire, les souches non-mucoïdes de *P. aeruginosa* ont un système de sécrétion de type III très peu actif et sont donc nettement plus sensibles à la bactéricidie par les neutrophiles. La souche non cytotoxique de *P. aeruginosa* utilisée dans le cadre de nos travaux est la souche standard PAO1 (B.W. Holloway).

Au-delà de leur fonction microbicide immédiate dans le neutrophile, les dérivés de l'oxygène sont des molécules pro-inflammatoires stimulant la réponse immunitaire. Or, les patients atteints de CGD souffrent également de syndromes d'hyper-inflammation. Ceci a été longtemps mis sur le compte d'hyper-inflammations secondaires à des infections par des germes non identifiés car décapités précocement par le traitement antibiotique. Des travaux récents ont démontré que les hyper-inflammations observées chez les patients CGD peuvent être plutôt expliquées par une dysrégulation immunitaire (pour revue voir Rosenzweig, 2008). De plus, les patients CGDX et leurs mères porteuses de la mutation sur *CYBB* qui ont schématiquement une activité oxydase réduite de 50 % par rapport aux neutrophiles normaux, souffrent également de maladies auto-immunes (lupus érythémateux, discoïde). Il apparaît que les syndromes d'hyper-inflammation peuvent être secondaires à :

- Une production d'espèce réactives de l'oxygène importante par activation de l'oxydase des phagocytes lors d'une infection d'un sujet sain par des pathogènes types *S. Aureus*, *Aspergillus*, *C. albicans* (germes principaux rencontrés dans la CGD), pouvant entraîner des dommages inflammatoires au niveau des tissus infectés.

- Une très faible production de dérivés oxygénés soit par activation partielle de l'oxydase, soit par activation d'analogues de la famille des Nox (cf. § III) dans les tissus infectés, permettant l'élimination de microorganismes et virus tels que *Helicobacter pylori*,

Cryptococcus, *Influenza*, et induisant à long terme des syndromes hyper-inflammatoires et auto-immuns (cas des patients CGD et de mères vectrices X-CGD) (Schäppi et *al.*, 2008).

Des mécanismes physiopathologiques et moléculaires expliquant les hyper-inflammations des patients CGD ont été récemment avancés. Ces hyper-inflammations pourraient être dues à des défauts de chimiotactisme, de phagocytose, d'apoptose, et de dégradation de matériel phagocyté. Ces défauts fonctionnels chez les patients CGD seraient liés à une production anormale de cytokines pro-inflammatoires suite à une activation du gène NFκB indépendante des dérivés oxygénés (Bylund et *al.*, 2007), à la diminution de l'expression de certains récepteurs de l'immunité (Hartl et *al.*, 2008), mais également à une dysrégulation du catabolisme du tryptophane entraînant une absence de tolérance vis-à-vis des cellules T (Romani et *al.*, 2008). Ainsi, les dérivés oxygénés pourraient avoir un rôle anti-inflammatoire direct, leur absence ou la très faible quantité produite dans la CGD expliquerait les hyper-inflammations observées dans cette maladie.

II. La NADPH oxydase phagocytaire

La NADPH oxydase est un complexe multi-protéique composé d'un élément membranaire, le cytochrome *b*₅₅₈, de protéines cytosoliques p47*phox*, p67*phox* et p40*phox* (*phox* pour « phagocytic oxidase ») et de deux petites protéines G Rac1/2 et Rap1A.

Dans les phagocytes au repos, les composants de l'oxydase sont dissociés et répartis entre la membrane plasmique ou granulaire et le cytosol (Figure 3). Les protéines p40*phox*, p47*phox*, p67*phox* sont associés dans le cytosol selon une stoechiométrie 1 :1 :1 (Lapouge et *al.*, 2002). Rac2 est aussi localisée dans le cytosol, liée à son inhibiteur RhoGDI (Rho Guanosine-5'-diphosphate dissociation inhibitor) (Kwong et *al.*, 1993). Rap1A est ancrée à la membrane avec le cytochrome *b*₅₅₈ (Quinn et *al.*, 1992b). Lors de l'activation du phagocyte par des éléments pathogènes, une série d'interactions protéine-protéine et protéine-lipide se produisent. Les facteurs cytosoliques p47*phox*, p67*phox* et p40*phox* subissent des événements de phosphorylation et migrent vers les membranes plasmiques où ils se fixent au cytochrome *b*₅₅₈. Rac2 subit de même une translocation à la membrane, convertie sous sa forme active c'est-à-dire liée à une molécule de GTP (guanosine-5'-triphosphate) (Quinn et *al.*, 1993 ; Bokoch et Zhao, 2006). L'association des différentes sous-unités déclenche l'activité oxydase avec transfert des électrons du NADPH cytosolique vers une molécule d'oxygène via une molécule de FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) (Figure 3).

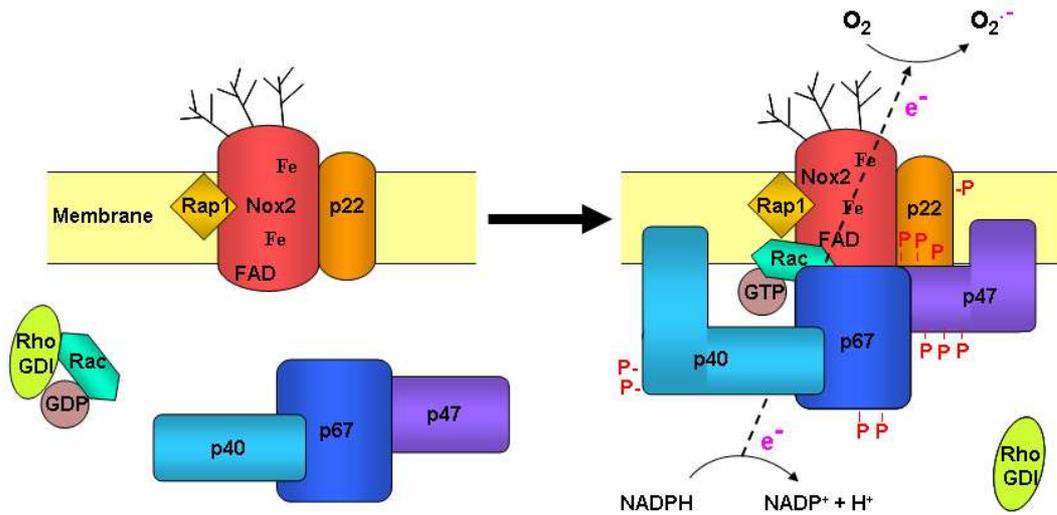


Figure 3: Modèle d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire. Les sous-unités membranaires Nox2 (gp91*phox*) et p22*phox* forment le cytochrome *b*₅₅₈. La molécule de FAD et les hèmes (Fe) sont liés à Nox2. Au repos, les composants cytosoliques p40*phox*, p67*phox* et p47*phox* forment un hétérotrimère, et la protéine Rac est maintenue inactive dans le cytosol, associée à RhoGDI et à une molécule de GDP (guanosine-5'-diphosphate). Lors de l'activation, la protéine Rac est libérée de RhoGDI, convertie sous forme active avec fixation d'une molécule de GTP et recrutée à la membrane. Les trois protéines p40*phox*, p67*phox* et p47*phox* subissent des événements de phosphorylation (-P) et s'associent au cytochrome *b*₅₅₈ à la membrane plasmique. Un transfert d'électrons peut alors avoir lieu du NADPH, via le FAD et les hèmes, vers l'oxygène moléculaire pour former des O₂⁻.

II.1. Le flavocytochrome *b*₅₅₈

Le cytochrome *b*₅₅₈ est une flavohémostéine intégrée à la membrane, constituée de deux sous-unités : la sous-unité α ou p22*phox* et la sous-unité glycosylée β ou gp91*phox* ou Nox2 (Parkos et *al.*, 1987 ; Huang et *al.*, 1995 ; Wallach et *al.*, 1996). Les deux sous-unités sont assemblées selon une stœchiométrie 1 :1. Le cytochrome *b*₅₅₈ a été identifié en 1978 dans les vacuoles phagocytaires de granulocytes humains (Segal et *al.*, 1978). Il a été référencé en tant que cytochrome *b*₅₅₈ du fait de la valeur de sa bande d'absorption α à 558 nm (Cross et *al.*, 1984) mais il est également nommé cytochrome *b*-245 en rapport avec son potentiel standard de réduction inhabituellement bas de -245 mV (Jesaitis et *al.*, 1995). Le cytochrome *b*₅₅₈ porte un FAD (flavin adenine dinucleotide) et deux groupements prosthétiques héminiques avec des potentiels redox de -225 et -265 mV à pH 7.0 (Sumimoto et *al.*, 1992 ; Segal et *al.*, 1992 ; Quinn et *al.*, 1992a ; Cross et *al.*, 1995b). La réaction de transfert d'électrons se déroule en deux étapes : une première étape de transfert d'un électron du NADPH au FAD (activité

diaphorase) suivie d'une seconde étape via les groupements héminiques pour finalement réduire l'oxygène en O_2^- (Figure 3) (Doussière et *al.*, 1996 ; Li et *al.*, 1997 ; Cross et *al.*, 1999b).

Dans les neutrophiles au repos, la plupart du cytochrome b_{558} est concentrée dans les granules (spécifiques), et seulement 5 à 20 % sont retrouvés au niveau de la membrane plasmique (Ginsel et *al.*, 1990). Lors de l'activation du neutrophile, les granules fusionnent à la fois avec la membrane de la vacuole phagocytaire mais aussi avec la membrane plasmique (Morel et *al.*, 1985).

II.1.1. Nox2/gp91phox

La sous-unité gp91phox ou Nox2 est une glycoprotéine de 570 acides aminés de 65,3 kDa, glycosylée sur trois des cinq sites potentiels de N-glycosylation : Asn¹³², Asn¹⁴⁹, Asn²⁴⁰ dans le neutrophile humain (Harper et *al.*, 1985 ; Wallach et *al.*, 1997). Nox2 est l'élément redox de l'oxydase. Nox2 est codée par le gène *CYBB* localisé sur le bras court du chromosome X au locus Xp21.1 (Royer-Pokora et *al.*, 1986).

Son profil d'hydrophobicité indique la présence de six hélices α transmembranaires en N-terminal, contenant les trois sites extracellulaires de glycosylation situés sur deux des boucles extracellulaires du modèle proposé. Dans ce modèle (Figure 4), les premiers acides aminés sont cytosoliques (Palet et *al.*, 2004) et Nox2 comporte deux boucles intracytosoliques B et D. La boucle B est impliquée dans l'interaction entre Nox2 et p47phox (DeLeo et *al.*, 1995a), les arginines 91 et 92 étant particulièrement essentielles à l'assemblage des facteurs cytosoliques (Biberstine-Kinkade et *al.*, 1999). La boucle D, localisée près du 5^e passage transmembranaire, participe au transfert des électrons du FAD aux hèmes, en particulier les résidus chargés Lys¹⁹⁵, Arg¹⁹⁸ et Arg¹⁹⁹ (Li et *al.*, 2005). Les deux hèmes non identiques sont liés à quatre résidus histidines du 3^e et 5^e passage transmembranaire de Nox2 : His¹⁰¹/His¹¹⁵ et His²⁰⁹/His²²². Leur incorporation est nécessaire au maintien de la structure de Nox2 et ils participent au transfert des électrons du FAD à travers la membrane (Yu et *al.*, 1997 ; DeLeo et *al.*, 2000 ; Biberstine-Kinkade, 2001).

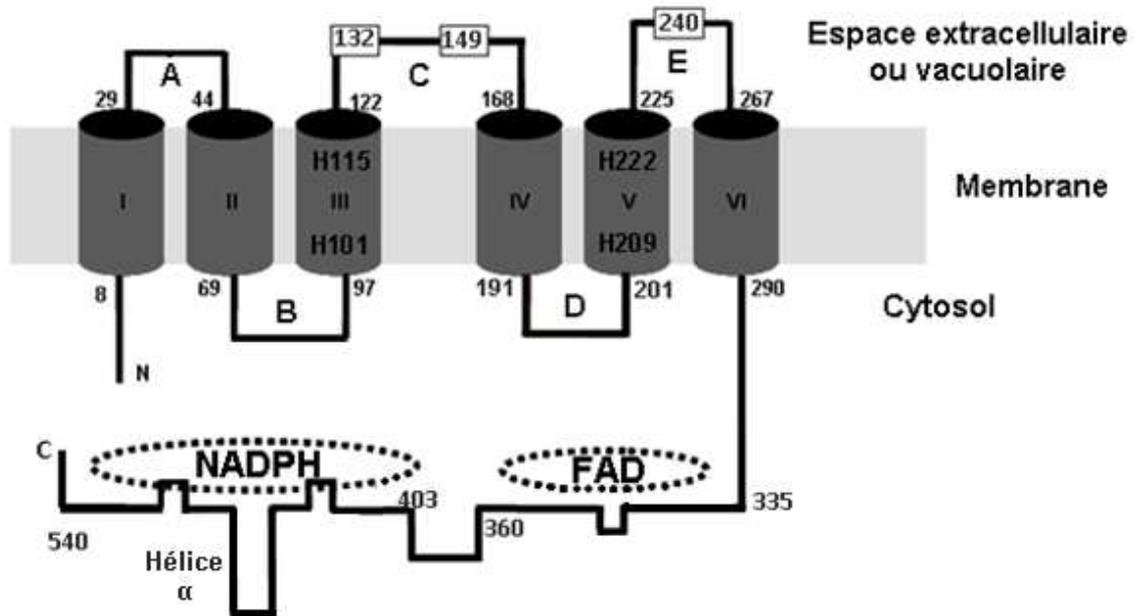


Figure 4 : **Modèle structural de Nox2.** Les asparagines glycosylées situées sur les boucles externes sont indiquées par leur numéro de résidu, et les histidines liant les hèmes par la lettre H suivie de leur numéro de résidu. Les domaines potentiels de fixation du NADPH et du FAD sont encadrés en pointillés.

La partie C-terminale cytosolique contient les sites potentiels de fixation du FAD et du NADPH, déterminés par comparaison avec des séquences de flavoenzymes de la famille des ferredoxines NADP réductases (FNR) (Taylor *et al.*, 1993). Les sites de liaison potentiels du FAD sont localisés au niveau des acides aminés ³³⁸HPFTLSA³⁴² et ³⁵⁴IRIVGD³⁵⁹ (Segal *et al.*, 1992, Sumimoto *et al.*, 1992). Ces deux séquences sont similaires à celles engagées dans la liaison de l'anneau isoalloxazine et de la chaîne ribityl du FAD dans les FNR et glutathion réductases. Il a été prouvé que le résidu His³³⁸ est primordial à l'incorporation du FAD et que cette incorporation est directement impliquée dans la stabilité du cytochrome *b*₅₅₈ (Yoshida *et al.*, 1998). Quant au NADPH, il se fixe au niveau de quatre régions potentielles : la région riche en glycine ⁴⁰⁵MLVGAGIGVTPF⁴¹⁶ contenant le motif GXGXXP qui s'associerait au pyrophosphate du NADPH via des liaisons hydrogènes, la région ⁴⁴²YWLCR⁴⁴⁶ dont la tyrosine formerait une liaison hydrogène avec le ribose du NADPH, la région ⁵⁰⁴GLKQ⁵⁰⁷ qui fixerait l'adénine du NADPH, et le double motif Cys⁵³⁷-Gly⁵³⁸ qui lierait le nicotinamide du NADPH (Rotrosen *et al.*, 1992 ; Sumimoto *et al.*, 1992). Selon la structure 3D de Nox2 prédite par Taylor *et al.* en 1993, l'hélice α ⁴⁸⁴DESQANHFVHHDEEKD⁵⁰⁰, localisée près du site de fixation de l'adénine du NADPH, recouvrirait le sillon dans lequel le NADPH se fixe. Durant

l'activation de l'oxydase, l'accès du NADPH pourrait être régulé par l'interaction de cette hélice α avec les facteurs cytosoliques (Li *et al.*, 2007). Cette région, et notamment les résidus Asp⁴⁸⁴, His⁴⁹⁰, and Asp⁵⁰⁰, est essentielle au processus de transfert des électrons du NADPH au FAD (Li *et al.*, 2005).

Nox2 est synthétisée sous forme d'un précurseur gp65 contenant des chaînes latérales riches en mannose (Porter *et al.*, 1994). La maturation complète de Nox2 requiert la présence de p22phox qui facilite la glycosylation et stabilise Nox2 (Yu *et al.*, 1997 ; Maly *et al.*, 1993). Les protéines Nox2 et p22phox isolées sont rapidement dégradées par le protéasome (DeLeo *et al.*, 2000 ; Block *et al.*, 2007). Nox2 mature porte une majorité de N-acetyl glucosamine et galactose, et une minorité de sucres mannose, glucose, fucose et xylose (Harper *et al.*, 1985). La glycosylation n'est pas nécessaire à la fonction catalytique de Nox2 mais semble protéger la protéine de la dégradation protéolytique (Paclet *et al.*, 2001).

Selon certains travaux, Nox2 serait aussi un canal à protons participant au processus de compensation de charge lors de sa propre activation (Henderson *et al.*, 1998 ; Maturana *et al.*, 2002). Les histidines 111 et 119 situées de part et d'autre de l'histidine 115 de Nox2 pourraient former un motif permettant le transport de H⁺ en parallèle du transfert d'électrons. Cependant, ce rôle de canal à proton est controversé et Nox2 ne serait pas elle-même le canal à protons mais modulerait le flux de protons via d'autres canaux à protons voltage-dépendants (Banfi *et al.*, 1999 ; Murphy et Decoursey, 2006). Le canal à protons impliqué pourrait être le canal VSOP (« voltage sensor only protein ») ou Hv1, qui a récemment été localisé dans la membrane plasmique et la membrane phagosomale de phagocytes (Sasaki *et al.*, 2006 ; Okochi *et al.*, 2009).

II.1.2. Sous-unité p22phox

La sous-unité p22phox est une protéine de 195 acides aminés, de 21 kDa. Elle est codée par le gène *CYBA* situé sur le bras long du chromosome 16 (locus 16q24) (Dinauer *et al.*, 1990). Contrairement à celui de Nox2, qui est uniquement exprimé dans des cellules lymphoïdes et myéloïdes, l'ARNm de p22phox a été détecté dans d'autres types cellulaires. P22phox contient une région riche en proline en C-terminal (¹⁵⁶PPRPP¹⁶⁰ et ¹⁷⁷GGPPGGP¹⁸³) qui interagit avec les domaines SH3 (src homology region 3) (Leto *et al.*, 1994 ; Sumimoto *et*

al., 1994). D'après la prédiction des domaines hydrophobes et les études d'interactions cytosoliques, *p22phox* contiendrait deux passages transmembranaires mais certains travaux prédisent jusqu'à quatre passages (Figure 5) (Davis *et al.*, 1998 ; Heyworth *et al.*, 2003 ; Taylor *et al.*, 2004 ; Groemping et Rittinger, 2005). *P22phox* n'est pas le centre redox de l'oxydase mais est indispensable à la maturation du cytochrome b_{558} et à l'assemblage du complexe oxydase. Elle participe en effet à la stabilité du complexe et interagit directement via son domaine PRR avec les facteurs cytosoliques, notamment avec *p47phox* (Porter *et al.*, 1994 ; Leusen *et al.*, 1994a ; Dahan *et al.*, 2002). Il est à noter que certains travaux suggèrent une implication de *p22phox* dans l'incorporation et la coordination d'un des hèmes (Quinn *et al.*, 1992a ; Foubert *et al.*, 2001).

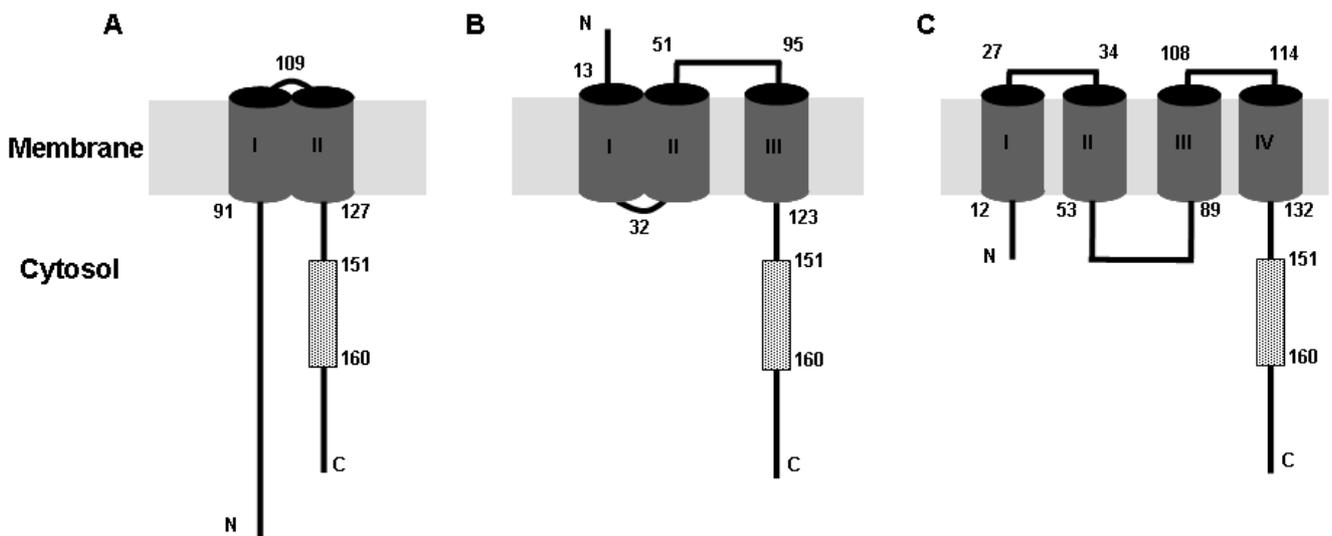


Figure 5 : Modèles structuraux de *p22phox*. La région PRR est représentée par un rectangle gris. A) Avec deux passages transmembranaires, d'après Taylor *et al.*, 2004. B) Avec trois passages transmembranaires, d'après Groemping *et al.*, 2005. C) Avec quatre passages transmembranaires, d'après Heyworth *et al.*, 2003.

II.1.3. Le processus de transfert d'électrons

Le mécanisme de transfert d'électrons implique sept étapes d'oxydoréduction (Figure 6). La première étape consiste en un transfert de deux électrons du NADPH au FAD (1). Puis un électron est transféré depuis le FADH₂ réduit jusqu'à l'hème interne. Il y a formation d'un composé radicalaire FAD[•] (2). Sachant que l'hème ne peut accepter qu'un seul électron à la

fois, l'hème interne réduit d'abord l'hème externe (3) avant de recevoir le deuxième électron du FAD° (5). L'hème externe réduit transfère ensuite un électron à une molécule d'oxygène, conduisant à la génération d'un anion superoxyde (4). Le second électron suit alors le même cheminement de l'hème interne vers l'hème externe (6) et enfin vers l'oxygène (7).

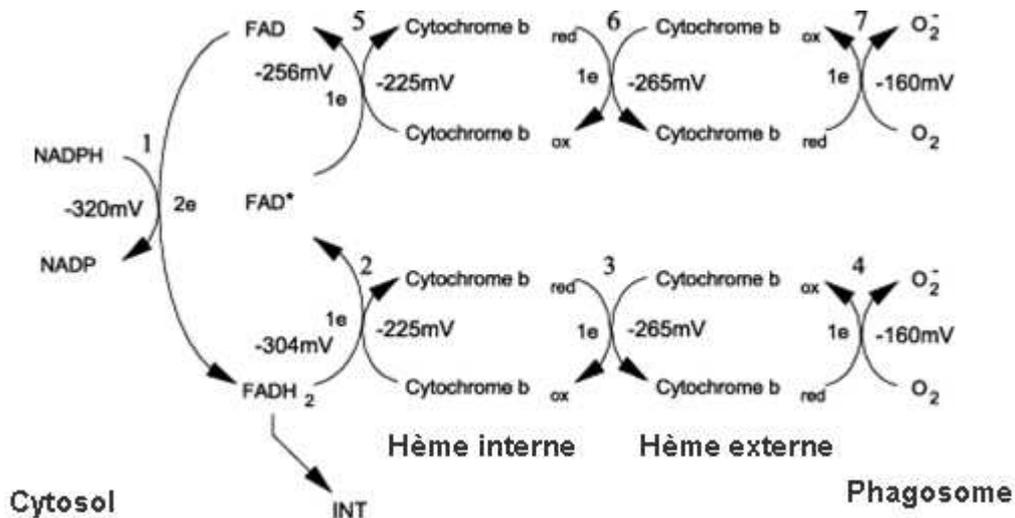


Figure 6 : Mécanisme de transfert d'électrons par le cytochrome b_{558} . Le transfert de deux électrons du NADPH s'effectue en 7 étapes d'oxydoréduction avec passage des deux électrons vers le FAD (1), puis transmission d'un premier électron via les hèmes (2, 3, 4) et enfin transfert du second électron à partir du FAD° via les hèmes (5, 6, 7). L'activité diaphorase correspond aux étapes 1 et 2. INT : iodonitrotétrazolium. (D'après Cross et Segal, 2004)

L'activité diaphorase correspond au transfert d'électrons jusqu'au centre redox du FAD. Cette activité peut être distinguée de l'activité NADPH oxydase en employant un accepteur final d'électron de potentiel redox compatible avec le transfert direct des électrons depuis le FAD : l'INT (iodonitrotétrazolium). La région de Nox2 responsable de cette activité correspond aux résidus 221 à 570. L'activité diaphorase est intrinsèque et ne nécessite pas la présence de facteurs cytosoliques. Cependant, les facteurs $p67phox$ et Rac permettent de la stimuler (Han *et al.*, 2001 ; Nisimoto *et al.*, 2004).

II.2. Rap1A

Rap1A est une petite protéine G de 22 kDa, très abondante dans les neutrophiles, membre de la famille Ras. Les petites protéines G lient les nucléotides guanidiques guanosine-

5'-triphosphate et -diphosphate (GTP et GDP). Elles sont actives lorsqu'elles sont liées à une molécule de GTP. Le gène codant Rap1A est situé sur le chromosome 1 (locus 1p13.3). Rap1A est associée au cytochrome *b*₅₅₈ selon une stoechiométrie 1:1 dans les neutrophiles (Quinn et *al.*, 1992b). Rap1A possède un site de géranylgeranylation en C-terminal qui permet son ancrage à la membrane. L'association avec le cytochrome *b*₅₅₈ est inhibée par une phosphorylation de Rap1A en C-terminal réalisée par la protéine kinase A AMPc-dépendante (Bokoch et *al.*, 1991). La phospholipase D (PLD) via la phosphorylation de la protéine kinase C (PKC) a également été impliquée dans l'activation de Rap1A (M'Rabet et *al.*, 1998). Sous sa forme active, c'est-à-dire liée au GTP, Rap1A se fixe plus étroitement au cytochrome *b*₅₅₈ (Bokoch et *al.*, 1991).

Le rôle de Rap1A n'a pas encore été clairement élucidé. Elle pourrait être *in vivo* un régulateur de la NADPH oxydase. Des travaux montrent que Rap1A pourrait augmenter l'efficacité de la voie de transduction du signal PKC-dépendante, et d'autres, réalisés sur les cellules HL-60, suggèrent un rôle d'activateur final de l'activité oxydase (Labadia et *al.*, 1993 ; Maly et *al.*, 1994 ; Gabig et *al.*, 1995). Rap1A est activée par de nombreux stimuli tels que le fMLF, le PAF ou le GM-CSF « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor », et ceci même en l'absence de cytochrome *b*₅₅₈ (M'Rabet et *al.*, 1998).

II.3. Les facteurs cytosoliques du complexe oxydase phagocytaire

II.3.1. Sous-unité p47phox

Le facteur p47phox est une protéine de 390 acides aminés, de 44,7 kDa, codée par le gène *NCF1* situé sur le bras long du chromosome 7 au locus 7q11.23 (Lomax et *al.*, 1989). La sous-unité p47phox tient la fonction « d'organisateur » ou « d'adaptateur » en permettant la translocation de p67phox et p40phox à la membrane. En effet, la translocation de p47phox se déroule normalement dans les neutrophiles déficients en p67phox alors que p67phox reste cytosolique dans les neutrophiles déficients en p47phox (Heyworth et *al.*, 1991). De plus, p47phox n'est pas indispensable en système reconstitué (cell-free system) en présence d'un large excès de p67phox et Rac (Koshkin et *al.*, 1997).

P47phox contient quatre domaines fonctionnels caractéristiques lui conférant sa fonction d'adaptateur (Figure 7):

- 1 domaine PX (*phox* homology) en N-terminal : 4-128

- 2 domaines SH3 (Src homology domain 3) en tandem : 156-215 et 226-285
- 1 domaine auto-inhibiteur AIR (auto-inhibitory region) : 292-340
- 1 domaine riche en proline PRR (proline-rich region) : 360-369

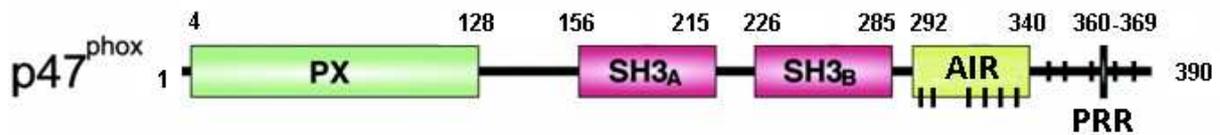


Figure 7 : Domaines structuraux de p47phox. Les acides aminés sérines phosphorylés au cours de l'activation sont indiqués par un tiret noir. (D'après Groemping et Rittinger, 2005)

Le domaine PX de p47phox peut se lier aux produits phosphatidylinositides de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) et principalement au phosphatidylinositol-4-phosphate [PI(4)P] et au phosphatidylinositol-3,4-biphosphate [PI(3,4)P₂] (Ago et al., 2001 ; Kanai et al., 2001 ; Karathanassis et al., 2002). Le domaine PX de p47phox possède une seconde poche de liaison aux lipides qui peut contenir des phospholipides comme la phosphatidylsérine (PS) et l'acide phosphatidique (PA). L'occupation simultanée des deux poches est possible et améliore l'affinité de p47phox pour les membranes (Karathanassis et al., 2002). Les phosphatidylinositides et les phospholipides PA et PS peuvent à eux seuls stimuler la NADPH oxydase (Tamura et al., 1993 ; Peng et al., 2003). La fixation de p47phox à ces lipides est indispensable pour sa translocation et une production d'anions superoxydes correctes (Ago et al., 2003).

Les domaines SH3 de p47phox sont impliqués dans la liaison à p22phox : le tandem SH3 de p47phox prend en « sandwich » la région PRR de p22phox située entre les résidus 151-160 (Nobuhisa et al., 2006). Quant au domaine PRR de p47phox, il est engagé dans l'association avec le domaine SH3 C-terminal du facteur p67phox (Finan et al., 1994 ; Lapouge et al., 2002 ; Massenet et al., 2005). Cette association est renforcée par des interactions entre le segment C-terminal restant de p47phox (résidus 372 à 386) et le domaine SH3 C-terminal de p67phox (Kami, 2002). Certains travaux suggèrent que lors de la formation du complexe oxydase actif, les régions impliquées dans l'association entre p47phox et p67phox évoluent : le domaine SH3_B de p47phox interagirait alors avec la région PRR de p67phox (de Mendez et al., 1996 et 1997).

En absence de stimulation, p47*phox* est maintenue sous une conformation auto-inhibée (Yuzawa et *al.*, 2004 ; Durand et *al.*, 2006 ; Marcoux et *al.*, 2009). Dans cette conformation, le domaine PX et la région auto-inhibitrice AIR interagissent simultanément avec le tandem SH3 de la protéine. Cette interaction intramoléculaire prévient le recrutement de p47*phox* à la membrane en absence de stimulation (Figure 8). Lors de l'activation du neutrophile, différentes sérines de la région AIR subissent une phosphorylation conduisant, en coopération avec d'autres agonistes tels que l'acide arachidonique (Shiose et Sumimoto, 2000), à un changement conformationnel de p47*phox* qui dévoile les domaines SH3 et PX (Ago et *al.*, 1999 ; Marcoux et *al.*, 2009). P47*phox* peut alors transloquer à la membrane et participer à l'activation de la NADPH oxydase via l'interaction de son domaine PX avec les phosphatidylinositides insérés à la membrane, et via la liaison de son tandem SH3 au domaine PRR cytoplasmique de p22*phox*.

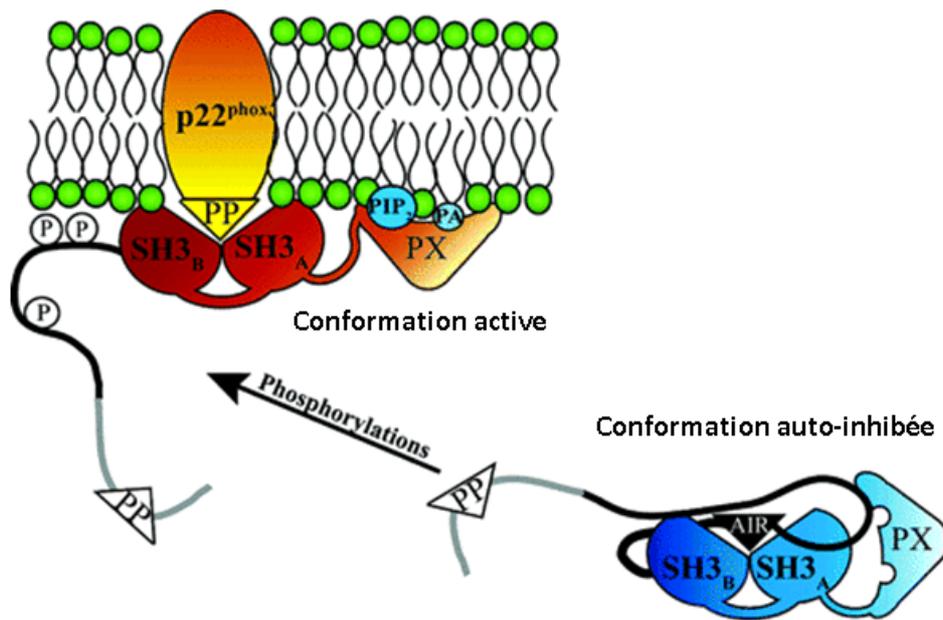


Figure 8 : Modèle de p47*phox* dans sa configuration auto-inhibée (au repos) et activée. Les événements de phosphorylation, levant les interactions intramoléculaires de p47*phox*, sont schématisés par un P encerclé. PP, PA et PIP2 correspondent, respectivement, à la région PRR, à l'acide phosphatidique et au phosphatidylinositol-3,4-biphosphate. La région auto-inhibitrice AIR est tracée en noir. (D'après Durand et *al.*, 2006)

II.3.2. Sous-unité p67^{phox}

Le facteur p67^{phox} est une protéine de 526 acides aminés, de 59,8 kDa, codée par le gène *NCF2* localisé sur le chromosome 1 au locus 1q25 (Volpp et al., 1988 ; Nuno et al., 1988). Le facteur p67^{phox} est considéré comme « l'activateur » du complexe oxydase, son association au cytochrome *b*₅₅₈ est essentielle à l'activité oxydase (Vergnaud et al., 2000 ; Li et al., 2007). L'étude de l'association de p67^{phox} avec le cytochrome *b*₅₅₈ préalablement inséré dans des liposomes a révélé des modifications conformationnelles détectables par microscopie à force atomique (Paclat et al., 2000). Ainsi, p67^{phox} peut être à l'origine d'effets allostériques sur l'activité catalytique du cytochrome *b*₅₅₈. P67^{phox} présente quatre types de domaines fonctionnels (Figure 9):

- 2 domaines SH3 : 240-298 et 457-515
- 4 séquences TPRs (tetratricopeptide repeats) : 3-36 ; 37-70 ; 71-104 et 120-154
- 1 « domaine d'activation » AD : 199-210
- 1 région PRR : 219-236
- 1 motif PB1 (*Phox* and Bem1) : 351-429

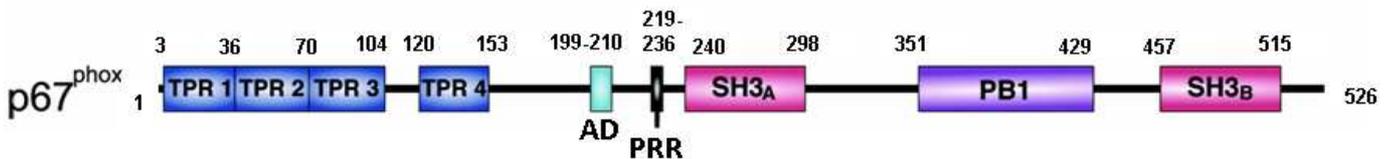


Figure 9 : Domaines structuraux de p67^{phox}. La localisation de l'acide aminé Thr²³³ phosphorylé au cours de l'activation est indiquée par un tiret noir. AD : « activation domain ». (D'après Groemping et Rittinger, 2005)

Une séquence TPR « tetratricopeptide repeat » est une séquence dégénérée de 34 acides aminés, impliquée dans des interactions protéine-protéine et dans l'assemblage de complexes multiprotéiques. Les 4 TPRs de la région N-terminale de p67^{phox} sont requises dans la liaison à la protéine Rac (stœchiométrie 1:1) (Ahmed et al., 1998 ; Lapouge et al., 2000 ; Grizot et al., 2001a). Deux autres sites adjacents aux séquences TPR seraient engagés dans cette interaction : la séquence 170-199 et le « domaine d'activation »

¹⁹⁹LKGAVVASVVD²¹⁰ qui est essentiel à l'activité oxydase (Han et *al.*, 1998). Il a été proposé qu'après liaison de RacGTP à p67phox, le domaine d'activation adoptait une structure interagissant avec le cytochrome *b*₅₅₈ (Nisimoto et *al.*, 1999 ; Dang et *al.*, 2001a). Le domaine d'activation joue un rôle critique dans la régulation du flux d'électrons et plus probablement dans le transfert d'électrons du NADPH au FAD (Cross et *al.*, 1995a ; Dang et *al.*, 1999a). Ainsi, p67phox avec RacGTP sont les éléments activateurs du cytochrome *b*₅₅₈ (Gorzalczany et *al.*, 2002).

Le domaine SH3_B de p67phox permet la translocation de p67phox en se fixant spécifiquement à la région PRR de p47phox. La spécificité et la haute affinité de cette interaction provient d'une part de la liaison du motif PxxP du domaine SH3_B de p67phox à 8 résidus du domaine PRR de p47phox (Gln362-Pro369), et d'autre part de contacts directs entre le domaine SH3_B et le segment C-terminal restant de p47phox (résidus 372-386 formant deux hélices α reliées par un coude) (Kami, 2002). Certains travaux suggèrent que lors de la formation du complexe oxydase actif, les régions impliquées dans l'association entre p47phox et p67phox évoluent : ce serait alors le domaine SH3_B de p47phox qui interagirait avec la région PRR de p67phox (de Mendez et *al.*, 1996 et 1997). Enfin, le module PB1 de p67phox se lie via des interactions électrostatiques avec p40phox dans les neutrophiles au repos (Nakamura et *al.*, 1998 ; Ito et *al.*, 2001).

II.3.3. Sous-unité Rac

La protéine Rac, membre de la famille des petites GTPases Rho, est un élément essentiel à l'activité oxydase lorsqu'elle est sous sa forme liée au GTP (pour revue voir Bokoch et Zhao, 2006). Il existe deux isoformes de Rac dans les cellules phagocytaires : Rac1 et Rac2. Les deux isoformes comptent 192 acides aminés et présentent 92% d'homologie de séquence (Kwong et *al.*, 1993). Rac2 est prédominante dans les neutrophiles alors que Rac1 et Rac2 sont toutes deux exprimées dans les monocytes et macrophages. Il a été trouvé chez un unique patient une mutation inhibitrice (dominant négatif) à l'origine d'une immunodéficiência sévère caractérisée par une diminution de l'activité oxydase mais également d'autres fonctions du neutrophile (Ambruso et *al.*, 2000 ; Williams et *al.*, 2000). En effet, les neutrophiles de ce patient présentent un défaut de chimiotactisme et de polarisation limitant leur mobilisation vers les sites infectieux, ainsi qu'un défaut de dégranulation du contenu des granules azurophiles.

Le recrutement de Rac à la membrane requiert une geranylgeranylation dans une région polybasique en C-terminal et se réalise indépendamment de celui de p47 $phox$ et p67 $phox$. En outre, la translocation de Rac dans des neutrophiles déficients en Nox2 est moins importante, ce qui laisse supposer une association directe entre Rac et le cytochrome b_{558} (Heyworth et *al.*, 1994). Au repos, Rac est cytoplasmique et associée à une protéine RhoGDI (GDP dissociation inhibitor) qui la maintient sous forme inactive (Kwong et *al.*, 1993). L'activation du neutrophile induit la dissociation de RhoGDI et la translocation de Rac à la membrane (Quinn et *al.*, 1993 ; Abo et *al.*, 1994). Rac est alors convertie sous sa forme active, c'est-à-dire liée à une molécule de GTP, sous l'action d'une protéine GEF (GDP/GTP exchange factor). Rac va alors s'associer à p67 $phox$ et au cytochrome b_{558} et permettre l'activation de l'oxydase (Figure 10).

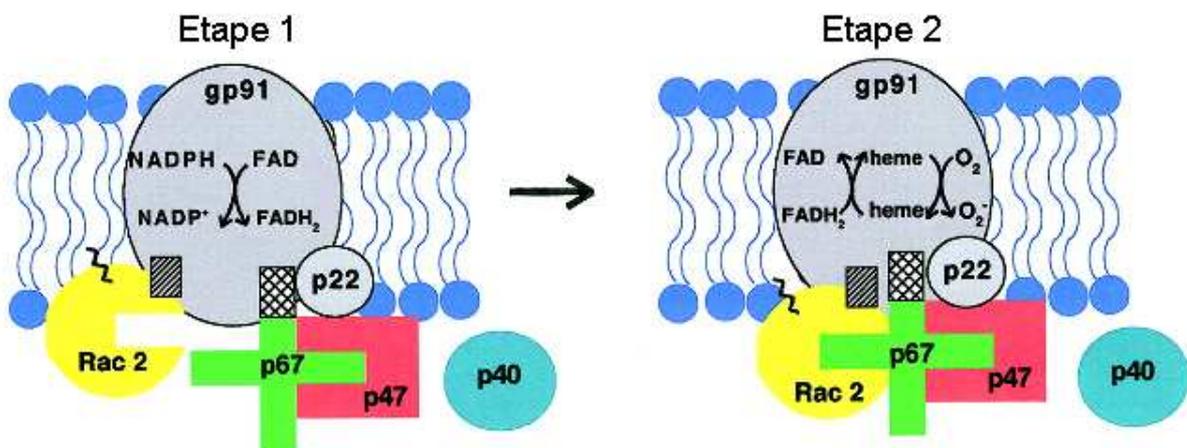


Figure 10: Modèle de régulation de l'activité du cytochrome b_{558} en deux étapes par Rac2. Dans l'étape 1, Rac2 migre à la membrane et interagit avec la bicouche lipidique via sa partie C-terminale. Par l'intermédiaire de sa région « insert » (rectangle hachuré), Rac2 interagit avec le cytochrome b_{558} et contribue à l'activation du flux d'électrons du NADPH au FAD, sans interagir avec p67 $phox$. P67 $phox$ participe à la régulation de ce premier flux d'électrons via son domaine d'activation représenté par un rectangle quadrillé. Dans l'étape 2, Rac2 s'associe à p67 $phox$ et induit un changement de conformation de p67 $phox$ qui permet la poursuite du flux d'électrons du FAD à l'oxygène via les hèmes. (D'après Bokoch et Diebold, 2002)

La région N-terminale de Rac est le site de fixation du GDP et du GTP. Elle contient deux régions « switch » (switch I et II), c'est-à-dire deux régions adoptant une conformation différente selon la nature du nucléotide lié à Rac. Les régions de Rac impliquées dans

l'activation de l'oxydase sont la région switch I (résidus 25-45) et les résidus 143 à 175 pour la liaison à *p67phox*, et la région « insert » (124-135) probablement via son interaction avec le cytochrome *b₅₅₈* (Freeman et *al.*, 1996 ; Nisimoto et *al.*, 1997 ; Toporik et *al.*, 1998). Rac, tout comme *p47phox*, a une fonction « d'adaptateur » en fournissant une plate-forme stable et propice aux interactions entre le cytochrome *b₅₅₈* et *p67phox*. En liant *p67phox*, RacGTP entraînerait un changement de conformation orientant favorablement le domaine d'activation de *p67phox* par rapport au cytochrome *b₅₅₈* (Sarfstein et *al.*, 2004 ; Mizrahi et *al.*, 2006). Il a été proposé que la protéine RacGTP agirait dans un premier temps par elle-même sur le transfert d'électrons du NADPH au FAD en interagissant avec le cytochrome *b₅₅₈*, puis que son association à *p67phox* permettrait la poursuite du transfert des électrons via les hèmes (Figure 10) (Bokoch et Diebold, 2002 ; Kao et *al.*, 2008).

Des protéines GAPs (GTPase-activating proteins), localisées au niveau de la membrane plasmique, peuvent améliorer l'activité GTPase de Rac (hydrolyse du GTP) et ainsi participer à l'arrêt du burst oxydatif (Moskwa et *al.*, 2002 et 2005).

II.3.4. Sous-unité *p40phox*

Le facteur cytosolique *p40phox* est une protéine de 339 acides aminés et de 39 kDa dont l'expression est essentiellement restreinte aux cellules myéloïdes (Wientjes et *al.*, 1993 ; Zhan et *al.*, 1996). Le gène codant *p40phox* est localisé sur le chromosome 22 au locus 22q13.1. La protéine *p40phox* a été mise en évidence par co-purification avec *p67phox* (Tsunawaki et *al.*, 1994). Elle possède trois domaines fonctionnels (Figure 11) :

- 1 domaine N-terminal PX spécifique au PI(3)P : 24-143
- 1 région SH3 : 170-227
- 1 domaine PB1 en C-terminal (type I – motif PC) : 237-329 (motif PC : 283-310)

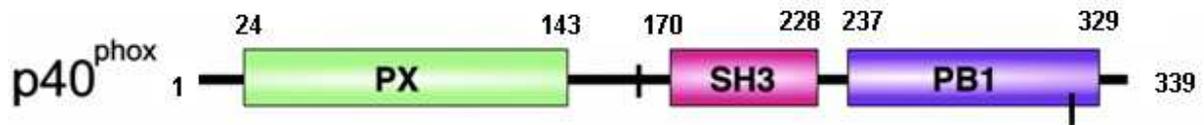


Figure 11 : Domaines structuraux de p40phox. Les deux acides aminés sérine et thréonine phosphorylés au cours de l'activation sont indiqués par un tiret noir. (D'après Groemping et Rittinger, 2005)

La région PX de p40phox est capable de se lier spécifiquement et fortement au phosphatidylinositol-3-phosphate [PI(3)P], la membrane phagosomale étant très enrichie en ce lipide (Ago et *al.*, 2001 ; Bravo et *al.*, 2001 ; Ellson et *al.*, 2001a et 2001b). Au repos, une interaction intramoléculaire du domaine PX avec le domaine PB1 semble empêcher la liaison au PI(3)P (Ueyama et *al.*, 2007). Le domaine PB1 permet d'autre part une interaction très stable avec p67phox via son domaine PB1 (Nakamura et *al.*, 1998 ; Ito et *al.*, 2001). L'interaction avec p67phox stabilise fortement p40phox car p40phox est absente ou en quantité réduite chez des patients atteints de CGD n'exprimant pas p67phox (Tsunawaki et *al.*, 1994). Le motif SH3 de p40phox peut *in vitro* s'associer au domaine PRR de p47phox mais l'affinité de p40phox pour p47phox est moins forte que celle du motif SH3_B de p67phox (Grizot et *al.*, 2001b ; Lapouge et *al.*, 2002 ; Massenet et *al.*, 2005). Par conséquent, il est supposé que l'interaction p47phox-p40phox ne se produit pas *in vivo* dans les neutrophiles. Par contre, il a été démontré que la région SH3 de p40phox pouvait s'associer au domaine PRR de p22phox (Tamura et *al.*, 2007).

La sous-unité p40phox n'est pas essentielle à l'activation de l'oxydase dans le cadre d'expériences en système reconstitué (cell free system) et aucun cas de CGD provenant d'un défaut de p40phox n'a été répertorié. Etant donné son affinité pour le PI(3)P, lipide synthétisé dans la membrane phagosomale, il a été supposé que p40phox pouvait être un « adaptateur » au même titre que p47phox et ainsi participer au recrutement de p67phox (Ellson et *al.*, 2001a et 2001b). Or, les premières expériences réalisées ont conduit à des conclusions contradictoires quant à la fonction de p40phox. En effet, p40phox s'est avéré activateur ou inhibiteur de l'oxydase (Sathyamoorthy et *al.*, 1997 ; Bouin et *al.*, 1998 ; Someya et *al.*, 1999 ; Vergnaud et *al.*, 2000 ; Lopes et *al.*, 2004). Il a notamment été mis en évidence que p40phox permettait

d'augmenter l'affinité de p47*phox* pour le cytochrome *b*₅₅₈ et qu'il favorisait la translocation des facteurs cytosoliques p47*phox* et p67*phox* (Cross et *al.*, 2000 ; Kuribayashi et *al.*, 2002).

Plus récemment, l'importance de p40*phox* dans la production de O₂⁻ a été confirmée dans le cadre d'une activation induite par phagocytose via le récepteur FcγR (Ellson et *al.*, 2006 ; Suh et *al.*, 2006 ; Ueyama et *al.*, 2007 ; Tian et *al.*, 2008). Dans ces conditions, la protéine p40*phox* n'est pas primordiale dans le processus d'assemblage mais plutôt dans la régulation de l'activité après assemblage complet au niveau du phagosome. En effet, la translocation de p67*phox* et p40*phox* au phagosome est antérieure à la clôture du phagosome et à l'accumulation de PI(3)P, donc PI(3)P-indépendante. Par contre, après formation complète du phagosome, l'association de p40*phox* au PI(3)P est nécessaire au maintien d'une activité oxydase soutenue. Ainsi, p40*phox* stimule l'activité oxydase FcγR-dépendante via son association au PI(3)P dans le phagosome mature (Ueyama et *al.*, 2007 ; Tian et *al.*, 2008).

III. Les homologues de l'oxydase phagocytaire : Nox et Duox

(pour revue voir : Lambeth et *al.*, 2007 ; Bedard et Krause, 2007 ; Sumimoto, 2008)

III.1. Caractéristiques des Nox et Duox

III.1.1. Structure des Nox et Duox

Durant les années 90, l'amélioration de la sensibilité des techniques a permis la détection de faibles quantités d'espèces réactives de l'oxygène dans différents types cellulaires autres que les cellules phagocytaires (épithéliales, musculaires, endothéliales, neuronales..etc). Leur production a d'abord été attribuée à la respiration mitochondriale mais l'utilisation d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire et des flavoenzymes a prouvé qu'une flavoprotéine similaire à Nox2 en était responsable. La première enzyme homologue de Nox2 a ainsi été décrite en 1999 (Suh et *al.*, 1999 ; Banfi et *al.*, 2000). Actuellement, six enzymes homologues de Nox2 ont été découvertes et répertoriées dans deux familles : Nox (pour NADPH oxydase) et Duox (pour Dual oxydase) (Figure 12).

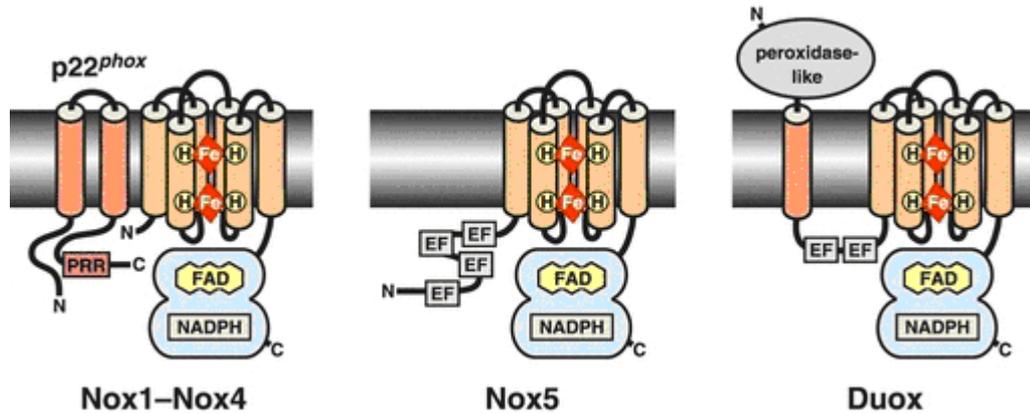


Figure 12 : Modèle structural des différents sous-types d'enzymes Nox et Duox. EF : motif EF-hand liant le calcium, H : histidines en coordination avec les hèmes (Fe). (D'après Sumimoto, 2008)

D'après leur séquence, tous les membres de la famille Nox (Nox1, 2, 3, 4, 5) possèdent six hélices transmembranaires avec les quatre résidus histidines en coordination avec les deux hèmes, et une région C-terminale cytosolique contenant les sites de fixation hautement conservés du FAD et du NADPH. Nox1, 3 et 4 sont quasiment identiques à Nox2 en taille (respectivement 564, 568 et 578 acides aminés). Nox1 et Nox3 présentent 60 % d'homologie de séquence avec Nox2 alors que Nox4 n'en possède que 39 %. Nox5 et les Duox diffèrent beaucoup plus de Nox2 (Figure 12). Nox5 possède une extension N-terminale supplémentaire contenant quatre motifs EF-hand, sites de liaison pour une molécule de calcium. La production de dérivés oxygénés par Nox5 est calcium-dépendante via ces motifs EF-hand (Banfi et *al.*, 2001).

Les deux membres de la famille Duox (Duox 1 et 2) possèdent également une extension N-terminale, formée de deux motifs EF-hand suivis d'une hélice transmembranaire additionnelle et d'un domaine peroxydase-homologue sur la face externe de la membrane plasmique. Elles semblent avoir le pouvoir de générer des $O_2^{\cdot -}$ qu'elles transforment directement en H_2O_2 avec leur propre domaine peroxydase (Ameziane-El-Hassani et *al.*, 2005). Cette double fonction paraît être idéalement adaptée à l'oxydation d'un co-substrat extracellulaire tel que les protéines de la matrice.

III.1.2. Fonction des oxydases non phagocytaires

Ces enzymes sont exprimées dans de nombreux tissus et organes tels que le cerveau, les testicules, l'oreille interne, le système vasculaire...etc. L'expression des oxydases non phagocytaires dans une très large variété de tissus démontre que la production intentionnelle de dérivés réactifs de l'oxygène, loin d'être une particularité réservée aux phagocytes, est une caractéristique de nombreuses et peut-être même de toutes les cellules. A de faibles concentrations, des études récentes indiquent que des mécanismes ont été sélectionnés afin de canaliser ces oxydations dans des voies spécifiques, telles que l'oxydation d'acides aminés catalytiques du site actif de certaines enzymes, menant à une inhibition réversible de leur activité (Lee *et al.*, 2002 ; Meng *et al.*, 2002). De manière générale, les homologues de Nox2 sont supposés être impliqués dans la défense de l'hôte et l'inflammation, la transduction du signal cellulaire, la régulation de l'expression génique, de la croissance cellulaire et la perception de l'oxygène (« oxygen sensing ») (pour revue voir Bedard et Krause, 2007). Par exemple, Nox1 est abondamment exprimée dans le colon où elle serait impliquée dans les défenses de l'hôte, mais elle est aussi retrouvée dans les cellules musculaires lisses vasculaires où elle participerait à la régulation de l'hypertension (Suh *et al.*, 1999 ; Geiszt *et al.*, 2003 ; Gavazzi *et al.*, 2006). Différentes cibles intracellulaires redox-sensibles ont été impliquées dans la signalisation oxydase-dépendante telles que la thioredoxine, des tyrosine phosphatases, des tyrosine kinases et des facteurs transcriptionnels.

La caractérisation de l'implication des oxydases non phagocytaires dans les processus physiologiques et pathophysiologiques est un domaine d'étude en plein essor et ces oxydases sont de plus en plus considérées comme d'éventuelles cibles thérapeutiques dans des pathologies comme le cancer, l'hypertension ou les maladies cardiaques (Bedard et Krause, 2007 ; Lambeth, 2007 ; Sirker *et al.*, 2007 ; Frey *et al.*, 2008 ; Paravicini et Touiz, 2008). Une multitude de processus physiologiques mettent en jeu des voies de signalisation dépendantes des oxydases non phagocytaires. Un des systèmes les plus étudiés est le système vasculaire dans lequel les oxydases sont impliquées dans la régulation de la pression artérielle mais aussi dans des événements patho-physiologiques tels que l'hypertension et l'athérosclérose (Griendling, 2004).

III.1.3. Régulation des oxydases de la famille Nox

Les Nox1, 3 et 4, tout comme Nox2, forment un hétérodimère avec *p22phox*, une association qui est absolument requise pour qu'elles soient fonctionnelles (Figure 13). La

régulation de Nox1 est la plus proche de celle de Nox2. Nox1 a besoin d'un facteur « organisateur », d'un facteur « activateur » et de Rac. Des analogues de p47phox et de p67phox ont été identifiés : respectivement Noxo1 (Nox organizer 1) et Noxa1 (Nox activator 1) (Banfi et al., 2003 ; Takeya et al., 2003). Nox1 produit des O_2^- en présence de ces deux analogues de p47phox et p67phox mais peut aussi s'associer à p47phox et p67phox avec cependant une plus faible affinité. Une activité oxydase peut même être obtenue en associant Noxo1 à p67phox et Noxa1 à p47phox. Contrairement à Nox1 et Nox2, Nox3 est capable de produire des O_2^- en absence d'un « organisateur » ou d'un « activateur ». Cependant, son activité est fortement améliorée par p47phox, p67phox, Noxo1 et/ou Noxa1, cette amélioration étant variable selon la combinaison de facteurs cytosoliques choisie (Cheng et al., 2004).

III.2. Zoom sur Nox4

La protéine Nox4 a initialement été découverte dans le rein humain (nommée Renox) (Geiszt et al., 2000 ; Shiose et al., 2001) mais elle est exprimée dans divers autres types cellulaires. Contrairement aux autres Nox qui sont localisées dans la membrane plasmique, Nox4 se situe dans les membranes internes, au niveau des réticulum endoplasmique et sarcoplasmique (Van Buul et al., 2005 ; Chen et al., 2008). En outre, Nox4 a été détectée dans le noyau cellulaire (Kuroda et al., 2005).

Nox4 présente 39% d'homologie de séquence avec Nox2 et sa structure est quasiment identique à celle de Nox2 exceptée au niveau de deux régions extracellulaires : la boucle C est raccourcie d'une quinzaine d'acides aminés et la boucle E est allongée de 25 acides aminés (Figure 4). L'association de Nox4 à p22phox est absolument nécessaire à l'activité oxydase. Cependant, la région PRR de p22phox, qui participe à l'assemblage des facteurs cytosoliques avec Nox2, n'est pas indispensable avec Nox4 (Kawahara et al., 2005). Or, contrairement aux Nox 1, 2 et 3, Nox4 génère constitutivement des O_2^- et son activité n'est aucunement affectée par les facteurs cytosoliques (Martyn et al., 2006 ; Serrander et al., 2007). Cette indépendance aux facteurs cytosoliques peut expliquer pourquoi la région PRR de p22phox n'est pas essentielle à l'activité oxydase de Nox4. Ainsi, l'augmentation de la production d' O_2^- par Nox4 semble provenir uniquement de l'augmentation de son expression protéique (Touyz et al., 2002 ; Murillo et al., 2007).

Cependant, l'existence de partenaires d'activation reste une éventualité suite à la caractérisation d'isoformes de la protéine Nox4 dominants négatifs (Nox4B et Nox4C)(Goyal

et *al.*, 2005). La surexpression de ces deux isoformes conduit en effet à la réduction de l'activité oxydase. Il se produit probablement un phénomène de compétition, qui peut provenir du détournement de partenaires potentiels de Nox4 encore non identifiés. D'autre part, certains travaux montrent une augmentation rapide de l'activité oxydase Nox4-dépendante, dans des délais apparemment trop brefs pour être compatibles avec une synthèse *de novo* de la protéine (Mahadev et *al.*, 2004). Ainsi, dans les chondrocytes humains, il a été rapporté une augmentation de la production d'O₂⁻ par Nox4, induite par l'interleukine-1β humaine en moins de 20 minutes (Grange et *al.*, 2006). Récemment, une régulation de l'activité de Nox4 par des composés quinoniques a été mise en évidence et les résultats obtenus laissent supposer une action directe de ces molécules sur la partie N-terminale de Nox4 (Nguyen M.V., thèse de science, 2008).

IV. Granulomatose septique chronique : CGD

(Pour revue voir : Stasia et Li, 2008a et 2008b ; van den Berg et *al.*, 2009)

La granulomatose septique chronique ou CGD (chronic granulomatous disease) est un syndrome d'immunodéficience héréditaire rare, survenant à une fréquence d'environ 1/250 000 individus. La CGD provient d'un défaut d'activité de la NADPH oxydase des cellules phagocytaires. Elle se caractérise cliniquement par des infections bactériennes ou fongiques sévères et récidivantes au niveau des tissus superficiels (peau, ganglions) mais aussi profonds (poumons, foie, tractus intestinal, os). La CGD doit son nom à la présence de foyers inflammatoires de types granulomateux, constitués de cellules géantes et multinucléées provenant de la fusion de macrophages ayant phagocytés des microorganismes non éliminés.

Cette maladie, survenant dès le plus jeune âge, est généralement diagnostiquée avant l'âge de un an mais il arrive qu'elle soit diagnostiquée à l'âge adulte (Schapiro et *al.*, 1991; Cathebras et *al.*, 2001). Le traitement actuel de la CGD repose essentiellement sur une prophylaxie antimicrobienne et antifongique, et parfois l'injection d'interférons γ. Les greffes de moelle sont très efficaces mais ce recours reste encore très limité du fait des risques de rejet et de mortalité. D'autre part, des essais de thérapie génique ont été réalisés, à l'origine de

Introduction

résultats encourageants mais encore préliminaires (Barese et *al.*, 2004 ; Ott et *al.*, 2007 ; Cavazzana-Calvo et Fischer, 2007).

La recherche des bases moléculaires de la CGD a permis d'élucider l'origine de l'explosion respiratoire et d'identifier la plupart des composants de la NADPH oxydase. En effet, les sous-unités Nox2, p47*phox* et p67*phox* ont été identifiées du fait de leur absence dans les cellules phagocytaires de patients CGD (Royer-Pokora et *al.*, 1986; Volpp et *al.*, 1988; Nuno et *al.*, 1988). On distingue quatre types de CGD avec deux modes de transmission: les CGD à transmission autosomale récessive affectant les gènes *CYBA*, *NCF1* et *NCF2* codant respectivement p22*phox*, p47*phox* et p67*phox* (CGD-AR), et les CGD à transmission liée au chromosome X touchant le gène *CYBB* codant Nox2 (CGD-X) (Table 1).

Table 1- Les différentes formes de granulomatose septique chronique

Dénomination	Gène impliqué	Protéine affectée	Sous-type	Mode de transmission	Localisation Chromosomique	Fréquence (%)
<u>CGD91X</u>	<i>CYBB</i>	gp91 <i>phox</i> ou NOX2	X91°	Récessive liée à l'X	Xp21.1	50
	Taille : 30 kb		X91 ⁻			3
	Nombre d'exons : 13		X91 ⁺			3
<u>CGD22AR</u>	<i>CYBA</i>	p22 <i>phox</i>	A22°	Récessive autosomale	16q24	5
	Taille : 8,5 kb		A22+			1 cas décrit
	Nombre d'exons : 6					
<u>CGD47AR</u>	<i>NCF1</i>	p47 <i>phox</i>	A47°	Récessive autosomale	7q11.23	33
	Taille : 15,2 kb Nombre d'exons : 11					
<u>CGD67AR</u>	<i>NCF2</i>	p67 <i>phox</i>	A67°	Récessive autosomale	1q25	5
	Taille : 37 kb		A67 ⁻			1 cas décrit
	Nombre d'exons : 16					

Les formes de CGD autosomales récessives sont nettement plus rares que la forme liée à l’X, exceptée la forme touchant le gène *NCF1* codant p47*phox*. Dans ce cas, il existe une mutation plus fréquente : une délétion GT sur l’exon 2. La fréquence élevée résulte d’événements de recombinaisons chromosomiques entre *NCF1* et des pseudogènes possédant cette délétion (Roesler et *al.*, 2000). Enfin, il existe à ce jour un seul cas de CGD lié à une mutation (dominante négative) de *Rac2* (Ambruso et *al.*, 2000 ; Williams et *al.*, 2000).

Près de deux tiers des cas de CGD répertoriés sont des formes récessives liées à l’X affectant *Nox2*. Il existe trois variantes de CGDX classées selon l’expression quantitative et qualitative de *Nox2*:

- CGDX⁰ : cette forme se traduit par une absence d’expression de *Nox2*, provoquant aussi l’absence d’expression de p22*phox* du fait du phénomène d’auto-stabilisation de ces deux sous-unités.
- CGDX⁻ : *Nox2*, et par conséquent le cytochrome *b₅₅₈*, sont synthétisés mais en quantité plus faible que la normale. L’activité oxydase se trouve alors très réduite voire abolie. Ces variants sont généralement dus soit à des mutations faux-sens à l’origine d’une perte partielle de la structure de *Nox2* empêchant la synthèse du cytochrome *b₅₅₈*, soit à des mutations dans le promoteur du gène *CYBB* provoquant la sous-expression de *Nox2* (Stasia et *al.*, 2003).
- CGDX⁺ : cette forme se caractérise par une expression normale de *Nox2* associée à une activité oxydase totalement abolie. Ces variants proviennent généralement de mutations faux-sens dans la partie « codante » du gène (Stasia et *al.*, 2002).

La CGD constitue un formidable modèle d’étude du complexe NADPH oxydase et plus particulièrement les variants CGDX⁺ qui permettent d’accéder à une meilleure compréhension du mécanisme de fonctionnement de l’oxydase (assemblage et interactions, activation, désactivation). Dix-neuf mutations à l’origine de CGDX⁺ ont été répertoriées, principalement dans la partie C-terminale cytosolique de *Nox2* qui est plus particulièrement impliquée dans le fonctionnement de l’oxydase (Figure 13). L’étude de ces variants permet d’établir un lien direct entre une région donnée et une fonction spécifique de *Nox2*. Ainsi,

certaines mutations peuvent illustrer l'importance de séquences telles que les sites de fixation du NADPH et du FAD.

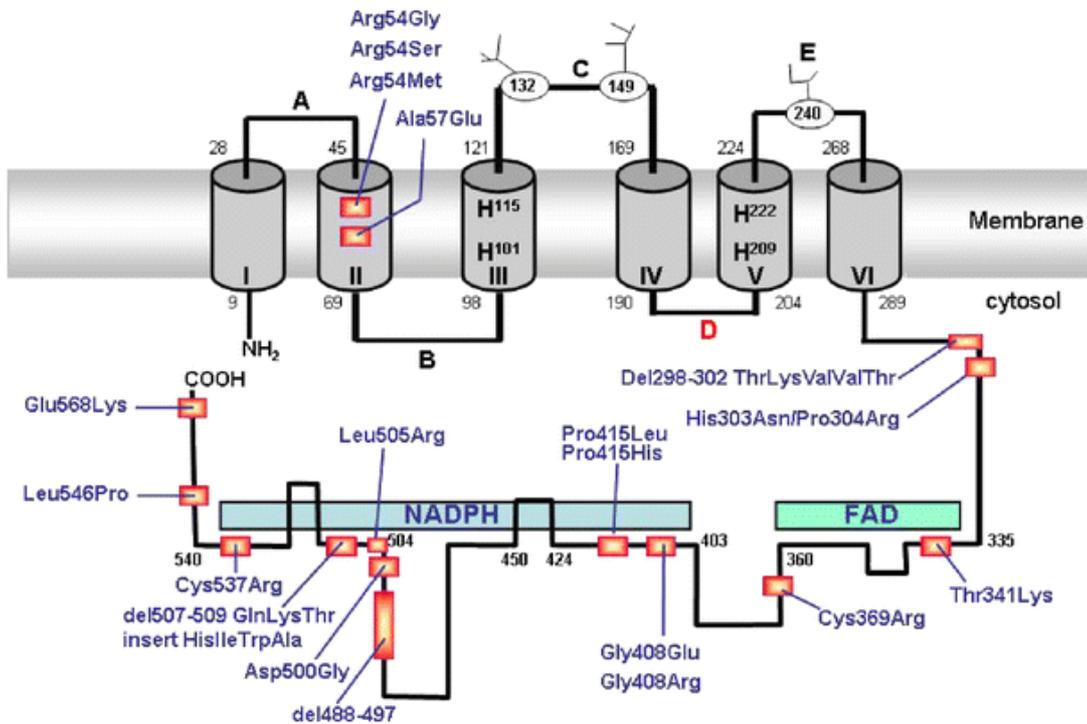


Figure 13: Mutations CGDX⁺ sur le modèle structural de Nox2. Les mutations sont représentées par un rectangle rouge. Les asparagines glycosylées situées sur les boucles externes sont indiquées par leur numéro de résidu, et les histidines liant les hèmes par la lettre H suivie de leur numéro de résidu. Les sites potentiels de liaison du FAD et du NADPH sont illustrés par des rectangles (D'après Stasia *et al.*, 2008a).

V. Activation du complexe NADPH oxydase

V.1. Généralités

L'activité oxydase est spatialement et temporellement régulée, sachant qu'une production excessive et inappropriée d'espèces réactives de l'oxygène par les phagocytes provoque des dommages aux cellules voisines et une inflammation sévère (Babior *et al.*, 1997). L'activation de Nox2 requiert la translocation des sous-unités cytosoliques p47phox, p67phox, p40phox et Rac à la membrane plasmique ou phagolysosomale avec formation d'un complexe oxydatif actif. Le processus de translocation et d'assemblage des facteurs cytosoliques nécessite l'activation de Rac et des phosphorylations réversibles d'acides aminés sérine et

thréonine des facteurs cytosoliques p47phox, p67phox et p40phox, ainsi que de p22phox et Nox2 (Groemping et al., 2005 ; Raad et al., 2009). Ces événements sont induits par divers stimuli via différentes voies de signalisation qui peuvent se recouper ou agir en synergie. L'intensité et la durée de l'activité NADPH oxydase dépendent des stimuli présents et de leur quantité. Parmi les éléments modifiés lors de la stimulation du neutrophile, le métabolisme lipidique ainsi que les flux calciques sont particulièrement importants dans la régulation de la fonction oxydase du neutrophile (Foyouzi-Youssefi et al., 1997 ; Hii et Ferrante, 2007 ; Brechard et Tschirhart, 2008 ; Shmelzer et al., 2003 et 2008).

L'activité oxydase peut-être reconstituée *in vitro* en « cell-free system » réunissant Nox2, p22phox, p47phox, p67phox et Rac (Bromberg et al., 1986 ; Abo et al., 1992). Seul le facteur p40phox paraît non essentiel bien qu'il tienne tout de même un rôle primordial dans l'activité du complexe oxydase *in vivo* (voir § II.3.4). En système reconstitué, le complexe oxydase est activable par ajout d'un détergent tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), ou d'un acide gras insaturé tel que l'acide arachidonique (AA) (Bromberg et al., 1986 ; Abo et al., 1992). Il a été supposé que l'effet activateur de ces composés pouvait provenir de leurs propriétés détergentes qui induiraient une perturbation non spécifique de la membrane et de la structure des facteurs cytosoliques.

Or, l'AA et d'autres acides gras insaturés peuvent stimuler l'activité oxydase des neutrophiles intacts et cette réponse peut être similaire en magnitude à celle obtenue avec le PMA (Badwey et al., 1981 ; Hardy et al., 1995). La phospholipase cytosolique PLA₂, qui est responsable de la libération d'AA, est même requise pour une production optimale de O₂⁻ quel que soit l'agoniste employé (Dana et al., 1998). D'une part, l'AA participe à la stimulation de l'activité de diverses molécules de signalisation impliquées dans l'activation de la NADPH oxydase telles que les protéines kinase PKCs (McPhail et al., 1984 ; Huang et al., 1997 ; Hii et Ferrante, 2007). D'autre part, il a été montré qu'à de fortes concentrations l'AA mimait le changement conformationnel de p47phox lors de sa phosphorylation, mais qu'à plus faibles doses il agissait en synergie avec la phosphorylation de p47phox pour faciliter l'interaction de p47phox avec p22phox (Shiose et Sumimoto, 2000).

En outre, d'autres travaux montrent que l'AA serait requis dans l'activation du complexe oxydase après assemblage (Dana et al., 1994). Notamment, il existerait des sites d'action de l'AA localisés dans la portion N-terminale de Nox2 où l'AA jouerait un rôle dans l'activation du canal à protons H⁺ et dans le transfert d'électrons au niveau du FAD

(Henderson et al., 1995 ; Susztak et al., 1997 ; Mankelow et al., 2003). De même, différents travaux suggèrent que l'AA affecterait l'oxydase par induction de changements conformationnels du cytochrome b_{558} ; l'existence d'un état intermédiaire d'activation dont la transition à l'état activé serait AA-dépendante a même été proposée (Doussière et al., 1999 ; Cross et al., 1999b ; Foubert et al., 2002). Enfin, la PLA₂ migre à la membrane plasmique et interagit avec p47phox, p67phox et Nox2 en réponse au fMLF et au zymosan opsonisé (Shmelzer et al., 2003 et 2008).

L'assemblage de l'oxydase est temporellement limité, avec une perte de détection de p47phox et p67phox au niveau du phagosome, provenant de leur dissociation et/ou dégradation. Les événements à l'origine de la perte d'assemblage et de la désactivation sont mal connus (pour revue voir DeCoursey et Ligeti, 2005). Il est envisagé une modification d'un ou plusieurs éléments de l'oxydase via des dérivés oxygénés compromettant sa fonction et provoquant à terme la dissociation du complexe. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que la cinétique oxydative est prolongée, et la dissociation/dégradation de p47phox et p67phox est différée, dans les neutrophiles déficients en MPO (Jandl et al., 1978 ; Nauseef et al., 1983) ; un événement MPO-dépendant contribue par conséquent à la terminaison de l'activité oxydase, mais il n'est pas suffisant à lui seul.

Il faut noter que le complexe oxydase activé subit, même au plus fort de l'explosion oxydative, un continu processus d'activation et de désactivation avec dissociation et réassociation d'un ou plusieurs facteurs (Akard et al., 1988 ; Cross et al., 1999a et 1999b ; van Bruggen et al., 2004). La production d'O₂⁻ est donc le résultat d'un équilibre entre des mécanismes activateurs et des mécanismes menant à la désactivation du complexe. Actuellement, les événements majeurs de désactivation semblent être des modifications de l'état de phosphorylation de p47phox (déphosphorylation et/ou hyperphosphorylation) et l'inactivation de Rac sous sa forme liée à une molécule de GDP. L'activation constitutive de phosphatases et de GAPs ou la prévention de la phosphorylation de p47phox et l'inhibition de Rac, résultent en une désactivation de l'oxydase quels que soient les mécanismes d'activation appliqués (Moskwa et al., 2002 ; Diebold et al., 2004 ; Gillibert et al., 2005).

V.2. Les voies d'activation de la NADPH oxydase du neutrophile

V.2.1. Voies d'activation par le PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate

Les esters de phorbols comme le PMA ont d'abord été considérés comme des promoteurs de tumeur. Ils induisent divers remaniements génétiques et phénotypiques, dont la stimulation de la NADPH oxydase (Tauber et *al.*, 1982). Cette stimulation provient de l'activation de la protéine kinase C (PKC) qui est un récepteur des esters de phorbol (Cox et *al.*, 1985). Le PMA induit une stimulation forte et continue de la sérine/thréonine kinase PKC. L'activité oxydase qui en résulte présente une longue phase de latence et une cinétique prolongée et intense. De ce fait, le PMA est devenu le contrôle positif le plus communément employé pour l'étude de l'activation du complexe NADPH oxydase.

Le PMA n'est pas un activateur physiologique et active directement la PKC en biaisant toute la signalisation située en amont dans les conditions normales de stimulation du neutrophile (notamment les phospholipases et la PI3K) et sans augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Les neutrophiles humains contiennent cinq des onze isoformes connues de PKCs: trois isoformes conventionnelles cPKC α , β I et β II, qui sont dépendantes de la phosphatidylsérine (PS), du diglycéride (DG) et du Ca^{2+} ; une nouvelle isoforme nPKC δ , qui requiert PS et DG mais est Ca^{2+} -indépendante; une isoforme atypique PKC ζ , DG- et Ca^{2+} -indépendante, mais activée par la PS, l'acide phosphatidique (PA) ou le phosphatidylinositol (Stasia et *al.*, 1990; Spitaler et Cantrell, 2004). L'activation des PKCs dans les neutrophiles est également accompagnée de leur translocation à la membrane au niveau de la NADPH oxydase (Dang et *al.*, 1995; Sergeant et McPhail, 1997).

Ce sont les PKCs α , β et δ qui participent à l'activation de l'oxydase induite par le PMA, l'isoforme β jouant un rôle majeur (Dekker et *al.*, 2000). Les PKCs participent aussi bien à la transduction du signal d'activation qu'à la phosphorylation finale des facteurs cytosoliques (Figure 14). En tant qu'effecteur direct, les PKCs sont susceptibles de phosphoryler les sous-unités du complexe oxydase p22*phox*, p40*phox*, p47*phox* et p67*phox* (cf. § V.3). En tant qu'effecteur indirect, les PKCs activées par le PMA stimulent les MAPKs (mitogen-activated protein kinases) ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) et p38.

La MAPK est une sérine-kinase, effecteur final d'une cascade de signalisation constituée de trois types successifs de protéines kinases : une MAPK kinase kinase (MKKK),

une MAPK kinase (MKK) et enfin une MAPK. Les MAPKs sont classées selon cinq sous-familles : les ERK1/2, la p38, la JNK (c-Jun N-terminal kinase), les ERK3/4 et la ERK5. Les deux isoformes ERK1 (ou p44 MAPK) et ERK2 (ou p42 MAPK) ainsi que la p38 MAPK sont exprimées dans les neutrophiles et impliquées dans la transduction du signal d'activation de l'oxydase et la phosphorylation finale des facteurs cytosoliques (cf. § V.3). Les MAPKs ERK1/2 et p38 sont activées par des voies distinctes menant à des événements de phosphorylation qui peuvent être différents mais aussi convergents, et mener à des réponses additives. Ainsi, dans les neutrophiles stimulés par le PMA, ces deux types de MAPKs participent à la phosphorylation de p67*phox* au niveau de sites distincts (Dang et al., 2003). Les MAPKs ERK1/2 et p38 sont également impliquées dans l'activation de PLA₂ lors d'une stimulation récepteur-dépendante, et l'AA qui est produit participe à la stimulation des PKCs et des MAPKs ERK1/2 et p38 (McPhail et al., 1984 ; Lin et al., 1993 ; Hazan-Halevy et al., 2000 ; Hii et Ferrante, 2007). L'AA est ainsi le constituant d'une boucle de signalisation dans laquelle il régule positivement sa propre production. Dans le cas d'une stimulation par le PMA, seules les MAPKs ERK1/2 participent à l'activation de PLA₂ (Syrbu et al., 1999). D'autre part, le processus d'autorégulation par l'AA a été uniquement établi lors d'une stimulation récepteur-dépendante.

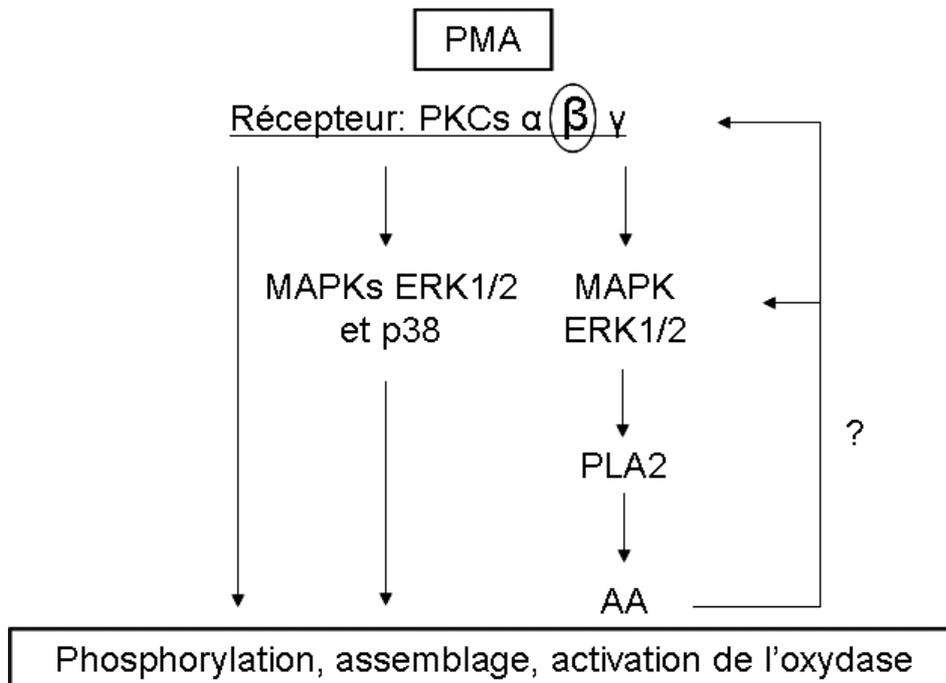


Figure 14: Schéma non exhaustif des voies de signalisation induites par le PMA menant à l'activation de la NADPH oxydase. Le rétrocontrôle positif exercé par l'acide arachidonique sur les kinases PKC et MAPK n'a pas été prouvé lors de l'activation au PMA.

V.2.2. Voies d'activation par le fMLF: formyl méthyl-leucyl-phénylalanine

Le tripeptide formylé fMLF est le principal facteur chemoattractant produit lors de la dégradation de *Escherichia coli* (Marasco et al., 1984). Le fMLF est un puissant chemoattractant pour les phagocytes. Le fMLF se lie à des récepteurs de surface spécifiques aux formyl-peptides bactériens FPRs (formyl peptides receptors). Ces récepteurs régulent en aval le chimiotactisme, la dégranulation et l'activité oxydase. Les FPRs sont couplés à une protéine G (protéine liant le GTP) sensible à la toxine pertussique (PTX-sensible), de la famille Gi (récepteurs **GPCR**). Après association du ligand fMLF, le récepteur subit un changement conformationnel qui permet son interaction avec la protéine G. Il se produit alors une conversion en GTP de la molécule de GDP fixée au niveau de la sous-unité α de la protéine G. Cette conversion s'accompagne de la dissociation des sous-unités β et γ du récepteur qui sont les effecteurs de transduction du signal (Boulay et al., 1990 ; Suzuki et al., 1996).

Les agonistes chemoattractants comme le fMLF induisent une production d' O_2^- de courte durée, avec très peu de phase de latence, sachant que les récepteurs FPRs subissent une inactivation rapide. L'inactivation du récepteur FPR, et donc l'arrêt du signal stimulateur, pourrait être le mécanisme de désactivation de l'oxydase stimulée par un chemoattractant.

En aval de la protéine G, différentes cascades de signalisation sont activées dans les neutrophiles humains (Figure 15). L'association ligand/récepteur engendre notamment l'activation de la phospholipase PLC β qui réalise l'hydrolyse de $PI(4,5)P_2$ en diacylglycérol (DAG) et inositol-(1,4,5)-triphosphate (IP3) (Takenawa et al., 1985 ; Li et al., 2000). L'IP3 entraîne une augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre Ca^{2+} via le système SOCE (store-operated Ca^{2+} entry) (pour revue voir Bréchard et Tschirhart, 2008).

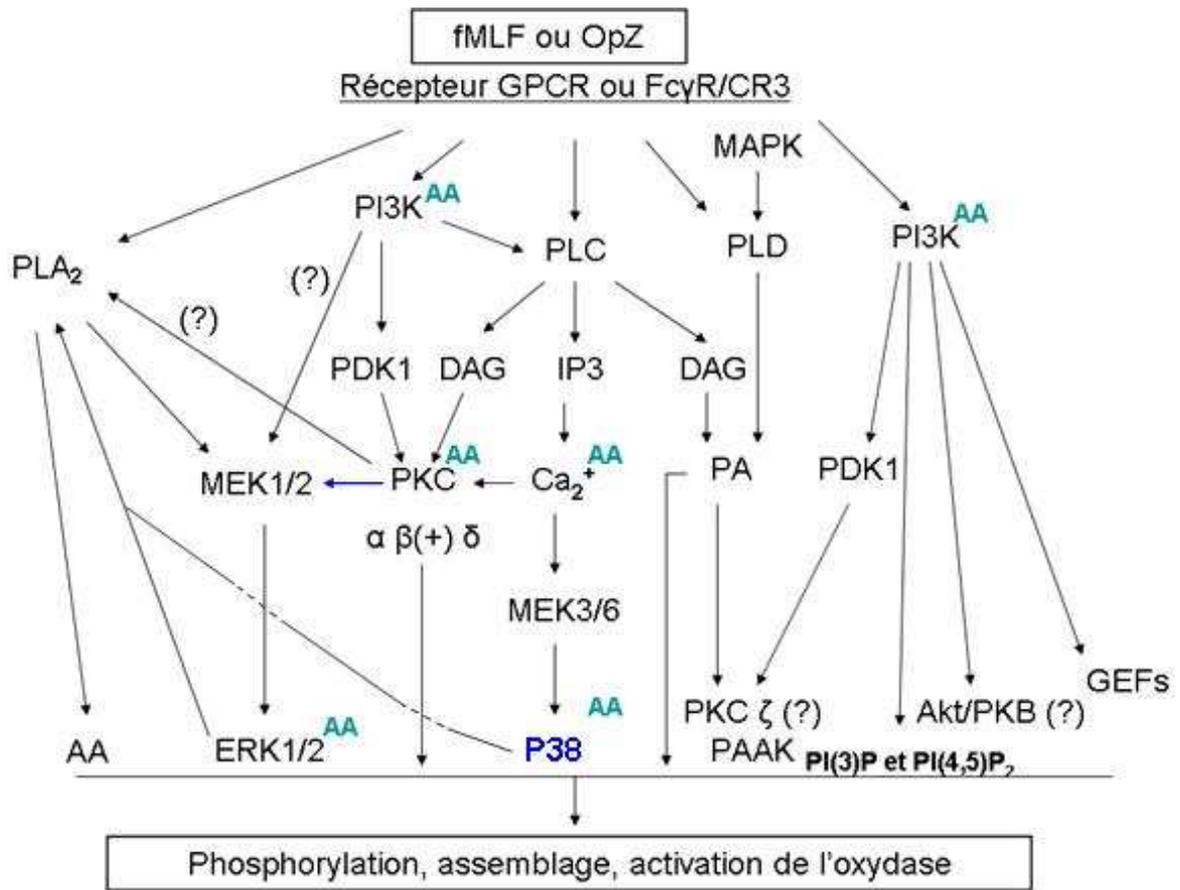


Figure 15: Schéma non exhaustif des multiples voies de signalisation induites par le fMLF ou OpZ menant à l'activation de la NADPH oxydase. L'annotation AA en vert indique que l'activation de la protéine est sensible à l'acide arachidonique. Les éléments inscrits en bleu seraient impliqués uniquement dans la stimulation au fMLF et « ? » indique une absence de résultats consensus.

Dans le système SOCE, l'IP3 stimule son récepteur-canal calcique dans la membrane du réticulum endoplasmique, provoquant une vidange des stocks intracellulaires de Ca²⁺ (Figure 16). La diminution de la concentration en Ca²⁺ dans le réticulum induit, via la molécule STIM1 (stromal-interacting molecule 1), l'activation de canaux calciques SOCs localisés dans la membrane plasmique, qui sont à l'origine d'un afflux extracellulaire de Ca²⁺. L'élévation de concentration cytosolique en Ca²⁺ est transitoire. Le retour à un niveau basal dépend des pompes à Ca²⁺ de la membrane plasmique et des pompes SERCA (sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase) qui sont en charge de reconstituer le stock de Ca²⁺ dans le réticulum.

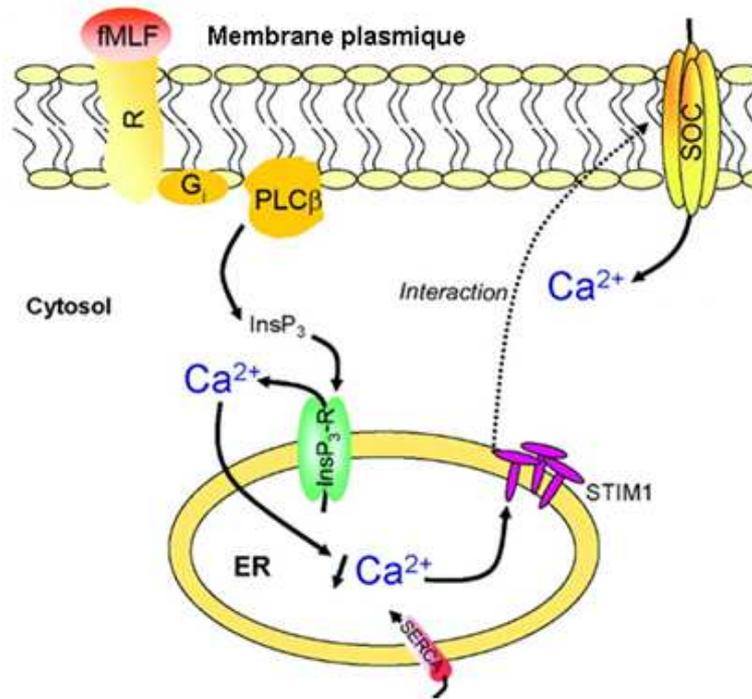


Figure 16: Modèle de régulation de l'influx calcique SOCE-dépendant dans le neutrophile humain activé par les chemoattractants. La fixation du fMLF avec son récepteur induit la génération d'inositol-triphosphate (InsP_3) via l'activation de la phospholipase $\text{C}\beta$ ($\text{PLC}\beta$), qui induit la libération de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (ER) via son récepteur-canal ($\text{InsP}_3\text{-R}$). La diminution du taux de Ca^{2+} dans le réticulum induit, via la molécule STIM1 , l'activation des canaux calciques SOCs situés dans la membrane plasmique et permet l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire. La reconstitution du stock de Ca^{2+} dans le réticulum est réalisée par les pompes SERCA . (D'après Bréchar et Tschirhart, 2008).

L'influx calcique est un des événements les plus précoces lors de l'exposition au fMLF sachant que le calcium fait partie intégrante de la transduction du signal (Heyworth et Badwey, 1990) (Figure 15). Notamment, les PKCs conventionnelles et la PKC δ sont activées en présence de DAG et/ou de calcium. Le DAG produit par la $\text{PLC}\beta$ peut être converti en acide phosphatidique (PA) par une diacylglycérol kinase (Ishitoya et *al.*, 1987) ou par la phospholipase PLD activée par la MAPK (Pai et *al.*, 1988 ; Djerdjouri et *al.*, 1999). Le PA produit est d'une part directement impliqué dans l'activation de l'oxydase du fait de son interaction avec *p47phox*, et d'autre part il stimule l'activité de kinases telles que la PKC ζ (Erickson et *al.*, 1999), kinase qui phosphoryle *p47phox* dans des cellules stimulées par le fMLF (Dang et *al.*, 2001b).

D'autre part, la phosphatidylinositol-3-kinase ou PI3K est également un acteur primordial dans la transduction du signal fMLF-dépendant (Leopoldt et *al.*, 1998 ; Li et *al.*,

2000). Les PI3Ks catalysent la phosphorylation du phosphatidylinositol en phosphatidylinositol-3-phosphate **PI3P** et du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate PI(4,5)P₂ en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate **PI(3,4,5)P₃**. Le PI(3,4,5)P₃ peut être déphosphorylé en PI(4,5)P₂ ou **PI(3,4)P₂** par des phosphatases (Vanhaesebroeck et *al.*, 2001). Dans le neutrophile, le PI(3)P, PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃ participent à la régulation de l'oxydase directement ou indirectement (Brown et *al.*, 2003) (Figure 15). Tout d'abord, diverses GEFs impliquées dans l'activation de Rac possèdent un domaine de liaison au PI(3,4,5)P₃, évoquant une éventuelle intervention de la PI3K dans l'activation de Rac (Welch et *al.*, 2003). Notamment, certains travaux récents suggèrent un rôle important des GEFs P-Rex1 et Vav1 (Kim et *al.*, 2003 ; Welch et *al.*, 2003 et 2005). D'autre part, les PI3Ks peuvent induire l'activation de certaines kinases contribuant à la phosphorylation et activation du complexe oxydase (Didichenko et *al.*, 1996). La PI3K, directement activée par la protéine G du récepteur FPR, peut activer des phospholipases et des kinases phosphatidylinositide-dépendantes telles que la PLC et la kinase phosphoinositide-dépendante PDK1, ainsi que les ERK1/2 (Rane et *al.*, 1997 ; Le Good et *al.*, 1998 ; Leslie et *al.*, 2001 ; Chen et *al.*, 2005 ; Suire et *al.*, 2006). L'activation de la PLC stimule les PKCs DAG- et Ca²⁺-dépendantes, et les isoformes de PKC δ et ζ peuvent être activées par la PDK1. De même, l'activité de la protéine Akt ou PKB, qui serait impliquée dans la phosphorylation de p47phox, dépend des lipides PI(3,4,5)P₃ et PI(3,4)P₂ (Chen et *al.*, 2003 ; Hoyal et *al.*, 2003). Enfin, les phosphatidylinositides sont particulièrement engagés dans l'activité oxydase du fait de leur association aux facteurs cytosoliques p47phox et p40phox dans le complexe oxydase actif (§ II.3.1 et II.3.4).

Pour terminer, parmi les effecteurs couplés aux récepteurs FPRs on retrouve la PLA₂ et l'AA qui sont absolument requis pour une activité oxydase optimale (Dana et *al.*, 1998). Outre un rôle direct sur le complexe oxydase (cf. § V.1), l'AA participe notamment à la stimulation de l'activité des PKCs, des MAPKs ERK1/2 et p38, de la PI3K, et également à la mobilisation des stocks de Ca²⁺ (McPhail et *al.*, 1984 ; Hardy et *al.*, 1995 ; Huang et *al.*, 1997 ; Hii et Ferrante, 2007).

V.2.3. Voies d'activation par les microorganismes et particules opsonisés

La NADPH oxydase est physiologiquement activée lors de la phagocytose de microorganismes ou de particules opsonisées (DeLeo et *al.*, 1999). Dans ce cas, la cinétique oxydative débute relativement lentement, augmente régulièrement jusqu'à 10 à 30 minutes puis diminue tout aussi lentement. L'occupation des récepteurs de surface par le microorganisme se poursuit probablement durant une assez longue période tout au long du processus de phagocytose et de digestion.

La signalisation est initiée via des récepteurs aux immunoglobulines Fc γ (Fc γ RIIA/CD32 et Fc γ RIIIB/CD16) et des récepteurs du complément (CR1 ou CD35 et CR3 ou β 2-intégrine CD11b/CD18). Les récepteurs phagocytaires fonctionnels sont Fc γ RIIA et CR3, alors que les deux autres récepteurs paraissent plutôt être des co-récepteurs facilitant leur fonction (Chuang et *al.*, 2000).

L'ingestion de particules recouvertes d'immunoglobulines G (IgG) est réalisée grâce à l'aggrégation de récepteurs Fc γ RII et la phosphorylation de leurs motifs cytoplasmiques ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) via des tyrosine kinases. Les ITAMs phosphorylés servent de sites d'ancrage à la tyrosine kinase Syk, qui déclenche diverses voies de signalisation, impliquant la PI3K et des protéines Rho (Crowley et *al.*, 1997 ; Caron et Hall, 1998). La phagocytose Fc γ RII-dépendante est accompagnée de l'activation de l'oxydase, d'une production d'AA et de cytokines.

L'ingestion de particules opsonisées par les dérivés du complément C3b/C3bi est réalisée par le récepteur du complément CR3. Il se trouve que des particules uniquement recouvertes de dérivés du complément C3b/C3bi ne sont pas suffisantes à elles seules pour promouvoir la phagocytose. Le neutrophile doit être simultanément en contact avec des protéines de la matrice extracellulaire et stimulé par du PMA ou du fMLF. Cette stimulation parallèle engendre la phosphorylation de CR1 qui active alors la capacité de liaison de CR3 (Brown, 1986 ; Wright et Meyer, 1986).

Il se produit une coopération entre les récepteurs au complément et les récepteurs Fc γ lorsque les cibles recouvertes de C3b/C3bi sont également opsonisées par des anticorps ou lorsque les ligands du CR3 sont glycosylés (Ehlenberger et Nussenzweig, 1977). Ce croisement entre les récepteurs de la phagocytose a été suggéré par le fait que les neutrophiles de patients déficients en CR3 présentent aussi un défaut de phagocytose anticorps-dépendante

(Dana et *al.*, 1984). Il a été prouvé que FcγRIII et CR3 peuvent interagir et activer en synergie la NADPH oxydase (Dahinden et *al.*, 1983 ; Zhou et Brown, 1994). Cette activation de la NADPH oxydase via la coopération entre FcγRIII et CR3 requiert FcγRII mais emprunte une voie de transduction du signal différente de celle empruntée lors d'une stimulation directe du récepteur FcγRII (Zhou et Brown, 1994).

Le zymosan opsonisé par du sérum, ou OpZ, est un agoniste couramment utilisé dans l'étude de l'activité NADPH oxydase induite par phagocytose. Le zymosan est un extrait de levure *Saccharomyces cerevisiae*, phagocyté par les neutrophiles s'il est préalablement opsonisé par du sérum. Le zymosan opsonisé par du sérum stimule simultanément les récepteurs du complément et des immunoglobulines CR3 et FcγR (Yagawa et *al.*, 1985 ; Worku et *al.*, 1995). Il a été clairement mis en cause une activation des différentes phospholipases PLC, PLD et PLA₂ avec d'importantes productions d'AA, de DAG, de PA et autres métabolites lipidiques (Figure 16) (Meshulam et *al.*, 1988, Della Bianca et *al.*, 1991 ; Hazan et *al.*, 1997). Les PKCs sont également activées par l'OpZ et subissent une redistribution au niveau du phagosome (Sergeant et McPhail, 1997). Dans ce cas, c'est encore la PKC β qui a un rôle primordial. Par contre, les PKCs ne participent pas à l'activation des MAPKs ERK1/2, comme c'est le cas lors d'une stimulation par le fMLF (Hazan et *al.*, 1997). Les kinases Akt/PKB et MAPKs participeraient aussi à l'activation de l'oxydase OpZ-dépendante (Hazan-Halevy et Levy, 2000 ; Yamamori et *al.*, 2002 ; Chen et *al.*, 2003). Concernant la p38 MAPK, sa participation est remise en cause par certains travaux (Brown et *al.*, 2004).

Lors d'une stimulation par l'OpZ, l'influx calcique est spatialement et temporellement différent de celui induit par les chemoattractants : la phagocytose de l'OpZ induit deux influx calciques distincts (Dewitt et Hallett, 2002). Tout d'abord, la fixation de la particule sur les récepteurs membranaires de la cellule provoque une première libération de Ca²⁺ intracellulaire près de la membrane plasmique au niveau du point de contact (Dewitt et *al.*, 2003). Ce flux est supposé stimuler la diffusion d'autres molécules réceptrices au point de contact afin de compléter le processus de phagocytose. Les calciosomes mis en jeu sont localisés à la périphérie des vésicules de phagocytose et sont distincts de ceux stimulés par les chemoattractants (Stendahl et *al.*, 1994). Une seconde augmentation globale de la concentration cytosolique en Ca²⁺ se produit au moment de la fermeture du phagosome. Ce second flux de Ca²⁺, provenant de canaux localisés sur toute la surface de la membrane

plasmique, est corrélé à l'activation de la NADPH oxydase. Il semblerait qu'il se déclenche une fois le lipide PI(3,4,5)P₃ accumulé dans la membrane phagosomale et lié au domaine PX de p40*phox* (Ellson et *al.*, 2006 ; Dewitt et *al.*, 2006).

V.2.4. Voies d'activation par l'ionomycine

L'ionomycine est un ionophore à calcium. Les ionophores à calcium sont de petites molécules hydrophobes qui s'intercalent dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire et augmentent la perméabilité au calcium. Comme indiqué précédemment, les changements de concentrations en calcium intracytosolique jouent un rôle majeur dans la signalisation récepteur-dépendante des neutrophiles. L'ionomycine cause un accroissement rapide du taux de calcium cytosolique non seulement par influx extracellulaire mais induit également la libération de calcium stocké dans les calciosomes. L'ionomycine semble directement agir sur les membranes des calciosomes et augmenter leur perméabilité au calcium tout comme sur les membranes plasmiques. L'ionomycine active essentiellement les pools d'oxydase intracellulaires, et ainsi très peu d'O₂⁻ sont produits dans le milieu extracellulaire (Dahlgren et *al.*, 1992). Il a été démontré que l'activation du système SOCE et la signalisation calcium-dépendante qui en découle induit une production d'O₂⁻ essentiellement intracellulaire, provenant d'une activation préférentielle de l'oxydase au niveau des granules plutôt qu'à la membrane plasmique (Granfeldt et *al.*, 2002). L'activation de l'oxydase par l'ionomycine implique au minimum la PKC et les MAPKs ERK1/2 et p38 (Elzi et *al.*, 2001). L'activation des MAPKs couplée au calcium peut alors stimuler la PLA₂ et la production d'AA (Hazan-Halevy et Levy, 2000 ; Hazan-Halevy et *al.*, 2000).

V.3. Rôles des événements de phosphorylation des sous-unités du complexe NADPH oxydase

V.3.1. Phosphorylation de Nox2

La phosphorylation de Nox2 a été très récemment mise en évidence dans le neutrophile humain lors d'une activation par le PMA, le fMLF et l'OpZ (Raad et *al.*, 2009). Cette phosphorylation de Nox2, qui est médiée par la PKC, favorise l'interaction avec p47*phox*, p67*phox* et Rac2, et améliore l'activité diaphorase. Nox2 est phosphorylée dans sa

région cytosolique C-terminale au niveau des séquences 321-405 et 466-570. Ces séquences contiennent trois sites potentiels de phosphorylation par la PKC : Ser³³³, Thr³⁰⁹ et Ser⁵⁵⁰.

V.3.2. Phosphorylation de p22phox

La sous-unité p22phox subit la phosphorylation de résidus thréonines durant l'activation de la NADPH oxydase par le PMA, fMLF et OpZ (Regier et al., 2000). *In vitro*, p22phox est le substrat d'une kinase activée par l'acide phosphatidique (kinase PAAK) et le substrat des isoformes conventionnelles de PKC α et β (Regier et al., 1999). Deux thréonines sont localisées dans un motif consensus de phosphorylation : Thr¹³² dans un motif de phosphorylation par la caséine kinase II, et Thr¹⁴⁷ dans un motif de phosphorylation par la PKC. La fonction physiologique de la phosphorylation de p22phox n'a pas encore été élucidée mais il est tout de même intéressant de noter que la Thr¹⁴⁷ est située juste avant la région PRR (151-160) qui est impliquée dans l'interaction avec les facteurs cytosoliques p47phox, p67phox et p40phox (Figure 5).

V.3.3. Phosphorylation de p40phox

Le facteur p40phox subit des phosphorylations lors de la stimulation de l'oxydase, ces événements se produisant en corrélation avec la production d'O₂⁻ (Fuchs et al., 1997). P40phox est phosphorylée sur des résidus sérine et thréonine dont au minimum les résidus Thr¹⁵⁴ et Ser³¹⁵ (Bouin et al., 1998) (Figure 11). Ces phosphorylations semblent être effectuées directement par la PKC durant l'activation du neutrophile. Or, au repos, une interaction intramoléculaire du domaine PX (résidus 24-143) avec le domaine PB1 (résidus 237-329) semble empêcher la liaison de p40phox au PI(3)P dans la membrane phagosomale (cf. § II.3.4, Ueyama et al., 2007). Il est envisageable que certains des événements de phosphorylation de p40phox lèvent cette interaction intramoléculaire, notamment la phosphorylation de Ser³¹⁵ dans le domaine PB1.

V.3.4. Phosphorylation de p67phox

Le facteur cytosolique p67phox subit quelques phosphorylations mais leur rôle n'est pas encore clairement établi. Indépendamment de p47phox, p67phox est phosphorylée durant l'activation de l'oxydase quel que soit l'agoniste (Dusi et al., 1993; El Benna et al., 1997 ;

Forbes et *al.*, 1999b). La signalisation responsable de cette phosphorylation peut emprunter plusieurs voies : elle est intégralement PKC-dépendante avec le PMA mais partiellement PKC-indépendante lors d'une stimulation par le fMLF (El Benna et *al.*, 1997). Le site majeur de phosphorylation de p67phox est Thr²³³ (Forbes et *al.*, 1999a) mais la présence d'autres sites a été mise en évidence, notamment au niveau de sérines (El Benna et *al.*, 1997 ; Dang et *al.*, 2003) (Figure 9). P67phox est ciblée par les MAPKs ERK1/2 et p38 lors d'une stimulation au PMA et au fMLF (Dang et *al.*, 2003). L'effet de ces kinases est additif et certains de leurs sites cibles semblent différer.

Tout comme p47phox, il se pourrait que p67phox ait une conformation auto-inhibée au repos. En effet, un site de phosphorylation de la portion C-terminale de p67phox (244-526) semble masqué par la portion N-terminale dans la protéine intacte, et ne devenir accessible qu'après un changement de conformation de la protéine. En outre, cette moitié C-terminale a un effet négatif sur l'activation de l'oxydase *in vitro* en système acellulaire (Hata et *al.*, 1998). En effet, même sans AA ou SDS stimulateurs, l'oxydase peut être activée si p67phox est tronquée de sa moitié C-terminale. Et sous l'action de l'AA ou du SDS, qui miment entre autres les événements de phosphorylation, cette inhibition sur la protéine entière est levée. Ainsi, *in vivo*, la phosphorylation de cette portion C-terminale par la p38 MAPK (et dans une moindre mesure par ERK2) pourrait abroger cette régulation négative.

V.3.5. Phosphorylation de p47phox

P47phox est la sous-unité la plus largement phosphorylée, avec un total de 10 à 11 sites de phosphorylation actuellement identifiés, situés dans la moitié C-terminale dans les domaines AIR et PRR (Figure 7). Les acides aminés modifiés sont les sérines 303, 304, (310), 315, 320, 328, 345, 348, 359, 370 et 379 (El Benna et *al.*, 1994 ; Faust et *al.*, 1995 ; Fontayne et *al.*, 2002). Il n'est pas encore clairement établi si toutes ces sérines sont phosphorylées lorsque la protéine est encore cytosolique ou lors de son assemblage à la membrane plasmique au niveau du cytochrome *b*₅₅₈. De plus, l'ordre de succession des phosphorylations n'est que partiellement connu. La principale fonction de p47phox est de permettre la translocation de l'hétérotrimère p40phox-p67phox-p47phox à la membrane et de le positionner correctement au niveau du cytochrome *b*₅₅₈. Au repos, p47phox est maintenue dans une conformation auto-inhibée qui prévient sa translocation (Figure 17). Au cours de la stimulation du neutrophile par des agonistes de l'oxydase, p47phox subit des événements de phosphorylation, notamment au niveau des sérines localisées dans la région AIR (Sérines 303 à 328) (Figure 17). La

phosphorylation simultanée des sérines 303, 304 et 328 dans le domaine AIR, en coopération avec d'autres agonistes comme l'acide arachidonique, induit une ouverture de la structure de p47phox, exposant les domaines SH3 et le domaine PX (Ago et al., 1999 ; Shiose et al., 2000 ; Marcoux et al., 2009). P47phox peut alors s'associer à p22phox et aux phosphatidylinositides à la membrane.

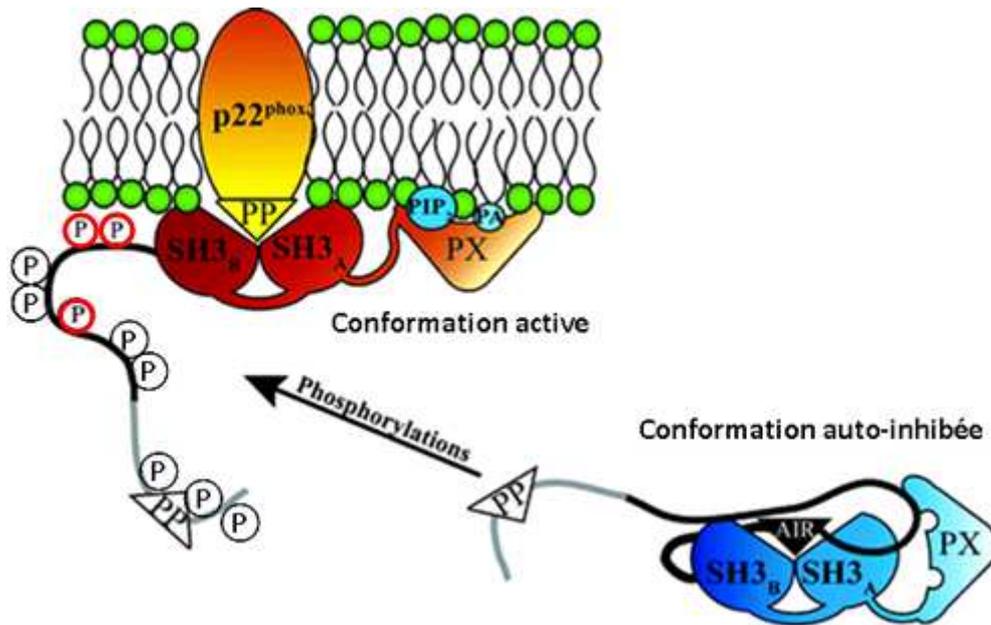


Figure 17: Modèle de conversion de p47phox dans sa conformation active via les événements de phosphorylations. Les sérines phosphorylées lors de l'activation de l'oxydase sont schématisées par un P encerclé. Les sérines 303, 304 et 328, dont la phosphorylation simultanée lève les interactions intramoléculeuses de p47phox, sont schématisées par un P encerclé de rouge. PP, PA et PIP2 correspondent, respectivement, à la région PRR, à l'acide phosphatidique et au phosphatidylinositol-3,4-biphosphate. La région auto-inhibitrice AIR est tracée en noir. (D'après Durand et al., 2006)

La sérine 345 de p47phox est impliquée dans la pré-activation du complexe NADPH oxydase par les cytokines GM-CSF et TNF α (phénomène de « priming »). Ces agents induisent en effet une phosphorylation de Ser³⁴⁵ par les MAPKs, qui provoque une augmentation du degré de phosphorylation de p47phox suite à une stimulation ultérieure. Or, un plus haut degré de phosphorylation s'accompagne d'une augmentation de la translocation et de l'activité oxydase (Dang et al., 1999a et 1999b; Dewas et al., 2003 ; Dang et al., 2006a). La signification de la phosphorylation de la Ser³⁴⁸, située elle aussi dans une séquence consensus reconnue par les MAPKs, n'a pas encore été élucidée (El Benna et al., 1994).

Les trois derniers sites de phosphorylation de p47phox sont localisés dans la région de fixation au domaine SH3_B de p67phox. Les sérines 359 et 370 flanquent la région PRR (362-369) et la sérine 379 se trouve dans le coude entre les deux hélices α du motif non-PxxP impliqué dans la fixation de p67phox (Figure 7). La substitution des sérines 359 et 370 en alanines réduit radicalement la phosphorylation globale de p47phox, ce qui conduit à un défaut de translocation et à une inhibition sévère de la production d'O₂⁻. La phosphorylation de ces deux sérines précède et initie la phosphorylation des autres résidus sérines de p47phox (Johnson et al., 1998). Lors de l'activation, p47phox se présente sous différentes formes plus ou moins phosphorylées, ce qui corrobore l'hypothèse d'une phosphorylation graduelle de p47phox. Seules les formes les plus phosphorylées semblent s'associer à la membrane et l'ancrage à la membrane paraît être nécessaire pour certains événements de phosphorylation (Heyworth et Badwey, 1990 ; Rotrosen et al., 1990). Dans ce modèle, la forme « fermée » de p47phox s'ouvre graduellement grâce à des événements de phosphorylation préalables, nécessaires à la phosphorylation des autres sérines. Cependant, il a aussi été montré que p47phox hyperphosphorylée perdait sa capacité à activer l'oxydase dans les neutrophiles intacts (Yamaguchi et al., 1995). Certaines études laissent supposer que la phosphorylation de certaines sérines pourrait avoir un effet inhibiteur sur l'activité oxydase (Fontayne et al., 2002 ; Mizuki et al., 2005).

Concernant la phosphorylation de Ser³⁷⁹, localisée dans la zone d'interaction avec p67phox, son rôle prête plus à débat. Il a été clairement établi que la substitution de cette sérine par une alanine provoquait une perte de translocation de p47phox et inhibait la fixation de p67phox à la séquence C-terminale de p47phox (Faust et al., 1995 ; Massenet et al., 2005 ; Mizuki et al., 2005). Certains auteurs suggèrent que la phosphorylation de Ser³⁷⁹ lors du burst oxydatif stopperait l'activité oxydase en entraînant la dissociation de p67phox (Mizuki et al., 2005). Cependant, la substitution S379A inhibe aussi la translocation de p47phox alors que, même en absence de p67phox, p47phox est capable de migrer à la membrane (Heyworth et al., 1991). Il se pourrait donc que la phosphorylation préalable de Ser³⁷⁹ soit nécessaire, au même titre que celle de Ser³⁵⁹ et Ser³⁷⁰, pour une ouverture complète de p47phox, la phosphorylation des sérines 303, 304 et 328 et à terme la translocation à la membrane. Dans cette hypothèse, au repos la région PRR de p47phox interagit avec le domaine SH3_B de p67phox. Lors de l'activation du neutrophile, Ser³⁷⁹ est phosphorylée et alors l'association de p47phox avec le domaine SH3_B de p67phox est atténuée. P67phox reste pourtant fixée à p47phox pour s'associer à la membrane, et cette hypothèse peut rejoindre le modèle d'interaction entre p47phox et p67phox établi par de Mendez et ses collaborateurs (de Mendez et al., 1996 et

1997). D'après ce modèle, lors de l'activation et association à la membrane, p67phox reste fixée à p47phox mais via son domaine PRR et le SH3_B de p47phox (cf. § II.3.2). La phosphorylation de Ser³⁷⁹ lèverait la première interaction (p47phox)PRR / SH3(p67phox), à laquelle succèderait l'interaction (p47phox)SH3 / PRR(p67phox). On peut également envisager un maintien simultané des deux interactions.

Ces événements de phosphorylation peuvent être réalisés par diverses kinases et à des degrés variés. Toutes les isoformes de PKC participent à la phosphorylation de p47phox et peuvent induire la production d'O₂⁻. *In vitro*, les cibles des PKCs α, βII et δ sont les sérines 303, 304, 315, 320, 328, 359, 370 et 379, Ser³²⁸ étant la plus intensément phosphorylée (El Benna et al., 1996 ; Fontayne et al., 2002). La PKC ζ ne peut phosphoryler que les sérines 303/304 et 315. La variation du degré de phosphorylation des sites selon les isoformes suggère que les PKCs pourraient avoir des rôles distincts dans les cellules entières, basés sur un ciblage plus spécifique de certaines sérines. Bien que la PKC ζ phosphoryle moins de sites de p47phox, elle induit pourtant une production plus importante d'O₂⁻ (Fontayne et al., 2002). Il est donc envisagé que la phosphorylation de certaines sérines par les PKCs α, β et δ pourrait atténuer l'activité oxydase ; ainsi les événements de phosphorylation par les PKCs ne seraient pas exclusivement activateurs. Les MAPKs ERK1/2 participent aussi à la phosphorylation de p47phox (Dewas et al., 2000). Les MAPKs ERK1/2 et p38 peuvent phosphoryler Ser³⁴⁵, induisant une augmentation de l'activité oxydase de base (Dang et al., 2006b). La protéine kinase PKA a été mise en cause au niveau des sérines 320, 328 et/ou 359/370 (El benna et al., 1996). La kinase Akt ou PKB, effecteur de la PI3K, peut phosphoryler *in vitro* Ser³⁰⁴ et Ser³²⁸, et a été impliquée dans la phosphorylation de p47phox (Chen et al., 2003 ; Hoyal et al., 2003). Cependant, des résultats contradictoires ne montrent aucune implication de Akt mais une activation de PKCs par la PI3K via la phospholipase PLC (Yamamori et al., 2004). D'autres kinases encore sont susceptibles d'induire ces phosphorylations telles que l'effecteur de Rac PAK (p21-activated kinase) et la caséine kinase II (Park et al., 2001 ; Martyn et al., 2005).

VI. Assemblage de la NADPH oxydase : modèles d'interactions protéines-protéines et protéines-lipides

VI.1. Interactions potentielles des facteurs cytosoliques

Différentes interactions entre les trois facteurs cytosoliques *p47^{phox}*, *p67^{phox}* et *p40^{phox}* ont été mises en évidence (cf. § II.3). La combinaison exacte de ces interactions n'est cependant pas totalement établie. Il existe encore de nombreuses incertitudes sur l'existence même de certaines de ces interactions ainsi que sur leur évolution au cours de l'activation de l'oxydase. L'ensemble de ces interactions est résumé dans la figure ci-dessous.

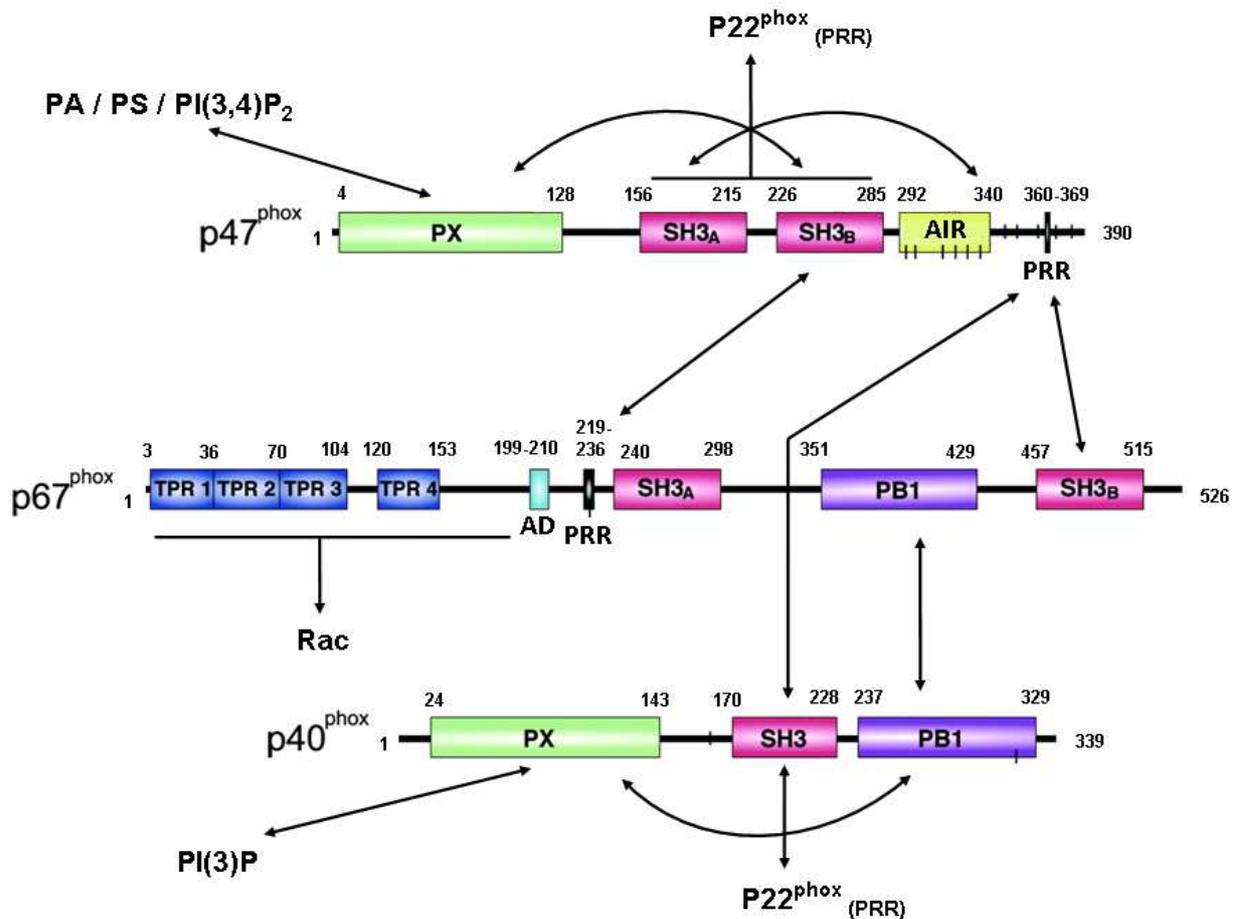


Figure 18: Représentation schématique des interactions possibles entre les facteurs cytosoliques *p47^{phox}*, *p67^{phox}* et *p40^{phox}* sur les modèles structuraux de Groemping et *al.*, 2005. Les flèches indiquent toutes les interactions démontrées expérimentalement. Les interactions des facteurs cytosoliques avec *p22^{phox}* et les lipides de la membrane plasmique sont aussi présentées.

VI.2. Interaction des facteurs cytosoliques avec le cytochrome *b*₅₅₈

Il a été prouvé que les facteurs cytosoliques p47*phox*, p67*phox* et Rac s'associent avec le cytochrome *b*₅₅₈ (Heyworth et al., 1991 ; Pacllet et al., 2000 ; Dang et al., 2001a ; Kao et al., 2008). Les différents sites potentiels de contact entre les facteurs p47*phox*-p67*phox* et le cytochrome *b*₅₅₈ ont été mis en évidence dans un premier temps par l'intermédiaire de cas de CGD⁺. En effet, pour certains patients, l'assemblage de l'oxydase est défectueux, ce qui incrimine possiblement le site muté comme un éventuel point de contact entre le cytochrome *b*₅₅₈ et les facteurs cytosoliques (Figure 19). Cependant, le défaut d'assemblage peut aussi provenir d'un changement conformationnel du cytochrome *b*₅₅₈ engendré par la mutation ponctuelle (Stasia et al., 2002). Sept mutations ont été identifiées chez ces patients, six sur Nox2 au niveau des résidus 303, 304, 369, 408, 500 et 568 (Leusen et al., 1994b ; Leusen et al., 2000 ; Stasia et al., 2002) et une sur p22*phox* sur la proline 156 (Leusen et al., 1994a). D'autre part, la capacité de petits peptides spécifiques à bloquer l'assemblage du complexe et l'activité oxydase a été testée (Park et al., 1997). Quatre régions de Nox2 nécessaires à l'association des facteurs cytosoliques ont été identifiées par cette approche : 87-100, 434-455, 491-504, 559-565. La région 87-100 inclut la séquence 86-93 qui a été impliquée plus particulièrement dans l'interaction avec p47*phox* (DeLeo et al., 1995), et notamment les arginines 91 et 92 qui sont essentielles à l'assemblage (Biberstine-Kinkade et al., 1999). La région 491-504 correspond à l'hélice α 484-500 qui est susceptible de réguler l'accès du NADPH à son site de fixation par interaction avec les facteurs cytosoliques (Taylor et al., 1993). Cette région, et notamment les résidus Asp⁴⁸⁴, His⁴⁹⁰, and Asp⁵⁰⁰, est essentielle au processus de transfert des électrons du NADPH au FAD (Li et al., 2005). En outre, la leucine 505 proche de cette hélice α est cruciale dans l'activation du cytochrome *b*₅₅₈. La mutation L505R de Nox2 est à l'origine d'un cas de CGD X⁺ (Stasia et al., 2005). La reconstitution d'une activité oxydase *in vitro* avec le cytochrome *b*₅₅₈ muté a révélé que la mutation de cette leucine perturbe la fixation du NADPH et des facteurs cytosoliques, plus particulièrement celle de p67*phox* (Li et al., 2007).

De précédents résultats obtenus par la technique de phage display avaient permis de révéler des régions d'interactions du cytochrome *b*₅₅₈ avec p47*phox* en particulier: les segments de Nox2 86-93, 450-457, 554-560, et les régions de p22*phox* 156-160 et 177-183 (DeLeo et al., 1995). Dans le modèle établi, le tandem SH3 de p47*phox* (séquences 156-212 et 226-283) prend en « sandwich » la région PRR de p22*phox* située entre les résidus 151-160. Les acides

aminés indispensables de p22*phox* sont Pro¹⁵², Pro¹⁵⁶ et Arg¹⁵⁸ (Groemping et al., 2003 ; Nobuhisa et al., 2006) ; on retrouve ainsi la proline 156 responsable d'un cas humain de CGDAR22⁺ (Leusen et al., 1994a).

D'autre part, les régions de p22*phox* engagées dans l'assemblage de l'oxydase ont été déterminées grâce à des pentadécapeptides se chevauchant et couvrant toute la séquence de la protéine (« peptides walking ») : 51-63 avec p47*phox*, 81-91 et 111-115 avec p67*phox*, 151-160 (région PRR) avec p47*phox*-p67*phox* (Figure 19) (Dahan et al., 2002). Il a également été mis en évidence une interaction de p40*phox*, via sa région SH3, avec le domaine PRR de p22*phox* (Tamura et al., 2007). Enfin, la séquence 323-332 de p47*phox* interagit avec p67*phox* puis s'associe au cytochrome *b*₅₅₈ pendant l'activation (Nauseef et al., 1993 ; DeLeo et al., 1996).

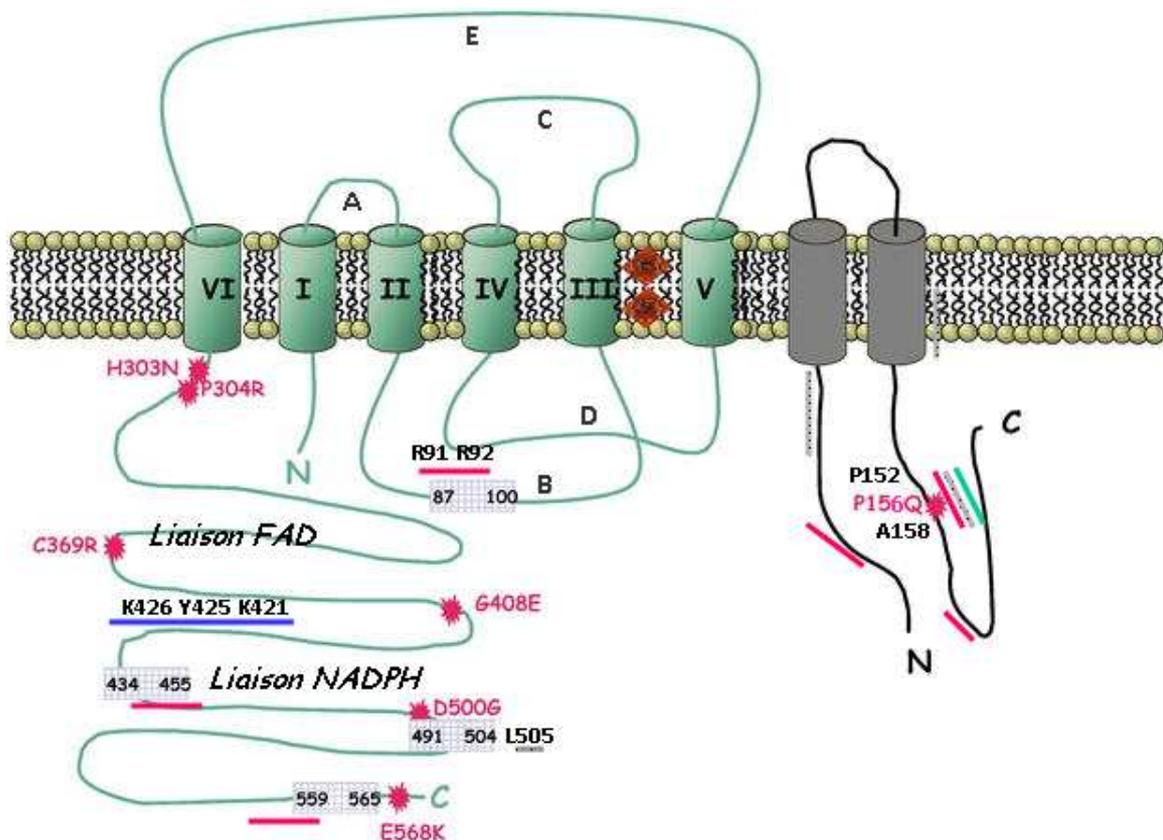


Figure 19: Régions du cytochrome *b*₅₅₈ impliquées dans l'assemblage et l'interaction avec les facteurs cytosoliques. Les sept mutations identifiées chez des patients CGD et associées à un défaut d'assemblage sont indiquées par une étoile rouge. Les régions de Nox2 impliquées dans l'assemblage en général sont représentées par des rectangles gris. Les régions d'interactions spécifiques à p47*phox* sont indiquées par un trait rose, à p67*phox* par un trait gris, à p40*phox* par un trait vert et à Rac par un trait bleu. Les acides aminés cruciaux dans ces interactions sont inscrits. (D'après Nauseef, 2004)

Les expériences avec peptides ont cependant des limites dans la détermination des séquences participant à l'assemblage de l'oxydase. En principe, s'il y a inhibition de l'assemblage par un peptide donné alors on peut conclure que la séquence est impliquée dans l'interaction avec les facteurs cytosoliques, mais s'il n'y a pas d'effet inhibiteur du peptide on ne peut pas conclure définitivement sur l'implication de la séquence dans l'assemblage du complexe oxydase. Par exemple, alors que les mutations H303N et P304R de Nox2 provoquent une inhibition de l'assemblage entraînant un cas de CGD X⁺, un peptide synthétique contenant les acides aminés 296 à 309 ne suffit pas à reconstituer *in vitro* le défaut observé chez les patients (Stasia et *al.*, 2002). Ceci suggère que la modification de ces acides aminés induit des changements conformationnels qui altèrent indirectement le site de fixation des facteurs cytosoliques d'une manière non reproduite par ces peptides. Il est donc nécessaire de combiner plusieurs approches pour statuer définitivement sur l'implication d'un acide aminé ou d'une région dans l'interaction directe avec les facteurs cytosoliques.

Enfin, il a été démontré que la translocation de Rac dans des neutrophiles déficients en Nox2 est moins importante, ce qui laisse supposer une association directe entre Rac et le cytochrome *b*₅₅₈ (Heyworth et *al.*, 1994). D'après certaines études, le domaine « insert » de Rac est engagé dans l'association au cytochrome *b*₅₅₈ (Freeman et *al.*, 1996 ; Bokoch et Diebold, 2002). Dernièrement, le site d'association de Rac avec le cytochrome *b*₅₅₈ a été localisé au niveau des acides aminés 419-430 de Nox2 (Kao et *al.*, 2008). Les résidus particulièrement nécessaires seraient Lys⁴²¹, Tyr⁴²⁵ et Lys⁴²⁶. La confirmation d'une interaction directe entre Rac et le cytochrome *b*₅₅₈ corrobore le modèle d'activation du transfert d'électrons du NADPH au FAD par RacGTP, avant son association à *p67phox* pour la poursuite du transfert des électrons (Bokoch et Diebold, 2002).

VI.3. Modèle d'assemblage du complexe NADPH oxydase

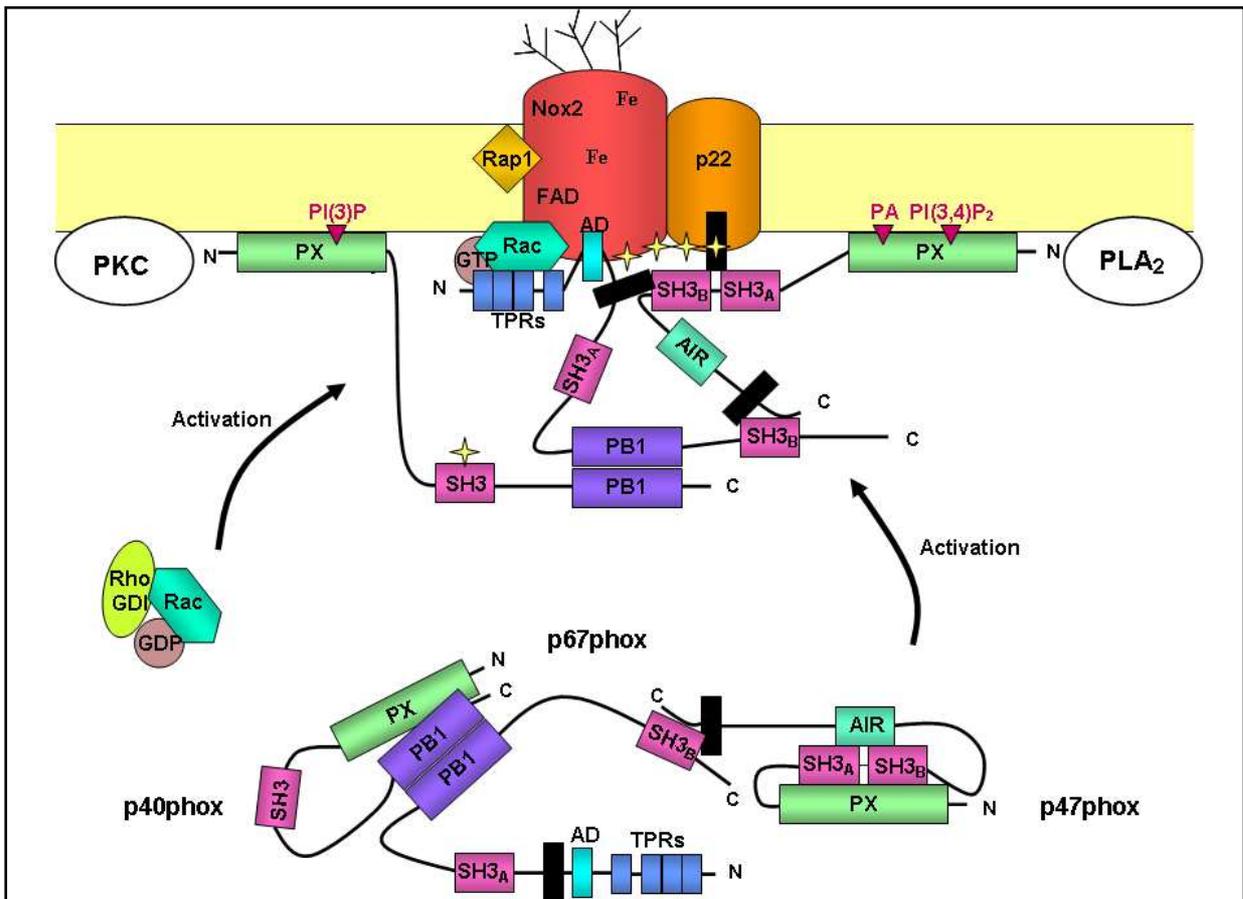


Figure 20: Modèle d'assemblage et d'activation du complexe NADPH oxydase. Au repos, l'hétérotrimère p40phox-p67phox-p47phox et la protéine Rac sont maintenues dans le cytoplasme, respectivement, via des interactions intramoléculaires inhibitrices et via la protéine inhibitrice RhoGDI. Les régions caractéristiques des protéines sont indiquées, un rectangle noir correspondant au domaine PRR. Au cours de l'activation du neutrophile, les interactions intramoléculaires sont levées par des événements de phosphorylation, et Rac est convertie sous forme active liée à une molécule de GTP. Les facteurs cytosoliques s'associent au cytochrome *b*₅₅₈ et à des lipides de la membrane plasmique. L'existence d'interactions supplémentaires entre les facteurs cytosoliques et le cytochrome *b*₅₅₈, encore non caractérisées, sont suggérées par des étoiles jaunes. Les protéines kinases PKC et PLA₂ subissent également une translocation au niveau du complexe NADPH oxydase.

VII. Modèle cellulaire PLB-985

La lignée promyélocytaire PLB-985 a été établie en 1987 par l'équipe du Pr Rado. Les cellules PLB-985 sont issues d'une lignée de cellules humaines, myéloïdes, diploïdes, obtenues à partir du sang périphérique d'une patiente atteinte d'une leucémie aigüe non lymphoïde (Tucker *et al.*, 1987). Les cellules PLB-985 sont des myélomonoblastes à un stade plus précoce

de maturation que la lignée promyélocytaire HL-60, également couramment utilisée dans l'étude de la NADPH oxydase. Les PLB-985 peuvent être différenciées en granulocytes ou en monocytes/macrophages en présence de certains agents inducteurs (PMA, diméthylsulfoxyde DMSO, acide rétinoïque ou diméthylformamide DMF) (Figure 21). Les PLB-985 différenciées par le DMF en granulocytes, ou « neutrophils-like », expriment toutes les sous-unités du complexe oxydase (Nox2, p22*phox*, p47*phox*, p67*phox* et p40*phox*) et sont capables d'accomplir les principales fonctions d'un polynucléaire neutrophile (Pedruzzi et al., 2002). Les cellules PLB-985 divergent néanmoins du neutrophile sur plusieurs points. Morphologiquement, elles conservent un noyau plus volumineux et moins polylobé que celui du neutrophile. Elles expriment environ 10 fois moins de cytochrome *b*₅₅₈ et ont un pouvoir microbicide nettement moins puissant que celui du neutrophile. Des travaux actuellement réalisés dans notre laboratoire révèlent également des déficiences en certaines protéines granulaires (travaux de thèse de Federica Defendi).

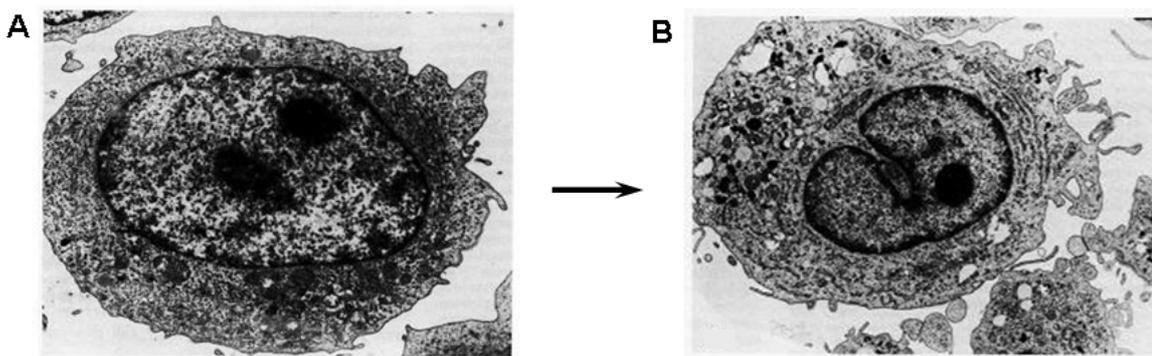


Figure 21: Morphologie des cellules PLB-985 en microscopie électronique en transmission. A) Cellule PLB-985 promyélocytaire non induite (agrandissement x 12730) B) Cellule PLB-985 après induction d'une différenciation granulocytaire au DMF (agrandissement x 7810). Le noyau apparaît réduit et polylobé, et le cytoplasme contient de nombreux granules (D'après Tucker et al., 1987).

En 1993, l'équipe du Pr Dinayer a établi une lignée PLB-985 dans laquelle le gène *CYBB* codant Nox2 a été inactivé par recombinaison homologue (Zhen et al., 1993). Cette lignée de cellules PLB-985 « X-CGD » a été obtenue par insertion d'une cassette, codant la phosphotransférase hygromycine B, par recombinaison homologue au niveau du 3^e exon du gène *CYBB* (Figure 22). Dans ce modèle cellulaire, l'expression sauvage de Nox2 est totalement abolie et l'activité oxydase est par conséquent nulle. Cette lignée permet ainsi

d'obtenir en culture des « neutrophils-like » de type CGDX⁰. Une activité oxydase équivalente à celle des cellules PLB-985 sauvages (WT) peut alors être reconstituée par transfection stable de l'ADNc sauvage de Nox2 (cellules **WT-Nox2**) (Zhen et *al.*, 1993).

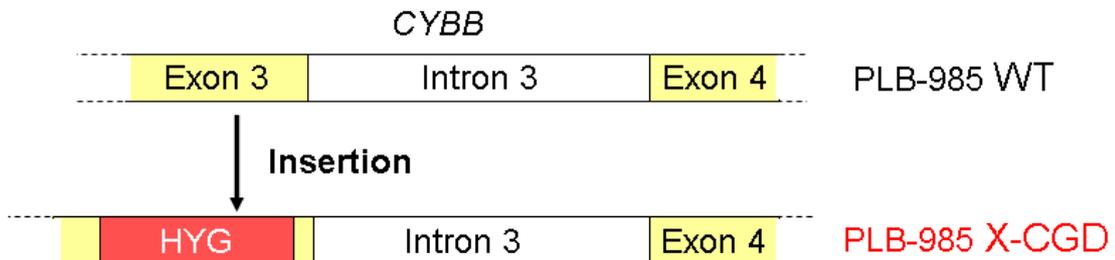


Figure 22: Construction de la lignée de cellules PLB-985 X-CGD. Interruption du gène *CYBB* codant Nox2 par insertion d'une cassette codant la phosphotransférase hygromycine B (HYG) par recombinaison homologue au niveau du 3^e exon du gène.

Le modèle PLB-985 X-CGD est un outil particulièrement intéressant pour effectuer une étude structure-fonction de la protéine Nox2 en réalisant des mutations de la séquence sauvage de Nox2. L'approche expérimentale consiste à modifier par mutagenèse dirigée l'ADNc de Nox2 qui est ensuite cloné dans un vecteur d'expression eucaryote qui peut alors être transfecté de manière stable dans le modèle cellulaire PLB-985 X-CGD. L'étude de l'effet de certaines modifications de Nox2 sur le phénotype des cellules PLB-985 a permis d'améliorer la caractérisation de la synthèse et du fonctionnement du complexe NADPH oxydase :

- **Caractérisation des mécanismes de synthèse et de maturation** du cytochrome *b*₅₅₈. Mise en évidence, entre autres, de l'implication des histidines 101, 115, 209, 222 dans la fixation des hèmes et la maturation du cytochrome *b*₅₅₈ (Biberstine-Kinkade et *al.*, 2001). L'acquisition des hèmes par le précurseur gp65 précède et est nécessaire à l'association de p22*phox* (DeLeo et *al.*, 2000).

- **Analyse des homologues de Nox2.** Il a été prouvé que Nox1 présente des similarités fonctionnelles avec l'oxydase phagocytaire Nox2 car Nox1 est capable de restaurer une activité oxydase dans les cellules X-CGD PLB-985 (Geiszt et *al.*, 2003).

- **Reproduction de mutations humaines de CGD X⁺** afin d'analyser les mécanismes d'activation du complexe oxydase: la double mutation His303Asn/Pro304Arg inhibe la

translocation des facteurs cytosoliques (Stasia *et al.*, 2002 ; Bionda *et al.*, 2004), la délétion $\Delta 488-497$ interrompt le transfert d'électrons vers le FAD (Schapiro *et al.*, 1991 ; Yu *et al.*, 1999), la mutation Leu505Arg altère l'interaction de p67phox avec le cytochrome b_{558} et la fixation du NADPH (Stasia *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2007).

- Etude des sites fonctionnels de Nox2 par mutagenèse dirigée :

- Région extrême C-terminale : la délétion des 11 derniers acides aminés déstabilise complètement la structure de Nox2 qui n'est plus exprimée. Le remplacement dans la région 559-565 des acides aminés non polaires par des acides aminés polaires ou chargés provoque une inhibition de l'expression de Nox2. Les derniers résidus sont essentiels à la stabilité de Nox2 (Zhen *et al.*, 1998).
- Boucle B : impliquée dans l'interaction de Nox2 avec les facteurs cytosoliques, en particulier les résidus Arg⁹¹ et Arg⁹² (Biberstine-Kinkade *et al.*, 1999)
- Hélice α 484-504 : indispensable à l'activité oxydase, à l'assemblage du complexe oxydase et au transfert d'électrons du NADPH au FAD, notamment les résidus Asp⁴⁸⁴, His⁴⁹⁰, and Asp⁵⁰⁰ (Li *et al.*, 2007).

Parmi les différentes études effectuées par mutagenèse dirigée de Nox2 dans le modèle PLB-985 X-CGD, notre laboratoire a réalisé l'étude de la **boucle D** intracytosolique de Nox2 ¹⁹¹TSSTKTIRRS²⁰⁰ (Li *et al.*, 2005). Afin d'élucider sa fonction, l'ADNc codant Nox2 a été modifié par mutagenèse dirigée dans la séquence correspondant à la boucle D. Puis l'ADNc muté a été cloné dans un vecteur d'expression eucaryote (pEF-PGKneo) et transfecté de manière stable dans le modèle cellulaire PLB-985 X-CGD. Ces travaux ont prouvé que la boucle D, localisée avant le 5^e passage transmembranaire porteur d'un des hèmes, est nécessaire au transfert des électrons du FAD à l'oxygène via les hèmes, en particulier les résidus chargés Lys¹⁹⁵, Arg¹⁹⁸ et Arg¹⁹⁹ (¹⁹¹TSSTKTIRRS²⁰⁰). Or, parmi les remaniements effectués sur la boucle D, certains ont permis d'augmenter significativement l'activité NADPH oxydase des cellules PLB-985, et notamment le remplacement de cette boucle D par son homologue provenant de l'oxydase non phagocytaire Nox4 ¹⁹¹TASTYAIRVS²⁰⁰ (les cellules PLB-985 obtenues sont nommées **D-loopNox4-Nox2**).

Objectifs

Dans le cadre de l'étude structure-fonction de la protéine Nox2 au niveau de la boucle D intracytosolique ($^{191}\text{TSSTKTIRRS}^{200}$) dans le modèle PLB-985 X-CGD, notre laboratoire a obtenu pour la première fois des mutants PLB-985 présentant une activité NADPH oxydase supérieure à la normale (Li et al., 2005). Le principal objectif de ce travail est la caractérisation de la super-activité du mutant PLB-985 **D-loopNox4-Nox2**, contenant la boucle D de la protéine homologue Nox4 ($^{191}\text{TASTYAIRVS}^{200}$), et l'élucidation des mécanismes moléculaires qui en sont à l'origine.

- 1) Dans un premier temps, le travail a consisté à caractériser la surproduction d' O_2^- par le mutant D-loopNox4-Nox2 (versus les cellules WT-Nox2) stimulé par divers agonistes solubles et particulaires. La cinétique de production d' O_2^- des cellules intactes a été mesurée par chemiluminescence en présence de luminol, et en présence d'isoluminol afin d'analyser également la localisation des O_2^- produits.
- 2) Dans un second temps, nous avons déterminé si le caractère super-mutant du complexe NADPH oxydase des cellules D-loopNox4-Nox2 se manifestait aussi *in vitro*. Pour cela, la production d' O_2^- a été mesurée en système reconstitué en présence de membranes purifiées de cellules PLB-985 transgéniques, puis en système simplifié en présence de cytochrome b_{558} purifié et de facteurs cytosoliques recombinants.
- 3) Ensuite, nous avons examiné l'implication des voies de transduction du signal d'activation du complexe NADPH oxydase dans la suractivité du mutant D-loopNox4-Nox2. Une étude de l'activité NADPH oxydase *ex vivo* en fonction de l'influx calcique intracellulaire et en fonction des événements de phosphorylation a été effectuée. L'implication des flux calciques et des événements de phosphorylation sur l'activité NADPH oxydase du super-mutant a été déterminée en inhibant ou en stimulant l'influx calcique, et en utilisant des inhibiteurs de kinase.

- 4) Nous avons finalement déterminé si la surproduction d' $O_2^{\cdot-}$ par le mutant D-loopNox4-Nox2 s'accompagnait d'une amélioration du pouvoir microbicide des cellules PLB-985. Les expériences de bactéricidie ont été réalisées avec l'entérobacille *Pseudomonas aeruginosa*, un microorganisme responsable d'infections rencontrées dans la CGD (utilisation de la souche non cytotoxique PAO1). Dans le cadre de cette étude, le pouvoir bactéricide des cellules PLB-985 vis-à-vis de *P. aeruginosa* a été analysé en fonction de leur activité NADPH oxydase.

Matériel et Méthodes

I. Préparations Biologiques

I.1. Culture de la lignée cellulaire PLB-985 sauvage et X-CGD

Les cellules PLB-985 sauvages (WT) et *CYBB*-KO (PLB-985 X-CGD) sont un généreux don du Dr Mary C. Dinauer (Department of Pediatrics and Department of Medical and Molecular Genetics, Indiana USA) (Zhen et *al.*, 1993). Les deux types de cellules sont cultivés en milieu complet constitué de RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de L-Glutamine, 100 U/ml de pénicilline G, 100 µg/ml de streptomycine et 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) préalablement décomplémenté par une incubation de 30 min à 56°C. Les cellules sont incubées en étuve humide à 37°C et 5% de CO₂. Le délai de doublement des cellules PLB-985 est de 24h à 48h. Lors d'un passage, elles sont diluées au 1/10^e. Les cellules peuvent alors être cultivées environ deux mois.

Lorsque les cellules PLB-985 X-CGD sont transfectées avec l'ADNc sauvage de Nox2 (cellules WT-Nox2) ou avec l'ADNc muté de Nox2, une pression de sélection du vecteur transfecté est maintenue par ajout de 0,5 mg/ml de généticine au milieu de culture (gène de résistance exprimé par le vecteur pEF-PGKneo) (Li et *al.*, 2005). Dans le cas où les cellules sont destinées à l'étude du pouvoir bactéricide, elles sont mises en culture sans antibiotiques au moins une semaine avant différenciation.

I.2. Différenciation des cellules PLB-985

Après dénombrement des cellules en cellule de Malassez, elles sont différenciées en granulocytes « neutrophil-like » par ajout de 0,5% (v/v) de diméthylformamide (DMF) en milieu de culture complet, à raison de 2×10^5 cellules/ml (Tucker et *al.*, 1987 ; Zhen et *al.*, 1993). Les deux tiers du milieu sont renouvelés après 3 jours de culture et les cellules sont utilisées au sixième jour de différenciation (J6).

I.3. Congélation et décongélation

I.3.1. Congélation

Les cellules sont dénombrées en cellule de Malassez et 10^7 cellules sont reprises dans 1 ml de milieu composé de DMSO 10% (v/v) et de SVF 90% (v/v). Elles sont ensuite

progressivement congelées en cryotube pendant 18h à -80°C dans une boîte de congélation Nalgen™ Cryo contenant de l'isopropanol. Les cryotubes sont finalement conservés en azote liquide.

I.3.2. Décongélation

Le cryotube est immédiatement plongé dans un bain-marie à 37°C. Les cellules décongelées sont rapidement diluées dans un grand volume de milieu de culture complet contenant 20% (v/v) de SVF. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois (centrifugation de 10 min à 400g à température ambiante) puis resuspendues dans 3 ml de milieu de culture complet contenant 20% (v/v) de SVF. Le milieu de culture à 20% de SVF est renouvelé le lendemain jusqu'à un volume final de 6 ml. Ensuite, les cellules sont cultivées en milieu complet classique à 10% (v/v) de SVF.

I.4. Purification des neutrophiles humains à partir de sang frais

L'Etablissement Français du Sang de Grenoble fournit du sang frais prélevé sur héparine. Les neutrophiles sont isolés sur gradient de densité Ficoll-Hypaque selon une méthodologie adaptée de celle préalablement décrite par Böyum en 1968. Le sang total est dilué au demi dans du tampon PBS (« phosphate-buffered saline solution » : KCl 2,7 mM ; KH₂PO₄ 1,5 mM ; Na₂HPO₄ (12H₂O) 8,1 mM ; NaCl 137 mM ; pH 7,3) contenant 1% (v/v) de citrate de sodium trisodique stérile. Cette dilution est déposée délicatement sur un gradient de densité Ficoll-Hypaque (d = 1,077) à raison d'un volume de Ficoll pour deux volumes de sang dilué. Une centrifugation de 20 min à 880g à 20°C (accélération et freinage lents) permet de séparer la couche lympho-monocytaire (anneau blanc à l'interface du plasma et de la couche de Ficoll) des polynucléaires et érythrocytes qui sont concentrés dans le culot. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 50 ml de tampon de lyse hypotonique à pH 7 composé de NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM et EDTA (2H₂O) 0,1 mM. La lyse des érythrocytes s'achève dans la glace en 5 à 15 min. Les neutrophiles sont ensuite récupérés par centrifugation à 460g pendant 7 min à 4°C, lavés une première fois par le tampon de lyse, une seconde fois par du PBS et repris dans le tampon PBS à une concentration finale de 10⁸ cellules/ml.

I.5. Morphologie cellulaire par coloration May-Grünwald Giemsa

La coloration de May-Grünwald Giemsa est une méthode de coloration permettant de distinguer les différentes cellules sanguines pour réaliser une formule leucocytaire. Cette technique repose sur l'action complémentaire de deux colorants neutres et sur l'affinité différentielle des éléments cellulaires pour les colorants acides ou basiques. Les deux colorants neutres, le May-Grünwald et le Giemsa, sont formés chacun d'un colorant basique et d'un colorant acide qui sont maintenus inactifs lorsque solubilisés dans le méthanol. Le May-Grünwald contient de l'éosinate de bleu de méthylène et le Giemsa contient de l'éosinate d'azur de méthylène. Au contact de l'eau, ils se dissocient en éosine (colorant acide) et azur et bleu de méthylène (colorants basiques). Ainsi, les éléments basophiles sont colorés en bleu, éosinophiles en orange, neutrophiles en beige-rose et les éléments azurophiles apparaissent en pourpre.

Afin de vérifier la morphologie des cellules PLB-985 après différenciation, un frottis de cellules est réalisé à partir d'une goutte de cellules reprises en PBS à raison de 2.10^7 cellules/ml. Le frottis est recouvert avec 10 à 15 gouttes de solution de May-Grünwald (RAL) pendant 3 min puis 15 gouttes d'eau neutre sont ajoutées afin d'activer les colorants. Après 1 min sous agitation douce, la lame est égouttée et le frottis est recouvert durant 20 min avec une solution de Giemsa-R (RAL) diluée au $1/10^{\circ}$ en eau neutre (30 gouttes dans 20 ml d'eau neutre). La lame est alors lavée rapidement à l'eau distillée, égouttée et séchée à l'air libre. L'observation des cellules s'effectue au microscope en immersion.

I.6. Préparations cellulaires

I.6.1. Traitement des cellules au diisopropylfluorophosphate

Dès leur purification, les cellules sont traitées avec 3 mM de DFP (inhibiteur de protéases à sérine) pendant 15 min dans la glace. Après une centrifugation de 5 min à 400g à 4°C, le culot sec de cellules peut être conservé à -80°C.

I.6.2. Séparation des fractions membranaires et cytosoliques

Les cellules traitées au DFP (M&M § I.6.1) sont resuspendues, à raison de 5.10^8 cellules/ml, en PBS contenant plusieurs inhibiteurs de protéases : 1mM PMSF, 2 μ M

leupeptine, 2 μ M pepstatine et 10 μ M TLCK (tampon PBS-inhibiteurs de protéases). Les cellules sont lysées par sonication avec 4 cycles de 5 secondes à 30W et 1 min d'intervalle entre les cycles, les cellules étant maintenues dans la glace. Une première centrifugation à 1000g pendant 15 min à 4°C permet d'éliminer les cellules et les noyaux non lysés. Une ultracentrifugation d'1h à 200 000g à 4°C est réalisée sur le surnageant afin de séparer les membranes et le cytosol. Le culot issu de l'ultracentrifugation, contenant les membranes brutes, est lavé à 3 reprises dans le tampon PBS-inhibiteurs de protéases et resuspendu dans ce même tampon à raison de 1 ml pour $5 \cdot 10^8$ cellules. Cette suspension membranaire est homogénéisée par une brève sonication de quelques secondes à 40W dans la glace. Le surnageant issu de l'ultracentrifugation, correspondant à la fraction cytosolique, est récupéré après filtration (0,22 μ m). La concentration protéique des deux fractions membranaires et cytosoliques est mesurée par la méthode de Bradford (M&M § III.1). Le cytosol est conservé à -80°C en aliquots contenant 3 mg de protéines alors que les membranes sont ajustées en aliquots contenant 300 μ g de protéines, pour une utilisation ultérieure en système reconstitué (M&M § V.3.1) (Batot et *al.*, 1995).

I.6.3. Préparation d'un extrait membranaire soluble

Les cellules traitées au DFP (M&M § I.5.1) sont resuspendues goutte à goutte, à raison de 10^8 cellules/ml, en tampon de lyse pH 7,4 (Triton X100 1%, HEPES 10mM, $MgCl_2$ 3,5 mM, PMSF 1 mM, leupeptine 2 μ M). L'échantillon est maintenu 20 min dans la glace avec une agitation au vortex toutes les 5 min. Une centrifugation de 30 min à 12000g à 4°C est effectuée. Le surnageant obtenu correspond à l'extrait soluble Triton X100 1% sur lequel le dosage des protéines membranaires solubilisées est effectué grâce à l'acide bicinchonique (M&M § III.2). Cet extrait membranaire soluble peut être conservé à -80°C (Stasia et al., 2002). Sur cet extrait membranaire soluble sont réalisés le Western blot des protéines du complexe oxydase et le spectre différentiel du cytochrome b_{558} . Cependant, le facteur $p67^{phox}$ est difficilement soluble dans l'extrait Triton X100 1%. Afin de le récupérer, le culot protéique insoluble dans le Triton X100 1% obtenu après la centrifugation à 12000g est repris à raison de 10^8 cellules/ml en tampon de lyse mais sans Triton X100. Une sonication de 5 secondes à 40W dans la glace permet alors d'homogénéiser ce culot. L'homogénat obtenu est complété en Triton X100 1% (par ajout d'une solution concentrée de Triton X100 10%) et peut être conservé à -80°C.

II. Synthèse et purification des protéines recombinantes

La synthèse et la purification des protéines recombinantes ont été précédemment réalisées au laboratoire. Les ADNc codant les protéines Rac1, p67*phox*, p47*phox* ont été clonés dans les vecteurs pGEX-3X (p67*phox*) et pGEX-2T (p47*phox*, Rac1) (Abo et *al.*, 1992 ; Vergnaud et *al.*, 2000 ; Li et *al.*, 2007). Ces vecteurs permettent l'expression des protéines fusionnées à la glutathione S-transférase (GST) après transformation de bactéries *Escherichia coli* DH5. L'expression des protéines a été induite par l'isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) durant 3h (0,2 mM à 20 °C pour p67*phox* et p47*phox* ou à 0,1 mM à 37°C pour Rac1). Les protéines de fusion ont été récupérées et purifiées sur une matrice de glutathione-Sepharose. Les protéines p47*phox* et Rac1 ont été clivées directement sur la matrice sous l'action de la thrombine, et la protéine p67*phox* a été éluée par compétition avec du glutathion réduit (obtention de GST-p67*phox*). La pureté et le clivage des protéines recombinantes ont été vérifiés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (M&M § III.3). L'efficacité de clivage était supérieure à 90 % et la pureté supérieure à 95 %. Les protéines recombinantes ont été stockées à -20°C (Li et *al.*, 2007).

III. Analyses protéiques

III.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Cette méthode est un test colorimétrique basé sur la fixation du bleu de Coomassie en milieu acide sur les groupements amines libres des protéines. La longueur d'onde d'absorption du bleu de Coomassie évolue de 465 nm à 595 nm lorsqu'il est complexé à un groupement amine (Bradford, 1976). Cette technique simple permet de doser de faibles quantités de protéines dans des milieux à forte salinité. L'absorbance du complexe à 595 nm est proportionnelle à la quantité de protéines. Elle est déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'albumine sérique bovine (BSA). Les échantillons et la gamme de BSA sont ajoutés à 1 ml de réactif de Bradford (BioRad protein Assay) et incubés au minimum 5 min à température ambiante. La mesure de l'absorbance doit être réalisée dans les 30 min suivantes (période de stabilité de la coloration).

III.2. Dosage des protéines par l'acide bicinchonique BCA

Cette méthode est un test colorimétrique basé sur la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ par les liaisons peptidiques des protéines (Smith et *al.*, 1985). Elle permet d'évaluer la concentration en protéines de milieux biologiques complexes. Le test utilise l'acide bicinchonique qui chélate spécifiquement les ions Cu^+ , issus de la réduction des ions Cu^{2+} par les liaisons peptidiques des protéines, en formant un complexe soluble violet (BCA Protein Assay kit, Interchim). L'absorbance de ce complexe à 562 nm est proportionnelle à la quantité de protéines. Elle est déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'albumine sérique bovine (BSA). Les échantillons et la gamme de BSA sont ajoutés à 2 ml de solution de travail et incubés 30 min à 37°C dans des tubes bouchés. L'absorbance à 562 nm est mesurée après refroidissement des tubes.

III.3. Séparation des protéines en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

La technique d'électrophorèse SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire (Laemmli et Favre, 1973). A un pH donné, les protéines acquièrent une charge électrique négative ou positive selon leur point isoélectrique. Cette propriété leur permet de migrer au sein d'un champ électrique. Dans cette technique, les protéines sont préalablement incubées avec l'agent réducteur β -mercaptoéthanol, qui rompt les ponts disulfures, et du SDS, qui dénature les protéines, de telle sorte à conférer une charge uniquement négative aux protéines. Dès lors, les protéines vont migrer dans la même direction au travers d'un gel de polyacrylamide et ne seront séparées qu'en fonction de leur masse moléculaire. Le choix du pourcentage de polyacrylamide du gel dépend de la taille de la protéine d'intérêt que l'on veut séparer. En effet, plus le maillage est dense (haut pourcentage) plus la migration est lente et alors les petites protéines seront mieux séparées.

III.3.1. Préparation du gel de polyacrylamide

Les quantités indiquées correspondent à la préparation de deux mini-gels (9 cm x 6,5 cm) de 1,5 mm d'épaisseur.

Gel de séparation 11% :

Réactifs	Volume (ml)
Eau	11,0
Tris-HCl 1,5 M pH 8,9	6,0
Acrylamide/Bisacrylamide 40%	6,6
SDS 10%	0,24
APS 10%	0,15
TEMED	0,025

Gel de concentration :

Réactifs	Volume (ml)
Eau	6,32
Tris-HCl 0,5 M pH 6,6	2,5
Acrylamide/Bisacrylamide 40%	1,0
SDS 10%	0,1
APS 10%	0,07
TEMED	0,01

III.3.2. Préparation des échantillons et migration électrophorétique

Les échantillons sont ajoutés à du tampon de dépôt [Tris-HCl 630 mM, bleu de bromophénol 0,004%, SDS 2% (p/v), sucrose 1% (p/v)] contenant 2,5% de β -mercaptoéthanol. Les protéines sont dénaturées à 60°C pendant 30 min ou à 95°C pendant 2 min. La migration des protéines s'effectue en 1h environ à 30 mA par gel pour des mini-gels, dans un tampon de migration à pH 8,8 [Tris 25 mM, Glycine 190 mM, SDS 0,1% (p/v)].

III.3.3. Révélation des protéines sur gel de polyacrylamide

Les protéines peuvent être révélées par coloration au bleu de Coomassie (détection d'environ 1 μ g de protéines). Le gel est incubé dans une solution de bleu de Coomassie [bleu de Coomassie 0,25% (p/v), acide acétique 10% (v/v), méthanol 50% (v/v)] pendant 10 à 30

min sous agitation. L'excès de colorant est éliminé par des bains successifs dans une solution de décoloration [éthanol 26% (v/v) et acide acétique 7% (v/v)]. L'avantage de cette méthode de révélation est sa réversibilité.

Les protéines peuvent aussi être révélées par coloration au nitrate d'argent. Cette technique est nettement plus sensible que celle au bleu de Coomassie : détection de quelques dizaines de ng de protéines. Elle est réalisée avec le kit BioRad Silver Stain (Merril et *al.*, 1981) selon le protocole suivant pour un mini-gel de 1,5 mm. Le gel est incubé 60 min dans un premier bain de fixation (méthanol 40% (v/v) et acide acétique 10% (v/v)) puis 30 min dans un second bain (éthanol 10% (v/v) et acide acétique 5% (v/v)). Ensuite, le gel est incubé 10 min dans la solution d'oxydation (dichromate de potassium et acide nitrique) puis lavé à trois reprises avec de l'eau distillée. Le gel est alors incubé 30 min avec le réactif à l'argent (nitrate d'argent), lavé à l'eau distillé et les protéines sont révélées grâce à trois bains successifs de quelques minutes dans le milieu de développement. La réaction est stoppée par l'ajout d'acide acétique 5% (v/v).

III.4. Western blot

III.4.1. Transfert des protéines sur membrane

Afin d'identifier les protéines séparées par électrophorèse SDS-PAGE à l'aide d'anticorps spécifiques, elles sont transférées sur membrane de nitrocellulose (0,45 μm) en système semi-sec. Dans ce cas, le gel SDS-PAGE ne doit pas être coloré au bleu de Coomassie comme précisé au paragraphe précédent. La cuve de transfert, constituée de deux électrodes de graphite, est soigneusement humidifiée par du tampon de transfert à pH 8,3 [Tris 25 mM, Glycine 129 mM, SDS 0,01% (p/v), méthanol 20% (v/v)]. Le gel est déposé sur la membrane de nitrocellulose « en sandwich » entre six feuilles de papiers Whatman n°3, l'ensemble étant préalablement imprégné de tampon de transfert. Ainsi, les protéines étant chargées négativement migrent de la cathode vers l'anode et s'adsorbent sur la membrane. Le transfert est réalisé à raison de 1 mA/cm² de gel à transférer durant 2h30 à 3h pour un gel de 1,5 mm d'épaisseur (Towbin et *al.*, 1979). L'efficacité du transfert peut être vérifiée en colorant le gel au bleu de Coomassie (cf § précédent).

III.4.2. Révélation des protéines

Après transfert, les sites libres de la membrane de nitrocellulose sont saturés par une incubation sous agitation douce pendant 1h dans du tampon TBS-Tween pH 7,5 [Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 0,05 % (v/v)] supplémenté en lait écrémé 1 % (p/v). La membrane est ensuite lavée à trois reprises durant 5 min en TBS-Tween. Elle est alors incubée en TBS-Tween pendant 2h à température ambiante sous agitation lente en présence de l'anticorps primaire spécifique de la protéine à révéler. Les anticorps primaires employés afin de détecter le cytochrome *b*₅₅₈ sont les anticorps monoclonaux mAb 48 et mAb 449 dirigés respectivement contre Nox2 et p22*phox* (Verhoeven et *al.*, 1989). Pour l'immunodétection des autres facteurs de l'oxydase, les anticorps utilisés sont des anticorps polyclonaux : C-19 de Santa Cruz pour p67*phox* et des anticorps polyclonaux dirigés contre la partie C-terminale de p40*phox* et p47*phox* ou contre les résidus 123 à 145 de Rac1 (Vergnaud et *al.*, 2000). La membrane est lavée au moins cinq fois 10 min en TBS-Tween avant d'être incubée 45 min avec l'anticorps secondaire dirigé spécifiquement contre les immunoglobulines de l'espèce utilisée pour l'obtention de l'anticorps primaire. La membrane est abondamment rincée en TBS-Tween pendant 3h à 4h. L'anticorps secondaire est couplé à l'enzyme peroxydase HRPO (horse radish peroxidase), ce qui permet une révélation par chemiluminescence (kit ECL Western blotting, Amersham Biosciences). La chemiluminescence obtenue résulte d'une dissipation d'énergie du luminol, excité suite à son oxydation catalysée par le système HRPO/H₂O₂ dans des conditions alcalines. La lumière émise par le retour du luminol à un état basal est intensifiée grâce à des composés phénols et captée sur film autoradiographique.

III.5. Spectre d'absorption différentiel du cytochrome *b*₅₅₈

Cette méthode permet d'identifier et de quantifier le cytochrome *b*₅₅₈ contenu dans l'extrait membranaire soluble (M&M § I.6.3). L'élément absorbant la lumière dans les cytochromes est le groupement héminique. Les spectres d'absorption du cytochrome *b*₅₅₈ sont réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre monofaisceau (Beckman DU640) sur lequel peuvent être adaptées des microcuvettes de 50 µl (trajet optique de 1 cm). Le spectre d'absorption de la fraction oxydée (cytochrome *b*₅₅₈ natif) est mesuré de 400 à 650 nm et mémorisé. Cette fraction est réduite par addition de quelques grains de dithionite de sodium et une nouvelle

lecture est effectuée de 400 à 650 nm. Le spectre différentiel rédox, correspondant à la différence d'absorption entre la fraction réduite et la fraction oxydée native, est calculé.

Le spectre différentiel d'absorption est spécifique d'un cytochrome donné. Le spectre différentiel du cytochrome b_{558} présente deux principaux pics d'absorption aux longueurs d'onde 426 nm et 558 nm (coefficients d'extinction molaire : $\epsilon_{558} = 21,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{426} = 106 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), et un pic très faible à 530 nm. La loi de Beer-Lambert établit un lien entre l'absorbance d'un composé à une longueur d'onde définie et sa concentration dans la cuve : $A = \epsilon \times l \times c$, avec « A » correspondant à l'absorbance à la longueur d'onde λ , « l » correspondant au trajet optique en cm, « c » à la concentration du composé en mM, « ϵ » au coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde λ en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Cette relation permet de déterminer la concentration en hème dans l'échantillon et donc la concentration en cytochrome b_{558} qui contient deux molécules d'hèmes. La quantité de cytochrome b_{558} peut ensuite être rapportée à la quantité totale de protéines membranaires (pmoles/mg). Il existe des pics d'absorption contaminants qui doivent être éliminés préalablement à la mesure, notamment celui de la myéloperoxydase à 474 nm (coefficient d'extinction molaire : $\epsilon_{474} = 89 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), mais aussi à 641 nm et celui de l'hémoglobine à 430 nm.

IV. Purification du cytochrome b_{558} de membranes de PLB-985

IV.1. Purification du cytochrome b_{558} par immunoaffinité

L'extraction du cytochrome b_{558} des cellules PLB-985 transfectées différenciées est réalisée sur la fraction membranaire (M&M § I.6.2) selon la technique mise au point par l'équipe du Pr Jesaitis (Lord et *al.*, 2008). La purification est réalisée par immunoaffinité en une seule étape grâce à l'anticorps monoclonal mAb CS9, spécifique de la sous-unité p22*phox* du cytochrome b_{558} (Taylor et *al.*, 2004). L'extraction a été réalisée sur 10^{10} cellules PLB-985 transfectées, différenciées.

Aux membranes, préalablement reprises en milieu tampon PBS-inhibiteurs de protéases à raison de $5 \cdot 10^8$ cellules/ml, est ajouté 1M de NaCl afin d'éliminer la MPO. Puis, l'échantillon est centrifugé 35 min à 4°C à 200 000g. Le culot est repris à raison de $5 \cdot 10^8$ cellules/ml en Tampon A contenant 10 mM d'Hépès à pH 7,4, 100 mM de KCl, 10 mM de NaCl et 1 mM d'EDTA. La solution est ensuite complétée avec 2 mM de PMSF, 1 μ l/ml du cocktail inhibiteur de protéases P8340 (Sigma), 0,1 mM de DTT, 100 μ g/ml de

désoxyribonucléase I et 100 µg/ml de ribonucléase B. Après ajout d'octylglucoside (OG) à 2 % (p/v) final et une brève sonication, l'échantillon est incubé sous agitation 40 min à 4°C. Après une centrifugation à 100 000g durant 30 min à 4°C, le surnageant est récupéré (environ 4,8 ml). Un premier spectre d'absorption est réalisé avant purification (M&M § III.5).

Le surnageant est alors ajouté à 300 µl de billes sépharose couplées à l'anticorps CS9 à raison de 2 mg de mAb CS9/ml de billes (collaboration avec le Pr Jesaitis). L'échantillon est agité sous rotation pendant 1h à 4°C puis la récupération du cytochrome *b*₅₅₈ est réalisée en batch. L'échantillon est lavé avec 3 ml de Tampon A froid contenant 1,2 % (p/v) d'OG, et une mesure de la DO à 260 et 280 nm est réalisée sur le surnageant de lavage récupéré. Un second lavage est réalisé avec 3 ml de Tampon A contenant 1,2 % (p/v) d'OG et 800 mM de NaCl au lieu de 10 mM, suivi d'un dernier lavage avec 3 ml de Tampon A contenant 1,2 % (p/v) d'OG. Des lavages supplémentaires sont réalisés jusqu'à disparition totale d'un signal à DO₂₆₀ et DO₂₈₀, indiquant l'élimination complète de tous les éléments non fixés aux billes. Afin d'éluer le cytochrome *b*₅₅₈, la matrice d'affinité est incubée 15 min à température ambiante avec 700 µl de Tampon A contenant 1,2% (p/v) d'OG et 200 µM de peptide compétitif Ac-AEARKKPSEEEAA-NH₂. L'éluat récupéré est immédiatement analysé par spectroscopie d'absorption afin d'évaluer la quantité de cytochrome *b*₅₅₈ purifié. Le degré de purification est également évalué en réalisant un gel d'électrophorèse SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent et un Western blot de p22*phox* et Nox2 (M&M § III.3 et III.4).

L'échantillon est finalement dessalé sur colonne « Zeba™ desalt spin columns » (Thermo Scientific) et concentré sur microsep-50kDa (Pall) (élimination des micelles d'OG libres d'environ 28 kDa).

IV.2. Reconstitution fonctionnelle du cytochrome *b*₅₅₈ purifié

La reconstitution fonctionnelle du cytochrome *b*₅₅₈ consiste à le replacer dans un environnement lipidique adéquat. Les lipides employés sont la phosphatidylcholine (PC) de type XVI-E (Sigma) préparée à une concentration de 99% dissoute dans du chloroforme à 10 mg/ml, et l'acide phosphatidique (18:1 phosphatidic acid ou DOPA) à 10 mg/ml en chloroforme.

Afin de préparer les lipides, 160 µl de PC 99% et 40 µl de DOPA sont séchés sous argon. Les phospholipides secs sont resuspendus à raison de 2 mg/ml dans du Tampon B (50 mM K₂HPO₄ pH 7,3, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 15% glycerol) contenant

1,2% (p/v) d'OG, et homogénéisés avec une légère sonication. Pour la reconstitution, 200 µg/ml de phospholipides solubilisés sont directement ajoutés au cytochrome *b*₅₅₈ purifié. Après une incubation de 20 min dans la glace, une dialyse contre le Tampon B est effectuée à l'aide du système « Slide-A-Lyzer® mini dialysis units » (Pierce) sur la nuit. L'intégrité du cytochrome *b*₅₅₈ est alors vérifiée par mesure du spectre d'absorption. Le cytochrome *b*₅₅₈ purifié est aliquoté et stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

V. Mesures de l'activité NADPH oxydase

V.1. Cytométrie en flux : expression de Nox2 et activité NADPH oxydase

La technique de cytométrie en flux (Fluorescence Activated Cell Sorter) permet le dénombrement et l'analyse multiparamétrée de particules en suspension dans un milieu liquide, en général des cellules. L'analyse se fait individuellement pour chaque cellule et les résultats obtenus fournissent la répartition cellulaire en fonction du ou des paramètres étudiés. Les paramètres mesurés peuvent être la fluorescence produite par des anticorps conjugués à un fluorophore ou celle directement produite par des composés fluorescents. La fluorescence émise est mesurée dans un cytomètre grâce à des détecteurs photomultiplicateurs spécifiques d'une gamme de longueur d'onde : canaux FL1 à FL4 (FACScalibur, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Les données sont collectées sur 10 000 événements avec le logiciel CellQuest (BD PharMingen) et traitées avec le logiciel WinMDI 2.8.

V.1.1. Evaluation de l'expression de Nox2 : simple marquage

Les cellules cultivées PLB-985 ou les neutrophiles purifiés sont ajustés à 5×10^6 cellules/ml dans du tampon PBS supplémenté avec 0,2 % (p/v) de BSA et 1 mM de CaCl₂. Le marquage est réalisé pour une prise d'essai de 100 µl, soit 5×10^5 cellules. Les 5×10^5 cellules sont incubées 30 min dans la glace avec 0,5 µg d'anticorps primaire 7D5 spécifique d'un épitope externe de Nox2 (IgG1 monoclonale de souris 7D5, MBL Japan) (Yamauchi et al., 2001). Afin d'évaluer les interactions non spécifiques de l'anticorps, la même incubation est réalisée avec 0,5 µg d'IgG1 de souris aspécifiques. Après une centrifugation rapide de 10 secondes à 10 000 g, les cellules sont lavées à 2 reprises dans le tampon PBS / BSA 0,2 % / CaCl₂ 1 mM. L'anticorps primaire 7D5 est révélé grâce à un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au fluorophore phycoérythrine émettant sur le canal FL2 (Immunotech Beckman

Coulter). Pour cela, le culot de cellules est resuspendu dans 150 μl d'une dilution au 1/200^e de l'anticorps secondaire en PBS / BSA 0,2 % / CaCl_2 1 mM et incubé 30 min dans la glace à l'obscurité. Les cellules sont lavées deux fois au PBS / BSA 0,2% / CaCl_2 1 mM et remises en suspension dans 500 μl de PBS / BSA 0,2 % / CaCl_2 1 mM (Stasia et *al.*, 2003).

V.1.2. Evaluation simultanée de l'expression de Nox2 et de l'activité NADPH oxydase : double marquage

Les cellules cultivées PLB-985 ou les neutrophiles purifiés sont ajustés à 5.10^6 cellules/ml dans du tampon PBS supplémenté avec 0,2 % (p/v) de BSA et 1 mM de CaCl_2 . Le marquage est réalisé pour une prise d'essai de 100 μl , soit 5×10^5 cellules. Le double marquage consiste en une première étape de marquage de Nox2 par l'intermédiaire de l'anticorps monoclonal 7D5 selon le protocole présenté au paragraphe précédent en utilisant un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à un fluorophore détecté sur le canal FL4 (Alexa Fluor 633 F(ab')₂, Invitrogen). Dans un second temps, la production d' O_2^- stimulée par le PMA est mesurée grâce au composé dihydrorhodamine 123 (DHR123). Le composé non fluorescent DHR123 peut être oxydé en rhodamine 123, qui est un composé hautement fluorescent détecté sur le canal de lecture FL1 (Smith et Weidemann, 1993). Après le marquage de Nox2, les cellules sont reprises dans 490 μl de PBS supplémenté avec 0,9 mM de CaCl_2 , 0,5 mM de MgCl_2 , 20 mM de glucose et 0,02 % (p/v) d'azide. La DHR123 est ajoutée aux cellules à une concentration finale de 0,5 μM et les échantillons sont incubés 10 min à 37°C, toujours à l'abri de la lumière. La spécificité de production de dérivés oxygénés par la NADPH oxydase peut être vérifiée en ajoutant 5 μM de diphenyl iodonium (DPI) lors de cette incubation. Les cellules sont finalement activées avec 80 ng/ml de PMA 15 min à 37°C. Les échantillons sont conservés dans la glace jusqu'à lecture de la fluorescence.

V.2. Activité NADPH oxydase par chemiluminescence

V.2.1. Principe et protocole

La technique de chemiluminescence est particulièrement sensible et permet de mesurer l'activité NADPH oxydase des cellules entières (Dahlgren et Karlsson, 1999). Cette technique repose sur le principe de dissipation de l'énergie par émission de lumière par un composé lorsque qu'il retourne d'un état excité vers son état initial. La réaction de

chemiluminescence appliquée repose sur une réaction d'oxydation du luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) dépendante de la peroxydase HRPO (horseradish peroxidase) et de la peroxydase intrinsèque MPO. Le retour du luminol excité vers son état fondamental s'accompagne d'une émission de lumière quantifiée par un luminomètre (Luminoscan Labssystem, Helsinki, Finlande). L'émission de lumière est directement proportionnelle à l'activité NADPH oxydase des cellules.

La mesure s'effectue en plaque 96 puits à raison de 5×10^5 cellules par puits, reprises dans 50 μ l de PBS. Le milieu réactionnel est composé de PBS contenant 0,9 mM de CaCl_2 , 0,5 mM de MgCl_2 , 20 mM de glucose, 20 μ M de luminol et 10 U/ml de HRPO (Li et al., 2005). Les cellules sont incubées dans le luminomètre une minute à 37°C avec 200 μ l de milieu réactionnel puis l'activité oxydase est stimulée par l'ajout de divers agonistes : PMA 80 ng/ml, fMLF 4×10^{-7} M, ionomycine 2 μ M, zymosan opsonisé au sérum humain à 0,64 mg/ml (M&M § V.2.2), $3,5 \cdot 10^8$ billes de latex de 0,8 μ m de diamètre opsonisées aux immunoglobulines IgG (M&M § V.2.2) ou *P. aeruginosa* PAO1 opsonisée au sérum humain à une MOI de 1 ou 10 (M&M § V.2.2). L'émission relative de lumière est enregistrée à 37°C pendant 60 min avec une mesure toutes les 30 secondes pour le PMA et les particules opsonisées, pendant 15 min avec une mesure toutes les 5 secondes pour le fMLF et l'ionomycine. Les mesures sont exprimées en unités relatives de luminescence (RLU).

Afin de déterminer la production de H_2O_2 externe, le luminol peut être remplacé par 20 μ M d'isoluminol (Lundqvist et Dahlgren, 1996). L'isoluminol a la même réactivité que le luminol mais il ne peut pas traverser les membranes (Figure 23).

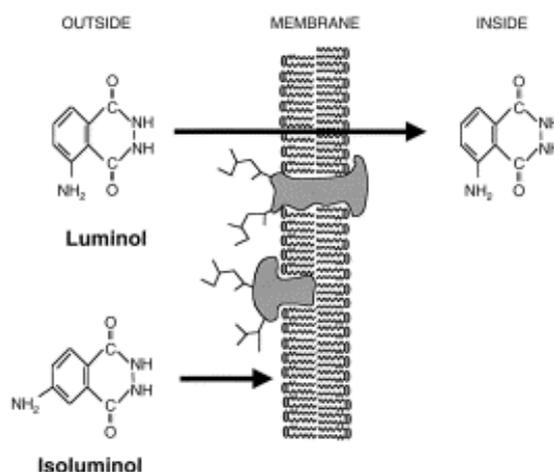


Figure 23: Structure moléculaire et perméabilité membranaire du luminol et de l'isoluminol (D'après Dahlgren et Karlsson, 1999).

Pour certaines expériences, les cellules (10^7 cellules/ml) sont préalablement incubées en PBS avec les inhibiteurs Ro 31-8220 (1,25 à 20 μM) ou wortmannin (6,25 à 100 nM) durant 15 min, LY 294002 (6,25 à 100 μM), SB 203580 (5 à 20 μM) ou génistéine (25 à 200 μM) durant 30 min à 37°C. Une incubation des cellules avec l'inhibiteur PD 98059 (10 à 40 μM) est réalisée sur la nuit en plaque 6 puits, en conservant les cellules en milieu de différenciation. Pour d'autres expériences, les cellules sont préalablement traitées avec les cytokines GM-CSF (12 ng/ml) ou TNF α (10 ng/ml) à 37°C pendant 15 min, directement dans le milieu réactionnel de chemiluminescence avant activation au fMLF ou OpZ. D'autre part, l'effet du métabolisme calcique sur l'activité oxydase est étudié en incubant les cellules en PBS avec 10 μM de BTP2 (inhibiteur des canaux calciques SOCs de la membrane plasmique) pendant 5 min à 37°C, ou en ajoutant le chélateur de Ca²⁺ EGTA (0,5 à 2,5 mM) dans les puits avant stimulation au fMLF (Steinckwich et *al.*, 2007). L'influx calcique SOCE-dépendant est stimulé par l'ajout de thapsigargine (0,03 à 1 μM) dans les puits, suivi ou non d'une activation au fMLF 4.10^{-7} M.

V.2.2. Préparation des agonistes opsonisés

- Zymosan opsonisé au sérum humain à 16 mg/ml :

16 mg de zymosan sont repris dans 1,6 ml d'eau physiologique et incubés 15 min au bain-marie. Après une centrifugation rapide de 10 secondes à 10 000 g, le culot de zymosan est repris dans 4 ml de sérum AB et incubé 30 min à 37°C sous agitation. Le zymosan opsonisé est récupéré après une centrifugation de 5 min à 600 g à température ambiante, lavé à 3 reprises en PBS et repris dans un volume final de 1 ml de PBS. Le même protocole est appliqué en parallèle en remplaçant le sérum AB par du PBS pour comparer l'effet du zymosan opsonisé et non opsonisé. Le zymosan opsonisé (OpZ) et non opsonisé est aliquoté et conservé à -20°C.

- Billes de latex (0.8 μm Ø) opsonisées aux immunoglobulines G :

100 μl de billes de latex (0,8 μm Ø, Sigma), soit $3,57.10^{10}$ billes, sont incubés 1h à 37°C avec 10 mg/ml de BSA en milieu HEPES HBSm (modified HEPES-buffered saline solution : hépès 15 mM à pH 7,4, glucose 8 mM, KCl 4 mM, NaCl 140 mM, MgCl₂ et CaCl₂ 1 mM). Les billes sont récupérées après une centrifugation de 2 min à 12 000 g, lavées une fois en HBSm puis incubées 30 min à 37°C avec 12,5 μg d'immunoglobulines IgG anti-BSA (MP Biomedicals, Ohio, USA) dans un volume final de 220 μl de HBSm. Les billes opsonisées sont lavées 3 fois en HBSm et reprises dans un volume final de 500 μl de HBSm (10 μl de cette

préparation sont utilisés afin de stimuler l'activité NADPH oxydase). Le même protocole est appliqué en parallèle sans ajout des IgG afin de comparer l'effet des billes opsonisées et non opsonisées. Les billes opsonisées et non opsonisées sont conservées à 4°C.

- ***P. aeruginosa* PAO1 opsonisée au sérum humain** (pour une MOI de 1 ou 10 avec $1,25 \cdot 10^6$ cellules par puits) :

Les bactéries sont cultivées sur la nuit à 37°C en milieu LB et dénombrées par mesure de la DO₆₀₀ (voir M&M § VI). Elles sont incubées 5 min à 37°C avec 10 % (v/v) de sérum AB en milieu HBSm à raison de $1,25 \cdot 10^8$ ou $1,25 \cdot 10^9$ bactéries/ml. Ces préparations de bactéries opsonisées sont utilisées immédiatement. Afin de reproduire les conditions appliquées au cours de la bactéricidie (M&M § VI), 10 µl de ces préparations sont ajoutés à $1,25 \cdot 10^6$ cellules par puits pour obtenir une MOI de 1 ou 10.

V.3. Activité NADPH oxydase en système reconstitué par réduction du cytochrome c

V.3.1. Sur la fraction membranaire purifiée

L'activité oxydase en milieu acellulaire est mesurée sur les membranes plasmiques purifiées (M&M § I.6.2) (Bromberg et Pick, 1984 ; Cohen-Tanugi et *al.*, 1991). L'activité oxydase est reconstituée dans un milieu réactionnel composé de PBS contenant 40 µM de GTPγS, 5 mM de MgCl₂, 0,3 mg/ml ou 1 mg/ml de fraction membranaire et 3 mg/ml de fraction cytosolique de neutrophile. L'activité est aussi évaluée en présence de quantités décroissantes de cytosol (0 à 3 mg/ml). L'activité oxydase est stimulée dans une prise d'essai de 100 µl par l'addition d'une quantité optimale d'acide arachidonique. La quantité d'acide arachidonique optimale pour obtenir une activation maximale de l'oxydase est propre à chaque lot de membranes purifiées et doit préalablement être déterminée sur une gamme de 20 à 100 nmol d'acide arachidonique (réduction du nitrobleu de tetrazolium NBT 1mM). Le milieu réactionnel est incubé 10 min à température ambiante après l'ajout d'acide arachidonique puis transféré dans une cuve spectrophotométrique contenant 100 µM de cytochrome c en tampon PBS dans un volume final de 1ml. La réaction est initiée en ajoutant 150 µM de NADPH. L'activité oxydase est déterminée par mesure de la cinétique de réduction du cytochrome c par les O₂⁻, en suivant l'augmentation d'absorbance à 550 nm (coefficient d'extinction molaire : $\epsilon_{550} = 21,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Après environ une minute d'enregistrement, la spécificité de la réaction

est confirmée par l'ajout de 50 μg de superoxyde dismutase (SOD), qui réduit les $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . L'activité oxydase reconstituée est exprimée en $\text{nmol O}_2^{\cdot-} / \text{min} / \text{mg}$ de protéines membranaires.

L'activité diaphorase correspond à la première étape de transfert des électrons jusqu'au centre redox du FAD. Cette activité peut être distinguée de l'activité NADPH oxydase globale en employant un accepteur final d'électron direct du FAD : l'INT (iodonitrotetrazolium) (Cross *et al.*, 1994). Sa mesure s'effectue dans les mêmes conditions que celle de l'activité NADPH oxydase par réduction du cytochrome c en remplaçant le cytochrome c par 50 μM d'INT.

V.3.2. Sur le cytochrome b_{558} purifié

L'activité oxydase est également mesurée avec le cytochrome b_{558} purifié et relipidé (M&M § IV.2). La technique appliquée est identique à celle utilisée au paragraphe précédent excepté qu'elle est réalisée en microplaque dans un volume final de 200 μl , et qu'un ajout de 10 μM de FAD dans le milieu réactionnel et le puits de mesure est nécessaire. Le cytosol de neutrophile est remplacé par les facteurs cytosoliques recombinants (M&M § II). Pour des conditions optimales, les mesures sont réalisées avec 5 nM de cytochrome b_{558} en présence de 1 μM de chacun des facteurs *p47phox*, *p67phox* et Rac1GTP. L'activité est stimulée par l'ajout d'acide phosphatidique PA ou d'acide arachidonique AA. Une gamme d'activation par le PA ou l'AA est réalisée afin de déterminer la quantité optimale de chacun d'eux pour obtenir une activation maximale de l'oxydase.

L'activité oxydase reconstituée avec le cytochrome b_{558} purifié permet d'accéder à la valeur du turnover de l'enzyme. Le turnover correspond à la quantité d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ qu'une mole de cytochrome b_{558} est capable de former dans un temps donné. Elle est ainsi exprimée en $\text{mol O}_2^{\cdot-} / \text{s} / \text{mol}$ de cytochrome b_{558} .

VI. Bactéricidie de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

La souche PAO1 (Holloway) est cultivée sur boîte de Petri sur le milieu spécifique «*Pseudomonas* Isolation Agar » (PIA Difco, Becton Dickinson). Une colonie est mise en culture sur la nuit à 37°C en milieu LB (Luria-Bertani). Le lendemain matin, les bactéries sont

remises en culture à 37°C en milieu LB afin d'obtenir une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. La croissance des PAO1 est suivie par mesure des variations de la densité optique à 600 nm. La culture bactérienne est ajustée à une DO₆₀₀ de 0,1 et la phase exponentielle de croissance des PAO1 est atteinte entre 1,5 et 2 de DO₆₀₀. Les PAO1 sont alors récupérées par centrifugation à 8500g durant 5 min à 4°C et lavées à 2 reprises dans du tampon HBSm (15 mM d'hépès pH 7,4 ; 8 mM de glucose ; 4 mM de KCl ; 140 mM de NaCl ; 1 mM de MgCl₂ et CaCl₂) (Dacheux et *al.*, 1999). Les bactéries sont reprises en milieu HBSm à raison de 5.10⁷ ou 5.10⁸ unités formant colonie de PAO1 (UFC) / ml, et conservées dans la glace jusqu'à utilisation. Le nombre d'UFC est évalué par mesure de la DO₆₀₀ de l'échantillon bactérien sachant que 1 unité de DO₆₀₀ correspond à 5.10⁸ UFC de PAO1. La bactéricidie est alors réalisée dans un volume final de 500 µl de milieu HBSm supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum humain. 2,5.10⁶ cellules sont ajoutées avec 2,5.10⁶ ou 2,5.10⁷ UFC de PAO1, afin d'obtenir une MOI de 1 ou 10. L'ensemble est incubé à 37°C et agité à 250 rpm. Durant 60 min, des échantillons de 50 µl du milieu de co-incubation sont collectés toutes les 15 min, dilués en série en milieu LB et étalés en duplicat sur milieu PIA solide. Les UFC sont dénombrées après une incubation d'une nuit à 37°C. Le pourcentage de bactéries viables est calculé par rapport au nombre d'UFC au temps 0 d'incubation. Pour certaines expériences, les cellules sont préalablement incubées 10 min à 37°C avec 5µM de DPI, et le milieu de co-incubation dans lequel s'effectue la bactéricidie est supplémenté par du DPI afin de maintenir une concentration finale en DPI de 5 µM.

VII.Statistiques

Les résultats exprimés sous forme de moyenne sont indiqués avec la déviation standard (DS) ou l'erreur standard moyenne (ESM). Les différences statistiquement significatives ont été identifiées en utilisant le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$ étant considéré comme significatif.

Résultats

I. Caractérisation *ex vivo* de la super-activité NADPH oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2

La « super-activité » NADPH oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2 a été révélée lors d'une précédente étude portant sur la fonction de la boucle D ¹⁹¹TSSTKTIRRS²⁰⁰ intracytosolique de Nox2 (Li *et al.*, 2005). Dans le cadre de cette étude, l'ADNc codant Nox2 a subi diverses modifications par mutagenèse dirigée puis a été cloné dans un vecteur d'expression eucaryote (pEF-PGKneo) transfecté de manière stable dans le modèle cellulaire PLB-985 X-CGD par électroporation. Les clones résistants à la généticine ont été sélectionnés par dilution limite (antibiotique contre lequel le vecteur confère une résistance). Une lignée transfectée avec l'ADNc sauvage de Nox2 a été construite, désignée sous la dénomination « WT-Nox2 ». Les cellules PLB-985 transfectées WT-Nox2 présentent une activité oxydase identique aux cellules PLB-985 sauvages (WT) lors d'une stimulation par le PMA ou le fMLF (Li *et al.*, 2005).

Parmi les remaniements effectués sur la boucle D (Figure 24), certains ont permis d'augmenter significativement l'activité NADPH oxydase des cellules PLB-985. Outre le mutant D-loopNox4-Nox2, la mutation ponctuelle de l'arginine 199 en glutamine ainsi que le remplacement de la boucle D par celle des homologues Nox1 et Nox3 ont provoqué une augmentation de la production d'O₂⁻ par les cellules PLB-985 différenciées, stimulées par le fMLF ou le PMA (Table 2).

	191			195			199	200
WT	T	S	S	T	K	T	I	R
R199Q	Q
D-loop Nox1	.	.	A	.	E	F	.	.
D-loop Nox3	E	F	.	Q
D-loop Nox4	.	A	.	.	Y	A	.	V

Figure 24 : Mutagenèse de la boucle cytosolique D ¹⁹¹TSSTKTIRRS²⁰⁰ de Nox2. La séquence sauvage d'acides aminés est inscrite sur la première ligne et les résidus modifiés chez les super-mutants sont surlignés en gris. Les points indiquent que les acides aminés sont identiques à la séquence sauvage.

Table 2

Taux de cytochrome b_{558} (pmol/mg de protéines) et activité NADPH oxydase des cellules PLB-985 sauvages et X-CGD transfectées. La quantité de cytochrome b_{558} a été évaluée par mesure du spectre d'absorption différentiel sur extraits membranaires solubles (Triton X-100 1%). La production de H_2O_2 des cellules différenciées a été mesurée par chemiluminescence en présence de luminol durant 90 min après activation par le PMA (80 ng/ml). La production totale de H_2O_2 est exprimée en somme de RLU mesurées sur 90 min (D'après Li et *al.*, 2005).

	Cytochrome b_{558} (pmol/mg)	Chemiluminescence	
		Production H_2O_2 (somme de RLU)	% du contrôle
WT	26,27 ± 2,96	397,75 ± 5,07	100
WT-Nox2	24,36 ± 2,31	453,02 ± 4,19	114
X-CGD	0	0,68 ± 0,03	0
R199Q	22,75 ± 2,45	562,75 ± 17,85	141
D-loopNox1	23,67 ± 2,10	521,75 ± 3,94	131
D-loopNox3	15,98 ± 0,79	497,73 ± 5,13	125
D-loopNox4	20,28 ± 0,72	646,93 ± 11,11	163

Des quatre super-mutants, D-loopNox4-Nox2 présentant la plus forte activité NADPH oxydase en réponse au PMA, nous avons fait le choix de focaliser notre étude sur ce super-mutant. Cependant, nous avons également contrôlé le comportement du mutant R199Q-Nox2 dans des études fonctionnelles au niveau cellulaire.

La caractérisation des mutants de Nox2 s'effectue par comparaison avec les cellules PLB-985 **X-CGD** (PLB-985 X-CGD transfectées avec le vecteur vide), et avec les cellules PLB-985 **WT-Nox2** (PLB-985 X-CGD transfectées avec le vecteur contenant l'ADNc sauvage de Nox2).

I.1. Contrôle du phénotype des cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées

I.1.1. Mise au point des conditions de différenciation des cellules PLB-985

Les cellules PLB-985 sont différenciées en granulocytes ou « neutrophils-like » en présence de 0,5% de diméthylformamide (DMF) en milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. Cette différenciation permet notamment d'induire l'expression endogène des facteurs cytosoliques $p47phox$, $p67phox$ et $p40phox$. Afin d'optimiser les conditions de différenciation pour obtenir une activité oxydase maximale, une étude comparative de l'activité oxydase des PLB-985 traitées au DMF selon deux méthodes a été

réalisée. D'après les travaux du Dr Pedruzzi (Pedruzzi et *al.*, 2002), la différenciation des PLB-985 peut être améliorée par l'ajout au milieu RPMI 1640 de 0,5 % de Nutridoma-SP (Roche) et seulement 0,5 % de sérum de veau fœtal. L'activité oxydase de 5.10^5 cellules, après 6 et 7 jours de différenciation par la méthode classique en sérum de veau fœtal (SVF) ou avec le Nutridoma-SP (N-SP), a été mesurée *ex vivo* par chemiluminescence en présence de luminol après stimulation par le PMA (80 ng/ml) et le fMLF (4.10^{-7} M) (Figure 25A et B).

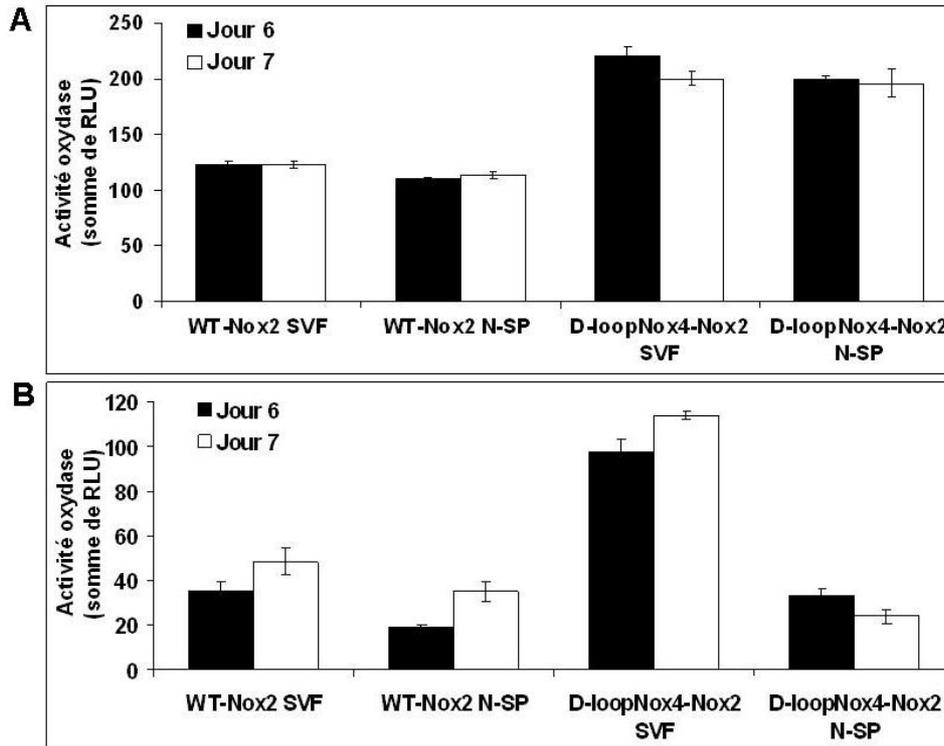


Figure 25 : Activité NADPH oxydase des cellules différenciées PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 en fonction du milieu de différenciation. Les cellules ont été différenciées 6 et 7 jours au DMF 0,5% en milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), ou en milieu RPMI 1640 contenant 0,5% de sérum de veau fœtal et 0,5% de Nutridoma-SP (N-SP). La production totale d' O_2^- a été mesurée par chemiluminescence en présence de luminol après stimulation par A) le PMA (80 ng/ml), ou par B) le fMLF (4.10^{-7} M). Elle est exprimée en somme de RLU, sur 60 min pour le PMA à raison d'une mesure toutes les 30 s, et sur 15 min pour le fMLF à raison d'une mesure toutes les 5 s. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative de trois expériences indépendantes.

L'activité oxydase totale obtenue est exprimée en somme de RLU mesurées pendant 60 et 15 min. L'activation par le PMA des cellules WT-Nox2 induit une activité oxydase identique avec les deux modes de différenciation, aussi bien au 6^e qu'au 7^e jour de différenciation (Figure 25A). Le même résultat est obtenu avec le mutant D-loopNox4-Nox2. Par contre, l'activation par le fMLF induit une activité oxydase plus faible lorsque les cellules

sont différenciées en présence de Nutridoma-SP et surtout pour le mutant D-loopNox4-Nox2 (Figure 25B).

Par conséquent, l'emploi d'un milieu de différenciation supplémenté en Nutridoma-SP n'améliore pas l'activité oxydase PMA-dépendante de nos cellules transfectées WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2, et diminue même leur activité fMLF-dépendante. Nous avons donc poursuivi nos expérimentations en choisissant la différenciation au DMF 0,5% des cellules PLB-985 dans les conditions classiques avec 10% de sérum de veau fœtal.

I.1.2. Contrôle de l'expression de Nox2 et des autres facteurs du complexe NADPH oxydase

L'utilisation de PLB-985 transfectées afin d'analyser l'activité NADPH oxydase nécessite des contrôles systématiques de l'expression des différentes sous-unités du complexe NADPH oxydase. Les PLB-985 X-CGD différenciées expriment naturellement tous les facteurs cytosoliques p40*phox*, p67*phox*, p47*phox*, ainsi que p22*phox*. Toutes les cellules PLB-985 différenciées utilisées dans nos travaux expriment à des taux identiques les trois sous-unités cytosoliques du complexe oxydase. La figure 27 présente une expérience d'immunodétection semi-quantitative par Western blot des facteurs cytosoliques à partir d'extraits solubles des cellules PLB-985 X-CGD, WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2.

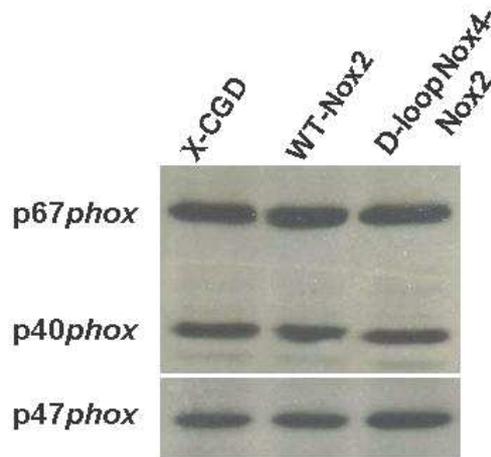


Figure 27 : Expression des facteurs cytosoliques dans les cellules PLB-985 X-CGD transfectées. L'immunodétection des sous-unités cytosoliques p40*phox*, p67*phox*, p47*phox* a été réalisée sur 40 µg d'extraits membranaires solubles (Triton X-100 1%) provenant des cellules PLB-985 X-CGD, WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2.

Concernant les contrôles d'expression de Nox2, ils doivent être très rigoureux et systématiques à chaque remise en culture des cellules PLB-985 X-CGD transfectées. L'expression de Nox2 dépendant de la transfection d'un vecteur d'expression, il faut s'assurer

que la reconstitution de l'expression de Nox2 est strictement identique dans tous les types de cellules transfectées afin que les variations de phénotype observées ne proviennent que de la mutation de Nox2 et non pas d'un taux d'expression différentiel de Nox2. En culture, une pression de sélection du vecteur est appliquée par ajout de généticine, un antibiotique contre lequel le vecteur confère une résistance. En pratique, l'expression de Nox2 est contrôlée par cytométrie en flux (FACS) d'une part et par Western blot d'autre part (Figure 28).

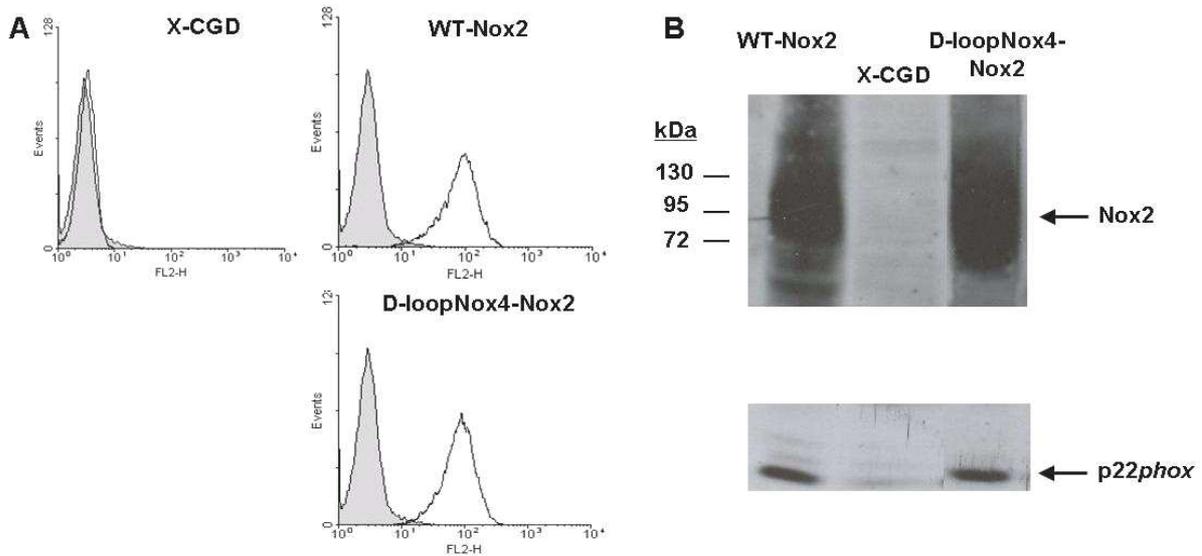


Figure 28 : Expression de la protéine Nox2 sauvage et mutée dans les cellules PLB-985 X-CGD transfectées. A) L'expression de Nox2 a été révélée grâce à l'anticorps monoclonal 7D5, spécifique d'un épitope externe de Nox2, combiné à un anticorps secondaire couplé au fluorophore phycoérythrine (émission de fluorescence sur le canal FL2 d'un cytomètre). L'IgG1 de souris est utilisée comme anticorps monoclonal irrelevant. B) L'immunodétection des sous-unités membranaires Nox2 et p22phox a été réalisée sur 30 µg d'extraits membranaires solubles (Triton X-100 1%) provenant des cellules X-CGD, WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2. Ces résultats proviennent d'une manipulation représentative, reproduite à chaque nouvelle décongélation d'un lot cellulaire.

Par FACS, l'expression de Nox2 est révélée grâce à l'anticorps monoclonal 7D5, spécifique d'un épitope externe de Nox2, combiné à un anticorps secondaire couplé au fluorophore phycoérythrine (émettant dans le canal FL2 d'un cytomètre). Des IgG1 de souris aspécifiques sont utilisées comme contrôle négatif pour estimer la spécificité d'interaction (contrôle isotypique). La protéine Nox2 n'est pas détectée dans les cellules PLB-985 X-CGD (Figure 28A). Par contre, son expression est similaire dans toutes les cellules PLB-985 transfectées. Ce résultat est contrôlé par Western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines Nox2 et p22phox (respectivement mAb 48 et mAb 449) d'extraits solubles de cellules X-CGD, WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 (Figure 28B). La protéine Nox2 glycosylée migre sur une large bande comprise entre environ 90 et 130 kDa.

Enfin, une mesure du spectre d'absorption différentiel du cytochrome b_{558} dans les extraits membranaires solubles permet de révéler l'incorporation correcte des hèmes et de confirmer que le taux de cytochrome b_{558} est équivalent dans toutes nos cellules PLB-985 X-CGD transfectées (Figure 29).

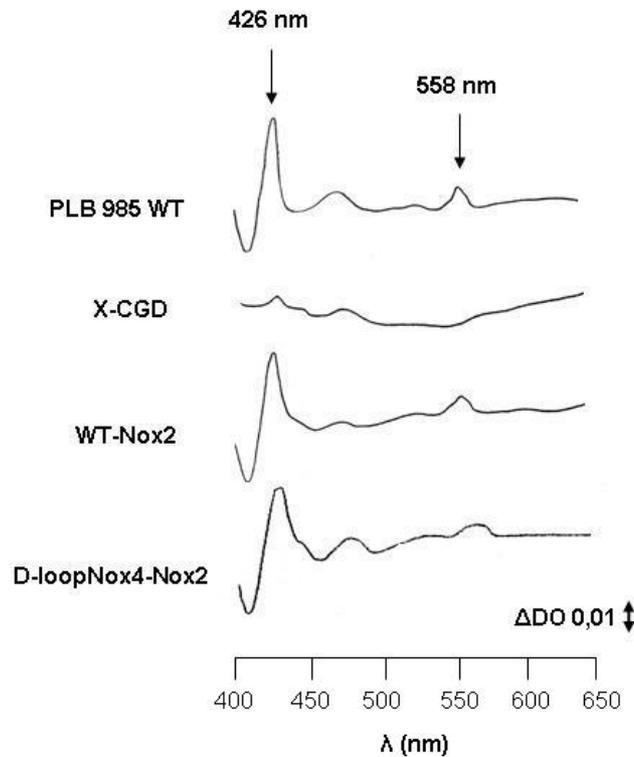


Figure 29: Spectres d'absorption différentiels du cytochrome b_{558} sur extraits membranaires solubles (Triton X-100 1%) de cellules PLB-985 sauvages (WT), X-CGD, WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 (80 μ g). Ces profils sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Le taux de cytochrome b_{558} est de $12,7 \pm 1,3$ pmol/mg de protéines dans les cellules WT-Nox2 et de $11,1 \pm 0,7$ pmol/mg de protéines dans les cellules D-loopNox4-Nox2, contre $139,2 \pm 19,9$ pmol/mg de protéines dans le neutrophile humain ($n = 3$). Des expériences précédemment effectuées dans notre laboratoire ont révélé un taux de cytochrome b_{558} de $13,1 \pm 1,5$ pmol/mg de protéines dans les cellules PLB-985 WT.

I.1.3. Mise au point d'une technique de mesure simultanée de l'expression de Nox2 et de l'activité oxydase des cellules PLB-985 X-CGD transfectées

Afin de faciliter la caractérisation des mutants élaborés dans notre laboratoire, nous avons développé une technique de double marquage permettant d'accéder simultanément à l'expression de Nox2 et à l'activité oxydase *ex vivo* en réponse au PMA (Figure 30). Le double

marquage consiste en une première étape de marquage de Nox2 par l'intermédiaire de l'anticorps monoclonal 7D5, combiné à un anticorps secondaire couplé à un fluorophore détecté sur le canal de lecture FL4 d'un cytomètre (Alexa Fluor 633 F(ab')₂, Invitrogen). Dans une seconde étape, les cellules sont chargées en DHR123 avant d'être stimulées par 80 ng/ml de PMA. La production d'O₂⁻ est alors évaluée grâce à l'oxydation de la DHR123 en rhodamine 123, un composé fluorescent détectable sur le canal de lecture FL1.

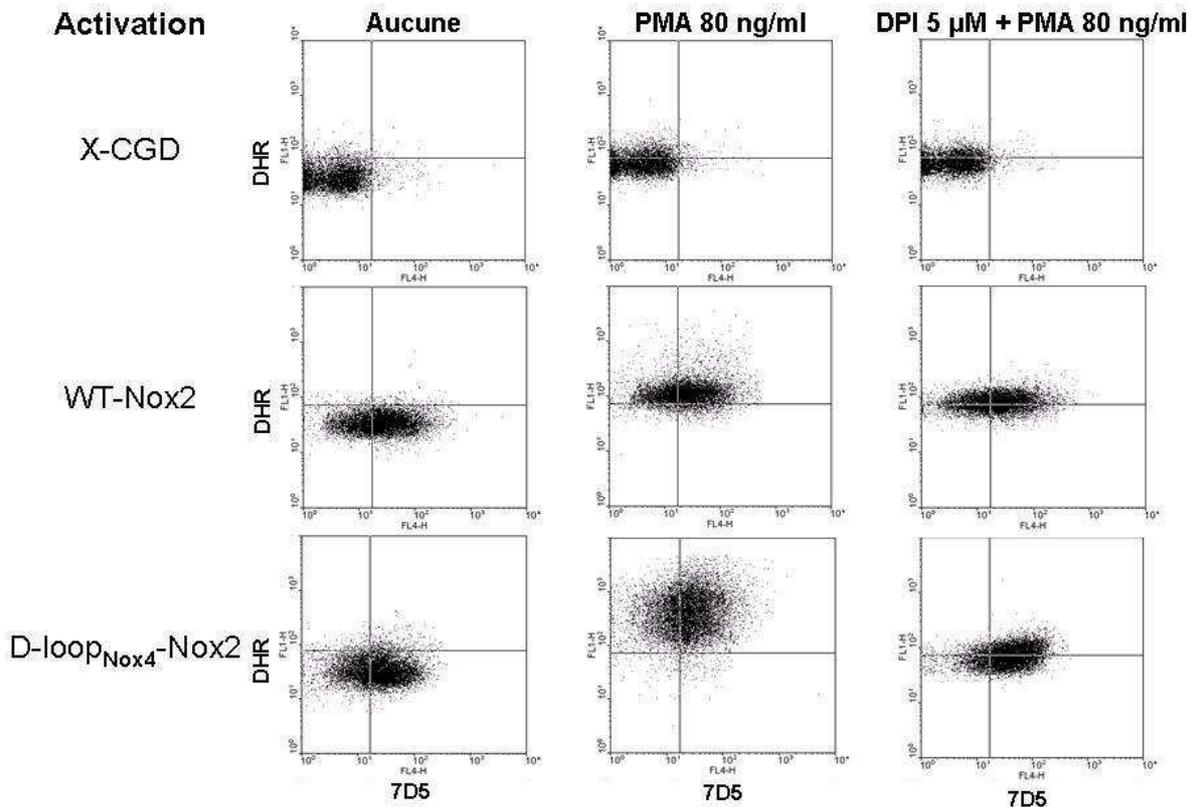


Figure 30 : Mesure simultanée de l'expression de Nox2 et de l'activité NADPH oxydase des cellules intactes PLB-985 X-CGD, WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées. L'expression de Nox2 est révélée en abscisse grâce à l'anticorps monoclonal 7D5 combiné à l'anticorps secondaire fluorescent Alexa fluor 633 F(ab')₂. L'activité oxydase est exprimée en ordonnée via l'oxydation de la DHR123 en rhodamine 123, détectable sur le canal de lecture FL1. Ce double marquage est réalisé dans les cellules non activées (1^{ère} colonne), activées 15 min par 80 ng/ml de PMA (2^e colonne) et préalablement traitées 10 min au DPI 5 µM avant stimulation par le PMA (3^e colonne). Ces données proviennent d'une expérience représentative de quatre expériences indépendantes.

En appliquant cette méthode au mutant D-loopNox4-Nox2, on confirme que l'expression de Nox2 est équivalente à celle des cellules WT-Nox2, alors que son activité NADPH oxydase est environ quatre fois supérieure (Figure 30). En effet, la moyenne

géométrique de fluorescence (G mean), indiquant la distribution de la population cellulaire en fonction de l'expression de Nox2 (en abscisse), est en moyenne de $17,4 \pm 4,0$ pour WT-Nox2 contre $22,1 \pm 5,3$ pour le mutant, sachant que la population de cellules X-CGD est à une valeur de $2,9 \pm 0,5$ ($n = 4$). Après activation par le PMA, le G mean lié à la fluorescence de la DHR123 observé est multiplié par $3,3 \pm 0,2$ pour les cellules WT-Nox2 et par $12,0 \pm 1,3$ pour le mutant D-loopNox4-Nox2. L'activation au PMA induit également un léger décalage de fluorescence chez les cellules X-CGD. La spécificité de la NADPH oxydase a été confirmée par l'emploi de DPI $5 \mu\text{M}$. Le décalage de fluorescence observé avec les cellules X-CGD activées n'est pas inhibé par le DPI et ce léger décalage est retrouvé dans les cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 après inhibition par le DPI. L'ajout de PMA provoque donc une modification NADPH oxydase-indépendante du niveau de base de fluorescence de la DHR123 dans les cellules PLB-985.

I.2. Activité NADPH oxydase des cellules intactes D-loopNox4-Nox2 en réponse à divers stimuli solubles et particulaires.

L'activité NADPH oxydase des cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées et des neutrophiles humains purifiés, a été mesurée par chemiluminescence en présence de luminol en réponse à divers stimuli solubles et particulaires. La cinétique de production de H_2O_2 par $5 \cdot 10^5$ cellules intactes PLB-985 X-CGD, WT-Nox2, R199Q, D-loopNox4-Nox2 ou neutrophiles humains a été enregistrée après activation par du PMA 80 ng/ml , du fMLF $4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, de l'ionomycine $2 \mu\text{M}$, du zymosan opsonisé avec du sérum (OpZ) $0,64 \text{ mg/ml}$ ou $3,5 \cdot 10^8$ billes de latex de $0,8 \mu\text{m}$ de diamètre opsonisées par les immunoglobulines G (Figures 31 à 35). Les cinétiques de production d' O_2^- de chaque type cellulaire ont été caractérisées et comparées selon quatre critères : la production totale d' O_2^- correspondant à la somme de RLU mesurées sur 15 ou 60 min, la valeur en RLU du pic de production (RLU_{max}), le temps nécessaire pour atteindre le pic de production (T_{max}) et enfin la durée de la cinétique (Table 3). Nous avons considéré que la cinétique arrivait à terme lorsque l'activité atteignait 10% de la valeur du pic maximal d'activité (RLU_{max}). Dans le cas où les cinétiques de production d' O_2^- n'atteignaient pas cette valeur, nous avons comparé le pourcentage de la valeur du pic à 60 min. D'autre part, nous nous sommes assurés que les cellules PLB-985 transfectées WT-Nox2 ont une activité oxydase identique à celle des cellules PLB-985 WT avec chacun des agonistes (données non montrées).

Table 3

Activité NADPH oxydase de cellules intactes PLB-985 et du neutrophile humain, induite par divers agonistes solubles ou particulaires. La production de H₂O₂ par 5.10⁵ cellules a été mesurée par chemiluminescence en présence de luminol durant 60 min après activation par le PMA (80 ng/ml), OpZ (0.64 mg/ml) ou avec 3.5.10⁸ billes de latex opsonisées aux IgG, et durant 15 min après activation par le fMLF (4 x 10⁻⁷ M) ou la ionomycine (2 μM). La production totale de H₂O₂ représente la somme de RLU mesurées sur 60 ou 15 min ; elle est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules WT-Nox2 dans la dernière colonne. « Pic-RLUmax » indique la valeur du pic maximal de production et « Pic-Tmax » le temps nécessaire pour l'atteindre. La durée correspond au temps nécessaire pour que la cinétique redescende à 10% de la valeur du pic maximal. Avec les agonistes particulaires, le pourcentage de la valeur du pic restant à 60 min est indiqué. NP : non pertinent. Différence significative des résultats des cellules D-loopNox4-Nox2, R199Q ou neutrophiles comparés aux WT-Nox2 : *, p<0,05.

Stimuli solubles	n	Production totale de H ₂ O ₂ (RLU)	Pic-Tmax (min)	Pic-RLUmax (RLU)	Durée (min)	% de la production de H ₂ O ₂ de WT-Nox2
PMA	X-CGD	0,46 ± 0,14	NP	NP	NP	0
	WT-Nox2	119,57 ± 4,94	6,45 ± 0,72	2,61 ± 0,44	58,1 ± 3,9	100
	D-loopNox4-Nox2	223,03 ± 18,58* (x 2)	4,36 ± 0,56*	10,13 ± 1,84* (x 4)	30,4 ± 4,0*	187
	R199Q	181,81 ± 13,22* (x 1,5)	5,71 ± 0,59	7,08 ± 1,53* (x 3)	36,0 ± 5,0*	152
	Neutrophile	249,22 ± 12,57* (x 2)	3,38 ± 0,22*	17,64 ± 2,81* (x 7)	20,9 ± 1,4*	208
fMLF	X-CGD	0,35 ± 0,03	NP	NP	NP	1
	WT-Nox2	29,69 ± 6,64	0,65 ± 0,16	1,59 ± 0,48	2,8 ± 0,3	100
	D-loopNox4-Nox2	145,95 ± 32,64* (x 5)	0,67 ± 0,15	8,28 ± 1,51* (x 5)	2,8 ± 0,3	492
	R199Q	135,79 ± 17,59* (x 4,5)	0,41 ± 0,05	8,76 ± 2,04* (x 5)	2,3 ± 0,2	457
	Neutrophile	341,92 ± 146,35* (x 11)	0,64 ± 0,04	14,72 ± 6,81* (x 10)	4,7 ± 1,4*	1152
Ionomycine	X-CGD	0,37 ± 0,19	NP	NP	NP	1
	WT-Nox2	27,55 ± 11,02	4,22 ± 1,07	0,39 ± 0,19	12,8 ± 1,7	100
	D-loopNox4-Nox2	218,71 ± 81,98* (x 8)	5,25 ± 0,93	3,03 ± 1,34* (x 8)	14,1 ± 1,1	794
	R199Q	190,90 ± 55,31* (x 7)	4,13 ± 0,66	2,40 ± 0,73* (x 6)	12,2 ± 1,2	693
	Neutrophile	492,96 ± 69,21* (x 18)	6,61 ± 0,48*	4,04 ± 0,40* (x 10)	> 15*	1789
Stimuli particulaires	Production totale de H ₂ O ₂ (RLU)		Pic-Tmax (min)	Pic-RLUmax (RLU)	% du pic-RLUmax à 60 min	% de la production de H ₂ O ₂ de WT-Nox2
	n					
OpZ	X-CGD	0,33 ± 0,14	NP	NP	NP	1
	WT-Nox2	30,72 ± 6,78	20,81 ± 3,27	0,40 ± 0,09	38,4 ± 4,2	100
	D-loopNox4-Nox2	48,84 ± 9,30* (x 1,5)	20,00 ± 3,99	0,60 ± 0,13 (x 1,5)	36,1 ± 8,6	159
	Neutrophile	629,76 ± 140,74* (x 20)	16,50 ± 3,08	8,39 ± 1,81* (x 21)	25,4 ± 11,4	2050
	WT-Nox2	1,02 ± 0,14	NP	NP	NP	3
Zymosan seul	D-loopNox4-Nox2	1,84 ± 0,28	NP	NP	NP	6
	Neutrophile	37,70 ± 1,56*	plateau 30 min	plateau 0,40	NP	123
	X-CGD	0,43 ± 0,24	NP	NP	NP	10
IgG-billes	WT-Nox2	4,04 ± 0,95	18,75 ± 3,42	0,06 ± 0,02	26,9 ± 5,2	100
	D-loopNox4-Nox2	10,90 ± 3,05* (x 3)	22,90 ± 1,16	0,13 ± 0,04* (x 2)	42,3 ± 1,8*	270
	Neutrophile	557,72 ± 231,92* (x 138)	18,90 ± 5,48	6,79 ± 2,44* (x 113)	41,8 ± 13,8*	13805
	WT-Nox2	0,90 ± 0,37	NP	NP	NP	22
	D-loopNox4-Nox2	4,2 ± 0,98	> 60	> 0,06	NP	104
Billes seules	Neutrophile	159,43 ± 82,93*	49,83 ± 12,94	2,61 ± 0,76*	NP	3946

▪ Activateurs solubles

Lors d'une stimulation par le **PMA**, le pic de production de H₂O₂ est augmenté de quatre fois environ grâce à la mutation de la boucle D. Celui-ci passe de $2,6 \pm 0,4$ RLU pour les cellules WT-Nox2 à $10,1 \pm 1,8$ RLU pour le mutant (Figure 31B, Table 3). De plus, le pic du mutant D-loopNox4-Nox2 survient à $4,4 \pm 0,6$ min contre $6,5 \pm 0,7$ min pour les cellules WT-Nox2. La surproduction de H₂O₂ par le mutant D-loopNox4-Nox2 n'est cependant pas suffisante pour rejoindre le niveau du pic du neutrophile humain qui est de $17,6 \pm 2,8$ RLU et atteint en seulement $3,4 \pm 0,2$ min (Figure 31A). La cinétique du mutant D-loopNox4-Nox2 tend à rejoindre celle du neutrophile avec un burst plus rapide et plus élevé que celui de WT-Nox2. L'activité du mutant R199Q suit la même tendance mais reste inférieure à celle de D-loopNox4-Nox2.

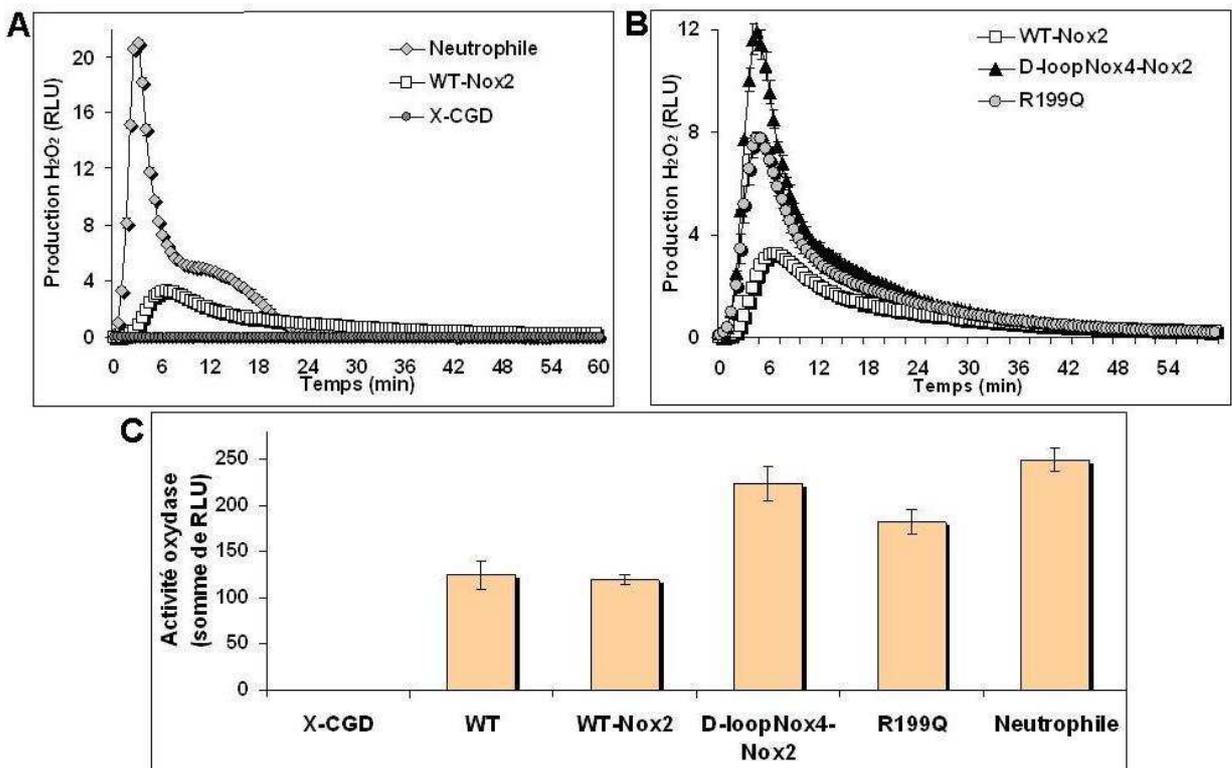


Figure 31 : Production de H₂O₂ dans les cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées et dans le neutrophile humain après stimulation par le PMA. La cinétique de production de H₂O₂ par $5 \cdot 10^5$ cellules intactes PLB-985 X-CGD, WT-Nox2 ou neutrophiles humains (A), ou R199Q et D-loopNox4-Nox2 (B), a été déterminée par chemiluminescence après stimulation par 80 ng/ml de PMA. Les valeurs représentent la moyenne \pm DS de trois mesures simultanées. Ces cinétiques sont représentatives d'au moins quatre déterminations indépendantes. C) Production totale de H₂O₂ exprimée en somme de RLU enregistrées sur 60 min. Ces données représentent la moyenne \pm DS d'au moins cinq expériences indépendantes (n = 5-11).

Il est important de noter qu’au cours de la stimulation par le PMA, le profil des cinétiques est tel que, en comparant la production totale de H₂O₂ mesurée sur 60 min dans tous les types cellulaires, les différences d’activité entre les différents types cellulaires sont nettement moins flagrantes (Figure 31, Table 3). L’activité oxydase totale du mutant D-loopNox4-Nox2 est quasi équivalente à celle du neutrophile humain, avec une production totale de H₂O₂ respectivement de 223,0 ± 18,6 RLU et 249,2 ± 12,6 RLU, alors que l’activité globale des cellules WT-Nox2 est de 119,6 ± 4,9 RLU. Il apparaît donc plus judicieux de comparer les pics de production plutôt que l’activité oxydase totale lors d’une activation par le PMA.

La surproduction de H₂O₂ par le mutant D-loopNox4-Nox2 est plus particulièrement marquée en réponse au **fMLF** par rapport à l’activation par le **PMA**.

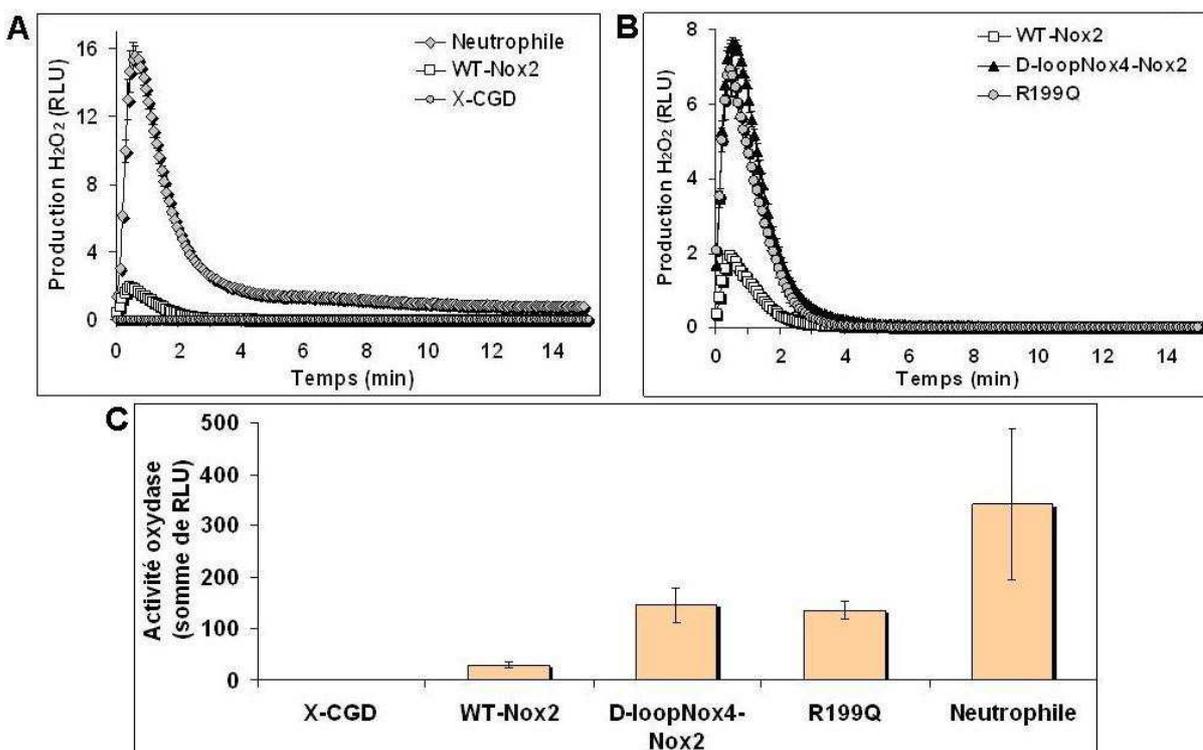


Figure 32 : Production de H₂O₂ dans les cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées et dans le neutrophile humain après stimulation par le fMLF. La cinétique de production de H₂O₂ par 5.10⁵ cellules intactes PLB-985 X-CGD, WT-Nox2 ou neutrophiles humains (A), ou R199Q et D-loopNox4-Nox2 (B), a été déterminée par chemiluminescence après stimulation par le fMLF 4.10⁻⁷M. Les valeurs représentent la moyenne ± DS de trois mesures simultanées. Ces cinétiques sont représentatives d’au moins quatre déterminations indépendantes. C) Production totale de H₂O₂ exprimée en somme de RLU enregistrées sur 15 min. Ces données représentent la moyenne ± DS d’au moins quatre expériences indépendantes (n = 4-6).

Le **fMLF** induit une réponse extrêmement rapide et brève dans les cellules PLB-985 WT-Nox2, avec une production maximale de $1,6 \pm 0,5$ RLU atteinte en 40 secondes environ pour une durée totale inférieure à 3 min (Figure 32B, Table 3). L'activité du mutant D-loopNox4-Nox2 est près de cinq fois supérieure à celle de WT-Nox2 que ce soit au niveau de la valeur du pic maximal d'activité ($8,3 \pm 1,5$ RLU versus $1,6 \pm 0,5$ RLU) ou de la production totale de H_2O_2 mesurée pendant 15 min (146 ± 33 RLU versus 30 ± 7 RLU) (Table 3). La cinétique de production de H_2O_2 du mutant R199Q présente un profil équivalent. Cette surproduction n'est cependant pas suffisante pour atteindre l'activité oxydase du neutrophile humain qui est de $341,9 \pm 146,4$ RLU avec un pic maximal à $14,7 \pm 6,8$ RLU.

D'autre part, on peut noter une différence de durée de la réponse des cellules PLB-985 par rapport au neutrophile : $2,8 \pm 0,3$ min contre $4,7 \pm 1,4$ min. En effet, la cinétique des cellules PLB-985 revient à des valeurs nulles après seulement 3 minutes alors que la cinétique du neutrophile diminue rapidement jusqu'à 3 minutes puis diminue progressivement sans atteindre de valeurs nulles à la différence des cellules PLB-985 (Figure 32A et B).

La super-activité oxydase de D-loopNox4-Nox2 est maximale lors d'une activation par **l'ionomycine** $2\mu M$. Cet ionophore à calcium a la particularité d'induire une réponse NADPH oxydase avec une reproductibilité relativement fluctuante, d'où l'obtention de fortes valeurs de déviation standard (Table 3). L'ionomycine induit dans les cellules PLB-985 WT-Nox2 un burst oxydatif faible avec une production de H_2O_2 maximale de seulement $0,4 \pm 0,2$ RLU atteint en $4,2 \pm 1,1$ min, pour une durée globale de $12,8 \pm 1,7$ min (Figure 33, Table 3).

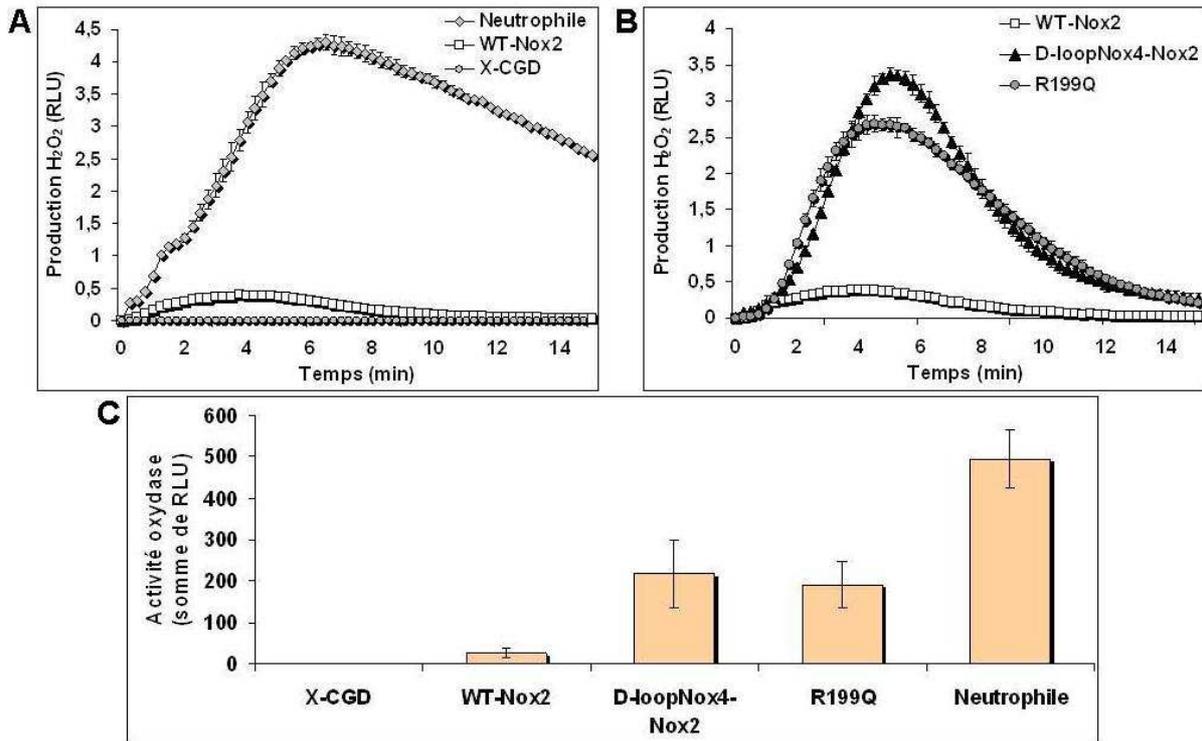


Figure 33 : Production de H₂O₂ dans les cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées et dans le neutrophile humain après stimulation par l'ionomycine. La cinétique de production de H₂O₂ par 5.10⁵ cellules intactes PLB-985 X-CGD, WT-Nox2, ou neutrophiles humains (A), ou R199Q et D-loopNox4-Nox2 (B), a été déterminée par chemiluminescence après stimulation par l'ionomycine 2 μM. Les valeurs représentent la moyenne ± DS de trois mesures simultanées. Ces cinétiques sont représentatives d'au moins trois déterminations indépendantes. C) Production totale de H₂O₂ exprimée en somme de RLU enregistrées sur 15 min. Ces données représentent la moyenne ± DS d'au moins quatre expériences indépendantes (n = 4-7).

La vitesse et la durée de la cinétique du mutant D-loopNox4-Nox2 sont identiques à celles des cellules WT-Nox2 mais l'activité totale mesurée pendant 15 min est environ huit fois supérieure à celle des cellules WT-Nox2 (218,7 ± 81,9 RLU versus 27,6 ± 11,0 RLU), avec un pic maximal de 3,0 ± 1,3 RLU. L'activité du mutant R199Q a tendance à être inférieure à l'activité du mutant D-loopNox4-Nox2 mais les différences obtenues ne sont pas significatives. Cette surproduction n'est cependant pas suffisante pour atteindre l'activité oxydase du neutrophile humain qui est de 492, 9 ± 69,2 RLU avec un pic maximal à 4,0 ± 0,4 RLU.

D'autre part, on peut noter à nouveau une différence de durée de la réponse des cellules PLB-985 par rapport au neutrophile : le pic maximal de production du neutrophile est moins précoce (6,6 ± 0,5 min versus 4,2 ± 1,1 min) et l'activité du neutrophile est prolongée bien au-delà de 15 min alors que la cinétique des cellules PLB-985 se termine à environ 13 min d'incubation.

▪ Activateurs particuliers

L'activité NADPH oxydase a été stimulée par deux types d'agents particuliers : du zymosan opsonisé avec du sérum (OpZ) ou des billes de latex de 0,8 µm de diamètre opsonisées par les immunoglobulines G. Ainsi opsonisés, l'OpZ stimule simultanément les récepteurs du complément et des immunoglobulines alors que les billes stimulent uniquement les récepteurs des immunoglobulines. Ces deux activateurs particuliers induisent une réponse oxydative beaucoup plus lente et plus longue que les activateurs solubles (Figures 34 et 35, Table 3).

Lors d'une stimulation par l'OpZ, l'activité oxydase globale du mutant D-loopNox4-Nox2 est supérieure à celle de WT-Nox2 de 60 % environ ($48,9 \pm 9,3$ RLU versus $30,7 \pm 6,8$ RLU), avec un pic maximal de production de $0,6 \pm 0,1$ RLU pour le mutant contre $0,4 \pm 0,1$ RLU pour les cellules WT-Nox2 (Figure 34, Table 3).

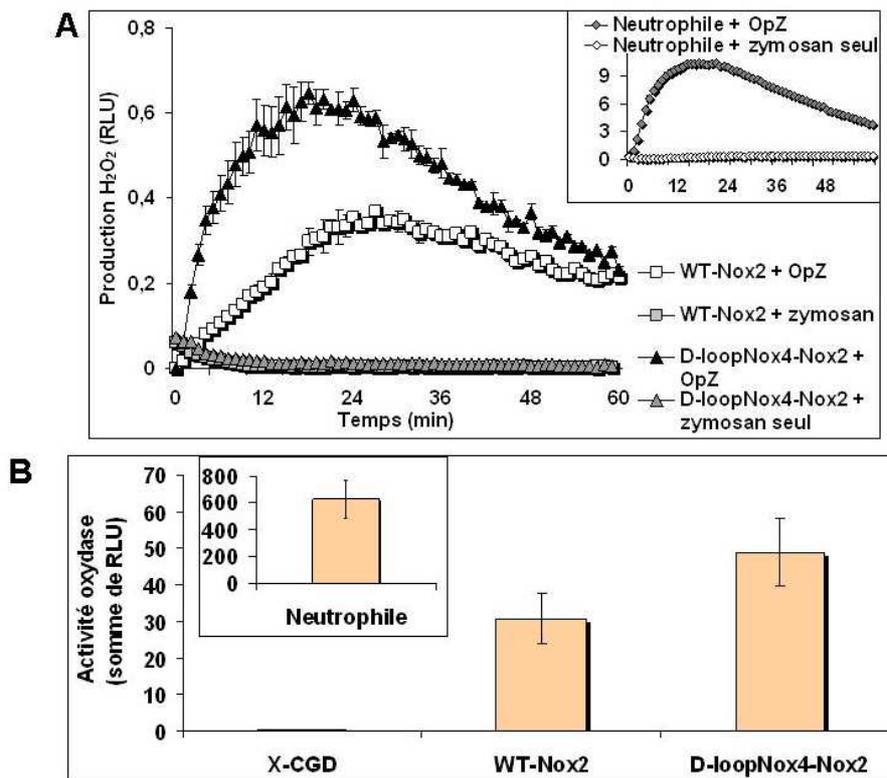


Figure 34 : Production de H₂O₂ dans les cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées et dans le neutrophile humain après stimulation par le zymosan opsonisé. A) La cinétique de production de H₂O₂ par 5.10⁵ cellules intactes PLB-985 X-CGD, WT-Nox2, D-loopNox4-Nox2 ou neutrophiles humains (encart) a été déterminée par chemiluminescence après stimulation avec 0,64 mg/ml d'OpZ ou de zymosan non opsonisé. Les valeurs représentent la moyenne ± DS de trois mesures simultanées. Ces cinétiques sont représentatives d'au moins trois déterminations indépendantes. B) Production totale de H₂O₂ exprimée en somme de RLU enregistrées sur 60 min. Ces données représentent la moyenne ± DS d'au moins cinq expériences indépendantes (n = 5-12).

Les cellules PLB-985 WT-Nox2 stimulées par l'OpZ présentent une activité oxydase nettement plus faible que celle du neutrophile, que ce soit au niveau de la valeur du pic maximal de production ($0,4 \pm 0,1$ RLU versus $8,39 \pm 1,8$ RLU) ou de la production totale d' H_2O_2 mesurée sur 60 min ($30,7 \pm 6,8$ RLU versus $629,8 \pm 140,7$ RLU). Sans opsonisation préalable du zymosan, la réponse des cellules PLB-985 est nulle, et le neutrophile n'est que très légèrement activé mais cependant à un niveau équivalent à celui des cellules WT-Nox2 stimulées par le zymosan opsonisé (Table 3).

Concernant l'activation de l'oxydase par des **billes de latex opsonisées par les immunoglobulines G**, le défaut de réponse des cellules PLB-985 par rapport au neutrophile est encore plus accentué qu'avec l'OpZ (Figure 35, Table 3).

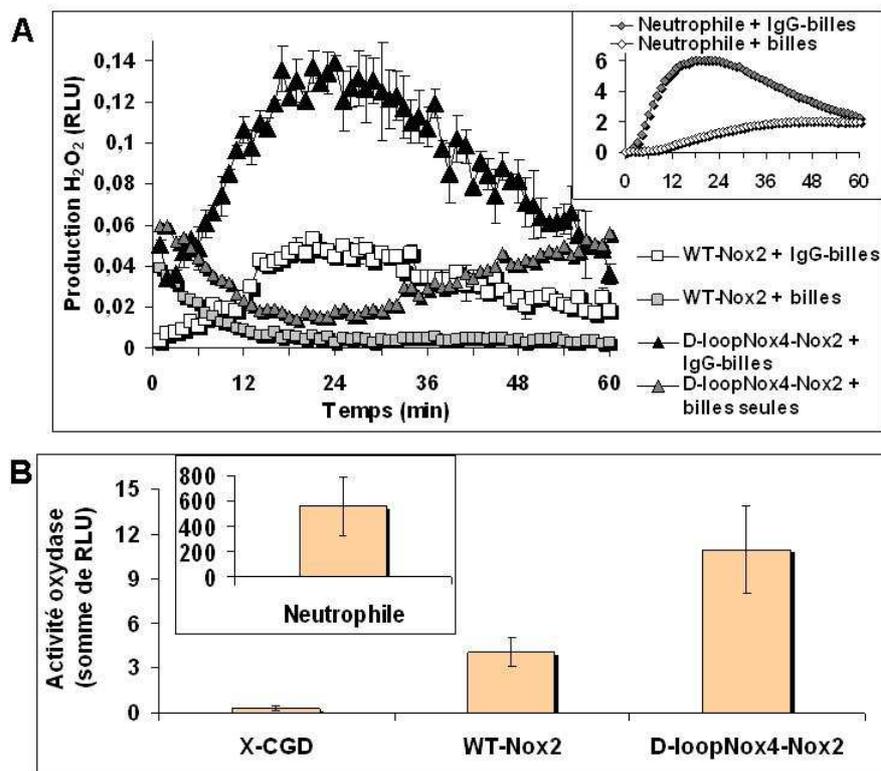


Figure 35 : Production de H_2O_2 dans les cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées et dans le neutrophile humain après stimulation par des billes de latex opsonisées. A) La cinétique de production de H_2O_2 par 5.10^5 cellules intactes PLB-985 X-CGD, WT-Nox2, D-loopNox4-Nox2 ou neutrophiles humains (encart) a été déterminée par chemiluminescence après activation avec $3,5.10^8$ billes de latex opsonisées aux immunoglobulines IgG ou non opsonisées. Les valeurs représentent la moyenne \pm DS de trois mesures simultanées. Ces cinétiques sont représentatives d'au moins trois déterminations indépendantes. B) Production totale de H_2O_2 exprimée en somme de RLU enregistrées sur 60 min. Ces données représentent la moyenne \pm DS d'au moins cinq expériences indépendantes (n = 5-11).

La production maximale de H_2O_2 de WT-Nox2 atteint difficilement $0,06 \pm 0,02$ RLU contre $6,8 \pm 2,4$ RLU pour le neutrophile. Ainsi, l'activité oxydase totale du neutrophile est 138 fois supérieure à celle de WT-Nox2 avec une activité totale de $557,7 \pm 231,9$ RLU versus $4,0 \pm 0,9$ RLU. Dans ces conditions d'activation, le mutant D-loopNox4-Nox2 présente une activité oxydase trois fois plus importante que WT-Nox2, avec une production totale de H_2O_2 de $10,9 \pm 3,1$ RLU et un pic de production de $0,13 \pm 0,04$ RLU. Sans opsonisation préalable des billes, la réponse des cellules PLB-985 WT-Nox2 est nulle et très faible pour le neutrophile (plateau à $2,6 \pm 0,8$ RLU).

En conclusion, la surproduction de H_2O_2 du mutant D-loopNox4-Nox2 est évidente lors d'une activation avec des agents solubles, spécialement avec l'ionomycine avec laquelle le pic maximal d'activité est quasiment comparable à celui du neutrophile humain. Lors d'une stimulation avec des agents particuliers, l'activation de la NADPH oxydase des cellules PLB-985 est extrêmement faible comparée au neutrophile. Malgré cette faible réponse des cellules PLB-985 aux agonistes particuliers, D-loopNox4-Nox2 conserve son caractère « super-mutant ».

I.3. Localisation de la surproduction de H_2O_2 du super-mutant D-loopNox4-Nox2

Dans le cadre de la caractérisation de la surproduction d' O_2^- par le mutant D-loopNox4-Nox2, nous avons analysé la localisation de la production de H_2O_2 afin de vérifier si la mutation induisait un changement du ratio entre la production interne et externe de H_2O_2 par le mutant D-loopNox4-Nox2. La synthèse totale et la synthèse externe de H_2O_2 ont été évaluées par chemiluminescence mesurée respectivement en présence de luminol et d'isoluminol (Figure 36) dans les cellules PLB-985 WT, WT-Nox2, R199Q, D-loopNox4-Nox2 et le neutrophile humain en réponse au PMA (80 ng/ml), fMLF 4.10^{-7} M, ionomycine 2 μ M et OpZ (0,64 mg/ml). La production interne d' H_2O_2 a été déduite de la soustraction des valeurs de production externe (isoluminol) aux valeurs de production totale (luminol).

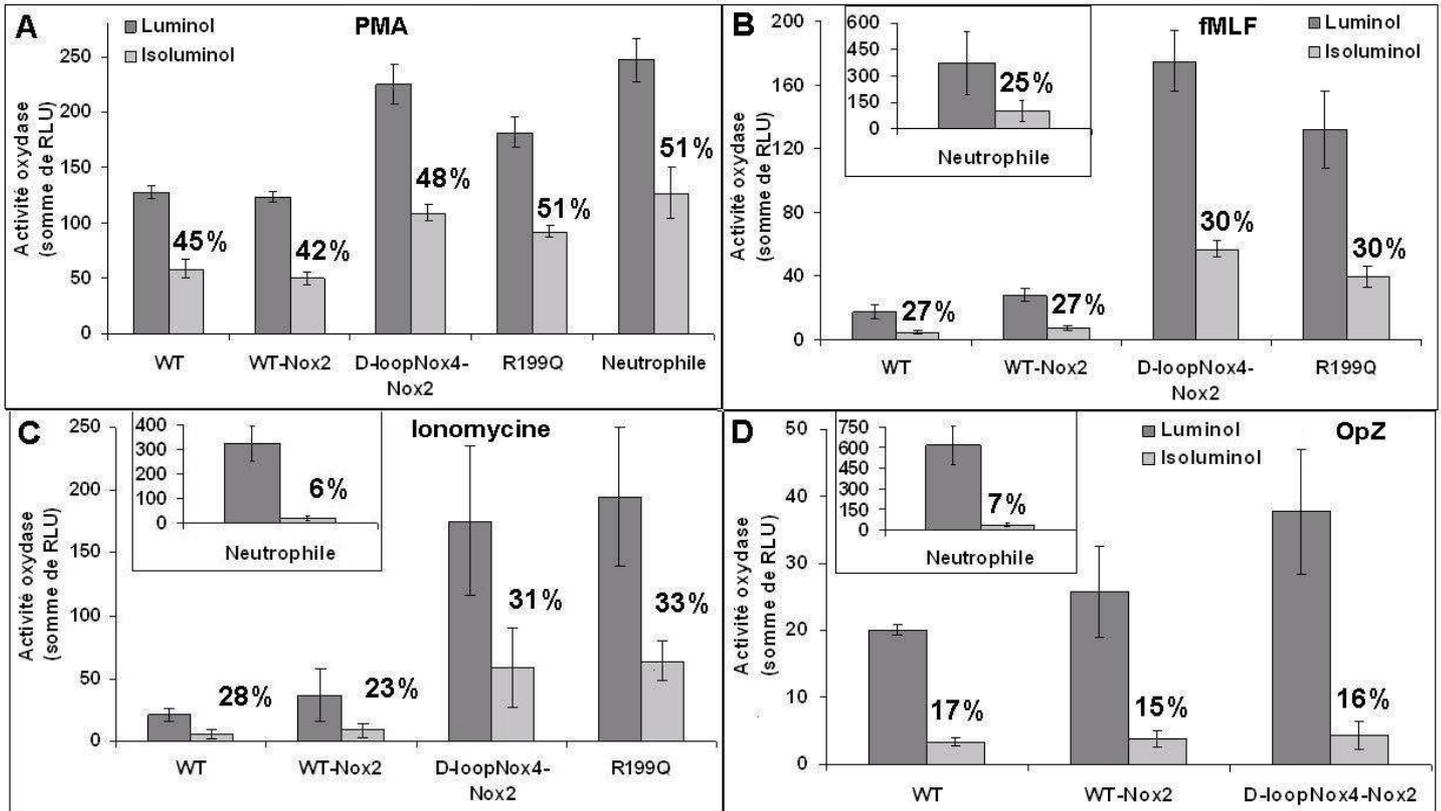


Figure 36 : Production de H₂O₂ externe, induite par divers agonistes, dans les cellules intactes différenciées PLB-985 et le neutrophile humain. La production de H₂O₂ totale ou externe de 5.10⁵ cellules a été mesurée par chemiluminescence en présence de luminol ou d’isoluminol après activation par A) 80 ng/ml de PMA, B) le fMLF 4 x 10⁻⁷ M, C) l’ionomycine 2 μM, ou D) 0,64 mg/ml d’OpZ. L’activité oxydase est exprimée en somme de RLU enregistrées pendant 15 min avec le fMLF (B) et l’ionomycine (C) ou 60 min avec le PMA (A) et l’OpZ (D). Les valeurs représentent la moyenne ± DS d’au moins trois expériences indépendantes (n = 3-6). Le pourcentage de production externe de H₂O₂ par rapport à la production totale est indiqué.

Après une activation par le PMA, le pourcentage de H₂O₂ externe est équivalent dans chaque type de cellules PLB-985 et dans le neutrophile humain, soit de 45-50 % environ (Figure 36A). On peut noter que l’expression de Nox2 recombinante n’affecte pas la répartition de la production de H₂O₂ par les cellules PLB-985 WT-Nox2 par rapport aux cellules WT d’origine avec respectivement une production externe de 41,8 ± 2,7 % et 45,1 ± 5,5 %. Les deux super-mutants D-loopNox4-Nox2 et R199Q présentent un pourcentage de H₂O₂ externe respectivement de 47,7 ± 6,0 % et 51,2 ± 5,3 comparable à celui du neutrophile (50,9 ± 5,6 %). Ainsi, l’activation via l’agent non physiologique PMA mène à une importante libération d’O₂⁻ dans le milieu extérieur, équivalente quel que soit le type cellulaire.

Suite à l’activation par le fMLF, le taux de H₂O₂ externe est également équivalent dans chaque type de cellules PLB-985 et comparable à celui du neutrophile humain, soit de 25-

30 % environ (Figure 36B). Les cellules WT-Nox2, D-loopNox4-Nox2 et le neutrophile présentent un pourcentage de H_2O_2 externe respectivement de $26,6 \pm 4,5$ %, $30,3 \pm 4,3$ % et $25,4 \pm 5,3$ %.

L'activation par l'ionomycine conduit à une production externe de 25 % environ dans chaque type de cellules PLB-985 (WT-Nox2 : $23,3 \pm 3,0$ % et D-loopNox4-Nox2 : $30,9 \pm 8,6$ %) alors qu'elle représente seulement $5,6 \pm 1,9$ % de la production totale pour le neutrophile (Figure 36C). La même différence de comportement est observée au cours de l'activation par l'OpZ avec seulement $6,6 \pm 2,0$ % de production externe dans le neutrophile contre environ 15 % dans les cellules PLB-985 (Figure 36D).

Finalement, quel que soit l'agoniste employé, les O_2^- surproduits par le mutant D-loopNox4-Nox2 sont distribués selon le même ratio interne/externe que pour les cellules PLB-985 WT-Nox2.

II. Caractérisation de l'activité NADPH oxydase *in vitro* du mutant D-loopNox4-Nox2

II.1. Activité NADPH oxydase en système reconstitué à partir de membranes purifiées

L'activité NADPH oxydase de 100 μg de membranes plasmiques purifiées, issues des cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2, a été reconstituée en système acellulaire avec du cytosol provenant de neutrophiles humains et en présence de NADPH, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ et d'une concentration adéquate d'acide arachidonique. La production d' O_2^- a été évaluée par réduction de 100 μM de cytochrome c sensible à la SOD. L'activité diaphorase de l'enzyme a également été mesurée par réduction de 50 μM d'INT (cf. § V.3.1). Nous avons évalué la capacité d'activation de ces membranes en fonction de concentrations décroissantes en cytosol (Figure 37).

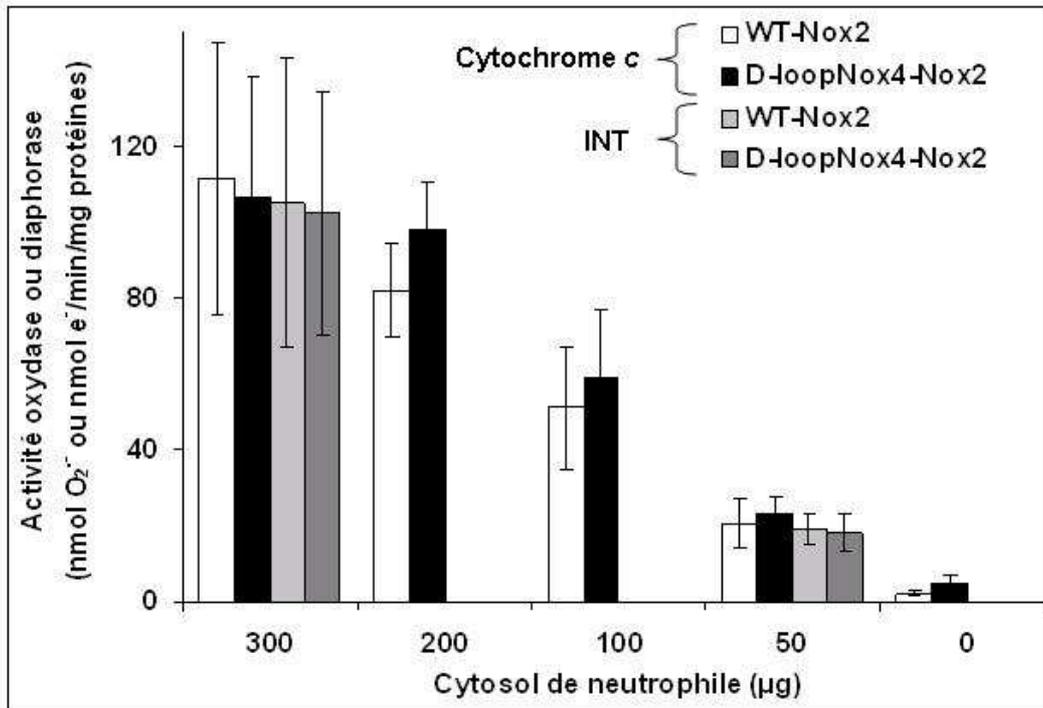


Figure 37 : Activité NADPH oxydase des cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 en système acellulaire par réduction du cytochrome c sensible à la SOD, et activité diaphorase par réduction de l'INT. L'activité NADPH oxydase de 100 µg de membranes purifiées de cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 a été reconstituée en présence de NADPH, GTPγS et de concentrations décroissantes de cytosol de neutrophile humain, puis activée par l'acide arachidonique. La production d'O₂⁻ a été évaluée par réduction de 100 µM de cytochrome c et l'activité diaphorase par réduction de 50 µM d'INT. Les données représentent la moyenne ± DS d'au moins trois expériences indépendantes (n = 3-7).

L'activité NADPH oxydase obtenue est équivalente dans les membranes issues de cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2, quelle que soit la concentration en cytosol. Dans les conditions optimales en présence de 300 µg de cytosol de neutrophiles, l'activité oxydase est de 112 ± 36 nmol d'O₂⁻/min/mg de protéines pour WT-Nox2 et de 106 ± 32 nmol d'O₂⁻/min/mg de protéines pour le mutant D-loopNox4-Nox2. La mesure de l'activité diaphorase en présence de 300 ou 50 µg de cytosol de neutrophile donne des résultats exactement identiques dans les deux types cellulaires (Figure 37). Ainsi, la mutation de la boucle D n'améliore pas l'activité NADPH oxydase ni diaphorase *in vitro* des membranes provenant des cellules D-loopNox4-Nox2.

II.2. Activité NADPH oxydase du cytochrome b_{558} du mutant D-loopNox4-Nox2 en système simplifié

Nous avons réalisé des expériences en système acellulaire simplifié en utilisant les cytochromes b_{558} de WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 purifiés, afin d'évaluer le turnover de l'enzyme. Ces travaux ont été réalisés avec le concours des Drs Antoine Picchiocci et Marie-Claire Dagher, et de Franck Debeurme. L'activité oxydase a été reconstituée avec du cytochrome b_{558} purifié à partir de cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées, et en présence de protéines recombinantes p47*phox*, p67*phox*, et Rac1 (cf. M&M §V.3.2). Le cytochrome b_{558} des cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées a été purifié par immunoaffinité selon la méthode mise au point par l'équipe du Pr Jesaitis (Lord et *al.*, 2008). De même, nous avons produit des protéines recombinantes de chacun des facteurs cytosoliques p47*phox*, p67*phox*, et Rac1 (cf. M&M §II).

II.2.1. Purification du cytochrome b_{558}

Le cytochrome b_{558} des cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 a été purifié à partir de 10^{10} cellules grâce à une collaboration établie avec l'équipe du Pr Jesaitis (Lord et *al.*, 2008 : M&M § IV). La purification se fait en une étape grâce à l'anticorps mAb CS9, spécifique de la sous-unité p22*phox* du cytochrome b_{558} (Taylor et *al.*, 2004).

La purification est effectuée sur la fraction membranaire obtenue à partir de 10^{10} cellules PLB-985 (M&M § I.6.2). Avant purification, la MPO est éliminée par un traitement au NaCl 1M et les membranes sont solubilisées dans un milieu contenant 2 % (p/v) d'octylglucoside OG. Le cytochrome b_{558} est ensuite fixé sur des billes de sépharose couplées à l'anticorps CS9 à raison de 2 mg de mAb CS9/ml de billes. Puis le cytochrome b_{558} est élué avec 200 μ M de peptide compétitif Ac-AEARKKPSEEEAA-NH₂ dans un tampon contenant 1,2 % (p/v) d'OG. La purification est suivie en mesurant la quantité de protéines totales par la méthode de Bradford ou mesure à 280 nm, et la quantité de cytochrome b_{558} via le spectre d'absorption différentiel redox (Table 4).

Table 4

Tableaux de purification du cytochrome b_{558} à partir de cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées. La purification se déroule selon le protocole décrit par l'équipe du Pr Jesaitis (M&M § IV). Les mesures ont été effectuées sur les membranes brutes, la fraction soluble en OG 2 % (p/v) avant purification, et sur l'extrait purifié élué en OG 1,2 % (p/v). La quantité de protéines avant purification et dans l'extrait soluble OG 2 % (p/v) est évaluée par la méthode de Bradford. La quantité de protéines après purification est estimée en fonction du poids moléculaire du cytochrome b_{558} en considérant que la pureté est de 100 % (*). La quantité de cytochrome b_{558} est déterminée par mesure du spectre d'absorption différentiel. Ces données correspondent à une unique expérience de purification.

WT-Nox2	Quantité de protéines (mg)	Cytochrome b_{558}		Facteur de purification	Rendement (%)
		pmol	pmol/mg		
Membranes brutes	172,3	11200	65	1	100
Extrait soluble OG 2 %	28,8	10530	366	5,6	94
Cytochrome b_{558} purifié	0,056*	650	11607	178	6

D-loopNox4-Nox2	Quantité de protéines (mg)	Cytochrome b_{558}		Facteur de purification	Rendement (%)
		pmol	pmol/mg		
Membranes brutes	181,3	11420	63	1	100
Extrait soluble OG 2 %	39,6	11175	282	4,5	98
Cytochrome b_{558} purifié	0,089*	1035	11629	185	9

La première étape de solubilisation des membranes en OG 2 % (p/v) permet un premier enrichissement en cytochrome b_{558} d'un facteur 5 avec seulement 5 % de pertes environ. Après l'unique étape de purification par affinité, c'est-à-dire dans l'extrait élué en OG 1,2 % (p/v), nous avons obtenu 650 pmoles de cytochrome b_{558} purifié à partir des cellules WT-Nox2 dans 130 μ l d'extrait, et 1035 pmoles de cytochrome b_{558} purifié à partir des cellules D-loopNox4-Nox2 dans 230 μ l d'extrait. Le rendement de purification total est de 6 à 9 % environ. La très grande pureté du cytochrome b_{558} retrouvé dans l'extrait final est révélée par un gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent et par un Western blot révélant les sous-unités p22 $phox$ et Nox2 grâce aux anticorps mAb 449 et mAb 48 (Figure 38). La révélation du contenu protéique au nitrate d'argent montre essentiellement une bande à 22 kDa et une large bande entre 90 et 130 kDa correspondant aux deux sous-unités du cytochrome b_{558} p22 $phox$ et Nox2. Le Western blot révèle une troisième bande autour de 40 kDa, détectée par l'anticorps anti-p22 $phox$ et que l'on distingue faiblement sur le gel à l'argent. Nous pouvons supposer que cette bande provient de la dimérisation de la protéine p22 $phox$.

La concentration protéique dans l'extrait élué n'a pu être mesurée du fait des faibles quantités d'échantillons obtenues et d'interférences avec le détergent. Cependant, nous avons

estimé la quantité minimale de protéines par rapport à la quantité de cytochrome b_{558} obtenue, en considérant que la pureté était de 100 %. En se basant sur le poids moléculaire du cytochrome b_{558} (86294 g/mol, avec 65336 g/mol pour Nox2 et 20958 g/mol pour p22 $phox$), la quantité de protéines éluées est au minimum de 56 μ g pour WT-Nox2 et 89 μ g pour D-loopNox4-Nox2. En utilisant ces quantités de protéines, le facteur d'enrichissement est alors d'environ 180. La pureté en cytochrome b_{558} de notre extrait final étant très élevée (supérieure à 90 %), ce facteur de purification n'est à priori que légèrement surestimé.

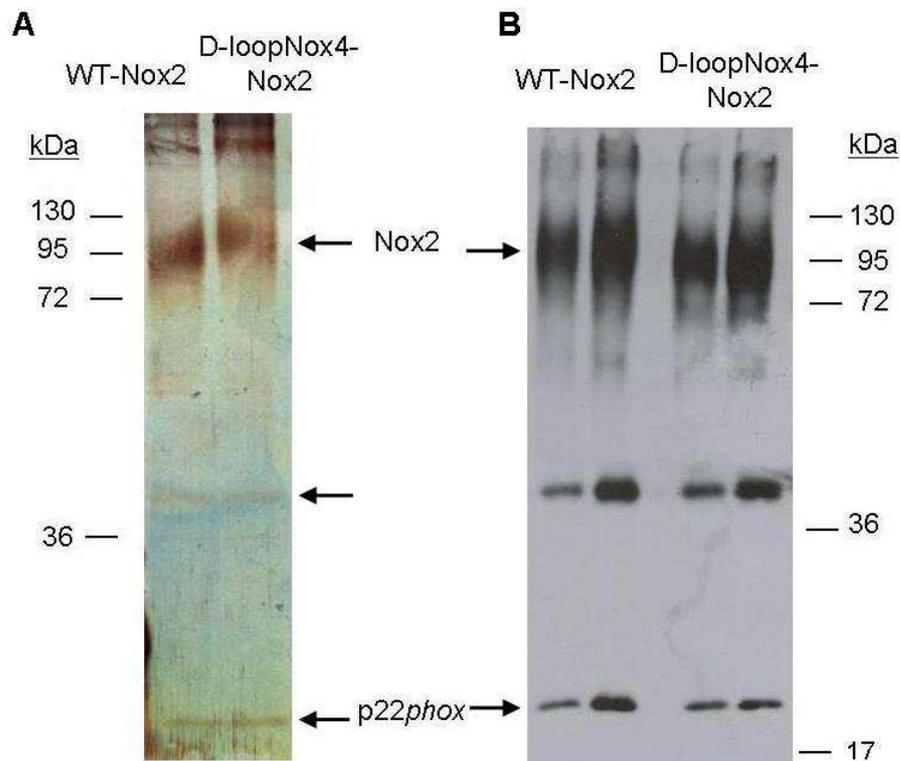


Figure 38 : Contrôle de la purification du cytochrome b_{558} des cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2. A) 50 pmoles de cytochrome b_{558} provenant de l'extrait final de purification ont subi une électrophorèse SDS-PAGE puis une révélation au nitrate d'argent. B) L'immunodétection par Western blot des sous-unités Nox2 et p22 $phox$ a été réalisée sur 3 et 6 pmoles de cytochrome b_{558} issu de l'extrait final de purification. Les bandes correspondant à Nox2 et p22 $phox$ sont indiquées.

Après purification, le cytochrome b_{558} est replacé dans un environnement lipidique adéquat afin de lui redonner une conformation active (M&M § IV.2). Les lipides employés pour la reconstitution fonctionnelle du cytochrome b_{558} sont la phosphatidylcholine de type XVI-E et l'acide phosphatidique dioleoyl (DOPA).

II.2.2. Purification des protéines recombinantes p67phox, p47phox et Rac1

Les protéines recombinantes p47phox, p67phox et Rac1 ont été produites au laboratoire afin de reconstituer l'activité oxydase du cytochrome *b*₅₅₈ purifié (cf. M&M § II). Les trois protéines fusionnées à la GST ont été exprimées dans les bactéries *E.coli* DH5 puis purifiées sur une matrice glutathion-Sepharose. La protéine p67phox recombinante reste fusionnée à la GST alors que la GST est clivée des protéines recombinantes p47phox et Rac1. Leur intégrité et leur pureté a été contrôlée sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (Figure 39).

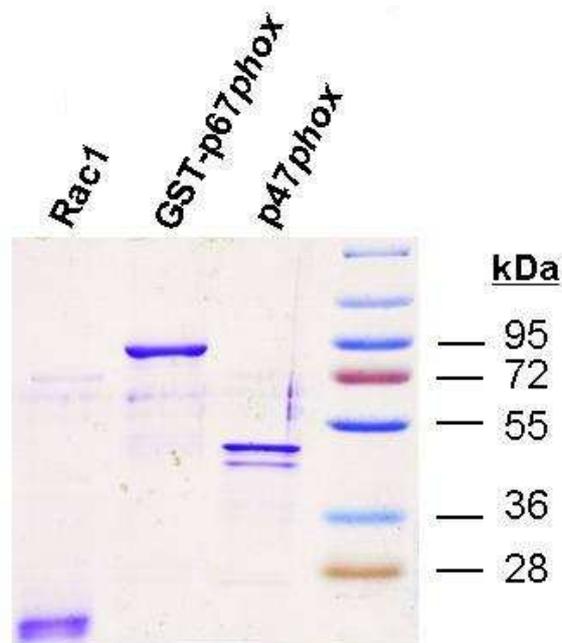


Figure 39 : Electrophorèse SDS-PAGE des protéines recombinantes p47phox, p67phox et Rac1 révélées après coloration au bleu de Coomassie. La révélation des protéines est réalisée sur un échantillon de 2 µg de protéines purifiées.

II.2.3. Turnover du cytochrome *b*₅₅₈ du mutant D-loopNox4-Nox2

L'activité du cytochrome *b*₅₅₈ purifié des cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 a été reconstituée en présence des protéines recombinantes p47phox, p67phox et Rac1 (M&M § V.3.2). Comme avec les extraits membranaires, l'activité a été évaluée par suivi de la réduction du cytochrome c à DO₅₅₀ après stimulation par l'acide arachidonique (AA) mais aussi par l'acide phosphatidique (PA) (Figures 40 et 41). Pour des conditions optimales, les mesures ont été réalisées avec 5 nM de cytochrome *b*₅₅₈ purifié en présence de 1 µM de chacun des facteurs p47phox, p67phox et Rac1GTP. Une gamme d'activation par le PA ou l'AA a été réalisée afin

de déterminer la quantité optimale de chacun d'eux pour obtenir une activation maximale de l'oxydase. Les résultats présentés dans les figures 40 et 41 sont représentatives de trois expériences différentes réalisées avec chacun des activateurs lipidiques AA et PA.

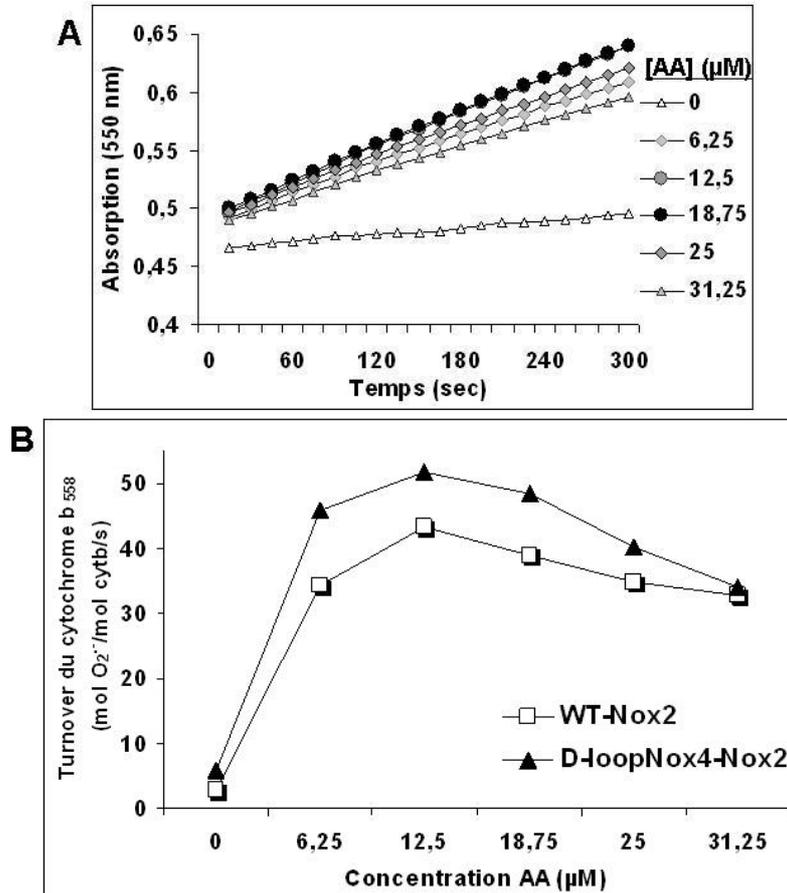


Figure 40 : Production d'O₂⁻ du cytochrome b₅₅₈ purifié de WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 en système reconstitué activé par l'AA en présence des protéines recombinantes p47phox, p67phox et Rac1. A) Cinétique de réduction du cytochrome c par le cytochrome b₅₅₈ purifié de WT-Nox2 en système simplifié activé par l'AA. La réduction du cytochrome c a été enregistrée à DO₅₅₀ après ajout de concentrations croissantes d'AA (0 à 31,25 μM). B) Turnover du cytochrome b₅₅₈ purifié de WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 activé par l'AA. L'activité oxydase a été évaluée par suivi de la réduction du cytochrome c puis le turnover de l'enzyme a été calculé en mol d'O₂⁻/mol de cytochrome b₅₅₈/s. Ces données correspondent à une expérience représentative de trois expériences indépendantes.

Dans les conditions expérimentales utilisées, le taux de production d'O₂⁻ stimulée par l'AA est maximal pour une concentration de 12,5 μM avec les deux cytochromes b₅₅₈ sauvage et muté (Figure 40). Le turnover du cytochrome b₅₅₈ de WT-Nox2 est alors de 43,3 ± 9,9 mol d'O₂⁻/mol de cytochrome b₅₅₈/s contre 51,8 ± 8,2 mol d'O₂⁻/mol de cytochrome b₅₅₈/s pour le cytochrome purifié de D-loopNox4-Nox2. Stimulés par l'AA, les cytochromes b₅₅₈ purifiés muté et sauvage présentent donc un turnover du même ordre de grandeur.

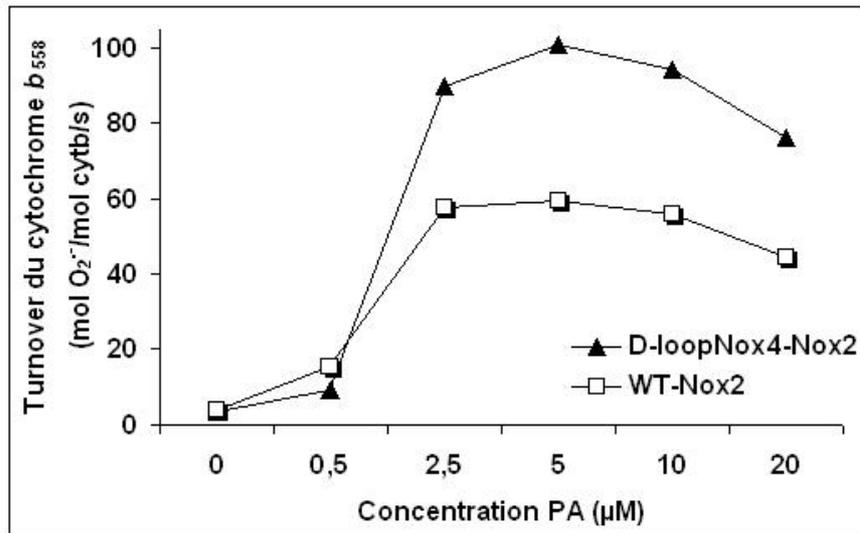


Figure 41 : Production d'O₂⁻ du cytochrome *b*₅₅₈ purifié de WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 en système reconstitué activé par le PA en présence des protéines recombinantes *p47phox*, *p67phox* et *Rac1*. Le turnover du cytochrome *b*₅₅₈ purifié de WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 a été déterminé après ajout de concentrations croissantes de PA (0 à 20 µM). L'activité oxydase a été évaluée par suivi de la réduction du cytochrome *c* à DO₅₅₀ puis le turnover de l'enzyme a été calculé en mol d'O₂⁻/mol de cytochrome *b*₅₅₈/s. Ces données correspondent à une expérience représentative de trois expériences indépendantes.

Pour l'activation par le PA, le taux de production d'O₂⁻ est maximal pour une concentration de 5 µM avec les deux cytochromes *b*₅₅₈ sauvage et muté (Figure 41). Le turnover du cytochrome *b*₅₅₈ de WT-Nox2 est alors de 48,7 ± 10,5 mol d'O₂⁻/mol de cytochrome *b*₅₅₈/s contre 79,2 ± 23,3 mol d'O₂⁻/mol de cytochrome *b*₅₅₈/s pour le cytochrome de D-loopNox4-Nox2 (n = 3). Du fait d'une importante variabilité des valeurs de l'activité oxydase maximale entre les 3 différentes expériences menées, le turnover du cytochrome *b*₅₅₈ de D-loopNox4-Nox2 n'apparaît pas significativement supérieur à celui du cytochrome *b*₅₅₈ sauvage. Cependant, si l'on mesure l'écart entre les turnovers du cytochrome *b*₅₅₈ muté et sauvage pour chaque expérience, on se rend compte qu'il est systématiquement plus élevé pour le cytochrome *b*₅₅₈ muté de 59,8 ± 17,3 %.

III. Etude des mécanismes moléculaires responsables de la super-activité NADPH oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2

III.1. Sensibilité du mutant D-loopNox4-Nox2 aux influx calciques induits lors de l'activation de la NADPH oxydase

Comme précédemment démontré, l'ionophore à calcium ionomycine est l'agoniste induisant la plus importante suractivité oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2 par rapport aux

cellules WT-Nox2 (Figure 33, Table 3). En outre, le calcium intracellulaire est un acteur primordial dans l'activation de la NADPH oxydase en réponse au fMLF, agoniste provoquant également une forte suractivité du mutant D-loopNox4-Nox2 (Figure 32). Suite à ces observations, nous avons analysé l'activité *ex vivo* du mutant D-loopNox4-Nox2 après induction de l'influx calcique intracellulaire (Figure 42).

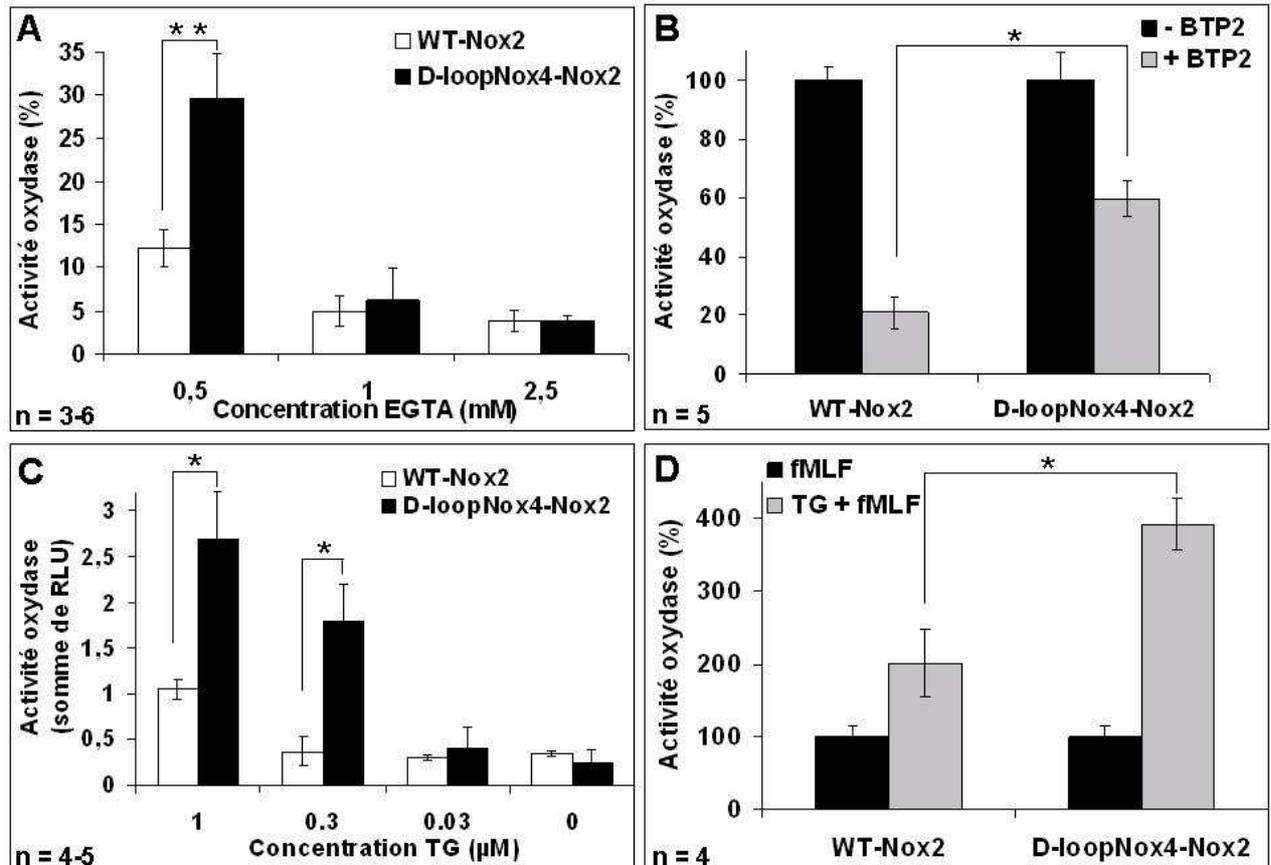


Figure 42 : Influence du métabolisme calcique sur l'activité NADPH oxydase des cellules intactes PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées. A) Effet de l'EGTA sur l'activité NADPH oxydase des cellules stimulées par le fMLF ($4 \cdot 10^{-7}M$). La production de H_2O_2 de $5 \cdot 10^5$ cellules a été mesurée par chemiluminescence en présence de luminol en présence de concentrations croissantes d'EGTA. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de l'activité sans EGTA. B) Effet du BTP2 sur l'activité NADPH oxydase des cellules stimulées par le fMLF ($4 \cdot 10^{-7}M$). Les cellules ont été incubées 5 min avec $10 \mu M$ de BTP2 avant stimulation. C) Effet de la thapsigargine sur l'activité oxydase de $5 \cdot 10^5$ cellules non stimulées. L'activité oxydase totale est exprimée en somme de RLU enregistrées sur 15 min. D) Effet de la thapsigargine $1 \mu M$ sur l'activité oxydase de $5 \cdot 10^5$ cellules stimulées par le fMLF ($4 \cdot 10^{-7}M$). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de l'activité sans thapsigargine. Les résultats représentent la moyenne \pm DS de manipulations indépendantes. Différence significative des résultats du mutant D-loopNox4-Nox2 par rapport à WT-Nox2 : *, $p < 0,05$ et **, $p < 0,01$.

Une déplétion en calcium extracellulaire par l'ajout de 0,5 mM, 1 mM ou 2,5 mM d'EGTA inhibe l'activité oxydase fMLF-dépendante des cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 (Figure 42A). Au-delà de 1 mM d'EGTA, l'inhibition est quasiment totale dans les deux types cellulaires. Par contre, le mutant D-loopNox4-Nox2 est significativement moins affecté par 0,5 mM d'EGTA que les cellules WT-Nox2 (30 ± 5 % d'activité oxydase restante contre 12 ± 2 %). Il semblerait donc que le mutant ait besoin de moins de calcium pour initier son activation ou qu'il soit plus sensible à de faibles concentrations calciques que les cellules WT-Nox2. Ce résultat a été confirmé par des expériences effectuées avec le BTP2, un inhibiteur de l'influx calcique SOCE-dépendant (Steinckwich et *al.*, 2007) (Figure 42B). En effet, après une incubation des cellules 5 min en présence de 10 μ M de BTP2, l'activité oxydase stimulée par le fMLF du mutant D-loopNox4-Nox2 est réduite de seulement 40% contre 80% pour les cellules WT-Nox2.

La déplétion des stocks de calcium intracellulaire, qui est à l'origine de l'influx calcique via les canaux du système SOCE, peut être reproduite grâce à un traitement à la thapsigargine (Thastrup et *al.*, 1994 ; Brécharde et Tschirhart, 2008). Comme résumé dans la figure 40C, la thapsigargine seule stimule difficilement l'activité NADPH oxydase des cellules PLB-985 : l'activité globale mesurée sur 15 min atteint à peine 1 à 3 RLU avec 1 μ M de thapsigargine. Néanmoins, l'activité oxydase totale du mutant D-loopNox4-Nox2 est 2,5 et 4 fois plus élevée que celle de WT-Nox2 avec respectivement 1 et 0,3 μ M de thapsigargine ajoutés dans les puits. Nous avons effectué une expérience de contrôle de la thapsigargine sur le neutrophile humain : 1 μ M de thapsigargine a stimulé une production de H₂O₂ par le neutrophile de 117 RLU en 15 min, soit environ un tiers de la production induite par le fMLF. La thapsigargine seule est donc nettement plus efficace pour activer l'oxydase du neutrophile humain que celle des cellules PLB-985.

En activant les cellules simultanément avec de la thapsigargine 1 μ M et du fMLF 4.10^{-7} M, le caractère super-mutant de D-loopNox4-Nox2 est encore plus accentué (Figure 42D). L'activité fMLF-dépendante de WT-Nox2 est deux fois plus importante grâce à l'ajout de thapsigargine alors que celle de D-loopNox4-Nox2 est près de quatre fois plus élevée. En conclusion, l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui se produit après la stimulation par le fMLF ou l'ionomycine est impliquée dans la super-activité oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2.

III.2. Sensibilité du mutant D-loopNox4-Nox2 aux événements de phosphorylation induits lors de la stimulation de l'activité NADPH oxydase

Nous venons de démontrer dans le paragraphe précédent que l'augmentation en calcium libre intracellulaire participe à la super-activité oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2. Or, certains événements de phosphorylation se produisant durant la transduction du signal d'activation de la NADPH oxydase nécessitent une augmentation du taux de calcium intracellulaire. Nous avons alors analysé l'implication des événements de phosphorylation dans l'activation *ex vivo* de l'oxydase de D-loopNox4-Nox2 en employant divers inhibiteurs de kinases. L'effet des inhibiteurs de kinases sur l'activité oxydase a été étudié par la technique de chemiluminescence, après activation par le fMLF, PMA ou OpZ. Les résultats obtenus ont été rapportés en pourcentage d'inhibition de l'activité oxydase sans inhibiteur (Table 5). Notre étude s'est focalisée sur quatre principales kinases impliquées dans le priming et/ou dans l'activation du complexe NADPH oxydase : la sérine/thréonine-kinase PKC, les sérine-kinases MAPKs ERK1/2 et p38, et la phosphatidylinositol-3-kinase PI3K.

Table 5

Influence des événements de phosphorylation sur l'activité NADPH oxydase des cellules intactes PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées. 5.10⁵ cellules ont été traitées 15 min avec les inhibiteurs de kinase Ro 31-8220 ou wortmannin, 30 min avec SB 203580 ou LY-294002, ou une nuit avec PD 98059. Puis la production de H₂O₂ OpZ-, PMA- et fMLF-dépendante des cellules a été mesurée par chemiluminescence en présence de luminol. Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'inhibition de l'activité oxydase de référence sans inhibiteur. Les données représentent la moyenne ± DS de trois à cinq déterminations indépendantes. Différence significative des résultats du mutant D-loopNox4-Nox2 par rapport aux cellules WT-Nox2 : *, p<0,05.

	Ro 31-8220			Wortmannin			LY-294002		
	Concentration (µM)	Concentration (nM)		Concentration (µM)		Concentration (µM)		D-loopNox4-Nox2	WT-Nox2
		WT-Nox2	D-loopNox4-Nox2	WT-Nox2	D-loopNox4-Nox2	WT-Nox2	D-loopNox4-Nox2		
OpZ	5	1,6 ± 5,5	4,4 ± 7,6	80,4 ± 7,1	50,9 ± 9,1*	6,25	52,6 ± 4,3	27,1 ± 8,7*	
	10	26,1 ± 8,1	29,0 ± 6,5	88,9 ± 3,3	64,9 ± 6,7*	12,5	66,9 ± 6,8	36,7 ± 11,4*	
	20	94,3 ± 0,4	89,8 ± 0,8	96,9 ± 0,9	87,2 ± 3,6*	25	81,2 ± 5,5	48,0 ± 10,4*	
PMA	1,25	39,5 ± 4,3	35,0 ± 1,8	5,0 ± 3,7	-5,1 ± 1,5	25	3,5 ± 1,3	5,9 ± 1,8	
	2,5	78,0 ± 3,2	82,0 ± 4,1	3,5 ± 1,6	-3,4 ± 1,7	50	5,1 ± 2,6	3,1 ± 1,7	
	5	99,6 ± 0,1	99,9 ± 0,3	3,9 ± 1,3	-5,8 ± 2,4	100	7,7 ± 1,7	5,7 ± 2,6	
fMLF	1,25	20,3 ± 7,1	7,6 ± 7,2	47,0 ± 6,6	45,5 ± 5,3	6,25	33,5 ± 2,9	25,1 ± 0,8	
	2,5	35,7 ± 11,6	28,9 ± 13,0	53,6 ± 4,7	52,7 ± 4,1	12,5	34,8 ± 4,0	28,5 ± 1,9	
	5	95,0 ± 2,9	88,1 ± 5,1	63,8 ± 4,6	63,9 ± 3,2	25	36,7 ± 2,3	34,3 ± 1,7	
OpZ	Concentration (µM)	PD 98059		SB 203580		Concentration (µM)	Concentration (µM)		
		WT-Nox2	D-loopNox4-Nox2	WT-Nox2	D-loopNox4-Nox2		WT-Nox2	D-loopNox4-Nox2	
	10	24,7 ± 6,3	19,3 ± 2,6	5	-2,6 ± 6,6	-5,7 ± 7,1			
20	32,2 ± 7,7	24,6 ± 3,8	10	-7,4 ± 6,5	-12,9 ± 4,7				
40	39,6 ± 4,1	30,5 ± 2,7	20	-12,0 ± 4,8	-24,6 ± 3,5*				
PMA	10	25,3 ± 3,6	7,8 ± 1,8*	5	4,2 ± 5,4	0,6 ± 2,4			
	20	32,2 ± 2,5	10,2 ± 2,1*	10	6,9 ± 3,2	4,0 ± 2,5			
	40	40,3 ± 2,2	7,9 ± 1,9*	20	8,5 ± 1,2	5,3 ± 1,2			
fMLF	10	70,2 ± 5,0	46,5 ± 6,0*	5	38,2 ± 6,4	55,4 ± 3,7			
	20	76,8 ± 4,4	54,7 ± 4,8*	10	53,6 ± 4,9	62,9 ± 2,9			
	40	79,9 ± 5,3	58,6 ± 0,5*	20	63,7 ± 2,5	71,2 ± 5,8			

Inhibition de la protéine kinase PKC

L'activité des protéines kinases PKCs peut être inhibée plus ou moins spécifiquement par les dérivés bisindolylmaléimides dont notamment les composés Go6976, GF 109203X et Ro31-8220 (Davies et *al.*, 2000). Ce sont de puissants inhibiteurs compétitifs agissant au niveau du site de fixation de l'ATP (IC_{50} de l'ordre du nanomolaire *in vitro*), principalement sur les isoformes de PKC α , β et γ .

Afin d'inhiber la kinase PKC, les cellules WT-Nox2 et le mutant D-loopNox4-Nox2 ont été préalablement incubés 15 min en présence de concentrations croissantes de Ro31-8220 avant d'être stimulées par l'OpZ, le PMA ou le fMLF. Or, les cinétiques d'inhibition de l'activité oxydase de WT-Nox2 et de D-loopNox4-Nox2 coïncident parfaitement quel que soit l'agent stimulant (Table 5). Ces résultats suggèrent que les événements de phosphorylation médiés par la PKC ont le même impact sur le processus d'activation des cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2. Par ailleurs, ces expériences mettent en évidence un niveau d'implication de la PKC variable selon la nature de l'agoniste. En effet, il faut quatre fois plus de Ro31-8220 avec l'OpZ pour obtenir une cinétique d'inhibition de l'activité oxydase équivalente à celle obtenue après stimulation par le PMA ou le fMLF. Ainsi, lorsque l'inhibition est totale, ou quasiment totale, pour une concentration de Ro31-8220 de 5 μ M dans les cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 stimulées avec le PMA et le fMLF, elle est inférieure à 5% en moyenne après stimulation par l'OpZ (Table 5).

Inhibition de la protéine kinase PI3K

L'activité de la PI3K peut être inhibée par les deux inhibiteurs ATP-compétitifs wortmannin et LY294002 (Davies et *al.*, 2000). La wortmannin est plus puissante, avec une IC_{50} de l'ordre du nanomolaire contre une IC_{50} de l'ordre du micromolaire pour le composé LY294002.

Afin d'inhiber la kinase PI3K, les cellules WT-Nox2 et le mutant D-loopNox4-Nox2 ont été incubés 15 min en présence de concentrations croissantes de wortmannin avant d'être stimulées par l'OpZ, le PMA ou le fMLF. On observe une variabilité de l'implication de la kinase selon le stimulateur utilisé pour activer l'oxydase (Table 5). Avec le PMA, qui active directement la PKC, la voie de transduction du signal d'activation de l'oxydase des cellules PLB-985 ne nécessite pas, ou alors très peu, l'activation de la PI3K. En effet, il se produit de légères variations de l'activité NADPH oxydase de WT-Nox2 et de D-loopNox4-Nox2 avec

l'inhibiteur mais aucune de ces variations n'est statistiquement significative même à de fortes concentrations (100 nM). Par contre, avec le fMLF les résultats confirment que la PI3K participe partiellement à l'activation de l'oxydase. A une concentration moyenne en wortmannin, soit 25 nM, l'inhibition de l'oxydase est de 50% environ dans les cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2. L'augmentation de la concentration jusqu'à 100 nM permet d'augmenter le taux d'inhibition mais très progressivement et sans atteindre d'inhibition totale pour les deux types cellulaires. Enfin, avec l'OpZ comme agoniste, l'activité oxydase de WT-Nox2 est inhibée à près de 80% avec seulement 6,25 nM de wortmannin et quasiment à 100% avec 25 nM. L'activité oxydase de WT-Nox2 induite par l'OpZ est donc fortement PI3K-dépendante. Or, aux mêmes concentrations, l'inhibition de l'oxydase est significativement moins élevée dans le mutant D-loopNox4-Nox2 (51% et 87% pour 6,25 et 25 nM respectivement) (Figure 43A). L'activité oxydase du mutant est par conséquent moins sensible aux événements de phosphorylation induits par la voie de signalisation PI3K-dépendante déclenchée par l'OpZ.

Afin de confirmer que les effets observés sont spécifiques de l'inhibition de la PI3K, les mêmes mesures ont été réalisées avec le second inhibiteur de la PI3K LY-294002. Les cellules WT-Nox2 et le mutant D-loopNox4-Nox2 ont été incubés 30 min en présence de concentrations croissantes de LY-294002 avant d'être stimulées par l'OpZ, le PMA ou le fMLF. On retrouve des résultats similaires à ceux obtenus avec la wortmannin (Table 5). Tout comme la wortmannin, le composé LY-294002 n'a aucun effet significatif sur l'activité oxydase PMA-dépendante ; il semble exister une légère tendance inhibitrice mais à des concentrations en LY294002 pour lesquelles la spécificité d'inhibition de la PI3K n'est plus garantie. L'inhibition de l'activité oxydase fMLF-dépendante par LY-294002 est moins efficace que celle induite par la wortmannin mais elle reste équivalente dans les cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2. En effet, avec 6,25 μ M de LY-294002, l'inhibition est de 30% environ dans les deux types cellulaires et se maintient à cette valeur avec des concentrations supérieures en LY-294002. Enfin, au cours d'une activation par l'OpZ, LY-294002 induit comme la wortmannin une forte inhibition de l'activité oxydase des cellules WT-Nox2 alors que l'inhibition de l'activité oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2 est moins élevée. Avec les deux inhibiteurs, lorsque près de 80% de l'activité oxydase OpZ-dépendante des cellules WT-Nox2 sont inhibés, l'activité oxydase du super-mutant est diminuée de seulement 50%.

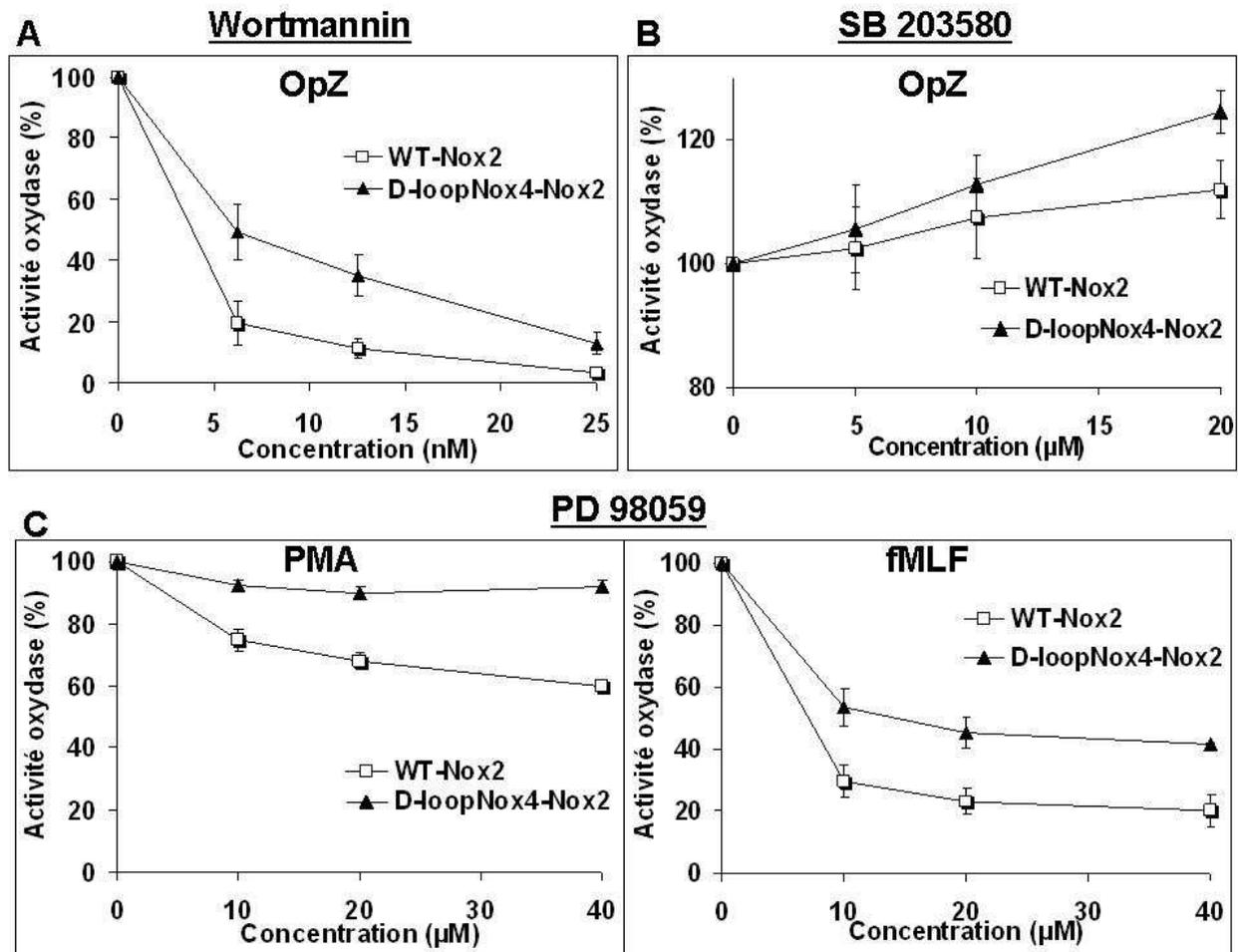


Figure 43 : Effet des événements de phosphorylation sur l'activité NADPH oxydase des cellules intactes PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées. $5 \cdot 10^5$ cellules ont été traitées 15 min avec l'inhibiteur de kinase wortmannin, 30 min avec SB 203580, ou une nuit avec PD 98059. La production de H_2O_2 OpZ-, PMA- et fMLF-dépendante des cellules a ensuite été mesurée par chemiluminescence en présence de luminol. Courbes d'inhibition de la production de H_2O_2 par A) la wortmannin, B) SB 203580, ou C) PD 98059, pour lesquelles il existe des divergences d'inhibition entre les cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de l'activité contrôle sans inhibiteur et représentent la moyenne \pm DS de trois à cinq déterminations indépendantes.

Inhibition des protéines kinases MAPKs

L'activité des protéines kinases MAPKs ERK1/2 peut être efficacement inhibée par les composés U0126, PD98059 ou PD184352, et celle de la MAPK p38 par le composé SB203580 (Davies *et al.*, 2000). Le pyridinyl imidazole SB203580 est un inhibiteur ATP-compétitif hautement spécifique de l'isoforme α de la MAPK p38, isoforme la plus active dans les neutrophiles. Les composés U0126, PD98059 et PD184352 ne sont pas des inhibiteurs ATP-compétitifs mais empêchent l'activation de la MAPK kinase MKK1, et donc inhibent indirectement l'activation des effecteurs ERK1/2.

Afin d'inhiber les kinases ERK 1/2, les cellules WT-Nox2 et le mutant D-loopNox4-Nox2 ont été incubés pendant une nuit avec 10, 20 ou 40 μM de PD98059. Avec une stimulation par le PMA, l'activité oxydase des cellules WT-Nox2 est inhibée jusqu'à 40% avec la concentration maximale de 40 μM de PD98059 alors que quasiment aucun effet inhibiteur n'est observé sur l'activité oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2 (Figure 43C). De ce fait, l'activité oxydase du mutant est pour ainsi dire insensible aux événements de phosphorylation induits par les ERK1/2 lors d'une stimulation par le PMA. Avec une stimulation par l'OpZ, l'activité oxydase des cellules WT-Nox2 est également inhibée jusqu'à 40% et le même effet inhibiteur est obtenu avec les cellules D-loopNox4-Nox2. Avec le fMLF, l'inhibition par PD98059 est plus efficace que celle constatée durant une stimulation par le PMA ou l'OpZ, avec un maximum d'inhibition de 80% dans les cellules WT-Nox2. Les protéines ERK1/2 sont donc fortement impliquées dans la transduction du signal lors de la stimulation par le fMLF. Or, l'activité oxydase fMLF-dépendante du mutant est significativement moins inhibée que celle de WT-Nox2, avec un maximum d'inhibition de seulement 58% (Figure 43C). L'activité oxydase de D-loopNox4-Nox2 est donc également moins sensible aux événements de phosphorylation induits par les ERK1/2 lors d'une stimulation par le fMLF.

Afin d'inhiber la p38 MAPK, les cellules WT-Nox2 et le mutant D-loopNox4-Nox2 ont été incubés 30 min avec 5, 10 ou 20 μM d'inhibiteur SB203580 avant stimulation de leur oxydase. Nos résultats révèlent une fois encore une implication variable de la kinase selon l'agoniste employé (Table 6). L'inhibition de l'activité oxydase PMA-dépendante des cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 est inférieure à 10% avec la concentration maximale de SB203580 (20 μM) alors que près de deux tiers de l'activité oxydase fMLF-dépendante est inhibée à cette même concentration. Ainsi, la p38 MAPK est très peu impliquée dans la transduction du signal d'activation par le PMA alors qu'elle est nécessaire à la majeure partie de la transduction du signal d'activation par le fMLF. Concernant l'effet de SB203580 sur l'activité oxydase stimulée par l'OpZ il est surprenant. En effet, l'inhibition de la p38 MAPK améliore l'activité oxydase des cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 activées par l'OpZ. Les événements de phosphorylation induits par la p38 MAPK exercent donc plutôt un contrôle négatif sur l'activité NADPH oxydase OpZ-dépendante des cellules PLB-985. D'autre part, avec 20 μM de SB203580, l'activité oxydase du mutant est significativement plus augmentée par rapport à celle des cellules WT-Nox2 (Figure 43B). Il apparaît donc que la levée de l'inhibition par la p38 MAPK favorise plus l'oxydase du mutant que l'oxydase de WT-Nox2 lors d'une activation par l'OpZ.

En conclusion, l'activité NADPH oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2 est moins influencée que celle de WT-Nox2 par certains événements de phosphorylation se produisant probablement sur les facteurs cytosoliques du complexe NADPH oxydase.

III.3. Analyse du « priming » de l'activité NADPH oxydase du super-mutant D-loopNox4-Nox2

Le « priming » de l'oxydase est un phénomène qui provoque une amplification de la réponse oxydative à un stimulus donné. Il consiste en une première stimulation du neutrophile par une molécule qui n'active pas par elle-même la production d'O₂⁻ mais qui induit des modifications permettant une production plus intense en réponse à un second agent agoniste de l'oxydase. Parmi les événements impliqués dans le priming, la phosphorylation préalable de certains acides aminés des facteurs cytosoliques du complexe oxydase est primordiale.

Nous avons émis l'hypothèse que la mutation de la boucle D pouvait conférer à Nox2 une conformation induisant une amplification de l'activité oxydase comme le ferait un agent de priming sur l'oxydase native. Comme nous venons de le démontrer dans le paragraphe précédent, l'activité NADPH oxydase du super-mutant est moins influencée que celle de WT-Nox2 par certains événements de phosphorylation. Nous avons alors analysé l'effet de deux agents de priming, les cytokines TNF α et GM-CSF, sur l'activité oxydase du super-mutant par rapport aux cellules WT-Nox2. L'activité oxydase fMLF- et OpZ-dépendante a été mesurée par chemiluminescence en présence de luminol après incubation des cellules avec 10 ng/ml de TNF α ou 12 ng/ml de GM-CSF (Figure 44).

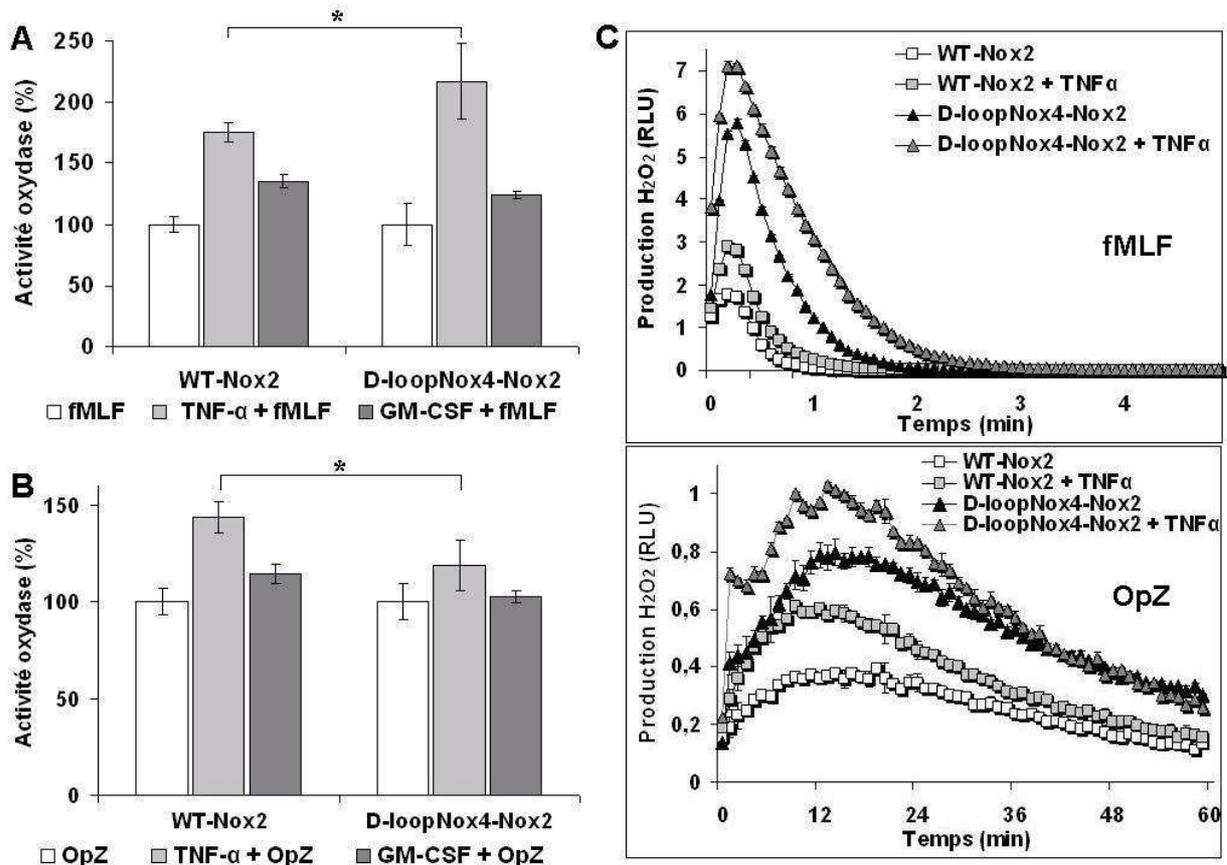


Figure 44 : « Priming » de l'activité NADPH oxydase des cellules intactes PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées. La production de H₂O₂ de 5.10⁵ cellules, induite par A) le fMLF (4.10⁻⁷M) ou B) l'OpZ (0.64 mg/ml), a été mesurée par chemiluminescence en présence de luminol après une incubation des cellules 15 min avec 10 ng/ml de TNF α ou 12 ng/ml de GM-CSF. Les données des histogrammes correspondent au pourcentage de l'activité oxydase sans cytokines. Ces résultats représentent la moyenne \pm DS d'au moins trois manipulations indépendantes (n = 3-5). C) Cinétiques de production de H₂O₂ représentatives obtenues avec le TNF α (les valeurs représentent la moyenne \pm DS de trois mesures simultanées). Différence significative des résultats du mutant D-loopNox4-Nox2 par rapport aux cellules WT-Nox2 : *, p<0,05.

Une incubation des cellules WT-Nox2 avec 10 ng/ml de TNF α induit une augmentation de 69 \pm 14 % de la réponse oxydative globale au **fMLF** (Figure 44A). Le TNF α améliore la valeur maximale du pic de production de H₂O₂ en réponse au fMLF sans modifier significativement la cinétique d'activation (Figure 44C). Pour le mutant D-loopNox4-Nox2, l'activité oxydase totale est augmentée de 117 \pm 31 % par le pré-traitement au TNF α . Cette augmentation provient d'une élévation de la valeur maximale du pic mais aussi d'une prolongation de la cinétique d'activation (Figure 44C). Ainsi, en comparant l'activité oxydase totale exprimée en somme de RLU, l'activité du mutant apparaît plus « primée » par le TNF α

que celle des cellules WT-Nox2. Cependant, le pourcentage d'augmentation de la valeur du pic-RLU_{max} est identique pour les deux types cellulaires : 40 ± 17 % pour WT-Nox2 et 31 ± 10 % pour D-loopNox4-Nox2.

Une incubation avec 12 ng/ml de GM-CSF induit une augmentation de respectivement 36 ± 10 % et 24 ± 6 % de la réponse oxydative globale au fMLF des cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 (Figure 44A). De ce fait, il semblerait que le GM-CSF ait un effet similaire sur les activités oxydases stimulées par le fMLF du mutant et de WT-Nox2. Afin de contrôler l'efficacité du GM-CSF, nous avons effectué une expérience de priming du neutrophile humain isolé à partir de sang total (données non représentées). Le GM-CSF est très efficace avec le neutrophile : l'activité oxydase totale est augmentée de 122 % et la valeur du pic-RLU_{max} est multipliée par trois. De même, il est intéressant de noter que le TNF α a lui aussi un effet beaucoup plus important sur le neutrophile humain que sur les cellules PLB-985 activées par le fMLF : l'activité oxydase totale du neutrophile est augmentée de 183 % et la valeur de son pic-RLU_{max} est multipliée par trois.

Les mêmes expériences ont été réalisées sur les cellules activées par l'**OpZ** (Figure 44B). Avec le GM-CSF, il se produit un très faible priming des cellules PLB-985 et du neutrophile : l'activité oxydase totale est augmentée de 15 ± 5 % avec WT-Nox2 et 3 ± 3 % avec D-loopNox4-Nox2, contre environ 10% avec le neutrophile. Par conséquent, le GM-CSF a un effet similaire sur les activités oxydases stimulées par l'OpZ du super-mutant et des cellules WT-Nox2.

Par contre, le TNF α n'induit pas les mêmes modifications de l'activité oxydase des cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 lors d'une activation par l'OpZ (Figure 44B). En effet, l'incubation avec 10 ng/ml de TNF α induit une augmentation de 44 ± 8 % et de 19 ± 13 % de la réponse oxydative totale à l'OpZ des cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 respectivement. La même différence significative est observée en comparant l'évolution de la valeur du pic-RLU_{max} : le pic RLU-max de la cinétique des cellules WT-Nox2 est augmenté de 161 ± 10 % contre seulement 137 ± 6 % avec les cellules D-loopNox4-Nox2 (Figure 44C). Par conséquent, l'effet du TNF α sur l'activité oxydase OpZ-dépendante des cellules D-loopNox4-Nox2 est moins important que sur celle des cellules WT-Nox2. Il semble donc qu'une partie de l'effet de priming de l'activité oxydase OpZ-dépendante par le TNF α soit déjà « en place » dans le super-mutant grâce à la mutation de la boucle D.

IV. Pouvoir bactéricide du super-mutant D-loopNox4-Nox2 vis-à-vis de *P. aeruginosa*

Afin de vérifier si la surproduction de H₂O₂ du mutant D-loopNox4-Nox2 s'accompagnait d'une amélioration de son pouvoir microbicide, l'activité bactéricide des cellules PLB-985 contre une souche non cytotoxique de *P. aeruginosa* PAO1 a été évaluée (cf. Introduction § I.4 et M&M § VI). Les enterobacilles *Pseudomonas* sont des pathogènes opportunistes à Gram négatif et « catalase-positif », fréquemment rencontrés dans les infections nosocomiales. L'espèce *P. aeruginosa* est phénotypiquement apparentée à l'espèce *Burkholderia cepacia* qui est responsable d'infections observées chez les patients CGD. La souche de *P. aeruginosa* PAO1 (Holloway, 1955) utilisée a la particularité d'être non cytotoxique envers le neutrophile du fait d'un système de sécrétion de type III déficient.

IV.1. Bactéricidie de *P. aeruginosa* PAO1 par le super-mutant D-loopNox4-Nox2

L'activité bactéricide des cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 contre les bactéries *P. aeruginosa* PAO1 a été suivie pendant 60 min à MOI 1 en réalisant le dénombrement des bactéries viables restantes toutes les 15 min (Figure 45) (cf. M&M § VI). Dès 15 min de co-incubation, le taux de survie des bactéries avec le super-mutant est significativement inférieur à celui obtenu avec WT-Nox2 : $43,2 \pm 2,5$ % contre $55,1 \pm 3,1$ %. Le mutant D-loopNox4-Nox2 conserve un pouvoir bactéricide supérieur à celui de WT-Nox2 tout au long de l'expérience, jusqu'à 60 min où les taux de survie des bactéries sont alors de $11,3 \pm 1,7$ % pour D-loopNox4-Nox2 contre $20,5 \pm 1,8$ % pour WT-Nox2. Par conséquent, les cellules WT-Nox2 sont capables d'éliminer à terme près de 80% des bactéries PAO1 mais la mutation de la boucle D confère un avantage aux cellules D-loopNox4-Nox2 qui peuvent éliminer jusqu'à 90% des bactéries. Cependant, nous n'avons pas pu prouver l'existence d'une surproduction d'O₂⁻ par les cellules D-loopNox4-Nox2 lors d'une stimulation par des PAO1 opsonisées dans les conditions expérimentales strictes de bactéricidie (données non montrées).

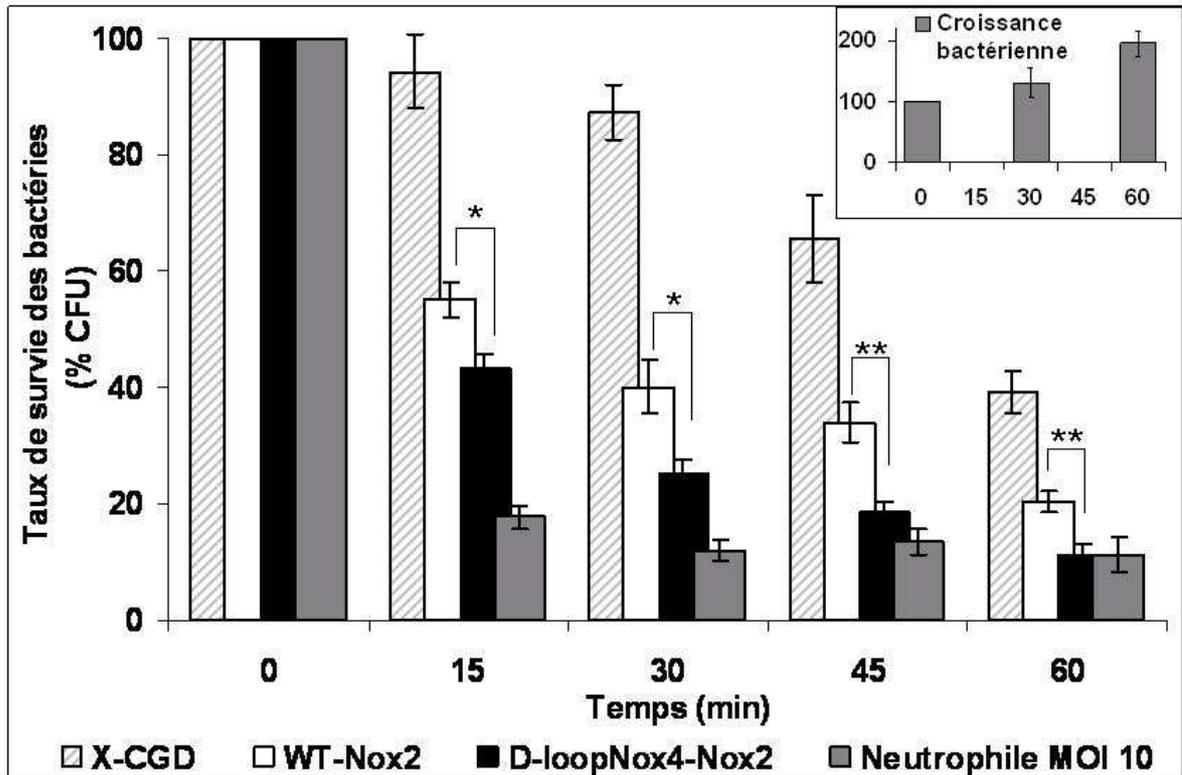


Figure 45 : Activité bactéricide des cellules différenciées PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 et du neutrophile humain vis-à-vis de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*. La diminution du nombre de CFU bactériennes a été suivie durant une co-incubation avec les cellules PLB-985 à MOI 1 ou avec le neutrophile humain à MOI 10. Les données correspondent au pourcentage de bactéries viables par rapport au taux initial de bactéries (100% au temps 0). Ces résultats représentent la moyenne \pm ESM d'au moins cinq expériences indépendantes (n = 5-9). Différence significative des résultats des cellules D-loopNox4-Nox2 comparés aux cellules WT-Nox2 : *, p<0,05 et **, p<0,01. *Encart* : croissance des PAO1 en absence de cellules (% CFU).

La cinétique de bactéricidie des bactéries PAO1 par le neutrophile humain a également été évaluée en parallèle en tant que référentiel d'activité. Du fait du fort pouvoir bactéricide du neutrophile humain, l'expérience a été réalisée à MOI 10 au lieu de MOI 1 (à MOI 1, le neutrophile est capable d'éliminer intégralement les bactéries PAO1 en moins de 5 min). A MOI 10, 80% des bactéries sont éliminées par le neutrophile dès 15 min d'incubation, et 90 % au terme de l'incubation (Figure 45). Ainsi, l'efficacité bactéricide du neutrophile humain à l'encontre des bactéries PAO1 est 20 fois plus importante que celle des cellules PLB-985 WT-Nox2 et seulement 10 fois plus que celle du mutant D-loopNox4-Nox2.

IV.2. Bactéricidie de *P. aeruginosa* PAO1 par les cellules PLB-985 en fonction de leur activité NADPH oxydase

L'implication de l'activité NADPH oxydase dans le pouvoir bactéricide des cellules PLB-985 vis-à-vis des bactéries PAO1 a été analysée plus en détails. Pour cela, la bactéricidie a été réalisée avec différents types cellulaires PLB-985 : les cellules PLB-985 X-CGD, dépourvues d'oxydase, les cellules WT-Nox2, présentant une activité oxydase normale, les cellules D-loopNox4-Nox2, et un mutant de Nox2 à faible activité oxydase « **H490D-Nox2** ». Au cours de travaux antérieurs, nous avons en effet montré que la mutation H490D provoquait une importante diminution de l'activité NADPH oxydase par rapport à celle de WT-Nox2 (Li *et al.*, 2005). L'activité oxydase *ex vivo* du mutant H490D représente ainsi environ 7% de l'activité de WT-Nox2 avec les agonistes particuliers ou le PMA (Table 6). Par contre, son activité est nulle lors d'une stimulation par le fMLF ou par l'ionomycine.

Table 6

Activité NADPH oxydase des cellules PLB-985 différenciées H490D-Nox2, induite par divers agonistes solubles et particuliers. La production de H₂O₂ de 5.10⁵ cellules a été mesurée par chemiluminescence au luminol durant 60 min après activation par le PMA (80 ng/ml) ou l'OpZ (0.64 mg/ml), et durant 15 min après activation par le fMLF (4 x 10⁻⁷ M) ou l'ionomycine (2 μM). La production totale de H₂O₂ représente la somme de RLU mesurées sur 60 ou 15 min ; elle est exprimée en pourcentage de la valeur obtenue avec les cellules WT-Nox2 dans la dernière colonne. « Pic-RLUmax » indique la valeur du pic maximal de production et « Pic-Tmax » le temps nécessaire pour l'atteindre. La durée de la cinétique correspond au temps nécessaire pour que la cinétique redescende à 10% de la valeur du pic maximal. Avec l'OpZ, le pourcentage de la valeur du pic restant à 60 min est indiqué. NP : non pertinent. (n = 3-5).

Stimuli solubles		Production totale de H ₂ O ₂ (RLU)	Pic-Tmax (min)	Pic-RLUmax (RLU)	Durée (min)	% de la production de H ₂ O ₂ de WT-Nox2
PMA	WT-Nox2	119,57 ± 4,94	6,45 ± 0,72	2,61 ± 0,44	58,1 ± 3,9	100
	H490D	8,61 ± 3,06	58,48 ± 1,43	0,10 ± 0,02	> 60	7,2
fMLF	WT-Nox2	29,69 ± 6,64	0,65 ± 0,16	1,59 ± 0,48	2,8 ± 0,3	100
	H490D	0,29 ± 0,03	NP	NP	NP	1
Ionomycine	WT-Nox2	27,55 ± 11,02	4,22 ± 1,07	0,39 ± 0,19	12,8 ± 1,7	100
	H490D	0,32 ± 0,18	NP	NP	NP	1

Stimuli particuliers		Production totale de H ₂ O ₂ (RLU)	Pic-Tmax (min)	Pic-RLUmax (RLU)	% du pic-RLUmax à 60 min	% de la production de H ₂ O ₂ de WT-Nox2
OpZ	WT-Nox2	30,72 ± 6,78	20,81 ± 3,27	0,40 ± 0,09	38,4 ± 4,2	100
	H490D	1,89 ± 0,56	25,50 ± 2,01	0,02 ± 0,00	33,2 ± 3,9	6

Dans un premier temps, l'activité bactéricide des cellules PLB-985 X-CGD et H490D a été évaluée (Figure 46A).

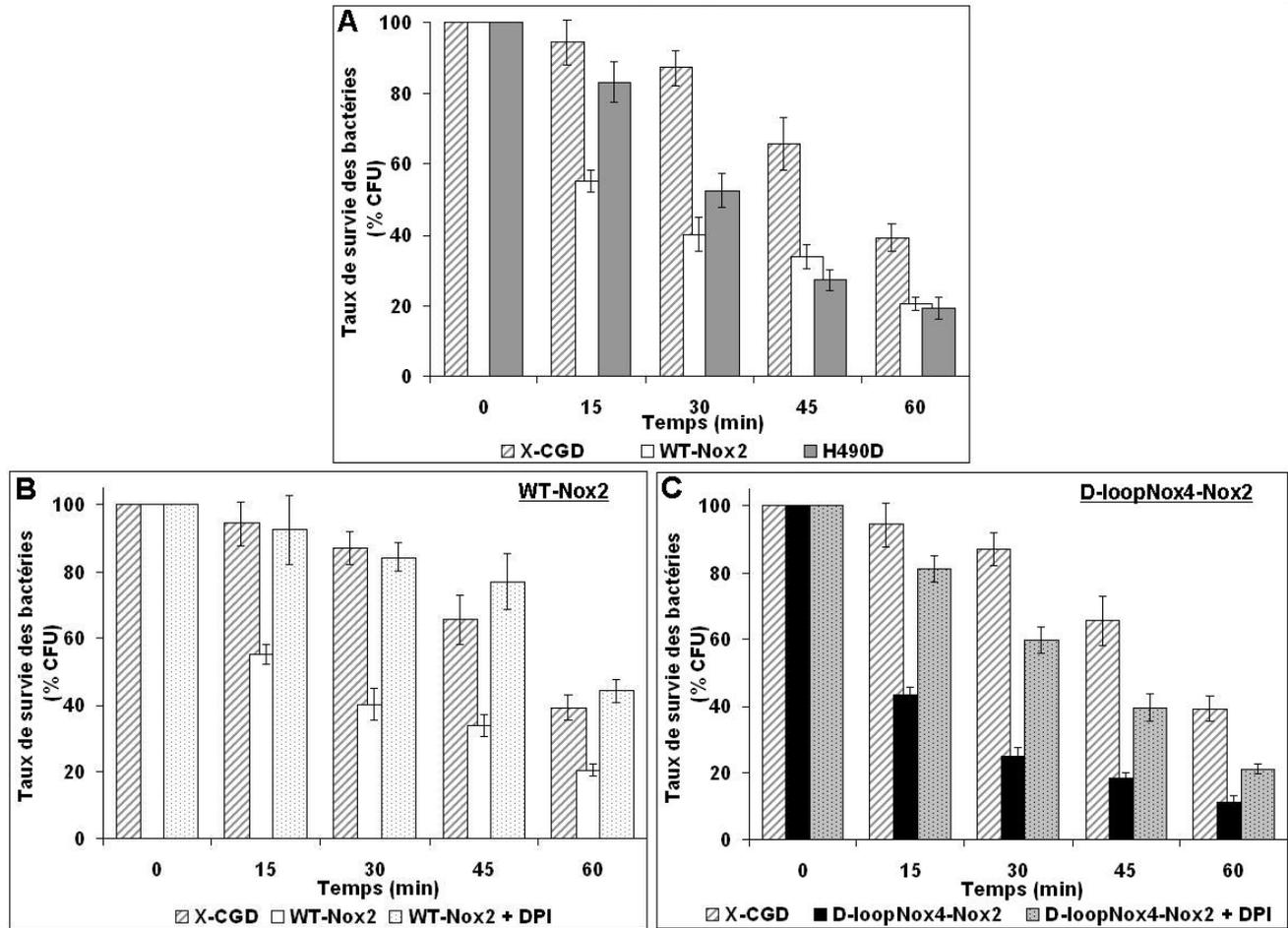


Figure 46 : Analyse de l'implication de la NADPH oxydase dans le pouvoir bactéricide des cellules PLB-985 vis-à-vis de *P. aeruginosa* PAO1. A) Cinétiques de bactéricidie des PAO1 par les cellules PLB-985 X-CGD, WT-Nox2 et H490D à MOI 1. Les valeurs représentent le pourcentage de bactéries viables par rapport au taux initial de bactéries (100% au temps 0). Ces résultats représentent la moyenne \pm ESM d'au moins cinq expériences indépendantes ($n = 5-9$). L'inhibition par le DPI 5 μ M de l'activité NADPH oxydase de B) WT-Nox2 et C) D-loopNox4-Nox2 a été réalisée avant mesure de leur activité bactéricide contre les PAO1 à MOI 1. Les résultats correspondent au taux de survie des bactéries incubées avec les cellules traitées ou non au DPI 5 μ M. La cinétique moyenne de bactéricidie obtenue avec les cellules X-CGD est représentée en référentiel. Ces résultats représentent la moyenne \pm ESM de trois à cinq expériences indépendantes.

On remarque que, malgré l'absence de NADPH oxydase, les cellules X-CGD sont capables d'éliminer efficacement les bactéries PAO1 au-delà de 30 min de contact. Au terme de la co-incubation, le taux de bactéries viables reste cependant supérieur à celui obtenu avec les cellules WT-Nox2 ($39,2 \pm 3,7$ % contre $20,5 \pm 1,8$ %). Par contre, le mutant à faible activité

oxydase H490D est capable de commencer à éliminer les bactéries PAO1 dès 15 min de contact et sa cinétique de bactéricidie rejoint celle des cellules WT-Nox2 à partir de 45 min. La cinétique de H490D est donc retardée par rapport à celle des cellules WT-Nox2 mais atteint tout de même le niveau optimal avant le terme de l'incubation. Ainsi, le processus d'élimination des bactéries PAO1 implique un mécanisme bactéricide précoce NADPH oxydase-dépendant, puis un mécanisme bactéricide NADPH oxydase-indépendant tardif qui reste insuffisant pour atteindre une bactéricidie optimale en 60 min de contact. Ces résultats démontrent que les cellules PLB-985 ont besoin du complexe NADPH oxydase pour réaliser une bactéricidie optimale des PAO1 mais qu'une faible production d' O_2^- suffit à améliorer l'activité bactéricide des cellules PLB-985 comparée aux cellules X-CGD.

Afin de discerner la phase NADPH oxydase-dépendante du processus de bactéricidie des cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2, nous avons réalisé l'expérience de bactéricidie en présence de DPI 5 μ M (Figure 46B et C). L'inhibition de la NADPH oxydase des cellules PLB-985 WT-Nox2 par le DPI provoque une diminution marquée de leur activité bactéricide qui se retrouve alors équivalente à celle des cellules X-CGD (Figure 46B). L'inhibition de l'activité oxydase de WT-Nox2 permet donc de reproduire exactement le phénotype des cellules X-CGD. Or, avec le mutant D-loopNox4-Nox2, l'activité bactéricide est aussi inhibée par le DPI 5 μ M mais elle reste supérieure à celle des cellules X-CGD selon une cinétique du même ordre que celle du mutant H490D (Figure 46C). Il semble donc que l'inhibition de l'activité oxydase de D-loopNox4-Nox2 par le DPI permette une faible production d' O_2^- qui est suffisante pour obtenir une meilleure bactéricidie que celle des cellules X-CGD.

L'effet du DPI 5 μ M a également été testé sur le neutrophile humain (Figure 47A). Le traitement du neutrophile humain par le DPI entraîne seulement une inhibition partielle de son activité bactéricide durant les 45 premières minutes de co-incubation. A 30 min, le taux de bactéries viables est de $42,8 \pm 5,8$ % contre $12,0 \pm 1,7$ % sans ajout de DPI. Après 45 min, malgré l'inhibition de l'oxydase, la cinétique de bactéricidie rejoint un niveau optimal, avec un taux de survie des PAO de $17,0 \pm 4,9$ % au terme de l'expérience contre $11,3 \pm 2,9$ sans ajout de DPI.

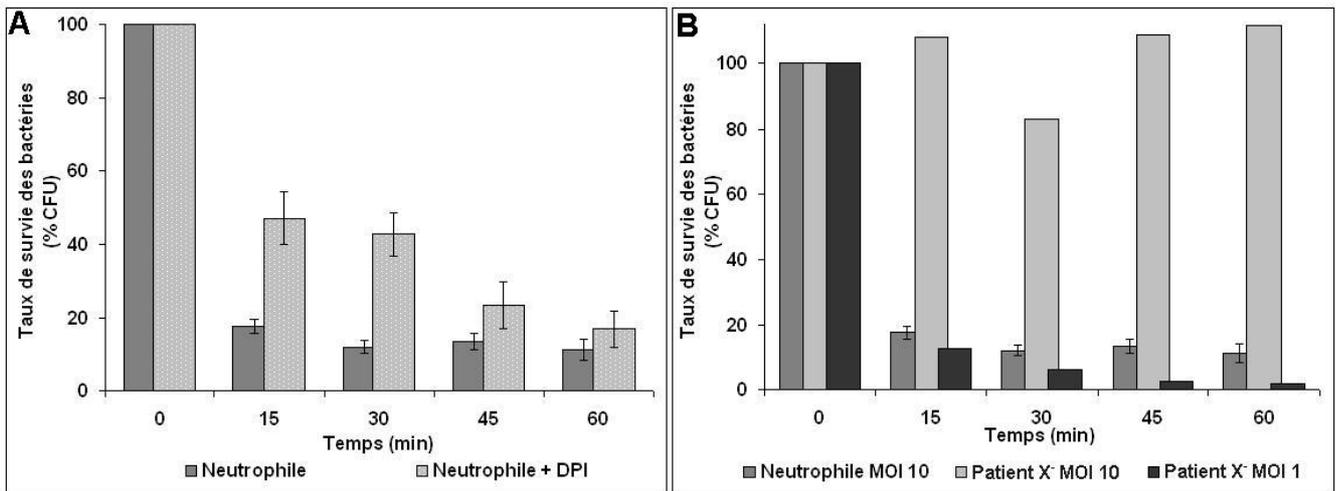


Figure 47 : Analyse de l'implication de la NADPH oxydase dans le pouvoir bactéricide de neutrophiles humains vis-à-vis de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*. A) L'inhibition par le DPI 5 μM de l'activité NADPH oxydase des neutrophiles a été réalisée avant mesure de leur activité bactéricide contre les PAO1 à MOI 10. Les résultats correspondent au taux de survie des bactéries incubées avec les cellules traitées ou non au DPI 5 μM . Ces résultats représentent la moyenne \pm ESM de cinq expériences indépendantes. B) La diminution du nombre de CFU bactériennes a été évaluée durant une co-incubation avec les neutrophiles d'un patient atteint de CGD X⁻ à MOI 1 ou 10. Les valeurs représentent le pourcentage de bactéries viables par rapport au taux initial de bactéries (100% au temps 0). La cinétique moyenne obtenue avec les neutrophiles sains est indiquée en référentiel.

Le graphique de la figure 47B expose une unique expérience de bactéricidie réalisée avec des neutrophiles purifiés provenant du sang d'un patient atteint de CGD X⁻. Ces neutrophiles présentent un défaut partiel d'expression de Nox2 (expression diminuée dans tous les neutrophiles du patient) induisant une faible activité NADPH oxydase. L'activité oxydase de ces neutrophiles a été mesurée par chemiluminescence en présence de luminol avant l'expérience de bactéricidie. Leur activité oxydase en réponse au PMA et à l'OpZ est équivalente à l'activité de cellules PLB-985 WT-Nox2 (production totale de H₂O₂ représentant respectivement 84 % et 109 % de la production totale de H₂O₂ par les cellules WT-Nox2). Or, du fait de ce défaut d'activité oxydase, les neutrophiles CGD X⁻ sont incapables d'éliminer les bactéries PAO1 à MOI 10 mais ralentissent tout de même leur croissance en maintenant leur taux à 110 % environ (Figure 47B). Par contre, à MOI 1, malgré leur faible activité oxydase, les neutrophiles CGD X⁻ ont une activité bactéricide équivalente à celle de neutrophiles humains sains et peuvent éliminer la quasi-totalité des bactéries PAO1.

L'ensemble de ces résultats confirment que, dans les conditions testées, l'activité NADPH oxydase des cellules PLB-985 et du neutrophile humain participe à l'élimination

précoce de la souche de *P. aeruginosa* PAO1 puis qu'un mécanisme bactéricide NADPH-oxydase indépendant devient efficace plus tardivement. D'autre part, même une très faible production d' O_2^- est suffisante pour significativement accélérer la bactéricidie des PAO1 par les cellules PLB-985, et une surproduction d' O_2^- par le super-mutant permet d'améliorer le pouvoir bactéricide de base des cellules PLB-985.

IV.3. Contrôles de viabilité des cellules PLB-985 au cours de la bactéricidie

Afin d'interpréter les cinétiques de bactéricidie obtenues, nous nous sommes assurés de la viabilité des cellules tout au long de l'expérience. La viabilité des cellules durant la bactéricidie a été évaluée sur cellule de Malassez après coloration des cellules au bleu Trypan (Figure 48). Pour chacun des types cellulaires étudiés, le taux de cellules viables ne varie pas au cours de la bactéricidie, restant toujours supérieur à 90 % en moyenne. De même, l'incubation préalable avec le DPI 5 μ M n'affecte pas la survie des cellules.

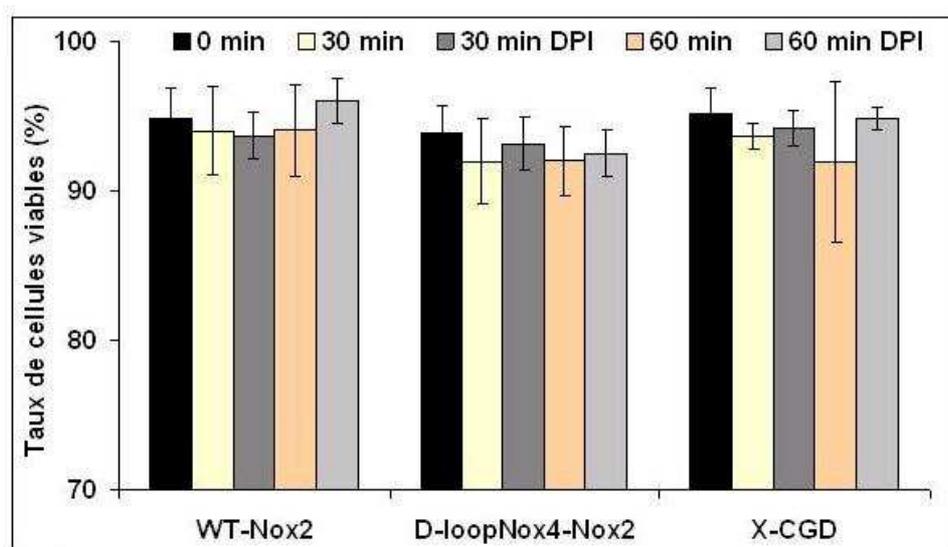


Figure 48 : Viabilité des cellules PLB-985 vis-à-vis de *P. aeruginosa* PAO1 au cours de la bactéricidie. Les cellules PLB-985 viables ont été dénombrées sur cellule de Malassez avec une coloration au bleu Trypan durant la bactéricidie. Ces résultats représentent la moyenne \pm DS d'au moins trois mesures indépendantes du pourcentage de cellules viables (n = 3-6).

IV.4. Rôle de la MPO dans la mesure par chemiluminescence de l'activité NADPH oxydase des cellules PLB-985

Les cellules PLB-985 présentent clairement un plus faible pouvoir microbicide que le neutrophile. Nous avons voulu vérifier si, hormis une moindre activité NADPH oxydase, les

cellules PLB-985 présentait d'autres déficiences par rapport au neutrophile pouvant expliquer leur faible activité microbicide. Nous avons alors analysé la participation de la MPO intrinsèque dans la mesure de l'activité oxydase par chemiluminescence des cellules PLB-985 comparée au neutrophile humain, sachant que la MPO stockée dans les granules azurophiles participe à la génération du signal de chemiluminescence en présence de luminol. Pour cela, une mesure de l'activité oxydase a été effectuée en présence et en absence de la peroxydase HRPO dans le milieu réactionnel. Sans ajout de HRPO, le signal de chemiluminescence obtenu dépend uniquement de la MPO intrinsèque. L'expérience a été réalisée lors d'une activation par l'OpZ, qui induit essentiellement une production intracellulaire d'O₂⁻, et lors d'une activation par le PMA, qui induit des productions intra- et extracellulaire équivalentes (Figure 36).

Lors de l'activation par l'OpZ le signal de chemiluminescence mesuré dans les cellules PLB-985 et le neutrophile, reste statistiquement identique avec et sans HRPO ajoutée au milieu réactionnel malgré un niveau d'activation différent entre ces différents types cellulaires (Figure 49). Ceci confirme que la production d'O₂⁻ est quasi totalement intracellulaire pour la stimulation par l'OpZ et qu'il est donc inutile d'ajouter dans le test de chemiluminescence de l'HRPO lors d'une stimulation de ce type.

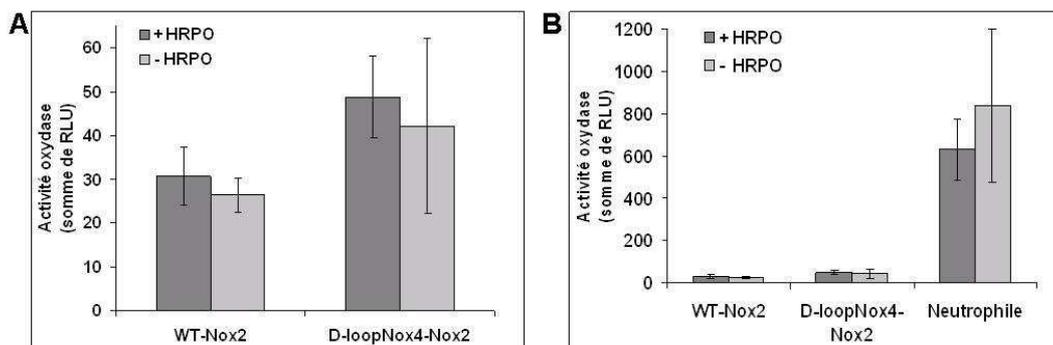


Figure 49 : Production de H₂O₂ mesurée avec et sans HRPO dans les cellules différenciées PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 et dans le neutrophile humain après stimulation par l'OpZ. A) La production totale de H₂O₂ par 5.10⁵ cellules intactes PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 a été mesurée par chemiluminescence en présence ou non de HRPO, après stimulation par 0,64 mg/ml d'OpZ. Elle est exprimée en somme de RLU enregistrées sur 60 min. Ces données représentent la moyenne ± DS de cinq expériences indépendantes. B) Production totale de H₂O₂ par 5.10⁵ neutrophiles en présence ou non de HRPO après activation par 0,64 mg/ml d'OpZ (n = 3-5).

Par contre, lors d'une activation par le PMA, l'absence d'HRPO modifie le signal de chemiluminescence enregistré dans les cellules PLB-985 et le neutrophile (Figure 50). Cependant, la cinétique de production d' O_2^- est très différente entre les cellules PLB-985 et le neutrophile. Elle est retardée pour chaque type de cellules (Pic-Tmax augmenté de 12 min environ) mais le pic maximal de production est diminué d'environ 90 % pour les cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 (Figure 50C et D) contre seulement 60 % pour le neutrophile (Figure 50B).

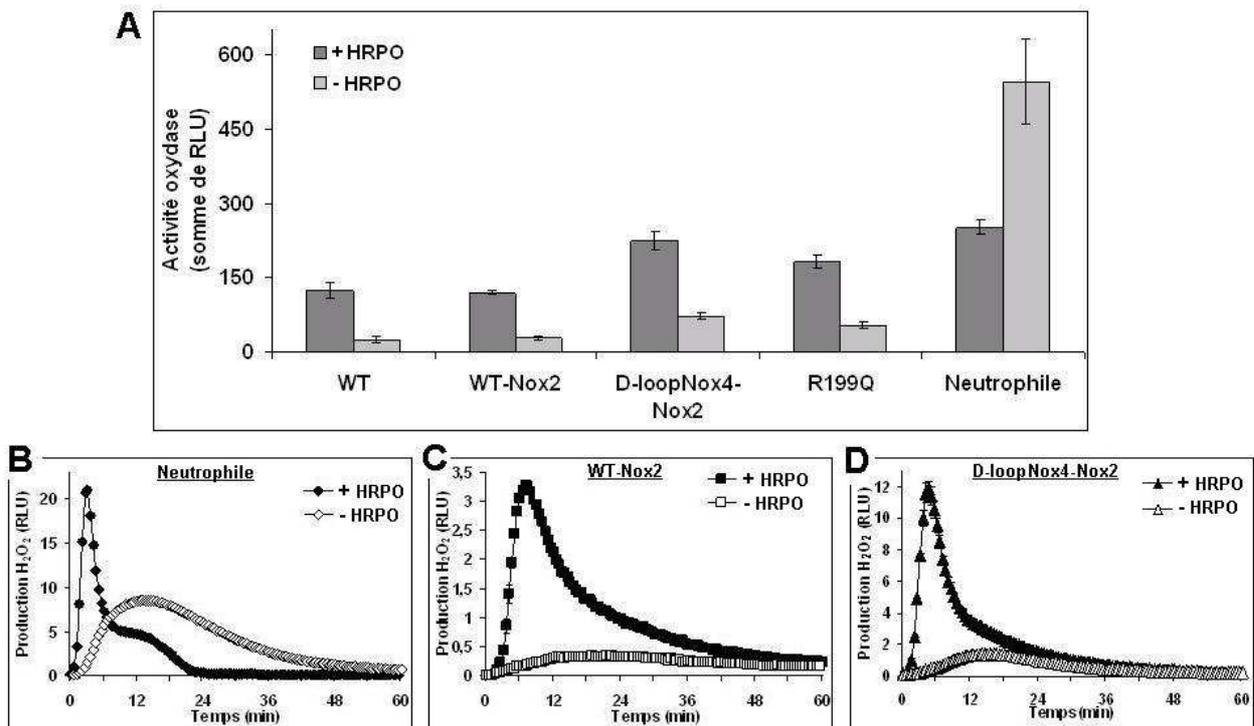


Figure 50 : Production de H₂O₂ mesurée avec et sans HRPO dans les cellules différenciées PLB-985 X-CGD transfectées et dans le neutrophile humain après stimulation par le PMA. A) La production totale de H₂O₂ par 5.10⁵ cellules intactes PLB-985 ou neutrophiles a été mesurée par chemiluminescence en présence ou non de HRPO, après stimulation par 80 ng/ml de PMA. Elle est exprimée en somme de RLU enregistrées sur 60 min. Ces données représentent la moyenne ± DS d'expériences indépendantes (n = 3-6). Des cinétiques représentatives de la production de H₂O₂, mesurée avec et sans HRPO, par B) le neutrophile, C) les cellules WT-Nox2 et D) les cellules D-loopNox4-Nox2 sont présentées.

De ce fait, l'activité oxydase totale, évaluée en somme totale de RLU pendant 60 min, est diminuée de 75 % environ pour les cellules PLB-985 alors que pour le neutrophile elle est augmentée de 115 % (Figure 50A). Or nous savons que la production d' O_2^- dans les cellules PLB-985 et le neutrophile se répartit également entre le compartiment intra- et extracellulaire

(cf. Figure 36). L'addition d'HRPO au test permet de révéler principalement la production extracellulaire d' O_2^- . Il est donc clair qu'en son absence nous mesurons uniquement la production intracellulaire due à la présence intrinsèque de MPO. De ce fait, il semble qu'il y ait un défaut d'activité MPO dans les cellules PLB-985 par rapport au neutrophile humain qui se révèle lors de la stimulation par le PMA.

Discussion et Perspectives

L'activité du complexe NADPH oxydase des cellules phagocytaires résulte de l'assemblage des protéines cytosoliques p67*phox*, p47*phox* et p40*phox* au niveau du cytochrome *b*₅₅₈, qui est responsable du transfert des électrons du NADPH vers l'oxygène via le FAD et les hèmes. Le travail présenté ici participe à l'élucidation des mécanismes moléculaires d'activation du complexe NADPH oxydase. Un travail préalablement réalisé au sein de notre laboratoire a permis d'élucider partiellement le rôle joué par la boucle D intracytosolique de Nox2 « ¹⁹¹TSSTKTIRRS²⁰⁰ » (Li et *al.*, 2005). Pour cela, la séquence correspondant à la boucle D de l'ADNc codant Nox2 a subi diverses modifications par mutagenèse dirigée, avant transfection stable dans le modèle cellulaire PLB-985 X-CGD dont le gène *CYBB* a été inactivé. Ces travaux ont prouvé que la boucle D de Nox2, localisée avant le 5^e passage transmembranaire porteur d'un des hèmes, participe au transfert des électrons du FAD aux hèmes, et en particulier les acides aminés chargés Lys¹⁹⁵, Arg¹⁹⁸ et Arg¹⁹⁹. Or, parmi les remaniements effectués sur la boucle D, certains d'entre eux ont permis pour la première fois d'améliorer l'activité NADPH oxydase normale des cellules PLB-985 : la mutation ponctuelle R199Q et les protéines chimères de Nox2 contenant la boucle D des homologues Nox1, Nox3 et Nox4. Nous avons choisi d'élucider l'origine de la « super-activité » du mutant présentant la plus forte surproduction d'O₂⁻ : le mutant « D-loop_{Nox4}-Nox2 » contenant la boucle D de la protéine Nox4 « ¹⁹¹TASTYAIRVS²⁰⁰ » (Table 2). Notre étude repose sur la comparaison des mécanismes d'activation des cellules PLB-985 D-loopNox4-Nox2 par rapport aux cellules contrôles PLB-985 WT-Nox2, transfectées par l'ADNc sauvage de Nox2. De façon systématique, nous avons contrôlé l'expression de Nox2 et l'activité NADPH oxydase des cellules PLB-985 transfectées après chaque décongélation de nos clones. Pour cela, nous avons mis en place une méthode inédite de double marquage en cytométrie en flux, permettant d'évaluer simultanément l'expression de Nox2 et l'activité oxydase PMA-dépendante des cellules transgéniques élaborées par notre laboratoire (Figure 30). Ainsi, nous nous assurons que l'expression de Nox2 mutée est identique à celle de Nox2 sauvage, étape essentielle pour valider la suite de nos résultats.

Notre méthode de transfection et de différenciation des cellules PLB-985 correspond à celle utilisée par l'équipe du Dr M.C. Dinuer lors de la mise au point du modèle cellulaire PLB-985 X-CGD (Zhen et *al.*, 1993). La différenciation de nos cellules PLB-985 transgéniques en granulocytes ou « neutrophils-like » est induite par un traitement de 6 jours au DMF 0,5 % en présence de 10 % de SVF. Dans ces conditions, environ 80 % des cellules PLB-985

acquièrent une activité oxydase (visualisation par réduction du nitro bleu de tetrazolium). Nous avons testé une autre technique de différenciation des cellules par le DMF en présence de Nutridoma-SP (Pedruzzi et *al.*, 2002) qui n'a apporté aucune amélioration de l'activité oxydase des cellules PLB-985 par rapport à la méthode en présence de 0,5 % de DMF et 10 % de SVF (Figure 25). La mesure du spectre d'absorption différentiel d'extraits membranaires provenant des cellules PLB-985 a révélé un taux de cytochrome b_{558} de $12,7 \pm 1,3$ pmol/mg de protéines dans les cellules WT-Nox2 et de $11,1 \pm 0,7$ pmol/mg de protéines dans les cellules D-loopNox4-Nox2, contre $139,2 \pm 19,9$ pmol/mg de protéines dans le neutrophile humain. Le différentiel d'expression de cytochrome b_{558} entre les cellules PLB-985 transfectées et le neutrophile correspond à celui mis en évidence dans des travaux précédemment publiés (Zhen et *al.*, 1993 ; Li et *al.*, 2005).

La première partie de l'étude a consisté à établir les mécanismes moléculaires à l'origine de la super-activité oxydase du mutant PLB-985 D-loopNox4-Nox2.

Le premier travail a été de caractériser **le profil d'activation de la NADPH oxydase des cellules PLB-985 D-loopNox4-Nox2 entières** vis-à-vis d'agents stimulants solubles ou particuliers. La cinétique de production d' O_2^- du super-mutant a été analysée par chemiluminescence en présence de luminol, et comparée à celle des cellules PLB-985 WT-Nox2 et celle du neutrophile humain isolé de sang périphérique. Nous nous sommes aussi préalablement assurés que nos cellules PLB-985 transfectées WT-Nox2 avaient une activité oxydase identique aux cellules PLB-985 WT d'origine avec chacun des agonistes.

Lorsque nous comparons l'activité NADPH oxydase des cellules PLB-985 WT ou WT-Nox2 à celle du neutrophile humain, nous obtenons une activité plus basse quels que soient les activateurs solubles : en production totale de H_2O_2 elle est 2, 11 et 18 fois moins forte pour le PMA, le fMLF, et l'ionomycine respectivement. Il en est de même pour les agents particuliers : elle est 20 et 138 fois moins forte dans les cellules PLB-985 WT-Nox2 versus le neutrophile humain pour l'OpZ et les billes de latex opsonisées respectivement (Table 3). Bien que la méthode de dosage décrite dans la littérature, utilisée pour la mesure de l'activité NADPH oxydase dans les cellules PLB-985 soit différente (réduction du cytochrome c), l'activité PMA- et OpZ-dépendante des cellules WT-Nox2 que nous mesurons est du même ordre de grandeur que celle mesurée par l'équipe du Dr Dinauer dans le même type de cellules (Zhen et *al.*, 1993, Biberstine-Kinkade et *al.*, 1999). Par contre, nous n'avons pas reproduit les résultats de Pedruzzi et *al.* (2002) lors de l'activation par le fMLF, qu'ils montrent identiques

dans les cellules PLB-985 et dans le neutrophile humain, même en utilisant du Nutridoma-SP dans le milieu de différenciation (Figure 25). Dans notre cas, l'activité oxydase serait même diminuée par rapport au milieu de différenciation contenant uniquement le SVF. L'importante différence d'activation des cellules PLB-985, quel que soit leur type, entre l'OpZ et les billes de latex opsonisées par des IgG, suggère un défaut dans la voie de signalisation médiée par les récepteurs aux Ig. En effet, l'OpZ opsonisé par du sérum, qui stimule simultanément les récepteurs des dérivés du complément (C3b/C3bi) et des Ig, produit une activation 7 fois supérieure à celle obtenue avec les billes de latex qui sont opsonisées uniquement par des IgG.

Ce qui est remarquable est que le mutant D-loopNox4-Nox2 présente une « super-activité » oxydase par rapport aux cellules PLB-985 WT-Nox2 avec les agonistes solubles (x 4-8 avec le PMA, fMLF ou ionomycine en prenant comme paramètre le pic maximal de production de H₂O₂) mais également lors d'une stimulation par les agonistes particuliers (x 1,5-2 avec l'OpZ ou les billes de latex opsonisées par des Ig G) (Table 3). Bien que le mutant D-loopNox4-Nox2 soit « super-mutant » quel que soit l'agoniste utilisé, nous obtenons comme dans les cellules WT-Nox2, une suractivation plus forte avec les agents solubles comparés aux agents particuliers. Plusieurs explications sont possibles à ce niveau :

- Le processus de phagocytose pourrait être mis en cause, mais dans des travaux précédents nous avons démontré une parfaite phagocytose de particules de billes de latex opsonisées par des IgG (Li et *al.*, 2005).
- Grâce aux travaux de thèse de Federica Defendi effectués dans notre laboratoire, nous avons mis en évidence un défaut de certaines enzymes granulaires qui démontrent une absence de granules spécifiques. Ceci a préalablement été montré par immuno-histochimie dans les cellules PLB-985 différenciées en granulocytes (Tucker et *al.*, 1987) mais également dans les cellules promyélocyaires HL-60 (Newburger et *al.*, 1979 ; Harris et Ralph, 1985). Or, nous savons que ces granules sont le réservoir principal de cytochrome *b*₅₅₈. Lors de l'activation de l'oxydase par des agents particuliers, il semble nécessaire qu'il y ait en permanence une alimentation en cytochrome *b*₅₅₈ au niveau de la membrane phagolysosomale pour soutenir une activation intraphagosomale maximale et plus longue qu'une activation uniquement membranaire comme par le fMLF.
- La faible activation de l'oxydase des cellules PLB-985 stimulée par des agents particuliers peut aussi s'expliquer par un défaut de réponse aux opsonines utilisées

pour opsoniser ces agents. Notamment, la voie de signalisation stimulée par les Ig G semble particulièrement déficiente dans les cellules PLB-985.

Retenons que les activateurs les plus efficaces dévoilant une super-activité NADPH oxydase du mutant PLB-985 D-loopNox4-Nox2 sont l'ionomycine et le fMLF, deux agonistes nécessitant une augmentation du taux de calcium intracellulaire pour agir. Nous reviendrons sur ce point important un peu plus loin.

Nous avons ensuite analysé le **profil de distribution des $O_2^{\cdot-}$ produits** par chemiluminescence dans les cellules PLB-985 transgéniques et dans le neutrophile, en mesurant la production totale et la production externe d' $O_2^{\cdot-}$ en présence respectivement de luminol et d'isoluminol (Figure 36). La NADPH oxydase du neutrophile humain peut être activée dans la membrane plasmique, dans le phagosome en cas de phagocytose, ou dans les membranes granulaires selon un ratio dépendant du stimulus employé. Dans le cas des cellules PLB-985, la répartition de la production des $O_2^{\cdot-}$ est strictement identique dans les cellules D-loopNox4-Nox2 par rapport aux cellules PLB-985 WT et WT-Nox2 quel que soit l'agoniste employé. La mutation de la boucle D n'induit donc pas de changement conformationnel de Nox2 pouvant entraîner une localisation différente de la production d' $O_2^{\cdot-}$. Aucuns résultats de ce type de mesures dans les cellules PLB-985 n'ont été rapportés dans la littérature. En ce qui concerne nos résultats avec le neutrophile humain, ils sont identiques à ceux publiés précédemment exceptés avec le fMLF (Dahlgren et Karlsson, 1999). En effet nous avons montré que seul un quart de l'activité oxydase du neutrophile humain stimulée par le fMLF est extracellulaire alors que, d'après les travaux de Dahlgren et Karlsson, elle est quasiment exclusivement extracellulaire (Dahlgren et Karlsson, 1999). Cette divergence de ratio avec le fMLF est surprenante alors que nous avons reproduit des profils de distribution d' $O_2^{\cdot-}$ similaires à ceux déjà publiés avec le PMA, l'ionomycine et l'OpZ. En effet, l'activation du neutrophile par le PMA induit une production interne et externe équivalentes alors que l'ionomycine induit une production quasiment exclusivement interne (Lundqvist et al., 1995 ; Dahlgren et al., 1992). Nous avons confirmé que les agents particuliers comme l'OpZ, permettent une très faible libération d' $O_2^{\cdot-}$ dans le milieu extracellulaire et par conséquent une optimisation de la réponse oxydative contre les microorganismes phagocytés par le neutrophile humain. La seule différence notable que nous ayons remarqué entre les cellules PLB-985 et le neutrophile humain est que l'activation par l'ionomycine ou l'OpZ conduit à une proportion plus importante de production extracellulaire d' $O_2^{\cdot-}$ que celle observée dans le neutrophile

humain (25 % versus 6 % avec l'ionomycine et 15 % versus 7 % avec l'OpZ). Il semble donc que des voies de signalisation impliquant le calcium induisent une activation différente du complexe NADPH oxydase dans les cellules PLB-985 par rapport au neutrophile humain. Dans le même temps, comme nous l'avons vu précédemment, l'ionophore à calcium ionomycine est l'agent entraînant la plus forte surproduction d' O_2^- pour le mutant D-loopNox4-Nox2.

La super-activité du mutant D-loopNox4-Nox2 est maximale lors d'une activation par l'ionomycine ou par le fMLF, deux agonistes solubles impliquant un influx calcique intracellulaire. Notre **analyse de l'activité oxydase *ex vivo* en fonction de l'influx calcique intracellulaire** a prouvé que le mutant D-loopNox4-Nox2 présente une sensibilité accrue au calcium libre intracellulaire (Figure 42). D'une part, l'activité oxydase fMLF-dépendante du mutant est proportionnellement moins affectée par une déplétion en calcium que l'activité des cellules WT-Nox2 (Figure 42A et B), ce qui pourrait vouloir dire que le taux de calcium nécessaire pour avoir une activité oxydase fMLF-dépendante est moindre pour le super-mutant par rapport aux cellules WT-Nox2. D'autre part, le mutant D-loopNox4-Nox2 présente une augmentation de l'activité oxydase 2 fois supérieure à celle des cellules PLB-985 WT-Nox2 lors d'une activation par le fMLF en présence de thapsigargine (Figure 42D). Ce produit permet de stimuler une vidange des stocks intracellulaires de calcium conduisant à l'entrée de calcium extracellulaire via les canaux SOCs (Thastrup et *al.*, 1994 ; Brécharde et Tschirhart, 2008). L'utilisation de la thapsigargine seule à 1 et 0,3 μ M, produit une activation de l'oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2 respectivement 2,5 et 4 fois plus élevée que celle de WT-Nox2 (Figure 42C). Ce simple influx calcique induit par la thapsigargine est suffisant pour que la suractivité de D-loopNox4-Nox2 s'exprime. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les cellules PLB-985 présentent un défaut de réponse à la thapsigargine par rapport au neutrophile humain (Granfeldt et *al.*, 2002). En effet la stimulation par 1 μ M de thapsigargine provoque une activité oxydase des cellules PLB-985 WT-Nox2 égale à 3 % de l'activité obtenue par stimulation par le fMLF alors que celle du neutrophile, activée par la même quantité de thapsigargine, représente un tiers de l'activité fMLF-dépendante (Figure 42C, Table 3). Ces résultats confirment l'existence d'un défaut de réponse au calcium des cellules PLB-985 WT-Nox2 par rapport au neutrophile humain, défaut qui est en partie surmonté grâce à la mutation de la boucle D pour le mutant D-loopNox4-Nox2.

L'augmentation du flux calcique intracellulaire fait partie intégrante de la signalisation à l'origine de l'activation de la NADPH oxydase. Le calcium est impliqué

notamment dans la transduction du signal via diverses phospholipases et kinases menant aux événements de phosphorylation finaux du complexe NADPH oxydase. Chaque agoniste de l'oxydase engendre un signal d'activation empruntant une voie de transduction spécifique. De ce fait, les protéines kinases ont un degré d'implication dans l'activation de l'oxydase qui est fonction de l'agoniste utilisé. Nous avons déterminé **le degré d'implication des kinases PKC, PI3K, MAPKs ERK1/2 et MAPK p38 dans l'activation de l'oxydase** du super-mutant D-loopNox4-Nox2 (Table 5) grâce à cinq inhibiteurs de kinase couramment employés (Davies et *al.*, 2000).

L'activité des MAPKs ERK1/2 a été inhibée par le composé PD 98059 qui empêche l'activation de la MAPK kinase MKK1 responsable de l'activation des MAPKs ERK1/2 (Davies et *al.*, 2000). Le composé PD 98059 n'a quasiment aucun effet sur l'activité oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2 stimulée par le PMA alors que l'activité oxydase des cellules WT-Nox2 est inhibée jusqu'à 40 %. De même, l'inhibition maximale obtenue de l'activité de D-loopNox4-Nox2 par PD 98059 est de 58 % contre 80 % pour les cellules WT-Nox2 lors de la stimulation par le fMLF (Table 5, Figure 43C). Ainsi, l'activité oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2 est donc moins sensible que les cellules WT-Nox2, voire insensible aux événements de phosphorylation ERK1/2-dépendants au cours d'une activation par le PMA et le fMLF. Sachant que les MAPKs ERK1/2 du neutrophile sont responsables de la phosphorylation directe du complexe oxydase et de l'activation de la phospholipase PLA₂ (Dang et *al.*, 2003 ; Dewas et *al.*, 2000 ; Syrbu et *al.*, 1999), la mutation de la boucle D dans le mutant D-loopNox4-Nox2 peut être à l'origine d'une modification de la conformation de Nox2 favorisant l'association des facteurs cytosoliques en l'absence d'événements de phosphorylation ERK1/2-dépendants, et/ou favorisant l'activation de l'oxydase sans avoir recours à la production d'AA par la PLA₂. Plusieurs travaux suggèrent en effet une intervention directe de l'AA sur le cytochrome *b*₅₅₈ après assemblage : l'AA associé à Nox2 participerait à l'activation du canal à protons et au transfert d'électrons au niveau du FAD, et serait nécessaire à la transition du cytochrome *b*₅₅₈ de son état intermédiaire à l'état activé (Henderson et *al.*, 1995 ; Susztak et *al.*, 1997 ; Mankelow et *al.*, 2003 ; Doussière et *al.*, 1999 ; Cross et *al.*, 1999b ; Foubert et *al.*, 2002). Au contraire du PMA et du fMLF, le composé PD 98059 entraîne une inhibition identique de l'activité oxydase après activation par l'OpZ des cellules D-loopNox4-Nox2 et WT-Nox2 (Table 5). Ce résultat souligne une divergence du rôle joué par les MAPKs ERK1/2 lors d'une activation par l'OpZ par rapport à celui joué au cours d'une activation par le PMA ou le fMLF.

En réalisant l'inhibition de la PKC avec le dérivé bisindolylmaléimide Ro 31-8220, un puissant inhibiteur compétitif agissant au niveau du site de fixation de l'ATP (Davies et *al.*, 2000 ; Davidson-Moncada et *al.*, 2002), nous n'avons observé aucune différence d'inhibition entre les cellules D-loopNox4-Nox2 et WT-Nox2 quel que soit l'agoniste utilisé (Table 5). On sait que l'activation des ERK1/2 par le PMA ou le fMLF implique une activation de la PKC en amont (Figures 14 et 15, Intro § V.2). Nous avons donc démontré que les événements de phosphorylation induits par la PKC sont nécessaires pour l'activation de l'oxydase par le PMA et le fMLF mais n'influencent en rien la super-activité oxydase du super-mutant.

L'inhibition de la PI3K a été obtenue avec les deux inhibiteurs ATP-compétitifs Wortmannin et LY-294002 (Davies et *al.*, 2000). Nous n'avons obtenu aucune inhibition significative de l'activité PMA-dépendante des cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 par ces deux inhibiteurs. De plus, ils inhibent l'activité oxydase fMLF-dépendante des cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 dans les mêmes proportions (de 30 à 60 % selon l'inhibiteur, Table 5). Par contre, l'activité NADPH oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2 est beaucoup moins inhibée par la Wortmannin et le LY-294002 que celle des cellules WT-Nox2 lors d'une activation par l'OpZ (Table 5, Figure 43A). En effet, lorsque l'activité oxydase des cellules PLB-985 est inhibée d'environ 80 %, l'activité des cellules D-loopNox4-Nox2 n'est inhibée que de 50 % environ. On peut conclure que le processus d'activation de l'oxydase des cellules D-loopNox4-Nox2 par l'OpZ est moins sensible aux événements de phosphorylation médiés par la PI3K, par comparaison avec les cellules WT-Nox2.

L'activité de la p38 MAPK a été inhibée par le composé pyridinyl imidazole SB203580, un inhibiteur ATP-compétitif hautement spécifique de l'isoforme de la p38 MAPK la plus active dans les neutrophiles (Davies et *al.*, 2000). Nous n'avons observé aucune différence d'inhibition de l'activité oxydase par SB203580 entre les cellules WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 lors d'une stimulation par le PMA et le fMLF (Table 5). Par contre, l'inhibition de la p38 MAPK induit un effet différentiel entre les cellules D-loopNox4-Nox2 et WT-Nox2 au cours d'une activation par l'OpZ (Table 5, Figure 43B). De manière inattendue, l'inhibition de la p38 MAPK des cellules PLB-985 lors d'une stimulation par l'OpZ provoque non pas une inhibition mais une amélioration de l'activité NADPH oxydase. Et cette amélioration tend à être plus élevée pour le super-mutant que pour les cellules WT-Nox2 à la concentration maximale en SB203580 de 20 μ M (+25 % versus +12 % d'activité oxydase). On peut supposer que la p38 MAPK exerce un rétrocontrôle négatif sur l'activité de certaines kinases stimulatrices, ou alors réalise des événements de phosphorylation du complexe

oxydase qui inhibent l'activité oxydase. Cette dernière hypothèse repose sur des travaux qui ont démontré *in vitro* que la phosphorylation de certaines sérines de p47*phox* pourrait avoir un effet inhibiteur sur l'activité oxydase phagocytaire (Yamaguchi et al., 1995 ; Fontayne et al., 2002 ; Mizuki et al., 2005). Cependant, il existe des résultats contradictoires sur la participation de la p38 MAPK lors d'une stimulation par l'OpZ du neutrophile humain. En effet, certains travaux ont montré que cette kinase n'était pas phosphorylée, donc inactive, en réponse à l'OpZ alors que d'autres l'impliquent dans l'activation de la PLA₂ par l'OpZ (Hazan-Halevy et Levy, 2000 ; Brown et al., 2004). D'autre part, le caractère inhibiteur de la p38 MAPK a déjà été observé dans le neutrophile stimulé par l'agent de priming GM-CSF : l'inhibition de la p38 MAPK par SB203580 améliore en effet la phosphorylation des MAPKs ERK1/2 et de p47*phox* induite par le GM-CSF (Dang et al., 2006).

En étudiant l'effet d'agents de « priming » sur l'activité oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2, nous avons démontré qu'au cours d'une stimulation par l'OpZ, l'agent de priming TNF α amplifie moins l'activité oxydase du super-mutant que celle des cellules WT-Nox2 (Figure 44B). Cette observation suggère qu'une partie de l'effet de priming de l'activité oxydase OpZ-dépendante par le TNF α est déjà « en place » dans le super-mutant grâce à la mutation de la boucle D. Sachant qu'une des principales conséquences du priming est la phosphorylation préalable de certains acides aminés des facteurs cytosoliques du complexe oxydase (Dewas et al., 2003 ; Dang et al., 2006b ; pour revue Sheppard et al., 2005), ceci renforce l'hypothèse selon laquelle la mutation de la boucle D confère à Nox2 une conformation facilitant l'activation du complexe oxydase sans avoir recours à certains événements calcium- et kinases-dépendants.

De manière générale, les résultats d'inhibition obtenus avec les cellules PLB-985 WT-Nox2 révèlent une implication de chacune des kinases testées en corrélation avec les schémas de transduction du signal établis pour le neutrophile humain et la lignée promyélocytaire HL-60 (Figures 14 et 15). Concernant la NADPH oxydase du mutant D-loopNox4-Nox2, elle est moins influencée par certains événements de phosphorylation intervenant lors de son activation que celle de WT-Nox2 (ERK1/2-dépendants lors d'une activation par le PMA et le fMLF, PI3K-dépendants et p38 MAPK-dépendants lors d'une activation par l'OpZ). La suractivité du mutant D-loopNox4-Nox2 provient aussi d'une sensibilité différente à l'augmentation du taux de calcium intracellulaire induite par différents agonistes (ionomycine, fMLF, OpZ).

On peut penser que la mutation de la boucle D du mutant D-loopNox4-Nox2 est à l'origine d'une modification de la conformation de Nox2 favorisant l'assemblage du complexe NADPH oxydase indépendamment de certains événements de phosphorylation/déphosphorylation des facteurs cytosoliques mais également de Nox2 (Raad et *al.*, 2009). **En effet la stabilité du complexe NADPH oxydase activé pourrait dépendre d'un cycle de phosphorylation/déphosphorylation des facteurs cytosoliques et pourquoi pas de Nox2 elle-même (De Coursey et Ligeti, 2005 ; Intro § V.1). Cette stabilité pourrait être accrue grâce à la mutation de la boucle D de Nox2.**

Nous avons alors étudié l'activité NADPH oxydase *in vitro* du super-mutant D-loopNox4-Nox2 en système simplifié à partir de membranes purifiées de cellules PLB-985 transgéniques puis à partir de cytochrome *b*₅₅₈ purifié. L'activité oxydase mesurée sur les membranes purifiées de D-loopNox4-Nox2 activée par l'AA est identique à celle mesurée sur les membranes issues de cellules PLB-985 WT-Nox2, quelle que soit la concentration en cytosol de neutrophile utilisée (Figure 37). Le caractère super-actif du mutant D-loopNox4-Nox2 ne s'exprime donc pas en système reconstitué à partir de membranes purifiées.

Nous avons également réalisé des expériences en système acellulaire simplifié sur le cytochrome *b*₅₅₈ purifié de WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2, en présence de protéines recombinantes p47*phox*, p67*phox*, et Rac1. Afin de réaliser ces expériences, le cytochrome *b*₅₅₈ des cellules PLB-985 WT-Nox2 et D-loopNox4-Nox2 différenciées a été purifié par immunoaffinité grâce à une collaboration établie avec l'équipe du Pr Jesaitis (Lord et *al.*, 2008). La technique consiste à purifier le cytochrome *b*₅₅₈ en une seule étape par immunoaffinité grâce à l'anticorps mAb CS9 (Taylor et *al.*, 2004), spécifique de la sous-unité p22*phox* du cytochrome *b*₅₅₈, après solubilisation avec le détergent octylglucoside. Nous avons réalisé une purification du cytochrome *b*₅₅₈ des cellules PLB-985 transgéniques avec un rendement de près de 10 % et une pureté du cytochrome *b*₅₅₈ supérieure à 90 % avec un facteur d'enrichissement de 180 fois environ (Figure 38, Table 4). En partant de cinq fois plus de cellules que l'équipe du Pr Jesaitis (2.10⁹ versus 10¹⁰ cellules), nous obtenons un rendement près de deux fois plus élevé que le leur. Les résultats d'activation de la NADPH oxydase *in vitro* par l'AA, en système cellulaire simplifié à partir des cytochromes *b*₅₅₈ purifiés, sont superposables à ceux que nous avons obtenus à partir des membranes du mutant D-loopNox4-Nox2 et des cellules WT-Nox2 (Figures 37 et 40). En effet, nous n'avons pas obtenu de différence significative d'activation entre ces deux types cellulaires ; le turnover du

cytochrome muté est de $43,3 \pm 9,9$ contre $51,8 \pm 8,2$ mol d' O_2^- /mol de cytochrome $b_{558/s}$ pour le sauvage. Par contre, après activation par le PA le turnover du cytochrome b_{558} muté est nettement plus élevé que celui du cytochrome b_{558} de WT-Nox2 puisque la valeur obtenue pour le mutant est supérieure de $59,8 \pm 17,3$ % (n=3) par rapport à celle du cytochrome sauvage (Figure 41). Nos valeurs sont de l'ordre de celles obtenues par l'équipe du Pr Jesaitis sur le cytochrome b_{558} sauvage en activant par l'acide phosphatidique ($63,8 \pm 2,9$ mol d' O_2^- /mol de cytochrome $b_{558/s}$). Outre un effet non spécifique perturbant la structure de la membrane plasmique, ces deux dérivés lipidiques semblent avoir des effets plus ciblés. L'AA semblerait agir directement sur la structure de p47phox en mimant son état déplié lorsqu'il a subi des phosphorylations à fortes concentrations, et pourrait même influencer sa liaison avec p22phox à faibles concentrations (Shiose et Sumimoto, 2000). De même, le PA aurait la capacité de se lier au domaine PX de p47phox (Karathanassis et al., 2002) et serait responsable de l'activation de la NADPH oxydase *in vitro* en agissant directement sur les composants du complexe oxydase (Palicz et al., 2001). Dans notre cas, il semble que le mécanisme d'activation du PA au niveau du complexe oxydase soit plus spécifique que celui de l'AA puisqu'il mime de plus près l'activation du complexe oxydase qui se produit dans la cellule entière. En effet, seul le PA permet d'obtenir *in vitro*, dans le système simplifié contenant uniquement des protéines du complexe oxydase purifiées, la surproduction d'anions superoxydes pour le cytochrome b_{558} muté. Ceci est encourageant dans la perspective de produire *in vitro* un cytochrome b_{558} super-actif en vue d'une approche de thérapie protéique de la granulomatose septique chronique (Marques et al., 2007).

Dans la seconde partie du travail, nous nous sommes intéressés à **l'activité microbicide du super-mutant D-loopNox4-Nox2** afin de vérifier si la surproduction d' O_2^- pouvait s'accompagner d'une amélioration du pouvoir microbicide.

La microbicidie résulte de l'action concertée des espèces réactives de l'oxygène, des enzymes et peptides antimicrobiens, et du flux ionique de compensation de charge qui soutient l'activité oxydase et maintient un environnement optimal dans le phagolysosome. Le degré d'implication de chacun de ces mécanismes est fonction du microorganisme à éliminer. Ainsi, la NADPH oxydase est absolument requise dans l'élimination de certaines bactéries comme *Staphylococcus aureus* alors qu'elle est secondaire dans l'élimination de bactéries comme *Escherichia coli*. De ce fait, des neutrophiles de patients CGD sont quasiment incapables

d'éliminer des microorganismes tels que *S. aureus* et *C. albicans* mais peuvent tuer *E. coli* presque aussi efficacement que des neutrophiles normaux [Weiss et al., 1985 ; Rada et al., 2004 ; Decleva et al., 2006, Defendi et al. (2009)]. Dans ces circonstances, nous avons voulu vérifier si la surproduction d' O_2^- du mutant D-loopNox4-Nox2 s'accompagnait d'une amélioration de son pouvoir microbicide contre un microorganisme responsable d'infections chez les patients CGD. Nous avons fait le choix de réaliser nos expériences avec l'entérobacille *Pseudomonas aeruginosa* qui est phénotypiquement apparenté à *Burkholderia cepacia*, un microorganisme responsable d'infections survenant dans la CGD (Winkelstein et al., 2000 ; van den Berg et al., 2009). Nous avons employé la souche atténuée PAO1 qui est incapable d'accomplir une lyse cytotoxique (Holloway, 1955 ; Dacheux et al., 1999).

Nous avons observé une activité bactéricide, vis-à-vis des bactéries PAO1 à MOI 1, plus élevée pour le super-mutant que pour les cellules PLB-985 WT-Nox2 dès les premières 15 min de co-incubation (taux de survie des bactéries de $43,2 \pm 2,5$ % versus $55,1 \pm 3,1$ %). De même après 60 min de co-incubation, le mutant D-loopNox4-Nox2 est capable d'éliminer près de 90 % des bactéries PAO1 contre 80 % pour les cellules WT-Nox2 (Figure 45).

Nous avons également démontré que le processus d'élimination de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* par les cellules PLB-985 implique un mécanisme bactéricide NADPH oxydase-dépendant précoce (<15 min), nécessaire pour une élimination optimale des bactéries, suivi d'un mécanisme bactéricide NADPH-oxydase indépendant dont l'efficacité est plus tardive (>30 min) (Figures 45 et 46). En effet, les cellules PLB-985 dépourvues d'activité oxydase (cellules X-CGD ou cellules WT-Nox2 inhibées par le DPI) sont capables d'éliminer efficacement les bactéries PAO1 au-delà de 30 min de contact mais au terme de la co-incubation, seuls 60 % des bactéries sont éliminées par les cellules X-CGD contre 80 % par les cellules WT-Nox2 (Figure 46B). L'augmentation de l'activité oxydase chez le mutant D-loopNox4-Nox2 permet donc d'améliorer l'activité bactéricide des cellules PLB-985 contre un microorganisme dont l'élimination est partiellement oxydase-dépendante. Cependant, nous n'avons pas pu prouver l'existence d'une surproduction d' O_2^- par les cellules D-loopNox4-Nox2 lors d'une stimulation par des PAO1 opsonisées dans les conditions expérimentales strictes de bactéricidie. Cette suractivité est pourtant plus que probable sachant qu'elle a été mise en évidence avec les agonistes particuliers OpZ et billes de latex ainsi qu'avec les microorganismes opsonisés *C. albicans* et *S. aureus* (travaux de thèse au laboratoire de Federica Defendi, article en soumission).

Il est particulièrement intéressant de noter qu'il existe une proportionnalité entre l'activité bactéricide des cellules PLB-985 à l'encontre des bactéries PAO1 et la quantité d' O_2^- produits. Une faible production d' O_2^- (mutant H490D) est en effet suffisante pour significativement accélérer la bactéricidie réalisée par les cellules PLB-985 comparée à celle réalisée par les cellules X-CGD (Figure 46A). Ces résultats confortent l'idée précédemment émise qu'il existe deux phases de bactéricidie : une précoce NADPH oxydase-dépendante et une seconde dont l'efficacité est améliorée par la production d' O_2^- durant la première phase. Cette seconde phase comprend des mécanismes antimicrobiens dépendant de la libération de certaines enzymes granulaires (MPO, protéines cationiques...etc.). Différents travaux ont suggérés que la compensation de charge (flux ioniques), concomitante à l'activation de l'oxydase, est susceptible de favoriser la dissociation et l'activation des protéases cationiques attachées à la membrane, directement responsables de la bactéricidie (Reeves et *al.*, 2002). De plus, il a été démontré que de faibles quantités d' O_2^- suffisent chez le neutrophile à induire une dépolarisation significative de la membrane. En effet moins de 5 % de la capacité maximale de production d' O_2^- est suffisante pour induire 50 % de la dépolarisation en réponse au PMA et au fMLF (Rada et *al.*, 2004 et 2008). Les résultats obtenus avec le mutant H490D tendent à corroborer cette hypothèse selon laquelle les mécanismes antimicrobiens secondaires sont améliorés par une production d' O_2^- même faible. Ce mécanisme n'exclut cependant pas le rôle bactéricide direct des O_2^- et de ses dérivés.

Une microbicidie efficace dans le temps nécessite un apport soutenu de cytochrome b_{558} au niveau des phagosomes et l'action simultanée des enzymes antimicrobiennes. Bien que la surproduction d' O_2^- par le super-mutant D-loopNox4-Nox2 améliore l'efficacité de la bactéricidie d'une souche atténuée de *P. aeruginosa*, elle ne permet pas aux cellules PLB-985 d'atteindre une efficacité équivalente à celle du neutrophile humain. En outre, nous avons démontré que l'activité microbicide du mutant D-loopNox4-Nox2 n'est pas supérieure à celle des cellules WT-Nox2 contre des souches virulentes de *C. albicans* et *S. aureus* (travaux de thèse au laboratoire de Federica Defendi, article en soumission). Ceci peut être expliqué par le fait que les cellules PLB-985 présentent plusieurs déficiences par rapport au neutrophile, limitant fortement leur pouvoir microbicide. Outre un déficit en cytochrome b_{558} (Résultats § I.1.2), nous avons montré un déficit en activité MPO (Figure 50). Des travaux, actuellement effectués au laboratoire par Federica Defendi, révèlent un défaut d'expression d'enzymes cationiques antimicrobiennes contenues dans les granules spécifiques (lactoferrine, lysozyme) mais aussi une expression largement diminuée du contenu des autres granules (cathepsine G, élastase), qui peut être responsable du faible pouvoir bactéricide des cellules PLB-985.

L'amélioration des connaissances du mode de fonctionnement du complexe NADPH oxydase doit conduire à plus ou moins long terme à des avancées thérapeutiques. D'une part, l'élucidation des mécanismes d'activation du complexe NADPH oxydase peut permettre d'améliorer les thérapies visant à inhiber l'activité oxydase au cours de pathologies inflammatoires. D'autre part, nos travaux peuvent contribuer à augmenter l'efficacité de la stratégie thérapeutique de la CGD par transfert protéique utilisant la « protéine-médicament ». Cette technique correctrice consiste à apporter la protéine Nox2 dans les cellules cibles. Des premières expériences prometteuses de synthèse et d'incorporation de Nox2 dans des liposomes ont déjà été réalisées (Marques et al., 2007). Une modification préalable de la protéine Nox2, pour augmenter son activité et/ou sa stabilité, est susceptible de renforcer l'efficacité d'une telle approche thérapeutique.

Perspectives :

- A court terme, la suite de notre travail va se focaliser sur l'étude de l'influence de l'état de phosphorylation des facteurs cytosoliques et de Nox2 sur l'assemblage du complexe NADPH oxydase du super-mutant D-loopNox4-Nox2. Pour cela, nous allons analyser l'influence de la phosphorylation des facteurs cytosoliques recombinants et de Nox2 sur le processus d'activation du complexe NADPH oxydase *in vitro*.

- Un suivi des changements conformationnels de Nox2 en présence des différents partenaires du complexe oxydase pourrait être envisagé par la technique du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) afin de confirmer notre hypothèse.

- Le transfert électronique vers les hèmes des mutants de la boucle D étudiés au laboratoire sera examiné par microscopie Raman afin de confirmer la participation de cette boucle dans le transfert électronique du FAD à l'oxygène via les hèmes (Collaboration Dr Henk-Jan van Manen, Biophysical Engineering group, University of Twente, the Netherland). Nous analyserons si ce transfert électronique aux hèmes est favorisé chez le super-mutant D-loopNox4-Nox2.

- Afin d'évaluer la participation de chacun des éléments de l'arsenal microbicide vis-à-vis de différents microorganismes, il pourrait être intéressant d'étudier le pouvoir bactéricide

des cellules PLB-985 après transfection stable d'une ou plusieurs protéines cationiques déficientes (cathepsine G, élastase, lactoferrine...etc.).

- Dans le cadre d'une collaboration avec le Pr B. Toussaint, une étude de l'interaction hôte/pathogène va être entreprise, impliquant *P. aeruginosa* et nos cellules PLB-985 transgéniques produisant différents taux d'O₂⁻. Le principe est d'analyser la réponse de la bactérie au niveau de ses voies de synthèse de molécules de signalisation interbactériennes en fonction du taux de dérivés oxygénés produits par les granulocytes.

Bibliographie

A

Abo, A., Boyhan, A., West, I., Thrasher, A.J., Segal, A.W. (1992) Reconstitution of neutrophil NADPH oxidase activity in the cell-free system by four components: p67-phox, p47-phox, p21rac1, and cytochrome b-245. *J Biol Chem* **267**, 16767-70.

Abo, A., Webb, M.R., Grogan, A., Segal, A.W. (1994) Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem J* **298 Pt 3**, 585-91.

Ago, T., Nunoi, H., Ito, T., Sumimoto, H. (1999) Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem* **274**, 33644-53.

Ago, T., Takeya, R., Hiroaki, H., Kuribayashi, F., Ito, T., Kohda, D., Sumimoto, H. (2001) The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 733-8.

Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D., Sumimoto, H. (2003) Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4474-9.

Ahluwalia, J. (2008) Chloride channels activated by swell can regulate the NADPH oxidase generated membrane depolarisation in activated human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 328-33.

Ahmed, S., Prigmore, E., Govind, S., Veryard, C., Kozma, R., Wientjes, F.B., Segal, A.W., Lim, L. (1998) Cryptic Rac-binding and p21(Cdc42Hs/Rac)-activated kinase phosphorylation sites of NADPH oxidase component p67(phox). *J Biol Chem* **273**, 15693-701.

Akard, L.P., English, D., Gabig, T.G. (1988) Rapid deactivation of NADPH oxidase in neutrophils: continuous replacement by newly activated enzyme sustains the respiratory burst. *Blood* **72**, 322-7.

Alessi, D.R. (1997) The protein kinase C inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1beta (Rsk-2) and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* **402**, 121-3.

Ambruso, D.R., Knall, C., Abell, A.N., Panepinto, J., Kurkchubasche, A., Thurman, G., Gonzalez-Aller, C., Hiester, A., deBoer, M., Harbeck, R.J., Oyer, R., Johnson, G.L., Roos, D. (2000) Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4654-9.

Ameziane-El-Hassani, R., Morand, S., Boucher, J.L., Frapart, Y.M., Apostolou, D., Agnandji, D., Gnidehou, S., Ohayon, R., Noel-Hudson, M.S., Francon, J., Lalaoui, K., Virion, A., Dupuy, C. (2005) Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity. *J Biol Chem* **280**, 30046-54.

B

Babior, B.M., Kipnes, R.S., Curnutte, J.T. (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* **52**, 741-4.

Babior, B.M. (1997) Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res* **30**, 141-55.

Badwey, J.A., Curnutte, J.T., Karnovsky, M.L. (1981) cis-Polyunsaturated fatty acids induce high levels of superoxide production by human neutrophils. *J Biol Chem* **256**, 12640-3.

Baldrige C.W. et Gerard R.W. (1932) The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol.* **103**, 235-236.

Banfi, B., Schrenzel, J., Nusse, O., Lew, D.P., Ligeti, E., Krause, K.H., Demaurex, N. (1999) A novel H(+) conductance in eosinophils: unique characteristics and absence in chronic granulomatous disease.

J Exp Med **190**, 183-94.

Banfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N., Krause, K.H. (2000) A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOX-1. *Science* **287**, 138-42.

Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demaurex, N., Krause, K.H. (2001) A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* **276**, 37594-601.

Banfi, B., Clark, R.A., Steger, K., Krause, K.H. (2003) Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* **278**, 3510-3.

Barese, C.N., Goebel, W.S., Dinauer, M.C. (2004) Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Expert Opin Biol Ther* **4**, 1423-34.

Batot, G., Martel, C., Capdeville, N., Wientjes, F., Morel, F. (1995) Characterization of neutrophil NADPH oxidase activity reconstituted in a cell-free assay using specific monoclonal antibodies raised against cytochrome b558. *Eur J Biochem* **234**, 208-15.

Bedard, K., Krause, K.H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* **87**, 245-313.

Belaouaj, A., McCarthy, R., Baumann, M., Gao, Z., Ley, T.J., Abraham, S.N., Shapiro, S.D. (1998) Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med* **4**, 615-8.

Biberstine-Kinkade, K.J., Yu, L., Dinauer, M.C. (1999) Mutagenesis of an arginine- and lysine-rich domain in the gp91(phox) subunit of the phagocyte NADPH-oxidase flavocytochrome b558. *J Biol Chem* **274**, 10451-7.

Biberstine-Kinkade, K.J., DeLeo, F.R., Epstein, R.I., LeRoy, B.A., Nauseef, W.M., Dinauer, M.C. (2001) Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem* **276**, 31105-12.

Bionda, C., Li, X.J., van Bruggen, R., Eppink, M., Roos, D., Morel, F., Stasia, M.J. (2004) 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**, 418-27.

Block, K., Gorin, Y., Hoover, P., Williams, P., Chelmicki, T., Clark, R.A., Yoneda, T., Abboud, H.E. (2007) NAD(P)H oxidases regulate HIF-2 α protein expression. *J Biol Chem* **282**, 8019-26.

Bokoch, G.M., Quilliam, L.A., Bohl, B.P., Jesaitis, A.J., Quinn, M.T. (1991) Inhibition of Rap1A binding to cytochrome b558 of NADPH oxidase by phosphorylation of Rap1A. *Science* **254**, 1794-6.

Bokoch, G.M., Diebold, B.A. (2002) Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood* **100**, 2692-6.

Bokoch, G.M., Zhao, T. (2006) Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxid Redox Signal* **8**, 1533-48.

Borsch-Haubold, A.G., Pasquet, S., Watson, S.P. (1998) Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059. SB 203580 also inhibits thromboxane synthase. *J Biol Chem* **273**, 28766-72.

Bouin, A.P., Grandvaux, N., Vignais, P.V., Fuchs, A. (1998) p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem* **273**, 30097-103.

Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L., Vignais, P. (1990) The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* **29**, 11123-33.

Boyum, A. (1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin*

Lab Invest Suppl **97**, 7.

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**, 248-54.

Bravo, J., Karathanassis, D., Pacold, C.M., Pacold, M.E., Ellson, C.D., Anderson, K.E., Butler, P.J., Lavenir, I., Perisic, O., Hawkins, P.T., Stephens, L., Williams, R.L. (2001) The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Mol Cell* **8**, 829-39.

Brechard, S., Tschirhart, E.J. (2008) Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. *J Leukoc Biol* **84**, 1223-37.

Bromberg, Y., Pick, E. (1984) Unsaturated fatty acids stimulate NADPH-dependent superoxide production by cell-free system derived from macrophages. *Cell Immunol* **88**, 213-21.

Bromberg, Y., Sha'ag, D., Shpungin, S., Pick, E. (1986) Activation of the superoxide forming NADPH oxidase in a macrophage-derived cell-free system by fatty acids and detergents. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **16**, 153-63.

Brown, E.J. (1986) The role of extracellular matrix proteins in the control of phagocytosis. *J Leukoc Biol* **39**, 579-91.

Brown, G.E., Stewart, M.Q., Liu, H., Ha, V.L., Yaffe, M.B. (2003) A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase. *Mol Cell* **11**, 35-47.

Brown, G.E., Stewart, M.Q., Bissonnette, S.A., Elia, A.E., Wilker, E., Yaffe, M.B. (2004) Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* **279**, 27059-68.

Bylund, J., MacDonald, K.L., Brown, K.L., Mydel, P., Collins, L.V., Hancock, R.E., Speert, D.P. (2007) Enhanced inflammatory responses of chronic granulomatous disease leukocytes involve ROS-independent activation of NF-kappa B. *Eur J Immunol* **37**, 1087-96.

C

Caron, E., Hall, A. (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**, 1717-21.

Cathebras, P., Sauron, C., Morel, F., Stasia, M.J. (2001) An unusual case of sarcoidosis. *Lancet* **358**, 294.

Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A. (2007) Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest* **117**, 1456-65.

Chang, Y.C., Segal, B.H., Holland, S.M., Miller, G.F., Kwon-Chung, K.J. (1998) Virulence of catalase-deficient aspergillus nidulans in p47(phox)^{-/-} mice. Implications for fungal pathogenicity and host defense in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* **101**, 1843-50.

Chen, Q., Powell, D.W., Rane, M.J., Singh, S., Butt, W., Klein, J.B., McLeish, K.R. (2003) Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J Immunol* **170**, 5302-8.

Chen, L.W., Lin, M.W., Hsu, C.M. (2005) Different pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or platelet activating factor in human neutrophils. *J Biomed Sci* **12**, 311-9.

Chen, K., Kirber, M.T., Xiao, H., Yang, Y., Keaney, J.F., Jr. (2008) Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol* **181**, 1129-39.

Cheng, G., Ritsick, D., Lambeth, J.D. (2004) Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem* **279**, 34250-5.

- Chuang**, F.Y., Sassaroli, M., Unkeless, J.C. (2000) Convergence of Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils. *J Immunol* **164**, 350-60.
- Cohen-Tanugi**, L., Morel, F., Pilloud-Dagher, M.C., Seigneurin, J.M., Francois, P., Bost, M., Vignais, P.V. (1991) Activation of O₂(-)-generating oxidase in an heterologous cell-free system derived from Epstein-Barr-virus-transformed human B lymphocytes and bovine neutrophils. Application to the study of defects in cytosolic factors in chronic granulomatous disease. *Eur J Biochem* **202**, 649-55.
- Cohn**, Z.A., Hirsch, J.G. (1960) The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* **112**, 983-1004.
- Cox**, J.A., Jeng, A.Y., Sharkey, N.A., Blumberg, P.M., Tauber, A.I. (1985) Activation of the human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase by protein kinase C. *J Clin Invest* **76**, 1932-8.
- Cross**, A.R., Parkinson, J.F., Jones, O.T. (1984) The superoxide-generating oxidase of leucocytes. NADPH-dependent reduction of flavin and cytochrome b in solubilized preparations. *Biochem J* **223**, 337-44.
- Cross**, A.R., Yarchover, J.L., Curnutte, J.T. (1994) The superoxide-generating system of human neutrophils possesses a novel diaphorase activity. Evidence for distinct regulation of electron flow within NADPH oxidase by p67-phox and p47-phox. *J Biol Chem* **269**, 21448-54.
- Cross**, A.R., Curnutte, J.T. (1995) The cytosolic activating factors p47phox and p67phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *J Biol Chem* **270**, 6543-8.
- Cross**, A.R., Heyworth, P.G., Rae, J., Curnutte, J.T. (1995) A variant X-linked chronic granulomatous disease patient (X91+) with partially functional cytochrome b. *J Biol Chem* **270**, 8194-200.
- Cross**, A.R., Erickson, R.W., Curnutte, J.T. (1999) The mechanism of activation of NADPH oxidase in the cell-free system: the activation process is primarily catalytic and not through the formation of a stoichiometric complex. *Biochem J* **341** (Pt 2), 251-5.
- Cross**, A.R., Erickson, R.W., Curnutte, J.T. (1999) Simultaneous presence of p47(phox) and flavocytochrome b-245 are required for the activation of NADPH oxidase by anionic amphiphiles. Evidence for an intermediate state of oxidase activation. *J Biol Chem* **274**, 15519-25.
- Cross**, A.R. (2000) p40(phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558). *Biochem J* **349**, 113-7.
- Cross**, A.R., Segal, A.W. (2004) The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* **1657**, 1-22.
- Crowley**, M.T., Costello, P.S., Fitzer-Attas, C.J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V.L., DeFranco, A.L. (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages. *J Exp Med* **186**, 1027-39.

D

- Dacheux**, D., Attree, I., Schneider, C., Toussaint, B. (1999) Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect Immun* **67**, 6164-7.
- Dahan**, I., Issaeva, I., Gorzalczyk, Y., Sigal, N., Hirshberg, M., Pick, E. (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**, 8421-32.
- Dahinden**, C.A., Fehr, J., Hugli, T.E. (1983) Role of cell surface contact in the kinetics of superoxide production by granulocytes. *J Clin Invest* **72**, 113-21.
- Dahlgren**, C., Johansson, A., Lundqvist, H., Bjerrum, O.W., Borregaard, N. (1992) Activation of the oxygen-radical-generating system in granules of intact human neutrophils by a calcium ionophore

(ionomycin). *Biochim Biophys Acta* **1137**, 182-8.

Dahlgren, C., Karlsson, A. (1999) Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* **232**, 3-14.

Dana, N., Todd, R.F., 3rd, Pitt, J., Springer, T.A., Arnaout, M.A. (1984) Deficiency of a surface membrane glycoprotein (Mo1) in man. *J Clin Invest* **73**, 153-9.

Dana, R., Malech, H.L., Levy, R. (1994) The requirement for phospholipase A2 for activation of the assembled NADPH oxidase in human neutrophils. *Biochem J* **297** (Pt 1), 217-23.

Dana, R., Leto, T.L., Malech, H.L., Levy, R. (1998) Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* **273**, 441-5.

Dang, P.M., Rais, S., Hakim, J., Perianin, A. (1995) Redistribution of protein kinase C isoforms in human neutrophils stimulated by formyl peptides and phorbol myristate acetate. *Biochem Biophys Res Commun* **212**, 664-72.

Dang, P.M., Babior, B.M., Smith, R.M. (1999) NADPH dehydrogenase activity of p67PHOX, a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. *Biochemistry* **38**, 5746-53.

Dang, P.M., Dewas, C., Gaudry, M., Fay, M., Pedruzzi, E., Gougerot-Pocidalò, M.A., El Benna, J. (1999) Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47(phox). *J Biol Chem* **274**, 20704-8.

Dang, P.M., Cross, A.R., Babior, B.M. (2001) Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3001-5.

Dang, P.M., Fontayne, A., Hakim, J., El Benna, J., Perianin, A. (2001) Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol* **166**, 1206-13.

Dang, P.M., Morel, F., Gougerot-Pocidalò, M.A., El Benna, J. (2003) Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry* **42**, 4520-6.

Dang, P.M., Elbim, C., Marie, J.C., Chiandotto, M., Gougerot-Pocidalò, M.A., El-Benna, J. (2006) Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity. *FASEB J* **20**, 1504-6.

Dang, P.M., Stensballe, A., Boussetta, T., Raad, H., Dewas, C., Kroviarski, Y., Hayem, G., Jensen, O.N., Gougerot-Pocidalò, M.A., El-Benna, J. (2006) A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest* **116**, 2033-43.

Davidson-Moncada, J.K., Lopez-Lluch, G., Segal, A.W., Dekker, L.V. (2002) Involvement of protein kinase D in Fc gamma-receptor activation of the NADPH oxidase in neutrophils. *Biochem J* **363**, 95-103.

Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **351**, 95-105.

Davis, A.R., Mascolo, P.L., Bunger, P.L., Sipes, K.M., Quinn, M.T. (1998) Cloning and sequencing of the bovine flavocytochrome b subunit proteins, gp91-phox and p22-phox: comparison with other known flavocytochrome b sequences. *J Leukoc Biol* **64**, 114-23.

de Mendez, I., Adams, A.G., Sokolic, R.A., Malech, H.L., Leto, T.L. (1996) Multiple SH3 domain interactions regulate NADPH oxidase assembly in whole cells. *Embo J* **15**, 1211-20.

de Mendez, I., Homayounpour, N., Leto, T.L. (1997) Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol Cell Biol* **17**, 2177-85.

- Decleva, E., Menegazzi, R., Busetto, S., Patriarca, P., Dri, P. (2006)** Common methodology is inadequate for studies on the microbicidal activity of neutrophils. *J Leukoc Biol* **79**, 87-94.
- DeCoursey, T.E., Morgan, D., Cherny, V.V. (2003)** The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. *Nature* **422**, 531-4.
- Decoursey, T.E., Ligeti, E. (2005)** Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2173-93.
- Dekker, L.V., Leitges, M., Altschuler, G., Mistry, N., McDermott, A., Roes, J., Segal, A.W. (2000)** Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem J* **347 Pt 1**, 285-9.
- DeLeo, F.R., Nauseef, W.M., Jesaitis, A.J., Burritt, J.B., Clark, R.A., Quinn, M.T. (1995)** A domain of p47phox that interacts with human neutrophil flavocytochrome b558. *J Biol Chem* **270**, 26246-51.
- DeLeo, F.R., Yu, L., Burritt, J.B., Loetterle, L.R., Bond, C.W., Jesaitis, A.J., Quinn, M.T. (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**, 7110-4.
- DeLeo, F.R., Quinn, M.T. (1996)** Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol* **60**, 677-91.
- DeLeo, F.R., Allen, L.A., Apicella, M., Nauseef, W.M. (1999)** NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J Immunol* **163**, 6732-40.
- DeLeo, F.R., Burritt, J.B., Yu, L., Jesaitis, A.J., Dinauer, M.C., Nauseef, W.M. (2000)** Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem* **275**, 13986-93.
- Della Bianca, V., Grzeskowiak, M., Lissandrini, D., Rossi, F. (1991)** Source and role of diacylglycerol formed during phagocytosis of opsonized yeast particles and associated respiratory burst in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **177**, 948-55.
- Dewas, C., Dang, P.M., Gougerot-Pocidallo, M.A., El-Benna, J. (2003)** TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* **171**, 4392-8.
- Dewitt, S., Hallett, M.B. (2002)** Cytosolic free Ca(2+) changes and calpain activation are required for beta integrin-accelerated phagocytosis by human neutrophils. *J Cell Biol* **159**, 181-9.
- Dewitt, S., Laffafian, I., Hallett, M.B. (2003)** Phagosomal oxidative activity during beta2 integrin (CR3)-mediated phagocytosis by neutrophils is triggered by a non-restricted Ca2+ signal: Ca2+ controls time not space. *J Cell Sci* **116**, 2857-65.
- Dewitt, S., Tian, W., Hallett, M.B. (2006)** Localised PtdIns(3,4,5)P3 or PtdIns(3,4)P2 at the phagocytic cup is required for both phagosome closure and Ca2+ signalling in HL60 neutrophils. *J Cell Sci* **119**, 443-51.
- Diamond, R.D., Clark, R.A., Haudenschild, C.C. (1980)** Damage to *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae by the myeloperoxidase system and oxidative products of neutrophil metabolism in vitro. *J Clin Invest* **66**, 908-17.
- Didichenko, S.A., Tilton, B., Hemmings, B.A., Ballmer-Hofer, K., Thelen, M. (1996)** Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47phox by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol* **6**, 1271-8.
- Diebold, B.A., Fowler, B., Lu, J., Dinauer, M.C., Bokoch, G.M. (2004)** Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* **279**, 28136-42.
- Dinauer, M.C., Curnutte, J.T., Rosen, H., Orkin, S.H. (1989)** A missense mutation in the neutrophil cytochrome b heavy chain in cytochrome-positive X-linked chronic granulomatous disease. *J Clin*

Invest **84**, 2012-6.

Dinauer, M.C., Pierce, E.A., Bruns, G.A., Curnutte, J.T., Orkin, S.H. (1990) Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* **86**, 1729-37.

Djerdjouri, B., Lenoir, M., Giroud, J.P., Perianin, A. (1999) Contribution of mitogen-activated protein kinase to stimulation of phospholipase D by the chemotactic peptide fMet-Leu-Phe in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 371-5.

Doussiere, J., Gaillard, J., Vignais, P.V. (1996) Electron transfer across the O₂- generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component. *Biochemistry* **35**, 13400-10.

Doussiere, J., Bouzidi, F., Poinas, A., Gaillard, J., Vignais, P.V. (1999) Kinetic study of the activation of the neutrophil NADPH oxidase by arachidonic acid. Antagonistic effects of arachidonic acid and phenylarsine oxide. *Biochemistry* **38**, 16394-406.

Durand, D., Cannella, D., Dubosclard, V., Pebay-Peyroula, E., Vachette, P., Fieschi, F. (2006) Small-angle X-ray scattering reveals an extended organization for the autoinhibitory resting state of the p47(phox) modular protein. *Biochemistry* **45**, 7185-93.

Dusi, S., Della Bianca, V., Grzeskowiak, M., Rossi, F. (1993) Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47phox and p67phox and activation of the NADPH oxidase in normal and Ca(2+)-depleted human neutrophils. *Biochem J* **290** (Pt 1), 173-8.

E

Ehlenberger, A.G., Nussenzweig, V. (1977) The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. *J Exp Med* **145**, 357-71.

El Benna, J., Faust, L.P., Babior, B.M. (1994) The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem* **269**, 23431-6.

El Benna, J., Faust, R.P., Johnson, J.L., Babior, B.M. (1996) Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **271**, 6374-8.

El Benna, J.E., Dang, P.M., Gaudry, M., Fay, M., Morel, F., Hakim, J., Gougerot-Pocidalò, M.A. (1997) Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. *J Biol Chem* **272**, 17204-8.

Ellson, C.D., Anderson, K.E., Morgan, G., Chilvers, E.R., Lipp, P., Stephens, L.R., Hawkins, P.T. (2001) Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes. *Curr Biol* **11**, 1631-5.

Ellson, C.D., Gobert-Gosse, S., Anderson, K.E., Davidson, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Thuring, J.W., Cooper, M.A., Lim, Z.Y., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Coadwell, J., Chilvers, E.R., Hawkins, P.T., Stephens, L.R. (2001) PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nat Cell Biol* **3**, 679-82.

Ellson, C.D., Davidson, K., Ferguson, G.J., O'Connor, R., Stephens, L.R., Hawkins, P.T. (2006) Neutrophils from p40phox^{-/-} mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. *J Exp Med* **203**, 1927-37.

Elzi, D.J., Bjornsen, A.J., MacKenzie, T., Wyman, T.H., Silliman, C.C. (2001) Ionomycin causes activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C350-60.

Erickson, R.W., Langel-Peveri, P., Traynor-Kaplan, A.E., Heyworth, P.G., Curnutte, J.T. (1999)

Activation of human neutrophil NADPH oxidase by phosphatidic acid or diacylglycerol in a cell-free system. Activity of diacylglycerol is dependent on its conversion to phosphatidic acid. *J Biol Chem* **274**, 22243-50.

F

Faust, L.R., el Benna, J., Babior, B.M., Chanock, S.J. (1995) The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest* **96**, 1499-505.

Finan, P., Shimizu, Y., Gout, I., Hsuan, J., Truong, O., Butcher, C., Bennett, P., Waterfield, M.D., Kellie, S. (1994) An SH3 domain and proline-rich sequence mediate an interaction between two components of the phagocyte NADPH oxidase complex. *J Biol Chem* **269**, 13752-5.

Fontayne, A., Dang, P.M., Gougerot-Pocidallo, M.A., El-Benna, J. (2002) Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* **41**, 7743-50.

Forbes, L.V., Truong, O., Wientjes, F.B., Moss, S.J., Segal, A.W. (1999) The major phosphorylation site of the NADPH oxidase component p67phox is Thr233. *Biochem J* **338** (Pt 1), 99-105.

Forbes, L.V., Moss, S.J., Segal, A.W. (1999) Phosphorylation of p67phox in the neutrophil occurs in the cytosol and is independent of p47phox. *FEBS Lett* **449**, 225-9.

Foubert, T.R., Bleazard, J.B., Burritt, J.B., Gripenrog, J.M., Baniulis, D., Taylor, R.M., Jesaitis, A.J. (2001) Identification of a spectrally stable proteolytic fragment of human neutrophil flavocytochrome b composed of the NH2-terminal regions of gp91(phox) and p22(phox). *J Biol Chem* **276**, 38852-61.

Foubert, T.R., Burritt, J.B., Taylor, R.M., Jesaitis, A.J. (2002) Structural changes are induced in human neutrophil cytochrome b by NADPH oxidase activators, LDS, SDS, and arachidonate: intermolecular resonance energy transfer between trisulfopyrenyl-wheat germ agglutinin and cytochrome b(558). *Biochim Biophys Acta* **1567**, 221-31.

Foyouzi-Youssefi, R., Petersson, F., Lew, D.P., Krause, K.H., Nüsse, O. (1997) Chemoattractant-induced respiratory burst: increases in cytosolic Ca²⁺ concentrations are essential and synergize with a kinetically distinct second signal. *Biochem J* **322** (Pt 3), 709-18.

Freeman, J.L., Abo, A., Lambeth, J.D. (1996) Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J Biol Chem* **271**, 19794-801.

Frey, R.S., Ushio-Fukai, M., Malik, A. (2008) NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*.

Fuchs, A., Bouin, A.P., Rabilloud, T., Vignais, P.V. (1997) The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells. *Eur J Biochem* **249**, 531-9.

G

Gabig, T.G., Crean, C.D., Mantel, P.L., Rosli, R. (1995) Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation. *Blood* **85**, 804-11.

Gavazzi, G., Banfi, B., Deffert, C., Fiette, L., Schappi, M., Herrmann, F., Krause, K.H. (2006) Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett* **580**, 497-504.

Geiszt, M., Kopp, J.B., Varnai, P., Leto, T.L. (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8010-4.

Geiszt, M., Lekstrom, K., Witta, J., Leto, T.L. (2003) Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem* **278**, 2000

Gillibert, M., Dehry, Z., Terrier, M., El Benna, J., Lederer, F. (2005) Another biological effect of tosylphenylalanylchloromethane (TPCK): it prevents p47phox phosphorylation and translocation upon neutrophil stimulation. *Biochem J* **386**, 549-56.

Ginsel, L.A., Onderwater, J.J., Fransen, J.A., Verhoeven, A.J., Roos, D. (1990) Localization of the low-Mr subunit of cytochrome b558 in human blood phagocytes by immunoelectron microscopy. *Blood* **76**, 2105-16.

Gorzalczany, Y., Alloul, N., Sigal, N., Weinbaum, C., Pick, E. (2002) A prenylated p67phox-Rac1 chimera elicits NADPH-dependent superoxide production by phagocyte membranes in the absence of an activator and of p47phox: conversion of a pagan NADPH oxidase to monotheism. *J Biol Chem* **277**, 18605-10.

Goyal, P., Weissmann, N., Rose, F., Grimminger, F., Schafers, H.J., Seeger, W., Hanze, J. (2005) Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 32-9.

Granfeldt, D., Samuelsson, M., Karlsson, A. (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**, 611-7.

Grange, L., Nguyen, M.V., Lardy, B., Derouazi, M., Campion, Y., Trocme, C., Paclet, M.H., Gaudin, P., Morel, F. (2006) NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxid Redox Signal* **8**, 1485-96.

Griendling, K.K. (2004) Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* **90**, 491-3.

Grizot, S., Fieschi, F., Dagher, M.C., Pebay-Peyroula, E. (2001) The active N-terminal region of p67phox. Structure at 1.8 Å resolution and biochemical characterizations of the A128V mutant implicated in chronic granulomatous disease. *J Biol Chem* **276**, 21627-31.

Grizot, S., Grandvaux, N., Fieschi, F., Faure, J., Massenet, C., Andrieu, J.P., Fuchs, A., Vignais, P.V., Timmins, P.A., Dagher, M.C., Pebay-Peyroula, E. (2001) Small angle neutron scattering and gel filtration analyses of neutrophil NADPH oxidase cytosolic factors highlight the role of the C-terminal end of p47phox in the association with p40phox. *Biochemistry* **40**, 3127-33.

Groemping, Y., Lapouge, K., Smerdon, S.J., Rittinger, K. (2003) Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* **113**, 343-55.

Groemping, Y., Rittinger, K. (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* **386**, 401-16.

Gullberg, U., Bengtsson, N., Bulow, E., Garwicz, D., Lindmark, A., Olsson, I. (1999) Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *J Immunol Methods* **232**, 201-10.

H

Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **92**, 3007-17.

Han, C.H., Freeman, J.L., Lee, T., Motalebi, S.A., Lambeth, J.D. (1998) Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* **273**, 16663-8

Han, C.H., Nisimoto, Y., Lee, S.H., Kim, E.T., Lambeth, J.D. (2001) Characterization of the flavoprotein domain of gp91phox which has NADPH diaphorase activity. *J Biochem* **129**, 513-20.

Hardy, S.J., Robinson, B.S., Ferrante, A., Hii, C.S., Johnson, D.W., Poulos, A., Murray, A.W. (1995) Polyenoic very-long-chain fatty acids mobilize intracellular calcium from a thapsigargin-insensitive pool in human neutrophils. The relationship between Ca²⁺ mobilization and superoxide production induced by long- and very-long-chain fatty acids. *Biochem J* **311** (Pt 2), 689-97.

Harper, A.M., Chaplin, M.F., Segal, A.W. (1985) Cytochrome b-245 from human neutrophils is a

glycoprotein. *Biochem J* **227**, 783-8.

Harris, P., Ralph, P. (1985) Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol* **37**, 407-22.

Hata, K., Ito, T., Takeshige, K., Sumimoto, H. (1998) Anionic amphiphile-independent activation of the phagocyte NADPH oxidase in a cell-free system by p47phox and p67phox, both in C terminally truncated forms. Implication for regulatory Src homology 3 domain-mediated interactions. *J Biol Chem* **273**, 4232-6.

Hawkins, P.T., Davidson, K., Stephens, L.R. (2007) The role of PI3Ks in the regulation of the neutrophil NADPH oxidase. *Biochem Soc Symp*, 59-67.

Hazan, I., Dana, R., Granot, Y., Levy, R. (1997) Cytosolic phospholipase A2 and its mode of activation in human neutrophils by opsonized zymosan. Correlation between 42/44 kDa mitogen-activated protein kinase, cytosolic phospholipase A2 and NADPH oxidase. *Biochem J* **326 (Pt 3)**, 867-76

Hazan-Halevy, I., Levy, R. (2000) Activation of cytosolic phospholipase A2 by opsonized zymosan in human neutrophils requires both ERK and p38 MAP-kinase. *Adv Exp Med Biol* **479**, 115-23.

Hazan-Halevy, I., Seger, R., Levy, R. (2000) The requirement of both extracellular regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase for stimulation of cytosolic phospholipase A(2) activity by either FcγRIIA or FcγRIIIB in human neutrophils. A possible role for Pyk2 but not for the Grb2-Sos-Shc complex. *J Biol Chem* **275**, 12416-23.

Henderson, L.M., Chappell, J.B., Jones, O.T. (1987) The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H⁺ channel. *Biochem J* **246**, 325-9.

Henderson, L.M., Banting, G., Chappell, J.B. (1995) The arachidonate-activable, NADPH oxidase-associated H⁺ channel. Evidence that gp91-phox functions as an essential part of the channel. *J Biol Chem* **270**, 5909-16.

Henderson, L.M. (1998) Role of histidines identified by mutagenesis in the NADPH oxidase-associated H⁺ channel. *J Biol Chem* **273**, 33216-23.

Heyworth, P.G., Badwey, J.A. (1990) Protein phosphorylation associated with the stimulation of neutrophils. Modulation of superoxide production by protein kinase C and calcium. *J Bioenerg Biomembr* **22**, 1-26.

Heyworth, P.G., Curnutte, J.T., Nauseef, W.M., Volpp, B.D., Pearson, D.W., Rosen, H., Clark, R.A. (1991) Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *J Clin Invest* **87**, 352-6.

Heyworth, P.G., Bohl, B.P., Bokoch, G.M., Curnutte, J.T. (1994) Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *J Biol Chem* **269**, 30749-52.

Heyworth, P.G., Cross, A.R., Curnutte, J.T. (2003) Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol* **15**, 578-84.

Hii, C.S., Huang, Z.H., Bilney, A., Costabile, M., Murray, A.W., Rathjen, D.A., Der, C.J., Ferrante, A. (1998) Stimulation of p38 phosphorylation and activity by arachidonic acid in HeLa cells, HL60 promyelocytic leukemic cells, and human neutrophils. Evidence for cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **273**, 19277-82.

Hii, C.S., Anson, D.S., Costabile, M., Mukaro, V., Dunning, K., Ferrante, A. (2004) Characterization of the MEK5-ERK5 module in human neutrophils and its relationship to ERK1/ERK2 in the chemotactic response. *J Biol Chem* **279**, 49825-34.

Hii, C.S., Ferrante, A. (2007) Regulation of the NADPH oxidase activity and anti-microbial function of neutrophils by arachidonic acid. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **55**, 99-110.

Hirsch, E., Katanaev, V.L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzani, S., Mantovani,

A., Altruda, F., Wymann, M.P. (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* **287**, 1049-53.

Holloway, B.W., Krishnapillai, V., Morgan, A.F. (1979) Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* **43**, 73-102.

Hartl, D., Lehmann, N., Hoffmann, F., Jansson, A., Hector, A., Notheis, G., Roos, D., Belohradsky, B.H., Wintergerst, U. (2008) Dysregulation of innate immune receptors on neutrophils in chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol* **121**, 375-382 e9.

Holmes, B., Page, A.R., Good, R.A. (1967) Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest* **46**, 1422-32.

Hoyal, C.R., Gutierrez, A., Young, B.M., Catz, S.D., Lin, J.H., Tschlis, P.N., Babior, B.M. (2003) Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5130-5.

Huang, J., Hitt, N.D., Kleinberg, M.E. (1995) Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558. *Biochemistry* **34**, 16753-7.

Huang, Z.H., Hii, C.S., Rathjen, D.A., Poulos, A., Murray, A.W., Ferrante, A. (1997) N-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids stimulate translocation of protein kinase Calpha, -betaI, -betaII and -epsilon and enhance agonist-induced NADPH oxidase in macrophages. *Biochem J* **325 (Pt 2)**, 553-7.

I

Ishitoya, J., Yamakawa, A., Takenawa, T. (1987) Translocation of diacylglycerol kinase in response to chemotactic peptide and phorbol ester in neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **144**, 1025-30.

Ito, T., Matsui, Y., Ago, T., Ota, K., Sumimoto, H. (2001) Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions. *Embo J* **20**, 3938-46.

J

Jandl, R.C., Andre-Schwartz, J., Borges-DuBois, L., Kipnes, R.S., McMurrich, B.J., Babior, B.M. (1978) Termination of the respiratory burst in human neutrophils. *J Clin Invest* **61**, 1176-85.

Jesaitis, A.J. (1995) Structure of human phagocyte cytochrome b and its relationship to microbicidal superoxide production. *J Immunol* **155**, 3286-8.

Jiang, Q., Hurst, J.K. (1997) Relative chlorinating, nitrating, and oxidizing capabilities of neutrophils determined with phagocytosable probes. *J Biol Chem* **272**, 32767-72.

Johnson, J.L., Park, J.W., Benna, J.E., Faust, L.P., Inanami, O., Babior, B.M. (1998) Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. *J Biol Chem* **273**, 35147-52.

K

Kami, K., Takeya, R., Sumimoto, H., Kohda, D. (2002) Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p. *Embo J* **21**, 4268-76.

Kanai, F., Liu, H., Field, S.J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G.E., Cantley, L.C., Yaffe, M.B. (2001) The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol* **3**, 675-8.

Kao, Y.Y., Gianni, D., Bohl, B., Taylor, R.M., Bokoch, G.M. (2008) Identification of a conserved Rac-binding site on NADPH oxidases supports a direct GTPase regulatory mechanism. *J Biol Chem* **283**, 12736-46.

Karathanassis, D., Stahelin, R.V., Bravo, J., Perisic, O., Pacold, C.M., Cho, W., Williams, R.L. (2002)

Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *Embo J* **21**, 5057-68.

Karlsson, A., Nixon, J.B., McPhail, L.C. (2000) Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol* **67**, 396-404.

Kawahara, T., Ritsick, D., Cheng, G., Lambeth, J.D. (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**, 31859-69.

Kim, C., Marchal, C.C., Penninger, J., Dinauer, M.C. (2003) The hemopoietic Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions. *J Immunol* **171**, 4425-30.

Koshkin, V., Lotan, O., Pick, E. (1997) Electron transfer in the superoxide-generating NADPH oxidase complex reconstituted in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1319**, 139-46.

Kuribayashi, F., Nunoi, H., Wakamatsu, K., Tsunawaki, S., Sato, K., Ito, T., Sumimoto, H. (2002) The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *Embo J* **21**, 6312-20.

Kuroda, J., Nakagawa, K., Yamasaki, T., Nakamura, K., Takeya, R., Kuribayashi, F., Imajoh-Ohmi, S., Igarashi, K., Shibata, Y., Sueishi, K., Sumimoto, H. (2005) The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes Cells* **10**, 1139-51.

Kutter, D. (1998) Prevalence of myeloperoxidase deficiency: population studies using Bayer-Technicon automated hematology. *J Mol Med* **76**, 669-75.

Kwong, C.H., Malech, H.L., Rotrosen, D., Leto, T.L. (1993) Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins. *Biochemistry* **32**, 5711-7.

L

Labadia, M.E., Bokoch, G.M., Huang, C.K. (1993) The Rap1A protein enhances protein kinase C activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **195**, 1321-8.

Laemmli, U.K., Favre, M. (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol* **80**, 575-99.

Lambeth, J.D. (2007) Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med* **43**, 332-47.

Lapouge, K., Smith, S.J., Walker, P.A., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., Rittinger, K. (2000) Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP. *Mol Cell* **6**, 899-907.

Lapouge, K., Smith, S.J., Groemping, Y., Rittinger, K. (2002) Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem* **277**, 10121-8.

Le Good, J.A., Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Alessi, D.R., Cohen, P., Parker, P.J. (1998) Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**, 2042-5.

Lee, S.R., Yang, K.S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., Rhee, S.G. (2002) Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem* **277**, 20336-42.

Lehrer, R.I., Hanifin, J., Cline, M.J. (1969) Defective bactericidal activity in myeloperoxidase-deficient human neutrophils. *Nature* **223**, 78-9.

Leopoldt, D., Hanck, T., Exner, T., Maier, U., Wetzker, R., Nurnberg, B. (1998) Gbetagamma stimulates phosphoinositide 3-kinase-gamma by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J Biol Chem* **273**, 7024-9.

Leslie, N.R., Biondi, R.M., Alessi, D.R. (2001) Phosphoinositide-regulated kinases and phosphoinositide phosphatases. *Chem Rev* **101**, 2365-80.

Leto, T.L., Adams, A.G., de Mendez, I. (1994) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10650-4.

Leusen, J.H., Bolscher, B.G., Hilarius, P.M., Weening, R.S., Kaulfersch, W., Seger, R.A., Roos, D., Verhoeven, A.J. (1994) 156Pro-->Gln substitution in the light chain of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase (p22-phox) leads to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. *J Exp Med* **180**, 2329-34.

Leusen, J.H., de Boer, M., Bolscher, B.G., Hilarius, P.M., Weening, R.S., Ochs, H.D., Roos, D., Verhoeven, A.J. (1994) A point mutation in gp91-phox of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase leading to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. *J Clin Invest* **93**, 2120-6.

Leusen, J.H., Meischl, C., Eppink, M.H., Hilarius, P.M., de Boer, M., Weening, R.S., Ahlin, A., Sanders, L., Goldblatt, D., Skopczynska, H., Bernatowska, E., Palmblad, J., Verhoeven, A.J., van Berkel, W.J., Roos, D. (2000) Four novel mutations in the gene encoding gp91-phox of human NADPH oxidase: consequences for oxidase assembly. *Blood* **95**, 666-73.

Li, J., Guillory, R.J. (1997) Purified leukocyte cytochrome b558 incorporated into liposomes catalyzes a cytosolic factor dependent diaphorase activity. *Biochemistry* **36**, 5529-37.

Li, Z., Jiang, H., Xie, W., Zhang, Z., Smrcka, A.V., Wu, D. (2000) Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* **287**, 1046-9.

Li, X.J., Grunwald, D., Mathieu, J., Morel, F., Stasia, M.J. (2005) Crucial role of two potential cytosolic regions of Nox2, 191TSSTKTIRRS200 and 484DESQANHFVHHDEEKD500, on NADPH oxidase activation. *J Biol Chem* **280**, 14962-73.

Li, X.J., Fieschi, F., Paquet, M.H., Grunwald, D., Champion, Y., Gaudin, P., Morel, F., Stasia, M.J. (2007) Leu505 of Nox2 is crucial for optimal p67phox-dependent activation of the flavocytochrome b558 during phagocytic NADPH oxidase assembly. *J Leukoc Biol* **81**, 238-49.

Lin, L.L., Wartmann, M., Lin, A.Y., Knopf, J.L., Seth, A., Davis, R.J. (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**, 269-78.

Lomax, K.J., Leto, T.L., Nunoi, H., Gallin, J.I., Malech, H.L. (1989) Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science* **245**, 409-12.

Lopes, L.R., Dagher, M.C., Gutierrez, A., Young, B., Bouin, A.P., Fuchs, A., Babior, B.M. (2004) Phosphorylated p40PHOX as a negative regulator of NADPH oxidase. *Biochemistry* **43**, 3723-30.

Lord, C.I., Riesselman, M.H., Gripenrog, J.M., Burritt, J.B., Jesaitis, A.J., Taylor, R.M. (2008) Single-step immunoaffinity purification and functional reconstitution of human phagocyte flavocytochrome b. *J Immunol Methods* **329**, 201-7.

Lundqvist, H., Kricka, L.J., Stott, R.A., Thorpe, G.H., Dahlgren, C. (1995) Influence of different luminols on the characteristics of the chemiluminescence reaction in human neutrophils. *J Biolumin Chemilumin* **10**, 353-9.

Lundqvist, H., Dahlgren, C. (1996) Isoluminol-enhanced chemiluminescence: a sensitive method to study the release of superoxide anion from human neutrophils. *Free Radic Biol Med* **20**, 785-92.

M

Mahadev, K., Motoshima, H., Wu, X., Ruddy, J.M., Arnold, R.S., Cheng, G., Lambeth, J.D., Goldstein, B.J. (2004) 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**, 1844-54.

Maly, F.E., Schuerer-Maly, C.C., Quilliam, L., Cochrane, C.G., Newburger, P.E., Curnutte, J.T.,

- Gifford, M., Dinauer, M.C. (1993) Restitution of superoxide generation in autosomal cytochrome-negative chronic granulomatous disease (A22(0) CGD)-derived B lymphocyte cell lines by transfection with p22phox cDNA. *J Exp Med* **178**, 2047-53.
- Maly**, F.E., Quilliam, L.A., Dorseuil, O., Der, C.J., Bokoch, G.M. (1994) Activated or dominant inhibitory mutants of Rap1A decrease the oxidative burst of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Biol Chem* **269**, 18743-6.
- Mankelov**, T.J., Pessach, E., Levy, R., Henderson, L.M. (2003) The requirement of cytosolic phospholipase A2 for the PMA activation of proton efflux through the N-terminal 230-amino-acid fragment of gp91phox. *Biochem J* **374**, 315-9.
- Mao**, G.D., Poznansky, M.J. (1992) Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. *FEBS Lett* **305**, 233-6.
- Marasco**, W.A., Phan, S.H., Krutzsch, H., Showell, H.J., Feltner, D.E., Nairn, R., Becker, E.L., Ward, P.A. (1984) Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by Escherichia coli. *J Biol Chem* **259**, 5430-9.
- Marcoux**, J., Man, P., Castellan, M., Vivès, C., Forest, E., Fieschi, F. (2009) Conformational changes in (p47)phox upon activation highlighted by mass spectrometry coupled to hydrogen/deuterium exchange and limited proteolysis. *FEBS Lett.* **583**, 835-40.
- Marques**, B., Liguori, L., Pacllet, M.H., Villegas-Mendez, A., Rothe, R., Morel, F., Lenormand, J.L. (2007) Liposome-mediated cellular delivery of active gp91(phox). *PLoS ONE* **2**, e856.
- Martyn**, K.D., Kim, M.J., Quinn, M.T., Dinauer, M.C., Knaus, U.G. (2005) p21-activated kinase (Pak) regulates NADPH oxidase activation in human neutrophils. *Blood* **106**, 3962-9.
- Martyn**, K.D., Frederick, L.M., von Loehneysen, K., Dinauer, M.C., Knaus, U.G. (2006) Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* **18**, 69-82.
- Massenet**, C., Chenavas, S., Cohen-Addad, C., Dagher, M.C., Brandolin, G., Pebay-Peyroula, E., Fieschi, F. (2005) Effects of p47phox C terminus phosphorylations on binding interactions with p40phox and p67phox. Structural and functional comparison of p40phox and p67phox SH3 domains. *J Biol Chem* **280**, 13752-61.
- Maturana**, A., Krause, K.H., Demaurex, N. (2002) NOX family NADPH oxidases: do they have built-in proton channels? *J Gen Physiol* **120**, 781-6.
- McPhail**, L.C., Clayton, C.C., Snyderman, R. (1984) A potential second messenger role for unsaturated fatty acids: activation of Ca²⁺-dependent protein kinase. *Science* **224**, 622-5.
- Meng**, T.C., Fukada, T., Tonks, N.K. (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* **9**, 387-99.
- Merril**, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A., Ebert, M.H. (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211**, 1437-8.
- Meshulam**, T., Diamond, R.D., Lyman, C.A., Wysong, D.R., Melnick, D.A. (1988) Temporal association of calcium mobilization, inositol trisphosphate generation, and superoxide anion release by human neutrophils activated by serum opsonized and nonopsonized particulate stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* **150**, 532-9.
- Messina**, C.G., Reeves, E.P., Roes, J., Segal, A.W. (2002) Catalase negative Staphylococcus aureus retain virulence in mouse model of chronic granulomatous disease. *FEBS Lett* **518**, 107-10.
- Metchnikoff** E. (Reprinted 1905) Immunity in Infective Diseases. Cambridge Univ. Press, Cambridge
- Mizrahi**, A., Berdichevsky, Y., Ugolev, Y., Molshanski-Mor, S., Nakash, Y., Dahan, I., Alloul, N., Gorzalczany, Y., Sarfstein, R., Hirshberg, M., Pick, E. (2006) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex: chimeric constructs derived from the cytosolic components as tools for exploring structure-function relationships. *J Leukoc Biol* **79**, 881-95.

- Mizuki, K.,** Takeya, R., Kuribayashi, F., Nobuhisa, I., Kohda, D., Nunoi, H., Takeshige, K., Sumimoto, H. (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**, 185-94.
- Morel, F.,** Doussiere, J., Stasia, M.J., Vignais, P.V. (1985) The respiratory burst of bovine neutrophils. Role of a b type cytochrome and coenzyme specificity. *Eur J Biochem* **152**, 669-79.
- Moskwa, P.,** Dagher, M.C., Paclet, M.H., Morel, F., Ligeti, E. (2002) Participation of Rac GTPase activating proteins in the deactivation of the phagocytic NADPH oxidase. *Biochemistry* **41**, 10710-6.
- Moskwa, P.,** Paclet, M.H., Dagher, M.C., Ligeti, E. (2005) Autoinhibition of p50 Rho GTPase-activating protein (GAP) is released by prenylated small GTPases. *J Biol Chem.* **280**, 6716-20.
- M'Rabet, L.,** Coffey, P., Zwartkruis, F., Franke, B., Segal, A.W., Koenderman, L., Bos, J.L. (1998) Activation of the small GTPase rap1 in human neutrophils. *Blood* **92**, 2133-40.
- Murillo, M.M.,** Carmona-Cuenca, I., Del Castillo, G., Ortiz, C., Roncero, C., Sanchez, A., Fernandez, M., Fabregat, I. (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**, 251-9.
- Murphy, R.,** DeCoursey, T.E. (2006) Charge compensation during the phagocyte respiratory burst. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 996-1011.

N

- Nakamura, R.,** Sumimoto, H., Mizuki, K., Hata, K., Ago, T., Kitajima, S., Takeshige, K., Sakaki, Y., Ito, T. (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**, 583-9.
- Nauseef, W.M.,** Metcalf, J.A., Root, R.K. (1983) Role of myeloperoxidase in the respiratory burst of human neutrophils. *Blood* **61**, 483-92.
- Nauseef, W.M.,** McCormick, S., Renee, J., Leidal, K.G., Clark, R.A. (1993) Functional domain in an arginine-rich carboxyl-terminal region of p47phox. *J Biol Chem* **268**, 23646-51.
- Nauseef, W.M.** (2004) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol* **122**, 277-91.
- Newburger, P.E.,** Chovaniec, M.E., Greenberger, J.S., Cohen, H.J. (1979) Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation. *J Cell Biol* **82**, 315-22.
- Nguyen M.V.C.** (2008) NADPH oxydase Nox4 native et recombinante. Composés quinoniques, éléments de régulation. Thèse de doctorat SVS, Grenoble 1.
- Nisimoto, Y.,** Freeman, J.L., Motalebi, S.A., Hirshberg, M., Lambeth, J.D. (1997) Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* **272**, 18834-41.
- Nisimoto, Y.,** Motalebi, S., Han, C.H., Lambeth, J.D. (1999) The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* **274**, 22999-3005.
- Nisimoto, Y.,** Ogawa, H., Miyano, K., Tamura, M. (2004) Activation of the flavoprotein domain of gp91phox upon interaction with N-terminal p67phox (1-210) and the Rac complex. *Biochemistry* **43**, 9567-75.
- Nobuhisa, I.,** Takeya, R., Ogura, K., Ueno, N., Kohda, D., Inagaki, F., Sumimoto, H. (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**, 183-92.

Nunoi, H., Rotrosen, D., Gallin, J.I., Malech, H.L. (1988) Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science* **242**, 1298-301.

O

Okochi, Y., Sasaki, M., Iwasaki, H., Okamura, Y. (2009) Voltage-gated proton channel is expressed on phagosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* **382(2)**, 274-9.

Ott, M.G., Seger, R., Stein, S., Siler, U., Hoelzer, D., Grez, M. (2007) Advances in the treatment of Chronic Granulomatous Disease by gene therapy. *Curr Gene Ther* **7**, 155-61.

P

Paclet, M.H., Coleman, A.W., Vergnaud, S., Morel, F. (2000) P67-phox-mediated NADPH oxidase assembly: imaging of cytochrome b558 liposomes by atomic force microscopy. *Biochemistry* **39**, 9302-10.

Paclet, M.H., Coleman, A.W., Burritt, J., Morel, F. (2001) NADPH oxidase of Epstein-Barr-virus immortalized B lymphocytes. Effect of cytochrome b(558) glycosylation. *Eur J Biochem* **268**, 5197-208.

Paclet, M.H., Henderson, L.M., Campion, Y., Morel, F., Dagher, M.C. (2004) Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. *Biochem J* **382**, 981-6.

Pai, J.K., Siegel, M.I., Egan, R.W., Billah, M.M. (1988) Phospholipase D catalyzes phospholipid metabolism in chemotactic peptide-stimulated HL-60 granulocytes. *J Biol Chem* **263**, 12472-7.

Palicz, A., Foubert, T.R., Jesaitis, A.J., Marodi, L., McPhail, L.C. (2001) Phosphatidic acid and diacylglycerol directly activate NADPH oxidase by interacting with enzyme components. *J Biol Chem* **276**, 3090-7.

Paravicini, T.M., Touyz, R.M. (2008) NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* **31 Suppl 2**, S170-80.

Park, M.Y., Imajoh-Ohmi, S., Nunoi, H., Kanegasaki, S. (1997) Synthetic peptides corresponding to various hydrophilic regions of the large subunit of cytochrome b558 inhibit superoxide generation in a cell-free system from neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 531-6.

Park, H.S., Lee, S.M., Lee, J.H., Kim, Y.S., Bae, Y.S., Park, J.W. (2001) Phosphorylation of the leucocyte NADPH oxidase subunit p47(phox) by casein kinase 2: conformation-dependent phosphorylation and modulation of oxidase activity. *Biochem J* **358**, 783-90.

Parkos, C.A., Allen, R.A., Cochrane, C.G., Jesaitis, A.J. (1987) Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest* **80**, 732-42.

Pedrucci, E., Fay, M., Elbim, C., Gaudry, M., Gougerot-Pocidallo, M.A. (2002) Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br J Haematol* **117**, 719-26.

Peng, G., Huang, J., Boyd, M., Kleinberg, M.E. (2003) Properties of phagocyte NADPH oxidase p47-phox mutants with unmasked SH3 (Src homology 3) domains: full reconstitution of oxidase activity in a semi-recombinant cell-free system lacking arachidonic acid. *Biochem J* **373**, 221-9.

Porter, C.D., Parkar, M.H., Verhoeven, A.J., Levinsky, R.J., Collins, M.K., Kinnon, C. (1994) p22-phox-deficient chronic granulomatous disease: reconstitution by retrovirus-mediated expression and identification of a biosynthetic intermediate of gp91-phox. *Blood* **84**, 2767-75.

Q

Quinn, M.T., Mullen, M.L., Jesaitis, A.J. (1992) Human neutrophil cytochrome b contains multiple hemes. Evidence for heme associated with both subunits. *J Biol Chem* **267**, 7303-9.

Quinn, M.T., Mullen, M.L., Jesaitis, A.J., Linner, J.G. (1992) Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559. *Blood* **79**, 1563-73.

Quinn, M.T., Evans, T., Loetterle, L.R., Jesaitis, A.J., Bokoch, G.M. (1993) Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *J Biol Chem* **268**, 20983-7.

R

Raad, H., Paclet, M.H., Boussetta, T., Krowiarski, Y., Morel, F., Quinn, M.T., Gougerot-Pocidallo, M.A., Dang, P.M., El-Benna, J. (2009) Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *Faseb J* **23**, 1011-22.

Rada, B.K., Geiszt, M., Kaldi, K., Timar, C., Ligeti, E. (2004) Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. *Blood* **104**, 2947-53.

Rada, B., Hably, C., Meczner, A., Timar, C., Lakatos, G., Enyedi, P., Ligeti, E. (2008) Role of Nox2 in elimination of microorganisms. *Semin Immunopathol* **30**, 237-53.

Rane, M.J., Carrithers, S.L., Arthur, J.M., Klein, J.B., McLeish, K.R. (1997) Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways: role in activation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *J Immunol* **159**, 5070-8.

Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J., Segal, A.W. (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* **416**, 291-7.

Reeves, E.P., Nagl, M., Godovac-Zimmermann, J., Segal, A.W. (2003) Reassessment of the microbicidal activity of reactive oxygen species and hypochlorous acid with reference to the phagocytic vacuole of the neutrophil granulocyte. *J Med Microbiol* **52**, 643-51.

Regier, D.S., Waite, K.A., Wallin, R., McPhail, L.C. (1999) A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22(phox), an NADPH oxidase component. *J Biol Chem* **274**, 36601-8.

Regier, D.S., Greene, D.G., Sergeant, S., Jesaitis, A.J., McPhail, L.C. (2000) Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation. *J Biol Chem* **275**, 28406-12.

Romani, L., Fallarino, F., De Luca, A., Montagnoli, C., D'Angelo, C., Zelante, T., Vacca, C., Bistoni, F., Fioretti, M.C., Grohmann U., Segal, B.H., Puccetti, P. (2008) Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *Nature* **451**, 211-5.

Roesler, J., Curnutte, J.T., Rae, J., Barrett, D., Patino, P., Chanock, S.J., Goerlack, A. (2000) Recombination events between the p47-phox gene and its highly homologous pseudogenes are the main cause of autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Blood* **95**, 2150-6.

Roos, D., Winterbourn, C.C. (2002) Immunology. Lethal weapons. *Science* **296**, 669-71.

Rosenzweig, S.D. (2008) Inflammatory manifestations in chronic granulomatous disease (CGD). *J Clin Immunol* **28 Suppl 1**, S67-72.

Rossi, F., Zatti, M. (1964) Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* **20**, 21-3.

Rotrosen, D., Leto, T.L. (1990) Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events. *J Biol Chem* **265**, 19910-5.

Rotrosen, D., Yeung, C.L., Leto, T.L., Malech, H.L., Kwong, C.H. (1992) Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* **256**, 1459-62.

Royer-Pokora, B., Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Goff, S.C., Newburger, P.E., Baehner, R.L., Cole, F.S., Curnutte, J.T., Orkin, S.H. (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* **322**, 32-8.

S

Sarfstein, R., Gorzalczany, Y., Mizrahi, A., Berdichevsky, Y., Molshanski-Mor, S., Weinbaum, C., Hirshberg, M., Dagher, M.C., Pick, E. (2004) Dual role of Rac in the assembly of NADPH oxidase, tethering to the membrane and activation of p67phox: a study based on mutagenesis of p67phox-Rac1 chimeras. *J Biol Chem* **279**, 16007-16.

Sasaki, M., Takagi, M., Okamura, Y. (2006) A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel. *Science* **312**, 589-92.

Sathyamoorthy, M., de Mendez, I., Adams, A.G., Leto, T.L. (1997) p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem* **272**, 9141-6.

Sbarra, A.J., Karnovsky, M.L. (1959) The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* **234**, 1355-62.

Schapiro, B.L., Newburger, P.E., Klempner, M.S., Dinauer, M.C. (1991) Chronic granulomatous disease presenting in a 69-year-old man. *N Engl J Med* **325**, 1786-90.

Schappi, M.G., Jaquet, V., Belli, D.C., Krause, K.H. (2008) Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. *Semin Immunopathol* **30**, 255-71.

Segal, A.W., Jones, O.T. (1978) Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* **276**, 515-7.

Segal, A.W., West, I., Wientjes, F., Nugent, J.H., Chavan, A.J., Haley, B., Garcia, R.C., Rosen, H., Scrace, G. (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)**, 781-8.

Segal, A.W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* **23**, 197-223.

Selvaraj, R.J., Sbarra, A.J. (1966) Relationship of glycolytic and oxidative metabolism to particle entry and destruction in phagocytosing cells. *Nature* **211**, 1272-6.

Sergeant, S., McPhail, L.C. (1997) Opsonized zymosan stimulates the redistribution of protein kinase C isoforms in human neutrophils. *J Immunol* **159**, 2877-85.

Serrander, L., Cartier, L., Bedard, K., Banfi, B., Lardy, B., Plastre, O., Sienkiewicz, A., Forro, L., Schlegel, W., Krause, K.H. (2007) NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J* **406**, 105-14.

Sheppard, F.R., Kelher, M.R., Moore, E.E., McLaughlin, N.J., Banerjee, A., Silliman, C.C. (2005) Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* **78**, 1025-42.

Shiose, A., Sumimoto, H. (2000) Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* **275**, 13793-801.

Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., Sumimoto, H. (2001) A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem* **276**,

1417-23.

Shmelzer, Z., Haddad, N., Admon, E., Pessach, I., Leto, T.L., Eitan-Hazan, Z., Hershinkel, M., Levy, R. (2003) Unique targeting of cytosolic phospholipase A2 to plasma membranes mediated by the NADPH oxidase in phagocytes. *J Cell Biol* **162**, 683-92.

Shmelzer, Z., Karter, M., Eisenstein, M., Leto, T.L., Hadad, N., Ben-Menahem, D., Gitler, D., Banani, S., Wolach, B., Rotem, M., Levy, R. (2008) Cytosolic phospholipase A2 α is targeted to P47phox-PX domain of the assembled NADPH oxidase via a novel binding site in its C2 domain. *J Biol Chem*.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.

Smith, J.A., Weidemann, M.J. (1993) Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods* **162**, 261-8.

Someya, A., Nunoi, H., Hasebe, T., Nagaoka, I. (1999) Phosphorylation of p40-phox during activation of neutrophil NADPH oxidase. *J Leukoc Biol* **66**, 851-7.

Spitaler, M., Cantrell, D.A. (2004) Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol* **5**, 785-90.

Stasia, M.J., Lardy, B., Maturana, A., Rousseau, P., Martel, C., Bordigoni, P., Demaurex, N., Morel, F. (2002) 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**, 316-30.

Stasia, M.J., Brion, J.P., Boutonnat, J., Morel, F. (2003) 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**, 1593-604.

Stasia, M.J., Bordigoni, P., Floret, D., Brion, J.P., Bost-Bru, C., Michel, G., Gatel, P., Durant-Vital, D., Voelckel, M.A., Li, X.J., Guillot, M., Maquet, E., Martel, C., Morel, F. (2005) Characterization of six novel mutations in the CYBB gene leading to different sub-types of X-linked chronic granulomatous disease. *Hum Genet* **116**, 72-82.

Stasia, M.J., Cathebras, P., Lutz, M.F., Durieu, I. (2008) [Chronic-granulomatous disease.]. *Rev Med Interne*.

Stasia, M.J., Li, X.J. (2008) Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin Immunopathol* **30**, 209-35.

Staudinger, B.J., Oberdoerster, M.A., Lewis, P.J., Rosen, H. (2002) mRNA expression profiles for Escherichia coli ingested by normal and phagocyte oxidase-deficient human neutrophils. *J Clin Invest* **110**, 1151-63.

Steinckwich, N., Frippiat, J.P., Stasia, M.J., Erard, M., Boxio, R., Tankosic, C., Doignon, I., Nusse, O. (2007) Potent inhibition of store-operated Ca²⁺ influx and superoxide production in HL60 cells and polymorphonuclear neutrophils by the pyrazole derivative BTP2. *J Leukoc Biol* **81**, 1054-64.

Stendahl, O., Krause, K.H., Krischer, J., Jerstrom, P., Theler, J.M., Clark, R.A., Carpentier, J.L., Lew, D.P. (1994) Redistribution of intracellular Ca²⁺ stores during phagocytosis in human neutrophils. *Science* **265**, 1439-41.

Suh, Y.A., Arnold, R.S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A.B., Griendling, K.K., Lambeth, J.D. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**, 79-82

Suh, C.I., Stull, N.D., Li, X.J., Tian, W., Price, M.O., Grinstein, S., Yaffe, M.B., Atkinson, S., Dinauer, M.C. (2006) The phosphoinositide-binding protein p40phox activates the NADPH oxidase during Fc γ RIIA receptor-induced phagocytosis. *J Exp Med* **203**, 1915-25.

Suire, S., Condliffe, A.M., Ferguson, G.J., Ellson, C.D., Guillou, H., Davidson, K., Welch, H., Coadwell, J., Turner, M., Chilvers, E.R., Hawkins, P.T., Stephens, L. (2006) Gbetagammagmas and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in

neutrophils. *Nat Cell Biol* **8**, 1303-9.

Sumimoto, H., Sakamoto, N., Nozaki, M., Sakaki, Y., Takeshige, K., Minakami, S. (1992) Cytochrome b558, a component of the phagocyte NADPH oxidase, is a flavoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 1368-75.

Sumimoto, H., Kage, Y., Nunoi, H., Sasaki, H., Nose, T., Fukumaki, Y., Ohno, M., Minakami, S., Takeshige, K. (1994) Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5345-9.

Sumimoto, H. (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *Febs J* **275**, 3249-77.

Susztak, K., Mocsai, A., Ligeti, E., Kapus, A. (1997) Electrogenic H⁺ pathway contributes to stimulus-induced changes of internal pH and membrane potential in intact neutrophils: role of cytoplasmic phospholipase A2. *Biochem J* **325** (Pt 2), 501-10.

Suzuki, T., Hazeki, O., Hazeki, K., Ui, M., Katada, T. (1996) Involvement of the beta gamma subunits of inhibitory GTP-binding protein in chemoattractant receptor-mediated potentiation of cyclic AMP formation in guinea pig neutrophils. *Biochim Biophys Acta* **1313**, 72-8.

Syrbu, S.I., Waterman, W.H., Molski, T.F., Nagarkatti, D., Hajjar, J.J., Sha'afi, R.I. (1999) Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in human neutrophils. *J Immunol* **162**, 2334-40.

T

Takenawa, T., Ishitoya, J., Homma, Y., Kato, M., Nagai, Y. (1985) Role of enhanced inositol phospholipid metabolism in neutrophil activation. *Biochem Pharmacol* **34**, 1931-5.

Takeya, R., Ueno, N., Kami, K., Taura, M., Kohjima, M., Izaki, T., Nunoi, H., Sumimoto, H. (2003) Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* **278**, 25234-46.

Tamura, M., Ogata, K., Takeshita, M. (1993) Phosphatidic acid-induced superoxide generation in electropermeabilized human neutrophils. *Arch Biochem Biophys* **305**, 477-82.

Tamura, M., Shiozaki, I., Ono, S., Miyano, K., Kunihiro, S., Sasaki, T. (2007) p40phox as an alternative organizer to p47phox in Nox2 activation: a new mechanism involving an interaction with p22phox. *FEBS Lett* **581**, 4533-8.

Tauber, A.I., Brettler, D.B., Kennington, E.A., Blumberg, P.M. (1982) Relation of human neutrophil phorbol ester receptor occupancy and NADPH-oxidase activity. *Blood* **60**, 333-9.

Taylor, W.R., Jones, D.T., Segal, A.W. (1993) A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain. *Protein Sci* **2**, 1675-85.

Taylor, R.M., Burritt, J.B., Baniulis, D., Foubert, T.R., Lord, C.I., Dinauer, M.C., Parkos, C.A., Jesaitis, A.J. (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**, 7349-57.

Thastrup, O., Dawson, A.P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Bjerrum, P.J., Christensen, S.B., Hanley, M.R. (1989) Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* **27**, 17-23.

Thastrup, O., Dawson, A.P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Bjerrum, P.J., Christensen, S.B., Hanley, M.R. (1994) Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. 1989. *Agents Actions* **43**, 187-93.

Tian, W., Li, X.J., Stull, N.D., Ming, W., Suh, C.I., Bissonnette, S.A., Yaffe, M.B., Grinstein, S., Atkinson, S.J., Dinauer, M.C. (2008) Fc{gamma}R-stimulated activation of the NADPH oxidase:

Phosphoinositide binding protein p40phox regulates NADPH oxidase activity after enzyme assembly on the phagosome. *Blood* **112**, 3867-77.

Tkalcevic, J., Novelli, M., Phylactides, M., Iredale, J.P., Segal, A.W., Roes, J. (2000) Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* **12**, 201-10.

Toporik, A., Gorzalczany, Y., Hirshberg, M., Pick, E., Lotan, O. (1998) Mutational analysis of novel effector domains in Rac1 involved in the activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced) oxidase. *Biochemistry* **37**, 7147-56.

Touyz, R.M., Chen, X., Tabet, F., Yao, G., He, G., Quinn, M.T., Pagano, P.J., Schiffrin, E.L. (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**, 1205-13.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.

Tsunawaki, S., Mizunari, H., Nagata, M., Tatsuzawa, O., Kuratsuji, T. (1994) A novel cytosolic component, p40phox, of respiratory burst oxidase associates with p67phox and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67phox. *Biochem Biophys Res Commun* **199**, 1378-87.

Tucker, K.A., Lilly, M.B., Heck, L., Jr., Rado, T.A. (1987) Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood* **70**, 372-8.

U

Ueyama, T., Tatsuno, T., Kawasaki, T., Tsujibe, S., Shirai, Y., Sumimoto, H., Leto, T.L., Saito, N. (2007) A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox. *Mol Biol Cell* **18**, 441-54.

Underhill, D.M., Ozinsky, A. (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* **20**, 825-52.

V

van Bruggen, R., Anthony, E., Fernandez-Borja, M., Roos, D. (2004) Continuous translocation of Rac2 and the NADPH oxidase component p67(phox) during phagocytosis. *J Biol Chem* **279**, 9097-102.

van Buul, J.D., Fernandez-Borja, M., Anthony, E.C., Hordijk, P.L. (2005) Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* **7**, 308-17.

van den Berg, J.M, van Koppen, E., Ahlin, A., Belohradsky, B.H., Bernatowska, E., Corbeel, L., Español, T., Fischer, A., Kurenko-Deptuch, M., Mouy, R., Petropoulou, T., Roesler, J., Seger, R., Stasia, M.J., Valerius, N.H., Weening, R.S., Wolach, B., Roos, D., Kuijpers, T.W. (2009) Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS ONE* **4** (4), e5234.

Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., Waterfield, M.D. (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* **70**, 535-602.

Vergnaud, S., Pacllet, M.H., El Benna, J., Pocardalo, M.A., Morel, F. (2000) Complementation of NADPH oxidase in p67-phox-deficient CGD patients p67-phox/p40-phox interaction. *Eur J Biochem* **267**, 1059-67.

Verhoeven, A.J., Bolscher, B.G., Meerhof, L.J., van Zwieten, R., Keijzer, J., Weening, R.S., Roos, D. (1989) Characterization of two monoclonal antibodies against cytochrome b558 of human neutrophils.

Blood **73**, 1686-94.

Volpp, B.D., Nauseef, W.M., Clark, R.A. (1988) Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* **242**, 1295-7.

W

Wallach, T.M., Segal, A.W. (1996) Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b558 of the NADPH oxidase of phagocytes. *Biochem J* **320** (Pt 1), 33-8.

Wallach, T.M., Segal, A.W. (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), 583-5.

Weiss, J., Kao, L., Victor, M., Elsbach, P. (1985) Oxygen-independent intracellular and oxygen-dependent extracellular killing of Escherichia coli S15 by human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* **76**, 206-12.

Welch, H.C., Coadwell, W.J., Stephens, L.R., Hawkins, P.T. (2003) Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett* **546**, 93-7.

Welch, H.C., Condliffe, A.M., Milne, L.J., Ferguson, G.J., Hill, K., Webb, L.M., Okkenhaug, K., Coadwell, W.J., Andrews, S.R., Thelen, M., Jones, G.E., Hawkins, P.T., Stephens, L.R. (2005) P-Rex1 regulates neutrophil function. *Curr Biol* **15**, 1867-73.

Wientjes, F.B., Hsuan, J.J., Totty, N.F., Segal, A.W. (1993) p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* **296** (Pt 3), 557-61.

Williams, D.A., Tao, W., Yang, F., Kim, C., Gu, Y., Mansfield, P., Levine, J.E., Petryniak, B., Derrow, C.W., Harris, C., Jia, B., Zheng, Y., Ambruso, D.R., Lowe, J.B., Atkinson, S.J., Dinauer, M.C., Boxer, L. (2000) Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood* **96**, 1646-54.

Winkelstein, J.A., Marino, M.C., Johnston, R.B., Jr., Boyle, J., Curnutte, J., Gallin, J.I., Malech, H.L., Holland, S.M., Ochs, H., Quie, P., Buckley, R.H., Foster, C.B., Chanock, S.J., Dickler, H. (2000) Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* **79**, 155-69.

Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* **80**, 617-53.

Worku, M., Paape, M.J., Di Carlo, A., Kehrl, M.E., Jr., Marquardt, W.W. (1995) Complement component C3b and immunoglobulin Fc receptors on neutrophils from calves with leukocyte adhesion deficiency. *Am J Vet Res* **56**, 435-9.

Wright, S.D., Meyer, B.C. (1986) Phorbol esters cause sequential activation and deactivation of complement receptors on polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* **136**, 1759-64.

Y

Yagawa, K., Kaku, M., Ichinose, Y., Aida, Y., Tomoda, A. (1985) Fc receptor-mediated desensitization of superoxide (O₂⁻) generation response of guinea-pig macrophages and polymorphonuclear leukocytes. *Immunology* **55**, 629-38.

Yamaguchi, M., Saeki, S., Yamane, H., Okamura, N., Ishibashi, S. (1995) Hyperphosphorylated p47-phox lost the ability to activate NADPH oxidase in guinea pig neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **216**, 203-8.

Yamamori, T., Inanami, O., Sumimoto, H., Akasaki, T., Nagahata, H., Kuwabara, M. (2002)

Relationship between p38 mitogen-activated protein kinase and small GTPase Rac for the activation of NADPH oxidase in bovine neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 1571-8.

Yamamori, T., Inanami, O., Nagahata, H., Kuwabara, M. (2004) Phosphoinositide 3-kinase regulates the phosphorylation of NADPH oxidase component p47(phox) by controlling cPKC/PKCdelta but not Akt. *Biochem Biophys Res Commun* **316**, 720-30.

Yamauchi, A., Yu, L., Potgens, A.J., Kuribayashi, F., Nunoi, H., Kanegasaki, S., Roos, D., Malech, H.L., Dinauer, M.C., Nakamura, M. (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**, 249-57.

Yoshida, L.S., Saruta, F., Yoshikawa, K., Tatsuzawa, O., Tsunawaki, S. (1998) Mutation at histidine 338 of gp91(phox) depletes FAD and affects expression of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase. *J Biol Chem* **273**, 27879-86.

Yu, L., Zhen, L., Dinauer, M.C. (1997) Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits. *J Biol Chem* **272**, 27288-94.

Yu, L., Cross, A.R., Zhen, L., Dinauer, M.C. (1999) Functional analysis of NADPH oxidase in granulocytic cells expressing a delta488-497 gp91(phox) deletion mutant. *Blood* **94**, 2497-504.

Yuzawa, S., Ogura, K., Horiuchi, M., Suzuki, N.N., Fujioka, Y., Kataoka, M., Sumimoto, H., Inagaki, F. (2004) Solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox in an autoinhibited form. *J Biol Chem* **279**, 29752-60.

Z

Zhan, S., Vazquez, N., Zhan, S., Wientjes, F.B., Budarf, M.L., Schrock, E., Ried, T., Green, E.D., Chanock, S.J. (1996) Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *Blood* **88**, 2714-21.

Zhen, L., King, A.A., Xiao, Y., Chanock, S.J., Orkin, S.H., Dinauer, M.C. (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**, 9832-6.

Zhen, L., Yu, L., Dinauer, M.C. (1998) Probing the role of the carboxyl terminus of the gp91phox subunit of neutrophil flavocytochrome b558 using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **273**, 6575-81.

Zhou, M.J., Brown, E.J. (1994) CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol* **125**, 1407-16.

Publications et Communications

Publication :

- **Carrichon, L.**, Defendi, F., Picciocchi, A., Debeurme, F., Jesaitis, A.J., Dagher, M.C., Stasia, M.J. (2009) Molecular basis of superoxide overproduction by the D-loop_{Nox4}-Nox2 cytochrome *b*₅₅₈ in phagocytes – Consequences for microorganism killing. (En soumission)

Communications et affiches :

- Li XJ., Carrichon L., Morel F., et Stasia MJ. La granulomatose septique chronique de type X⁺ et X⁻, modèle d'étude du dysfonctionnement du complexe NADPH oxydase des phagocytes. Avril 2006, Journée de la Recherche médicale, Grenoble – France
- Carrichon L., Defendi F., Beaumel S., Stasia M.J. Fonctionnement du complexe enzymatique NADPH oxydase des cellules phagocytaires : rôle de la boucle D de la sous-unité Nox2. Avril 2007, Journée de la Recherche médicale, Grenoble – France
- Carrichon L., Defendi F., Beaumel S., Stasia M.J. Study of molecular mechanisms of the superoxide anions over-production by the D-loopNox4-Nox2 mutant PLB-985 cells. Mai 2007, Club Oxydase 2007, Grenoble – France (exposé oral)
- Carrichon L., Picciocchi A., Debeurme F. et Stasia M.J. Study of molecular mechanisms of the superoxide anions over-production by the D-loopNox4-Nox2 mutant PLB-985 cells. 42nd European Society of Clinical investigation-ESCI, 26-29 Mars 2008, Genève – Suisse (exposé oral)
- Debeurme F., Picciocchi A., Carrichon L., Beaumel S., Defendi F., Dagher M.C., Stasia M.J. «La granulomatose septique chronique X⁺ - Fabuleux modèle d'étude du complexe NADPH oxydase » Avril 2009, Journée de la Recherche médicale, Grenoble – France
- Debeurme F., Picciocchi A., Grunwald D., Carrichon L., Beaumel S., Defendi F., Stasia M.J. «La granulomatose septique chronique X⁺ - Fabuleux modèle d'étude du complexe NADPH oxydase » Mai 2009, Club Oxydase 2009, Paris – France

La NADPH-oxydase phagocytaire, responsable de la production d'anions superoxydes microbicides, résulte de l'assemblage des protéines cytosoliques avec le cytochrome *b*₅₅₈ membranaire redox formé de Nox2 et p22*phox*. Nous avons mis en évidence précédemment que le remplacement de la boucle D de Nox2 par celle de Nox4 (mutant **D-loop_{Nox4}-Nox2**) était à l'origine d'une « super-activité » oxydase. Le présent travail a consisté à élucider les mécanismes moléculaires à l'origine de la super-activité oxydase de ce mutant. Le mutant présente une activité oxydase *ex vivo* 2 à 8 fois supérieure à celle de cellules PLB-985 WT-Nox2, en réponse aux stimuli solubles et particuliers. Cette suractivité est plus importante en réponse à l'ionomycine et au facteur chimiotactique fMLF, dont les voies d'activation impliquent une augmentation du taux de Ca²⁺_i. Cette suractivité a également été mise en évidence dans un système simplifié *in vitro* contenant uniquement les protéines purifiées du complexe oxydase et activé par l'acide phosphatidique. L'activité oxydase du mutant *ex vivo* présente une sensibilité accrue à un influx de calcium. Le cytochrome *b*₅₅₈ muté est moins sensible aux événements de phosphorylation dépendant d'ERK1/2 durant l'activation par le fMLF. Ainsi, la suractivité du mutant D-loopNox4-Nox2 pourrait provenir d'une modification de la conformation de Nox2 mutée, favorisant l'état activé du complexe oxydase. De plus, la super-activité du mutant améliore son pouvoir bactéricide vis-à-vis de la souche atténuée *P. aeruginosa* PAO1. Enfin, nous avons pu mettre en évidence l'existence de deux phases distinctes et interdépendantes dans le processus de bactéricidie de ce microorganisme.

The phagocytic NADPH oxidase, responsible for superoxide anions production, becomes activated after assembly of cytosolic proteins with cytochrome *b*₅₅₈, the transmembrane redox core of the enzyme composed of Nox2 and p22*phox*. We have previously observed that replacement of the D-loop of Nox2 with D-loop of Nox4 (mutant **D-loop_{Nox4}-Nox2**) induced a NADPH oxidase super-activity. The present work was to elucidate molecular mechanisms responsible for the overproduction of superoxide anions by the D-loopNox4-Nox2 mutant. The super-mutant exhibits an *ex vivo* oxidase activity which is 2 to 8 times higher than that of the WT-Nox2 PLB-985 cells, after stimulation by soluble and particulate agonists. The highest NADPH oxidase activity is obtained after ionomycin and fMLF chemotactic peptide activation, including signalling pathways with an increase of Ca²⁺_i. This overproduction is also observed *in vitro* in a cell free system using only purified proteins of the oxidase complex, and activated by phosphatidic acid. *Ex vivo* oxidase activity of the mutant demonstrated an enhanced sensitivity to calcium influx. The mutated cytochrome *b*₅₅₈ is less dependent on phosphorylation events ERK1/2-dependent occurring during activation with fMLF. Then, the super-oxidase activity of the D-loopNox4-Nox2 mutant could come from a conformational change of Nox2 improving the NADPH oxidase activated state. Moreover, superoxide anions overproduction by the mutant improves its killing activity against attenuated strain of *P. aeruginosa* PAO1. At last, we have found that the bactericidal process of this microorganism by phagocytes consists in two distinct and interdependent phases.

Mots-clés : NADPH oxydase ; CGD ; Nox2 (gp91*phox*) ; cellules PLB-985 X-CGD transgéniques ; cytochrome *b*₅₅₈ ; microbicidie