



HAL
open science

Analyse du rôle de la NADPH oxydase et du stress oxydant dans les cellules dendritiques

Manuel Rangel

► **To cite this version:**

Manuel Rangel. Analyse du rôle de la NADPH oxydase et du stress oxydant dans les cellules dendritiques. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENV003 . tel-00767151

HAL Id: tel-00767151

<https://theses.hal.science/tel-00767151>

Submitted on 19 Dec 2012

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« **Manuel Rodrigo/ RANGEL** »

Thèse dirigée par « **Christian/VILLIERS** »

préparée au sein du **Laboratoire d'Immunologie Analytique des Pathologies Chroniques, INSERM-U823** Institut Albert Bonniot dans l'**École Doctorale Chimie Sciences du Vivante**

Analyse du rôle de la NADPH Oxydase et du stress oxydant dans les cellules dendritiques

Thèse soutenue publiquement le « **3 Février 2012** », devant le jury composé de :

Dr., Bertrand, TOUSSAINT

Président

Dr., My-Chan, DANG

Rapporteur

Dr., Karl-Heinz, KRAUSE

Rapporteur

Dr., Laure, PERRIN-COCON

Membre

Dr., Christian, VILLIERS

Membre

Dr., Patrice, MARCHE

Membre



*A mes parents, Carmen et Manuel.
A Laurine, Irène, Alvaro y Victor.*

*Je leur dédie cette thèse, qu'elle soit le symbole de ma reconnaissance et
de toute mon affection.*

Sommaire

1	INTRODUCTION	6
1.1	INTRODUCTION GENERALE	6
1.2	LES CELLULES DENDRITIQUES.....	7
1.2.1	<i>Modèles de CD humaines et murines.....</i>	<i>8</i>
1.2.2	<i>Classification et origine des CD.....</i>	<i>9</i>
1.2.3	<i>Fonction des cellules dendritiques.....</i>	<i>11</i>
1.3	LES PROTEINES NOX.....	23
1.3.1	<i>Structure et interactions des protéines NOX avec leurs sous-unités.....</i>	<i>23</i>
1.3.2	<i>Activation, localisation et fonction des NOX.....</i>	<i>31</i>
1.4	STRESS OXYDANT DANS LES CELLULES DENDRITIQUES.....	35
2	OBJECTIF DU TRAVAIL	38
3	RESULTATS.....	40
3.1	PRODUCTION DES FRO PAR LES CELLULES DENDRITIQUES.....	40
3.1.1	<i>Mesure de H₂O₂ et activation de la NADPH Oxydase dans les cellules dendritiques.....</i>	<i>40</i>
3.1.2	<i>Effet synergique des activateurs de NOX dans les CD.....</i>	<i>44</i>
3.1.3	<i>Effet des inhibiteurs dans la production du H₂O₂ par les CD.....</i>	<i>45</i>
3.1.4	<i>Mesure de la production de O₂ par les CD.....</i>	<i>46</i>
3.2	NANOPARTICULES ET STRESS OXYDANT DANS LES CD.....	47
3.2.1	<i>Effet des NP P601 sur la production de H₂O₂ dans les CD.....</i>	<i>49</i>
3.2.2	<i>Effet des NP d'or et Gadolinium sur la production de H₂O₂ par les CD.....</i>	<i>49</i>
3.2.3	<i>Masquage de la luminescence et fluorescence par les NP phagocytées par les CD.....</i>	<i>50</i>
3.3	MATURATION DES CD, EFFETS PHENOTYPIQUES.....	54
3.3.1	<i>Analyse par cytométrie en flux de la maturation des CD.....</i>	<i>54</i>
3.3.2	<i>Analyse par cytométrie en flux de la production des FRO par les CD.....</i>	<i>55</i>
3.3.3	<i>Effets des NP sur les CD, étude par cytométrie en flux.....</i>	<i>56</i>
3.4	ANALYSE DES PROTEINES DU SYSTEME OXYDASE DANS LES CD	62
3.4.1	<i>Etude de l'expression de protéines impliquées dans les systèmes oxydase dans les CD.....</i>	<i>62</i>
3.4.2	<i>Expression simultanée de NOX1 et NOX2 dans les CD.....</i>	<i>65</i>
3.4.3	<i>Expression de SOD3 dans les CD.....</i>	<i>93</i>
4	DISCUSSION	102
4.1	CELLULES DENDRITIQUES ET FRO	102
4.1.1	<i>Généralités</i>	<i>102</i>
4.1.2	<i>Production, activateurs et Inhibiteurs.....</i>	<i>102</i>
4.2	ENZYMES ET FRO DANS LES CD	108
4.2.1	<i>NADPH Oxydases.....</i>	<i>108</i>
4.2.2	<i>Superoxyde Dismutases.....</i>	<i>110</i>
4.3	NANOPARTICULES ET FRO	115
5	CONCLUSION GENERALE.....	116
6	PERSPECTIVES	117
7	DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	118
8	ANNEXES	137

Sommaire de Figures

DIFFERENCE MORPHOLOGIQUE DES CELLULES DENDRITIQUES IMMATURES ET MATURES	8
CLASSIFICATION DES CD SELON HEATH ET CARBONE (HEATH & CARBONE, 2009).....	12
CLASSIFICATION DES CD HUMAINES SELON SA LOCALISATION.	12
FONCTION CONSENSUS DES CD	13
TYPES D'ENDOCYTOSE PRESENTES DANS LA CELLULE DENDRITIQUE	18
LOCALISATION DES PHOSPHATIDYLINOSITOIDES PARMIS LES EVENEMENTS D'ENDOCYTOSE D'APRES (LE ROY & WRANA, 2005)	18
RESUME DES TYPES DE PRESENTATION D'ANTIGENE CONNUS. D'APRES (HUBBELL, THOMAS, & SWARTZ, 2009)	21
VISION GENERALE DE LA DISPOSITION STRUCTURALE DES NOX1 ET NOX2.....	24
STRUCTURE 3D PARTIELLE DE NOX2 PROPOSEE PAR HONBU K, NODA N. N., SUMIMOTO H., INAGAKI F.....	25
STRUCTURES HYPOTHETIQUES DES DIFFERENTS NOX (1, 3, 4 ET 5)	26
STRUCTURE 3D DE DES DOMAINES D'HOMOLOGIE SRC DE P47PHOX COMPLEXE AVEC UN PEPTIDE RICHE EN PROLINE DERIVE DE P22PHOX.	28
REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES INTERACTIONS ENTRE LES SOUS-UNITES NOX: P22, P47, P67 ET P40	29
REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES INTERACTIONS ENTRE LES SOUS-UNITES NOXO1 ET NOXA1	30
STRUCTURE DES PROTEINES DUOX.....	31
ACTIVATION DE NOX2 ET SES INTERACTIONS.....	32
PRODUCTION DU H ₂ O ₂ PAR LES CD SELON LEUR JOUR DE CULTURE.....	40
CHIMOLUMINESCENCE DE PRODUCTION DE H ₂ O ₂ AVEC PMA ET LPS.....	41
CINETIQUE DE PRODUCTION DE H ₂ O ₂ EN PRESENCE DE PMA ET ZYM (MESURE PAR CHIMOLUMINESCENCE)	41
CHIMOLUMINESCENCE DE PRODUCTION DE H ₂ O ₂ AVEC W6	43
CHIMOLUMINESCENCE DE PRODUCTION DE H ₂ O ₂ AVEC PAF.....	43
EFFET SYNERGIQUE DU LPS ET DES ACTIVATEURS NOX	44
EFFET DES INHIBITEURS DANS LA PRODUCTION DE H ₂ O ₂ PAR LES CD	45
H ₂ O ₂ (CHIMOLUMINESCENCE) ET O ₂ ⁻ (NBT) ANALYSE DE LA PRODUCTION PAR LES CD	46
DIFFERENCES DE PRODUCTION DES FRO DANS LES CD IMMATURES ET LPS-ACTIVEES/MATURES A) MESURE DE H ₂ O ₂ PAR CHEMILUMINESCENCE, B) MESURE DE O ₂ ⁻ PAR NBT	47
REPRESENTATION DE LA QUANTITE TOTALE DE H ₂ O ₂ PRODUITE PAR LES CD INCUBEES TEL QUE MESURE PAR CHIMOLUMINESCENCE AVEC DES NANOPARTICULES P601.....	48
QUANTITE TOTALE DE H ₂ O ₂ PRODUITE PAR LES CD INCUBEES AVEC DES NANOPARTICULES ISSUES DES DIFFERENTS MATERIAUX.....	49
H ₂ O ₂ TOTAL PRODUIT PAR LES CD INCUBEES AVEC DIFFERENTES CONCENTRATIONS DES NANOPARTICULES D'OR	51
FLUORESCENCE PAR AMPLEX RED, ANALYSE DE LA PRODUCTION DU H ₂ O ₂ EXTRACELLULAIRE PAR LES CD ...	52
PRODUCTION DE H ₂ O ₂ PAR FLUORESCENCE D'AMPLEX RED DANS LES CD INCUBEES AVEC DES NP DE GADOLINIUM ET P601	53
ANALYSE PAR CYTOMETRIE DE FLUX DES CD	54
HISTOGRAMMES DE LA FLUORESCENCE DES CD MATURES ET IMMATURES	55

AUGMENTATION DE LA GRANULOSITE DES CD INCUBEES AVEC DES NP	57
MESURE DE LA MORTALITE CELLULAIRE DES DC INCUBEES AVEC DES NP	57
EFFET DES NP SUR L'ACTIVATION DES CD	58
ANALYSE DES DC ET NP PAR CYTOMETRIE EN FLUX	58
IMAGE DU GEL D'AGAROSE POUR LES AMPLICONS DES ARNM DES PROTEINES DU SYSTEME OXYDANTE.....	62
HISTOGRAMME DE TAUX D'EXPRESSION DES ARNM CODANT POUR DES PROTEINES DU SYSTEME OXYDASE ..	63
HISTOGRAMME DE TAUX D'EXPRESSION DES ARNM CODANT POUR DES PROTEINES DU SYSTEME OXYDASE, CELLULES NA ET LPS	64
MESURE PAR CHIMOLUMINESCENCE DU H ₂ O ₂ DE DIFFERENTES CELLULES IMPLIQUEES DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE.....	94
PRODUCTION DE O ₂ ⁻ PAR DES CELLULES DU SYSTEME IMMUNITAIRE.....	95
VISUALISATION DANS GEL D'AGAROSE DES AMPLICONS DU NOX1, NOX2 ET SOD3 DANS DES CELLULES PHAGOCYTAIRES.....	96
HISTOGRAMME DES QUANTITES RELATIVES D'ARNM DES CD ET PCD CODANT POUR DES PROTEINES DU SYSTEME OXYDANT	97
QPCR DE SOD3 AU COURS DE LA DIFFERENTIATION DES CD.....	98
WESTERN BLOT POUR SOD3 DANS LES CELLULES DENDRITIQUES	99
IMAGES CONFOCALES DES CD, IMMUNOMARQUAGE POUR SOD3	100
CHIMOLUMINESCENCE DES CD, INCUBATION AVEC L'INHIBITEUR DE SOD DETCA.....	100
MESURE DE PRODUCTION DES FRO PAR MICROSCOPIE CONFOCALE.....	101
CINETIQUE DE PRODUCTION DE O ₂ ⁻ PAR LES CD EN PRESENCE DE DETCA	102
EFFET DE L'AZIDE DANS LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE	108

Abréviations

ADN = Acide désoxyribonucléique

AR = Amplex Red

ARN = Acide ribonucléique

ATOX-1 = Protéine antioxydante-1

Au = Nanoparticules d'or

Azide = Azide de sodium

BSA = Bovine Sérum Albumine

CAT = Catalase

CD = Cellules Dendritiques

CD11c = Intégrine, Alpha x chaîne

CD86 = Molécule co-stimulatrice des lymphocytes-T

DETCA = Diethyldithiocarbamate de sodium

DPI = Diphenyleneiodonium

DUOX = Dual oxydase (1 et 2)

FPR = Formyl Peptide Receptor

FRN = Formes Réactives du Nitrogène

FRO = Formes réactives de l'oxygène

G3PDH = Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GPX = Glutathion peroxydase (1, 4(1) mitochondrial et 4(2) nucléaire)

GSH = Glutathion

H₂O₂ = Peroxyde d'hydrogène

HBD = Heparin binding domain

IAb = Molécules de classe II IAb

LPS = Lipopolysaccharide

MCB = Monochlorobimane

Mo-J774 = Lignée cellulaire du macrophage J774

NA = Non activées

NBT = Nitro Blue Tetrazolium

NOX = NADPH Oxydase (1 à 4)

NOXA1 = NOX1 activator

NOXO1 = NOX1 organizer

NP = Nanoparticules

O_2^- = Superoxyde

P601 = Nanoparticules de ferricobalte P601

PAF = Facteur Activateur des Plaquettes

PAFr = Recepteur du Facteur Activateur des Plaquettes

pCD = Cellule Dendritique plasmacytoïde

PMA = Phorbol 12-myristate 13-acetate

pMo = Macrophage péritonéal

RAC = Ras-related C3 botulinum toxin substrate (1 et 2)

SOD = Superoxyde dismutase (1,2 et 3)

TLR = Toll-like receptors

W6 = Peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met (WKYMVM)

WT = Wild type (souche sauvage)

ZYM = Zymosan

Introduction

1.1 Introduction Générale

La réponse immunitaire est un processus qui permet à l'organisme de traiter les différentes pathologies de type infectieux qui peuvent l'affecter, on peut alors parler d'auto-traitement. Ces mécanismes de défense peuvent être divisés en deux grandes entités appelées : réponse immunitaire innée et réponse immunitaire adaptative (Ruslan Medzhitov & Janeway, 1997). Ces deux systèmes de défense contre les infections présentent des différences essentielles dans leurs fonctions. La complexité des mécanismes de défense mis en jeu au travers de ces différents systèmes est renforcée par l'implication d'un grand nombre de cellules qui interviennent soit directement soit indirectement et avec des fonctions très variées comme le montre leur phénotype (Fearon & Locksley, 1996; Iwasaki & Medzhitov, 2010; Nagler-Anderson, 2001). L'une de ces cellules a une position prépondérante dans ces mécanismes participant aux réponses immunitaires, c'est la cellule dendritique (CD) qui a été décrite d'abord comme étant une cellule présentatrice de l'antigène (antigen presenting cell ou APC en anglais) grâce à sa capacité à reconnaître un antigène ou un pathogène, à le phagocyter et ensuite à associer des peptides dérivés de ce pathogène à des molécules de classe I et/ou de classe II. Ces complexes sont exposés à la surface cellulaire et présentés aux autres cellules du système immunitaire que sont les lymphocytes T naïfs (Banchereau & Steinman, 1998; Caetano Reis e Sousa, 2004). La capacité des CD comme la plupart des phagocytes (macrophages et neutrophiles) à phagocyter puis à protéolyser ces pathogènes a été étudiée par différents auteurs qui ont montré que les stress oxydatifs sont impliqués dans le contrôle des mécanismes de protéolyse au sein du phagosome (Dahlgren & Karlsson, 1999; Forman & Torres, 2002). Ce stress oxydatif est généralement causé par l'activité d'un complexe protéique appelé NADPH Oxydase. Ce dernier est capable de produire de fortes quantités de formes réactives de l'oxygène ou FRO. Dans les CD, ces complexes sont impliqués dans le contrôle du pH dans les phagosomes où l'antigène est protéolysé par les enzymes protéolytiques, les fragments protéiques sont alors associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ou de classe I pour être ensuite présentés à la surface cellulaire (Savina & Amigorena, 2007).

Dans ce chapitre nous allons détailler les différents types de cellules dendritiques retrouvées dans l'organisme avec les principales fonctions qui leurs sont associées, les phénomènes de stress oxydatif dont elles sont le siège et l'implication des NADPH oxydases dans ce stress avec les diverses protéines interagissant avec ces systèmes.

1.2 Les cellules dendritiques.

Au sein des cellules impliquées dans le système immunitaire, il existe des cellules spécialisées dans la présentation des antigènes appelées cellules dendritiques (CD), ces cellules ont été le sujet de nombreuses études, non seulement liées à la présentation des antigènes et donc à la réponse immunitaire adaptative, ces cellules interviennent également dans la réponse immunitaire innée. Un peu plus de 40 ans sont passés depuis la première description d'une cellule du type étoilée par Ralph Steinmann dans les années 70. Depuis, plusieurs types de CD ont été mises en évidence et leur description détaillée a fait l'objet de nombreux travaux par des laboratoires du monde entier. La synthèse de tous ces résultats permet de postuler que de nombreux tissus périphériques contiennent divers types de CD dont les fonctions peuvent paraître dans un premier temps similaires mais qui en réalité présentent des différences très subtiles qui font des CD « un système cellulaire complexe » (Gluckman, Canque, & Rosenzweig, 1998)

Il est assez difficile de décrire le fonctionnement des CD dans leur ensemble car la complexité des CD et le grand nombre de sous-types répartis dans les différents tissus fait que chaque modèle diffère de façon assez significatives des autres. En général, on peut considérer les CD comme étant des cellules présentatrices des antigènes dont la capacité d'interaction avec les autres cellules du système immunitaire (notamment les cellules T) est tout à fait particulière. Les CD ont la capacité de phagocyter des bactéries, des virus, ou des corps apoptotiques correspondant à des cellules entières ou fragmentées ; elles présentent une morphologie dendritique après maturation (Figure 1) et expriment à leur surface différentes molécules qui leurs confèrent de nombreuses possibilités : détection de ligands grâce à des molécules récepteurs ou interaction avec d'autres cellules via des molécules stimulatrices. De plus, les CD synthétisent et secrètent des cytokines pro-inflammatoires et immunostimulantes ainsi que des facteurs de chimiotactisme (Dichmann et al., 2000).

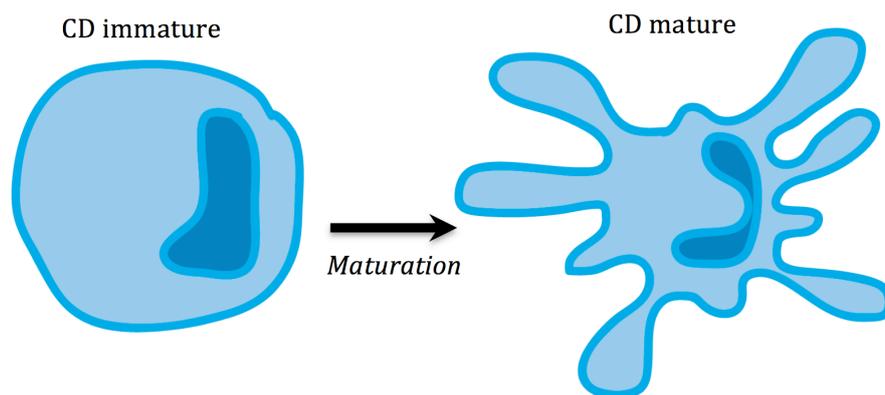


Figure 1 Différence morphologique des cellules dendritiques immatures et matures

1.2.1 Modèles de CD humaines et murines.

Les principaux modèles d'étude des CD proviennent principalement des deux mammifères que sont l'homme et la souris. Ces deux modèles cellulaires sont assez comparables, cependant il reste certaines différences qui, quoique assez subtiles, permettent d'expliquer les différences de résultats observés en fonction des origines et des espèces choisies comme modèle : La première différence importante réside dans les marqueurs membranaires caractéristiques des différents stades ou des différents types de CD qui ont été décrites. Dans le Tableau 1 sont réunis les quelques marqueurs membranaires décrits qui permettent d'identifier les CD. Il faut noter qu'aucun marqueur n'est vraiment spécifique d'un type donné de CD et que pour l'analyse des populations de CD, il est nécessaire d'utiliser une combinaison de plusieurs marqueurs qui permettent d'identifier avec certitude chacune des populations cellulaires (Banchereau et al., 2000) ; chez la souris le marqueur le plus utilisé est CD11c lequel sert à caractériser la population des CD.

Il est nécessaire de signaler le besoin qu'il y a à utiliser des modèles de CD génères *in vitro* : il est difficile d'obtenir des populations homogène en nombre suffisant *in vivo* chez l'homme ; en second, la variabilité des CD et de leurs phénotypes fait qu'il est très difficile d'obtenir des CD « propre », c'est à dire possédant un seul phénotype et ne présentant pas de grande variabilité fonctionnelle (Santegoets, van den Eertwegh, van de Loosdrecht, Scheper, & de Gruijl, 2008).

Tableau 1 Marqueurs de membrane des CD, d'après: (Banchereau et al., 2000)(Troxell et al., 2005)(Kronin, Wu, Gong, Nussenzweig, & Shortman, 2000)(H. J. Cho et al., 2007)

Type de CD	Marqueur Membranaire
<p>Cellules Dendritiques Murines</p>	<p>Beta-Glucan Récepteur, CCR7 (CD197), CD11b, CD11c, CD40, CD45R, CD86 (B7-2), CD205 (DEC205), CD206, MARCO, MHC Class II, TLR2, TLR4, 33D1, CD80 (B7-1), CD83, CD123 (IL-3Rα), CD207 (Langerin), CD209 (DC-SIGN), CD273 (B7-DC), CD283 (TLR3), CD289 (TLR9), CXCR4 (CD184), GITR Ligand, IL-23 p19, MHC Class I H-2Kb/SIINFEKL, PDCA-1, Siglec H.</p>
<p>Cellules Dendritiques Humaines</p>	<p>CD1a, CD1c, CD1d, CD83, CD184 (ED), CD184 (N-terminus), CD195, CD205, CD206, CD209, HLA-DR, TLR2, TLR4, CCR7 (CD197), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD123 (IL-3Rα), CD205 (DEC205), CD209 (DC-SIGN), CD273 (B7-DC), CD283 (TLR3), CD289 (TLR9), CXCR4 (CD184), GITR Ligand, IFN-α2, IL-12 p40, IL-23, ILT1 (CD85h), ILT2 (CD85j), ILT3 (CD85k), ILT4 (CD85d), ILT5 (CD85a), ILT7 (CD85g), TSLP Récepteur.</p>

1.2.2 Classification et origine des CD.

Pendant de nombreuses années, les CD ont été classées selon leur origine de différenciation (indépendamment de l'espèce d'origine), cette classification qui fut donc utilisée pendant de nombreuses années se référait aux CD d'origine lymphoïde pour toutes les cellules que dérivait et se trouvaient dans les tissus lymphoïdes et thymiques ; et les cellules d'origine myéloïde, pour les cellules observées en périphérie ou plus généralement hors du thymus et dont l'origine est la moelle osseuse avec des précurseurs myéloïdes (Ken Shortman & Liu, 2002; Li Wu & Dakic, 2004) . Dans le Tableau 2, nous avons récapitulé les différents sous-types de CD avec leur classification selon les organes où elles peuvent être retrouvées.

Tableau 2 Distribution dans différents organes de sous-populations des CD murines d'après (Ardavin, 2003)

CD sous-population	Thymus	Rate	Ganglion lymphatique	Plaques de Peyer	Peau	Foie
CD8- CD8	*	+	+	+	-	+
CD8+ CD8	+	+	+	+	-	+
CD8int CD8	-	-	+	-	-	-
Cellules de Langerhans	-	-	-	-	+	-
CDs Dermiques	-	-	-	-	+	-
Plasmacytoïde CD8	+	+	+	+	-	N.D.

**Des CD8⁻ ont été retrouvées dans le thymus, mais elles constituent une proportion faible dans les CD8 du thymus. + Présentes, - Absentes, CD8int CD8 cellules avec une expression intermédiaire du CD8, N.D. non déterminé.*

Même si ce modèle de classification des CD était assez confortable et largement admis par la communauté scientifique, il posait cependant des problèmes quant à la compréhension de leurs mécanismes de différenciation, en effet certains auteurs avaient trouvé des CD avec un phénotype plutôt lymphoïde qui se développaient parmi des cellules d'origine myéloïde et vice-versa (Martinon-ego et al., 2001) ; le mélange de différents types cellulaires qui paraissaient d'origines différentes a été confirmé dans les cultures de cellules générées ou développées in vitro. Un bon exemple de ces ambiguïtés est fourni par les pCD qui ont d'abord été retrouvées et décrites comme étant des cellules exclusivement d'origine lymphoïde (Hochrein, O'Keeffe, & Wagner, 2002) : les auteurs comparaient les phénotypes des différentes pCD chez l'homme et la souris, mais à l'époque, les auteurs ne pensaient pas qu'il fut possible de retrouver des cellules d'origine myéloïde avec un phénotype de pCD. Dans ce même article, les auteurs étudiaient l'influence du microenvironnement des cellules, et plus spécifiquement de la nécessité pour les pCD de devoir être activées par un pathogène (dans ce cas précis : un virus) pour qu'elles deviennent des CD8 activées, seules cellules à être retrouvées dans un environnement infectieux. Un peu plus tard deux publications ont fait évoluer ces concepts : la première est réalisée à partir d'expériences faites in vitro et démontre qu'il est possible d'obtenir à partir de précurseurs myéloïdes et dans un environnement lymphoïde, des pCD complètement actives et fonctionnelles. Cette étude a été une des premières à proposer qu'il existe une grande plasticité dans le développement des pCD (Ferrero et al., 2002). Le

deuxième article proposait un concept plus fermé du développement des pCD, en effet ces auteurs pensaient que ce type de cellule dérivait exclusivement de précurseurs myéloïdes (Harman, Miller, Nikbakht, Gerstein, & Allman, 2006), ce qui était en contradiction avec l'idée initiale concernant l'origine lymphoïde des pCD.

La plasticité des pCD et des CD permettrait une adaptation des cellules à leur environnement et à l'état infectieux en général, ces éléments constituent un des facteurs clefs pour expliquer l'origine et la différenciation de ce type de cellules. La plasticité des CD a ensuite été largement démontrée par plusieurs auteurs (Ardavin, 2003; Geissmann et al., 2010; Reizis, Bunin, Ghosh, Lewis, & Sisirak, 2010; Ken Shortman & Liu, 2002; Li Wu & Dakic, 2004) et pose des bases stables pour la classification des nombreux types des CD. Dans la Figure 2, on montre la classification généraliste des CD proposée par Heath et Carbone (Heath & Carbone, 2009), même si certains auteurs disent que cette classification est très réductionniste et qu'elle devrait changer lorsque de nouveaux sous-types de CD apparaîtront, cette organisation permet cependant d'avoir une idée globale de l'activité des CD selon leurs phénotypes. Concernant les CD humaines, il est difficile de proposer une classification par fonctionnalité, cependant, il est connu que la fonction dépend de la localisation de la cellule, nous proposons dans la Figure 3 une classification des CD humaines basée sur leur localisation tissulaire.

1.2.3 Fonction des cellules dendritiques.

Dans le cadre de nos études et étant donné la diversité cellulaire des CD, nous avons retenu comme modèle cellulaire des CD différenciées en culture en présence de diverses cytokines, ce modèle est caractérisé grâce à l'expression des marqueurs suivants : CD11b+, CD11c+, CD8-, la maturation est suivie par le biais de l'expression des marqueurs CD86+ et/ou des molécules de classe II ; le phénotype décrit correspond au deuxième groupe de la Figure 2 (CD11b+ CD).

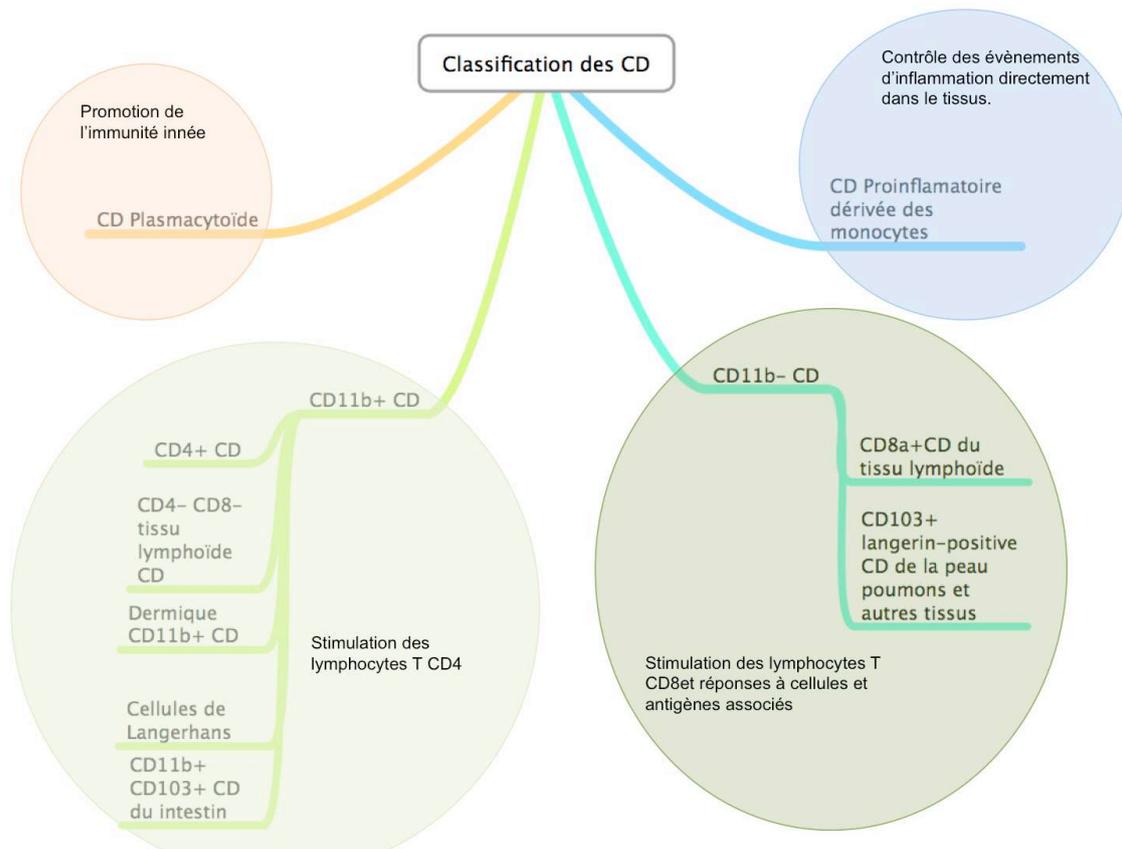


Figure 2 Classification des CD selon Heath et Carbone (Heath & Carbone, 2009)

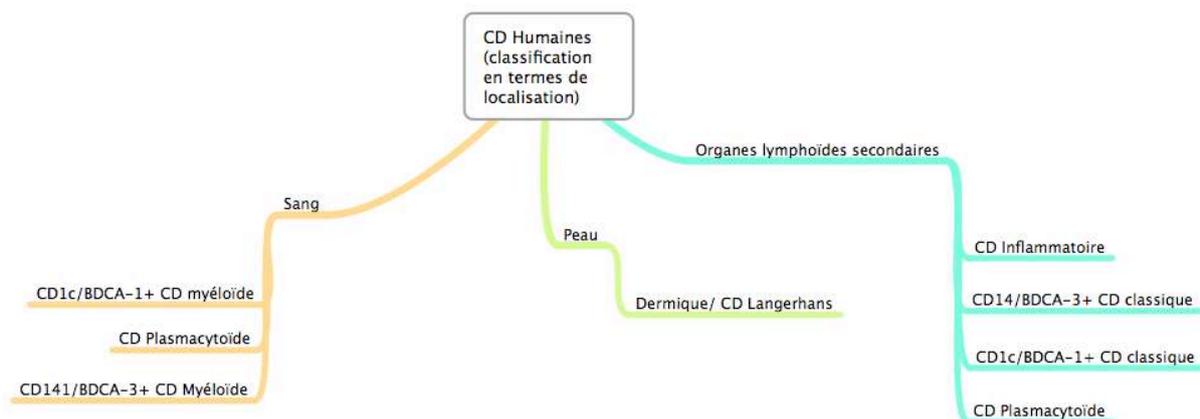


Figure 3 Classification des CD humaines selon leur localisation.

Les CD se trouvent normalement dans les tissus périphériques (Holt, Schon-Hegrad, & McMenamin, 1990; Pavli, Woodhams, Doe, & Hume, 1990) où elles agissent comme sentinelles vis-à-vis des pathogènes potentiels ; par exemple les bactéries sont reconnues par les CD grâce à différents récepteurs de surface parmi lesquels nous pouvons citer les TLR ou "toll like receptor". La Figure 4 correspond à une

représentation schématique de la fonction des CD : 1- Les CD immatures périphériques rencontrent le pathogène dans la zone de l'infection, 2- La cellule devient mature et commence sa migration vers les ganglions lymphatiques, 3- Les CD sont alors matures et « activés » dans les ganglions, 4- Les CD présentent aux lymphocytes T naïfs, les antigènes correspondant à ce pathogène, ce qui constitue une étape déterminante pour le développement de la réponse immunitaire qu'elle soit humorale ou cytotoxique (Banchereau & Steinman, 1998; Segura & Villadangos,

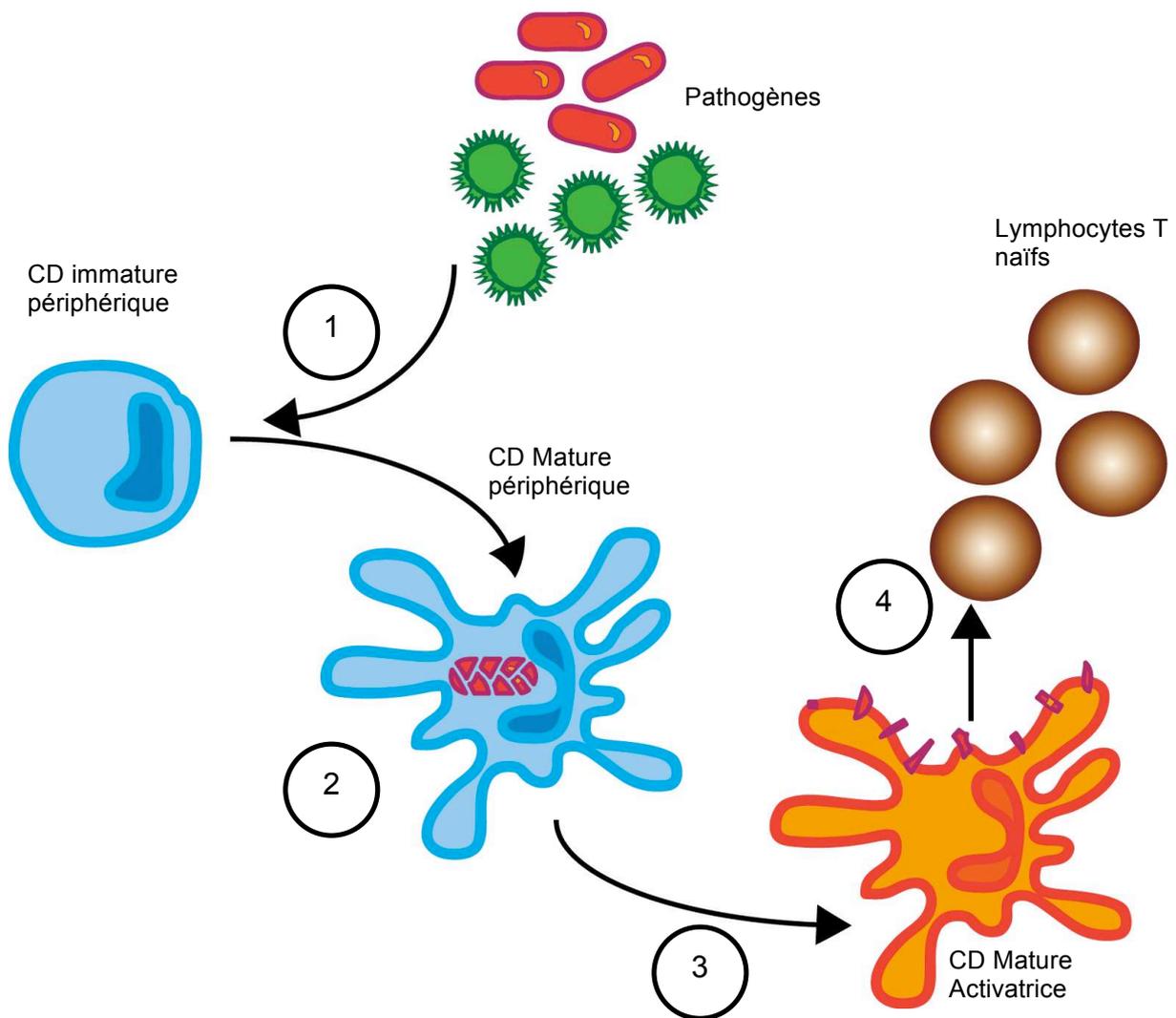


Figure 4 Fonction consensus des CD.

2009).

En lien avec ce concept, plusieurs études ont été menées afin de mieux comprendre les différentes étapes qui conduisent au développement des CD et à l'identification des mécanismes clés de ce qui correspond à la présentation des antigènes.

Les différentes étapes correspondent à :

- a) La surveillance par les CD immatures en périphérie, la détection des pathogènes, et l'activation qui en résulte conduisant à l'activation de la réponse immunitaire innée.
- b) La phagocytose des pathogènes, le trafic intracellulaire et la dégradation des antigènes qui s'en suit afin d'obtenir les peptides qui seront reconnus en association avec les molécules de Classe 1 ou 2 pendant la présentation.
- c) La présentation des antigènes aux lymphocytes T naïfs, la sécrétion des cytokines et les molécules d'activation contrôlent l'efficacité de la réponse immunitaire.
- d) La dernière étape correspond à la fin de la vie de la cellule : induction et contrôle de l'apoptose avec élimination des CD.

1.2.3.1 Surveillance par les CD.

Les cellules dendritiques sont localisées à l'état immature dans les tissus périphériques de l'organisme : peau, épithélium intestinaux ou poumons, elles sont capables de « scanner » leur environnement à la recherche de tout élément infectieux, son contact entraînant l'activation des CD (C Reis e Sousa, 2001). Pour que ces réactions aient lieu, les CD doivent être capables de reconnaître les différents pathogènes ou autres molécules étrangères qui entraînent, suite à leur reconnaissance par les CD, les premières étapes de l'activation des réponses immunitaires innées puis adaptatives.

Les plus importantes molécules permettant la reconnaissance des pathogènes dans les APC sont les TLR pour « Toll like receptors » qui ont été décrites dans un premier temps chez la Drosophile, puis retrouvées chez différents mammifères incluant l'homme (R Medzhitov, Preston-Hurlburt, & Janeway, 1997). Ces molécules ont été très fortement conservées au cours de l'évolution, les TLR ont été retrouvés dans de nombreuses espèces et leur fonction reste inchangée, seul la molécule reconnue pouvant varier d'une espèce à l'autre (Takeda, Kaisho, & Akira, 2003). Les TLR sont des protéines qui ont un rôle prépondérant lors de l'initiation des réponses immunitaires (Schnare et al., 2001), et sont très fortement exprimées par les CD . Il existe différents types de TLR qui se différencient par leurs ligands et dans certains cas par leur localisation cellulaire, mais la majorité de ces molécules sont exprimées par les CD.

Tableau 3 Classification des TLR avec leurs ligands d'après (Kiyoshi Takeda et al., 2003)

TLR Famille	Ligands (Origine)
TLR1	Tri-acyl lipopeptides (bactérie, mycobactérie) Facteurs Solubles (Neisseria meningitides)
TLR2	Lipoprotéine/lipopeptides (une grande variété de pathogènes) Peptidoglycan (bactérie Gram-positive) Lipoteichoic acid (bactérie Gram-positive) Lipoarabinomannan (mycobactérie) A phénol-soluble modulin (Staphylococcus epidermidis) Glycoinositolphospholipides (Trypanosoma Cruzi) Glycolipides (Treponema maltophilum) Porins (Neisseria) Zymosan (fungi) Atypical LPS (Leptospira interrogans) LPS atypique (Porphyromonas gingivalis) HSP70 (hôte)
TLR3	ARN double chaine (virus)
TLR4	LPS (bactérie Gram-positive) Taxol (plantes) protéine de fusion (RSV) protéines de l'enveloppe (MMTV) HSP60 (Chlamydia pneumoniae) HSP60 (Hôte) HSP70 (Hôte) extra domaine A de fibronectine Type III répété (Hôte) Oligosaccharides de l'acide hyaluronique (Hôte) Polysaccharide fragments de polysaccharide de l'héparine sulfate (Hôte) Fibrinogène (Hôte)
TLR5	Flagelline (bactérie)
TLR6	Di-acyl lipopeptides (mycoplasme) Imidazoquinoline (composants synthétiques) Loxoribine (composants synthétiques) Bropirimine (composants synthétiques)
TLR7	Virus à RNA monocaténaire
TLR9	CpG DNA (bactérie)
TLR10	?

Une fois que les CD ont détecté les pathogène via leurs récepteurs, les cellules activées sécrètent des cytokines et des chimiokines, ce qui va entrainer une mobilisation de différentes cellules du système immunitaire inné, la sécrétion de ces facteurs par les CD correspond à la première étape de la réponse immunitaire (G. J. Clark et al., 2000; Caetano Reis e Sousa, 2004), une étude récente montre notamment que les CD myéloïdes ont la capacité à interagir avec les cellules NK (Chijioke & Münz, 2011), l'auteur postule que les CD pendant leur voyage vers les

centres germinatifs où aura lieu la stimulation des cellules T naïfs, pré-activent les cellules NK grâce à la sécrétion d'IL-15 par les CD qui survient lorsque ces cellules entrent en contact.

1.2.3.2 Types d'internalisation par les CD.

Concomitamment à la sécrétion des molécules nécessaires à l'activation des acteurs de l'immunité innée, les CD sont capables d'internaliser les pathogènes qui ont été détectés par les récepteurs, Pour ce faire, il existe plusieurs mécanismes : la macropinocytose, l'endocytose dépendante de la clathrine et la phagocytose ; ces trois types d'internalisation des antigènes sont importantes et fonctionnent de façon différente.

La macropinocytosis (Swanson & Watts, 1995) est un mécanisme utilisé par la plupart des cellules pour se procurer les nutriments qui sont nécessaires à leur survie. Dans le cas des CD, c'est un phénomène constitutif lorsque les cellules sont immatures en milieu standard lorsqu'elles sont cultivées en présence d'IL-4 et de GM-CSF, dans le cas où ces deux cytokines sont enlevées du milieu de culture et que de plus, les CD sont stimulées en présence de TNF α , les cellules sont alors activées, elles réduisent leur capacité de macropinocytose et augmentent leur aptitude à stimuler les cellules T (Sallusto, Cella, Danieli, & Lanzavecchia, 1995).

L'endocytose dépendante de la clathrine (Le Roy & Wrana, 2005), correspond à une internalisation au cours de laquelle les cellules endocytent différents facteurs tels que facteurs de croissance. La caractéristique de cette voie c'est la formation de vésicules de clathrine où se concentrent les protéines pour leur internalisation. La vésicule est formée par l'assemblage de plusieurs composants dont des quantités abondantes de clathrine et de **AP-2** (de l'anglais Adaptor ou Assembly Protein 2). D'autres protéines participent à la formation des vésicules de clathrine tels que : **AP180** (AP-3) et son isoforme **CALM** qui sont des protéines monomériques avec des sites de liaison pour la clathrine et AP-2 (Lafer, 1995; Tebar, Bohlander, & Sorokin, 1999) ; l'**Epsine** (Protéine d'interaction avec Eps-15) qui contient des sites de liaison avec PtdIns(4,5)P₂, avec AP-2, Eps-15 et avec la clathrine (H. Chen et al., 1998; Drake, Downs, & Traub, 2000; Itoh et al., 2001; Owen et al., 1999) ; l'**Eps-15** pour « EGF (Epidermal Growth Factor) receptor pathway substrate clone No. 15 » qui contient des motifs de liaison avec l'epsine, AP180/CALM et la sous-unité alpha de AP-2 (Cupers, ter Haar, Boll, & Kirchhausen, 1997) ; **Dab2** (de l'anglais « Disabled

proteïn 2 »), elle interagit avec le PtdIns(4,5)P₂, des récepteurs de la famille LDL (de l'anglais « Low density lipoprotein ») comme ApoER2 (de l'anglais « Apolipoprotein E receptor 2 ») (Morris & Cooper, 2001; Oleinikov, Zhao, & Makker, 2000). D'autres protéines comme la **dynamine**, l'**amphiphysine** et l'**endophiline** ne font pas partie des composants nécessaires à la formation de la vésicule, mais sont impliquées dans les étapes qui suivent l'endocytose, comme l'invagination de la membrane et la réaction de fusion qui permet la fermeture de la vésicule (Mousavi, Malerød, Berg, & Kjekken, 2004).

La phagocytose permet essentiellement l'internalisation de très gros complexes tels que des pathogènes (bactéries) ou des fragments de cellule, ces mécanismes sont sous le contrôle d'interactions entre les pathogènes, les TLR, et les récepteurs de reconnaissance des pathogènes, (PRRs pour pathogen recognition receptor). Ces phénomènes utilisent l'actine pour la formation de la vésicule de phagocytose ou phagosome ; ensuite le phagosome subit une maturation à l'intérieur de la cellule (Jutras & Desjardins, 2005). Dans le cas des CD, la phagocytose est certainement le phénomène le plus étudié, car la présence de TLR et leur implication dans la réponse immunitaire en font un modèle fondamental pour l'initiation de telles réponses dans le contexte d'une infection.

Les CD ayant phagocyté des pathogènes sont activées et commencent leur migration vers les ganglions lymphatiques via l'utilisation de gradients de deux cytokines CCL21 et CCL19 qui se lient avec les récepteur membranaires CCR7 présent chez les CD, permettant ainsi à la cellule de migrer vers les ganglions lymphatiques où est réalisée la présentation des antigènes (Haessler, Pisano, Wu, & Swartz, 2011; Murphy, 2010; von Andrian & Mempel, 2003).

Ces trois types d'endocytose sont illustrés dans la Figure 5 ; nous montrons également la localisation spécifique des phosphatidyl inositols (PI) (Figure 6), qui favorisent la formation des vésicules par interaction avec des complexes adaptateur-protéine comme les epsines (Legendre-Guillemain, Wasiak, Hussain, Angers, & McPherson, 2004). Ainsi la phosphorylation ou déphosphorylation des PI intervient pour contrôler les interfaces membrane-cytoplasme, et activer des voies de signalisation conduisant à différents mécanismes : endocytose, exocytose ou motilité cellulaire, entre autres (Di Paolo & De Camilli, 2006).

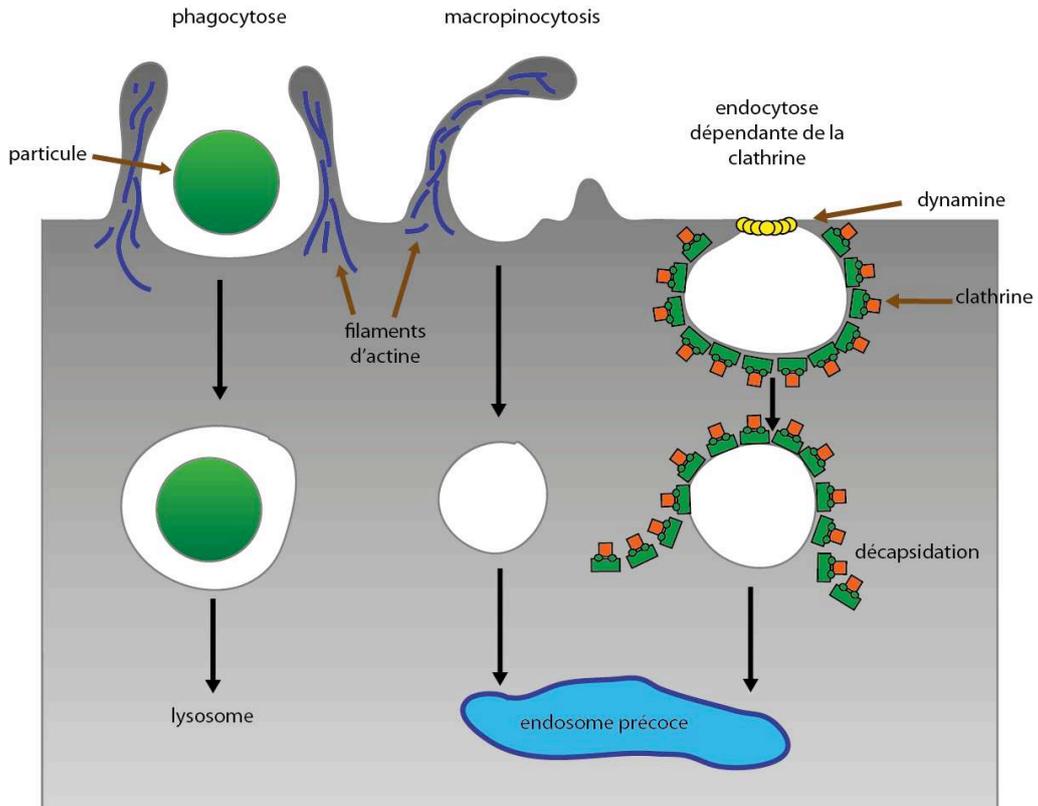


Figure 5 Types d'endocytose présentes dans la cellule dendritique

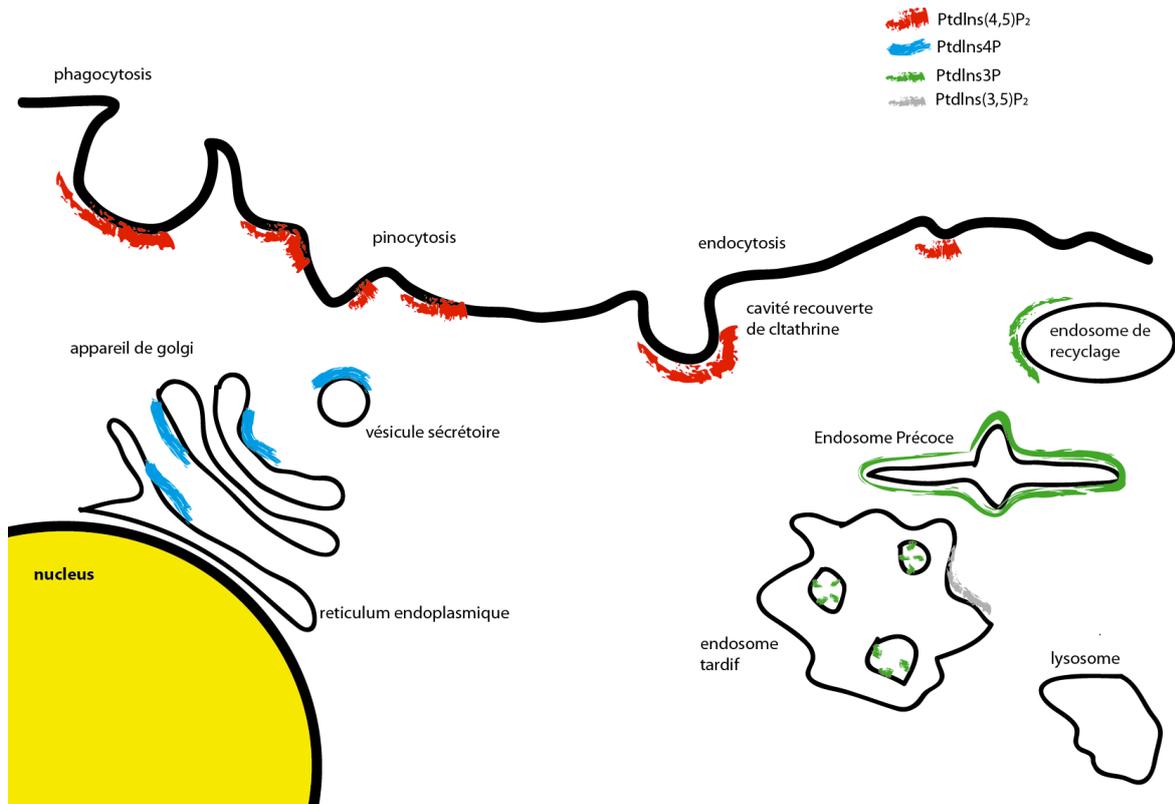


Figure 6 Localisation des phosphatidyl-inositols au cours des mécanismes d'endocytose d'après (Le Roy & Wrana, 2005)

1.2.3.3 Apprêtement et présentation de l'antigène.

Une fois activées, les CD présentent les antigènes préalablement phagocytés, aux lymphocytes T qu'elles soient naïves ou qu'elles aient déjà rencontré leurs antigènes. Les CD ayant phagocyté un pathogène sont capables de ré-exprimer à leur surface certains peptides issus de la protéolyse de ces mêmes antigènes en association avec des molécules d'histocompatibilité de classe I et/ou de classe II, ces deux types de molécules sont produites en forte quantité par les CD. (den Haan, Lehar, & Bevan, 2000).

La dégradation du pathogène qui suit sa phagocytose peut être considérée comme une des étapes les plus importantes dans la réponse immunitaire car comme l'a indiqué Colin Watts (Watts, 2006), la dégradation du pathogène va déterminer les types de peptides présentés par les CD, toute modification dans la taille ou la séquence des acides aminés pourra changer la qualité de la réponse immunitaire spécifique qui va être générée dans ces conditions (Watts, 2011).

Savina a montré qu'une protéine du type flavoprotéine appelé NADPH Oxydase 2 ou NOX2 qui produit des radicaux oxygénés, intervient dans le contrôle du pH interne des phagosomes. Ces auteurs ont également montré que grâce à ce contrôle, la protéolyse des antigènes est modifiée, la génération des peptides antigéniques est donc fonction de l'activité de NOX (Ramachandra, Simmons, & Harding, 2009; Savina et al., 2006), ils ont également montré que ce contrôle avait un impact important sur les phénomènes de cross-présentation. Les protéines NOX sont analysées dans le chapitre qui leur est consacré.

La présentation de ces deux types de molécules diffère par plusieurs aspects:

La présentation du type I via les MHC I, correspond globalement à la présentation de peptides issus des protéines endogènes au cytoplasme cellulaire, ces protéines sont dégradées par le proteasome (Koopmann, Hämmerling, & Momburg, 1997) ; les peptides interagissent ensuite avec la protéine TAP (« transporter associated with antigen processing » en anglais) qui les transporte depuis le cytoplasme où ils ont été produits vers le réticulum endoplasmique où ils sont associés aux MHCI (Cresswell, Ackerman, Giodini, Peaper, & Wearsch, 2005).

Le rôle prépondérant de ce système de protéolyse a été démontré dans le cas des réponses immunitaires à des protéines d'origine virale ou des protéines incorporées dans le cytoplasme dans le cas de cellules infectées (Ikuta, 2002). Ce type de présentation conduit à la stimulation des cellules T CD8+ (cytotoxiques) lesquelles

pourront ensuite interagir avec les cellules contaminées et les détruire (J. Wang, 2001).

La présentation du type II est réalisée via les MHC II, ce mécanisme concerne très majoritairement la présentation des antigènes exogènes internalisés par les différentes voies d'endocytose, que ce soit phagocytose, macropinocytose ou endocytose (Figure 5). La fixation des peptides produits par dégradation enzymatique, avec les molécules de classe II est réalisée dans un compartiment intracellulaire à la croisée entre les compartiments d'endocytose et d'exocytose appelé compartiment de charge, le complexe ainsi formé est transporté vers la surface des cellules pour être présenté aux lymphocytes T (Ferrari, Knight, Watts, & Pieters, 1997).

Le dernier mécanisme impliqué dans la présentation des antigènes est **la cross-présentation**, c'est un phénomène spécifique aux CD, qui permet de présenter en association avec des molécules MHC I, des peptides issus d'antigènes exogènes à la cellule. La cross-présentation se différencie donc de la présentation classe I par l'origine des antigènes, puisqu'ils sont issus des voies d'endocytose. Via des mécanismes encore très mal compris, les antigènes se retrouvent dans le cytosol où ils sont captés par le système du protéasome pour être dégradés, les peptides sont alors transportés dans le réticulum via les protéines TAP, pour être associés aux molécules de classe I (Heath et al., 2004). Il est important de signaler que lors de la dégradation de l'antigène au niveau du phagosome, la protéine NOX2 est impliquée d'une part dans le phénomène de cross-présentation et d'autre part dans la régulation de l'activité des enzymes protéolytiques (Mantegazza et al., 2008). D'autre part, trois laboratoires ont montré que le phagosome pouvait fusionner avec des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique (Ackerman, Kyritsis, Tampé, & Cresswell, 2003; Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003). Tous ces travaux nous laissent à penser que la cross-présentation pourrait ne pas être un mécanisme uniforme ; il pourrait y avoir différentes formes de cross-présentation qui seraient dépendantes du type de cellule et/ou du type d'antigène impliqué.

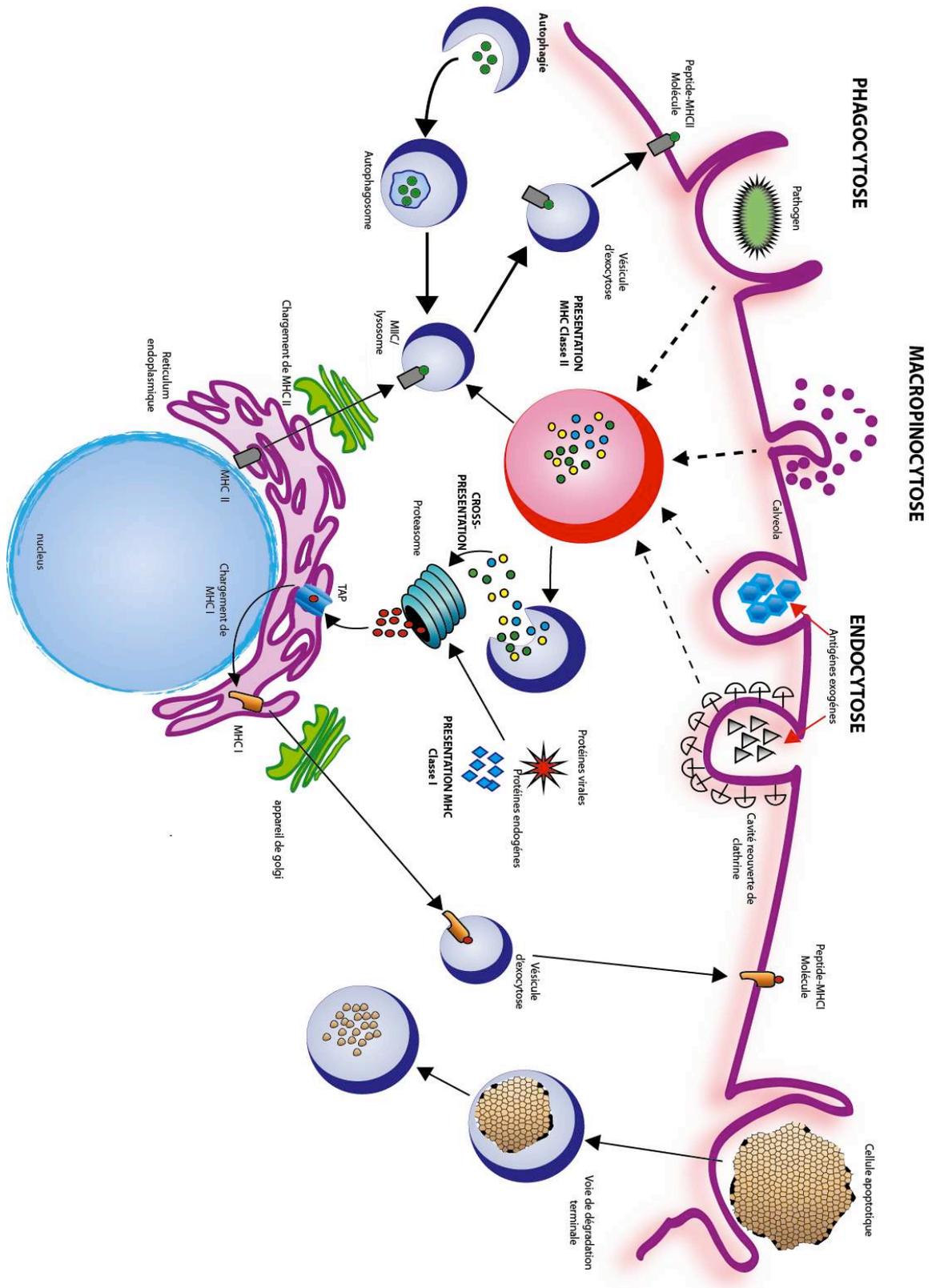


Figure 7 Résumé des différents types de présentation des antigènes. D'après (Hubbell, Thomas, & Swartz, 2009)

Une fois que les peptides antigéniques sont exposés à la surface de la membrane cellulaire en association avec les molécules de classe I ou II, les CD interagissent

avec différents lymphocytes T jusqu'à ce qu'il y ait une interaction suffisamment forte pour induire une activation des cellules, les cellules de type CD8+ dans le cas des molécules de classe I et CD4+ pour la présentation via les molécules de classe II (J. Wang, 2001). Pour compléter cette activation, les CD sont capables de créer un microenvironnement grâce à la sécrétion de différentes cytokines qui vont orienter l'activation des lymphocytes T. Le Tableau 4 résume les conditions cytokiniques qui permettent l'orientation des réponses immunitaires tel que nous les connaissons actuellement. (Hubbell et al., 2009)

Tableau 4 Cellules dendritiques et microenvironnement

Type de réponse	Microenvironnement d'activation des CD	Cytokines produites par les CD activées	Cytokines produites par les cellules T activées	Effets sur d'autres cellules	Inducteurs naturels
Cellule T_{reg}	Haute TGF-β1 et IL-10 ; Faible IL-6 et IL-12	TGF-β1	IL-10	Supprime la prolifération des cellules T CD4+ et CD8+	Antigènes de soi
Cellule T_{H17}	IL-23, haute TGF-β1 et haute IL-6	TNF-α	IL-17, IL-22 et IL-6	Activation des fibroblastes à produire IL-6, G-CSF, GM-CSF, CXCL8 et CXCL12, qui attirent neutrophiles et macrophages, créant le T _{H1} -Cytokine microenvironnement	Infections bactériennes et virales
Cellule T_{H1}	IL-12, IL-18 et IL-27	IL-12	INF-γ, IL-12 ET Lymphotoxine-a	Bloque le développement de T _{H17} et T _{H2} ; les cellules B à produire des IgG1 (Chez l'homme)	Infections bactériennes et virales
Cellule T_{H2}	IL-4 et IL-6	IL-1	IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et IL-13	Induit la prolifération des cellules B et la commutation isotypique des anticorps ; favorise le développement des cellules T _{reg} , active les macrophages (par la voie alterne)	Infections helminthiques

La CD est une cellule qui a un rôle prépondérant dans l'établissement des réponses immunitaires ; la production des peptides antigéniques est particulièrement importante puisque ce sont ces mêmes peptides qui seront associés aux molécules d'histocompatibilité et qui seront présentés aux lymphocytes T. Cette protéolyse dépend à la fois des différentes protéases localisées dans les compartiments intracellulaires et des paramètres physiques de ces derniers. En effet, l'activité des protéases est par exemple, étroitement liée au pH de la vacuole, or ce pH va

dépendre de différents facteurs comme l'activité des pompes à proton (ATPase vacuolaires) et de la consommation des protons par les radicaux oxygénés pour la formation de molécules de peroxyde d'hydrogène. Nous savons que la production d'anion $O_2^{\circ-}$ provient des complexes protéiques du type NADPH Oxydases (NOX) et en particulier de NOX2 dans les CD.

1.3 Les protéines NOX

Les NADPH Oxydases (Nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate oxydase) sont des complexes enzymatiques membranaires qui ont pour fonction première la production d'anions $O_2^{\circ-}$, à partir d'oxygène, grâce au transfert d'électrons à partir du NADPH (Chanock, el Benna, Smith, & Babior, 1994). L'enzyme a été initialement décrite dans les neutrophiles (SEGAL & JONES, 1978). Cette NOX dite phagocytaire puisque retrouvée dans les différentes cellules capables de phagocyter fut la première à être étudiée, son pouvoir bactéricide est particulièrement mis en évidence dans le cas de la maladie de CGD (de l'anglais « chronic granulomatous disease ») (Segal, 1987). En effet, Segal a démontré que la maladie de CGD caractérisée par la présence d'infections récurrente, est le résultat d'une déficience dans l'activité de l'enzyme NOX, ce qui conduit à l'idée que le superoxyde produit via une activité NOX une fois transformé en peroxyde pouvait être responsable de la destruction des agents infectieux.

1.3.1 Structure et interactions des protéines NOX avec leurs sous-unités

Les complexes NOX sont composés de protéines membranaires et d'entités cytosoliques. Comme indiqué précédemment, la NOX phagocytaire (NOX2) fut la première NADPH oxydase décrite, elle est composée de deux protéines membranaires gp91phox (glycoprotéine 91kDa) et p22phox, ces deux unités se trouvent au cœur du complexe ; elles sont complétées par des facteurs, qui à l'état inactivés sont situés dans le cytosol, ce sont les protéines p47phox, p67phox, p40phox ainsi que des GTPases comme RAC1. L'activation résultant de différents stimulus entraîne la phosphorylation des sous-unités cytosoliques, provoquant leur association avec les protéines membranaires gp91 et p22 pour former un complexe actif produisant des radicaux superoxyde (Chanock et al., 1994). Une représentation schématique des différents sous unités de NOX2 ainsi que de leur association spatiale est présentée Figure 8.

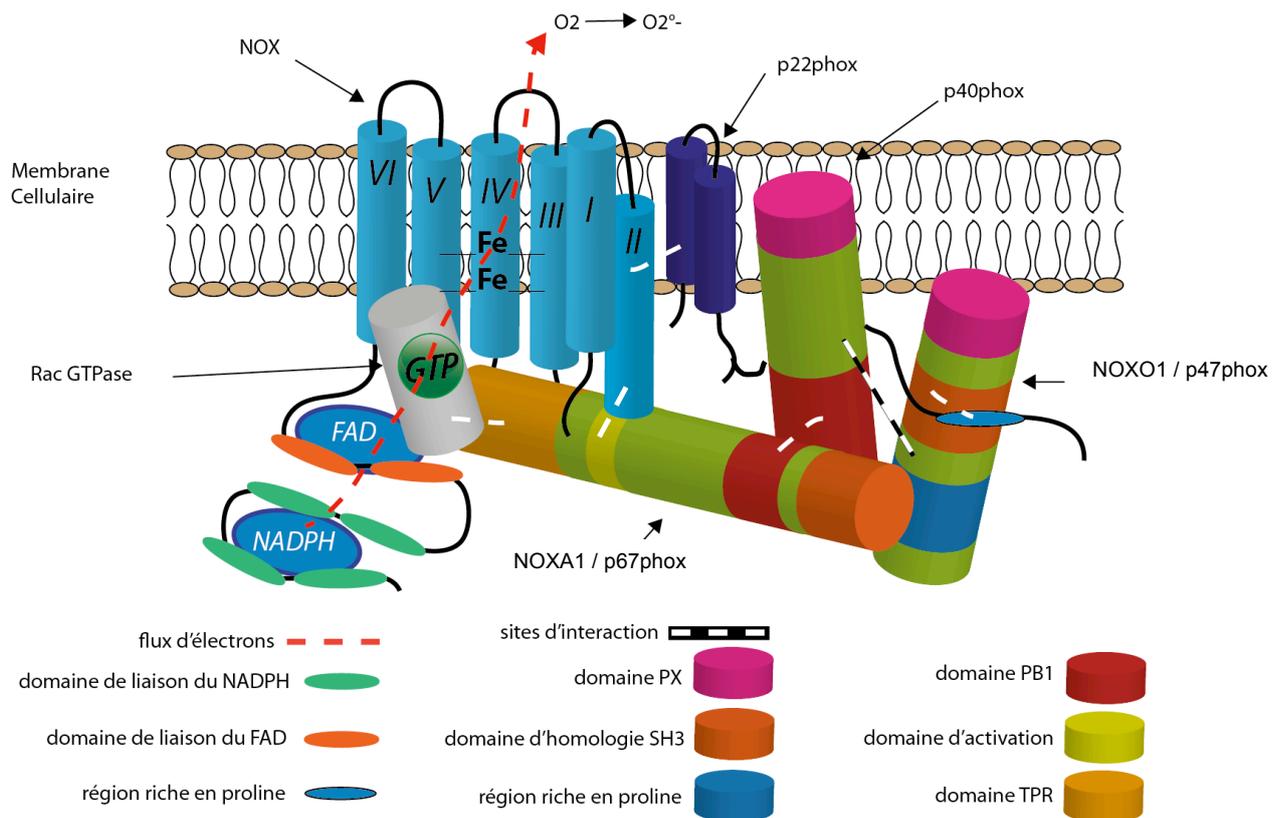


Figure 8 Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de NOX1 et NOX2

En générale, les protéines de la famille des NOX contiennent six domaines transmembranaires très conservés du côté N-terminal. Les domaines transmembranaires III et V contiennent deux résidus histidine couplés à deux groupes « hème ». La partie cytoplasmique C-terminal de NOX, contient des domaines conservés de liaison du FAD et du NADPH. NOX interagit avec p22phox, sous-unité avec laquelle elle reste en constant partenariat et qui permet des interactions avec les autres sous-unités cytoplasmiques. NOXO (sous-unité organisateur) et NOXA (sous-unité activateur) et p40phox sont des sous-unités qui contiennent des domaines critiques pour leurs interactions mutuelles, leur association aux membranes cellulaires sont importantes pour le fonctionnement des NOX. Les GTPases Rac sont, elles aussi, impliquées dans la régulation des NOX mais elles ne sont pas considérées comme étant des éléments constitutifs des NOX, mais plutôt comme des régulateurs. Le modèle illustré ici correspond à NOX1 et NOX2 principalement. Toutes les NOX sont des transporteurs d'électrons entre le NADPH et l'oxygène, en passant par le FAD et les deux ions fer pour finir par la production de radicaux "superoxyde". Dans le cas de NOX1, la sous-unité p40phox n'est pas nécessaire pour l'activation du complexe.

1.3.1.1 NOX2

La première protéine décrite dans la famille NOX fut NOX2, souvent désignée sous le terme de gp91phox, ce qui désigne en fait le cœur catalytique de NOX2, sa taille moyenne est de 91kDa (570 acides aminés) ; sa structure tridimensionnelle a été récemment publiée par Honbu K, Noda N.N. *et al.*. La dernière version de la

structure de NOX2 est illustrée dans la Figure 9, MMDDBID: 81200 (Hideki Sumimoto, 2008).

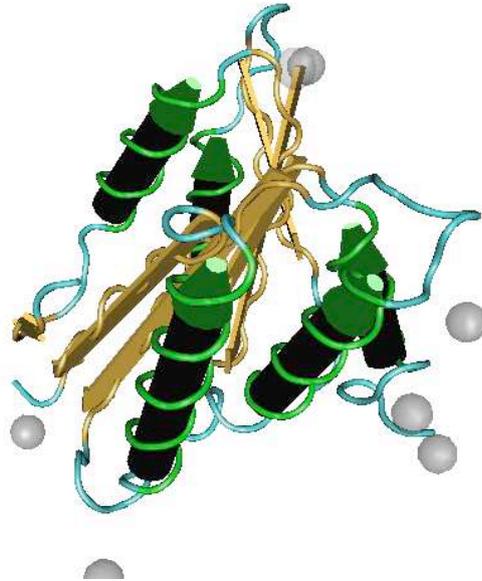


Figure 9 Structure 3D partielle de NOX2 proposé par Honbu K, Noda N. N., Sumimoto H., Inagaki F.

La sous-unité catalytique de NOX2 comporte six hélices transmembranaires (représentées dans la figure 6, la protéine NOX2 n'a pas été entièrement cristallisée), les hélices III et V contiennent des résidus Histidine qui sont couplés directement aux groupements "hème". Ces deux hèmes fonctionnent comme transporteurs d'électrons, reliant le flux d'électrons entre le FAD cytosolique et l'oxygène extracellulaire (Vignais, 2002).

1.3.1.1 NOX1, NOX3, NOX4 et NOX5

La sous-unité catalytique NOX1 (anciennement appelé MOX1, pour « mytogenic oxidase »), a été identifiée après la description de NOX2, il y a 60% d'identité de séquence entre NOX1 et NOX2 (Bedard & Krause, 2007; Suh et al., 1999). Bien que la structure tridimensionnelle de NOX1 n'ait pas été encore décrite (Gabanyi et al., 2011), la similitude de séquence avec NOX2 a permis de proposer une conformation spatiale hypothétique comme indiqué dans la Figure 8. NOX1, de la même façon que NOX2 a besoin de facteurs cytosoliques pour activer sa fonction oxydase, NOXO1 et NOXA1 équivalents respectivement de p47phox et de p67phox (Botond Bánfi, Clark, Steger, & Krause, 2003; Miklós Geiszt, Lekstrom, Witta, & Leto, 2003).

NOX3, NOX4 et NOX5 ont été décrites un peu plus tard (G Cheng, Cao, Xu, van Meir, & Lambeth, 2001). Il n'y a pas non plus de structure 3D de décrite pour ces

protéines, mais là encore, leur similitude avec NOX2 à permis à Cheng d'émettre un certain nombre d'hypothèses qui sont résumées dans le tableau 5. Dans ce tableau, nous avons repris les éléments caractéristiques décrits par l'auteur qui différentient les NOX3, 4 et 5 des NOX2 et NOX1. La Figure 10 illustre les différentes structures hypothétiques des NOX1, 3, 4 et 5.

Tableau 5 Caractéristiques des séquences proposées par Cheng et al (Homme)

	NOX3	NOX4	NOX5
Acides aminés prédits.	568	578	565
Poids moléculaire. (kDa)	64,9	66,9	64,7
PI de la protéine	8,0	8,7	9,7
Identité avec NOX2	58%	37%	27%
Identité avec NOX1	55%	35%	29%

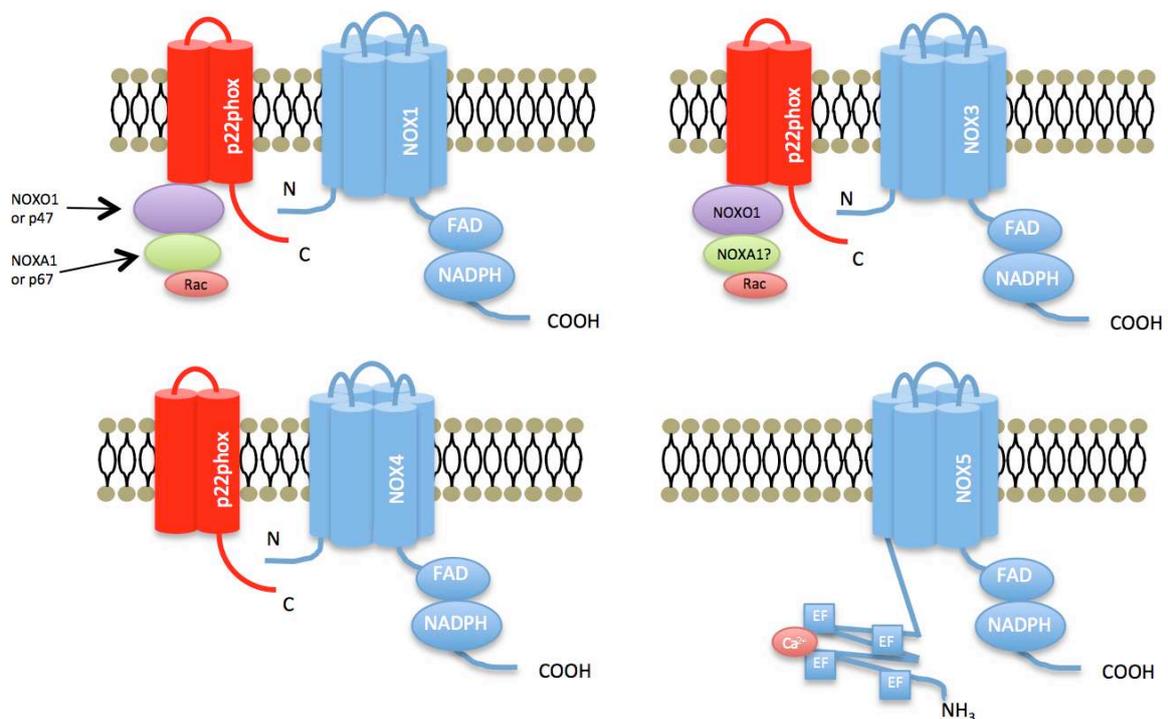


Figure 10 Structures hypothétiques des différents NOX (1, 3, 4 et 5)

Les caractéristiques d'activation des différentes NOX ont fait l'objet de nombreux travaux ; dans le cas de NOX1 il a été démontré que c'est essentiellement NOXA1 et NOXO1 qui sont recrutés par le complexe membranaire NOX1/p22 et qui permettent le fonctionnement de la NADPH oxydase (Botond Bánfi et al., 2003) ; cependant les sous-unités p47phox et p67phox sont aussi capables d'activer NOX1 quoique moins efficacement, de plus l'activation du complexe requière une stimulation (addition de PMA par exemple) qui n'est pas requise en présence de NOXO1 et de NOXA1 (Botond Bánfi et al., 2003; Miklós Geiszt, Lekstrom, Witta, & Leto, 2003; Takeya et

al., 2003). En ce qui concerne NOX3, il a déjà été démontré qu'il interagit avec NOXO1 via au moins en partie la protéine p22phox. Toujours dans le contexte de NOX3, le lien direct avec l'organisateur impliquerait une région riche en proline. Le fait que NOXA1 ou Rac soient nécessaire pour le fonctionnement de NOX3 n'a pas été clairement démontré, des données présentés par l'auteur, où p67 et NOXA1 fonctionnent principalement comme inhibiteurs de l'activité NOX dans des cellules COS-7 transfectées (Ueno, Takeya, Miyano, Kikuchi, & Sumimoto, 2005).

Concernant NOX4, il a été montré que la seule présence de p22 suffisait pour que cette NADPH Oxydase fonctionne, sans que les sous-unités activatrices ou organisatrices (Martyn, Frederick, von Loehneysen, Dinauer, & Knaus, 2006) soient présentes. Certains auteurs considèrent que l'activité constitutive de NOX4 est en fait contrôlée via le niveau des ARNm (Serrander et al., 2007). Finalement NOX5, ce dernier membre de la famille des NOX n'est exprimée que chez l'homme, et n'a pas été étudiée aussi intensément que les autres protéines NOX. NOX5 a une plus longue séquence que les autres membres de la famille NOX, et ce en raison de la présence de quatre régions de liaison au Calcium (Régions EF) du côté N-terminal ; cette seule région permet l'activation spontanée de la protéine sans qu'il y ait besoin des sous-unités régulatrices (B Bánfi et al., 2001; Fulton, 2009)

1.3.1.2 p22phox

La sous-unité p22phox est une protéine de 195 acides aminés, poids moléculaire apparent de 22kDa. Elle renferme deux domaines transmembranaires dans la partie N-terminale, du côté C-terminal, il y a une région riche en proline qui est cruciale pour l'interaction avec les sous-unités organisatrices, que ce soit p47phox ou NOXO1. La structure 3D des domaines d'homologie SRC de p47phox complexé avec un peptide riche en proline dérivé de p22phox est illustrée Figure 11, elle présente les zones d'interaction avec p47phox élucidée par résonance magnétique nucléaire (Ogura et al., 2006). Il est important de signaler à ce niveau que la sous-unité p22phox est toujours couplée à une protéine NOX, sauf pour NOX5, Figure 10 ; si l'interaction entre les deux unités (p22 et NOX) est rendue impossible du fait d'une modification chimique ou structurelle, alors le complexe entier n'est pas fonctionnel (M C Dinauer et al., 1991; Kawahara, Ritsick, Cheng, & Lambeth, 2005), il est importante de signaler que la protéine p22phox stabilise et mature le cœur catalytique des NOX.

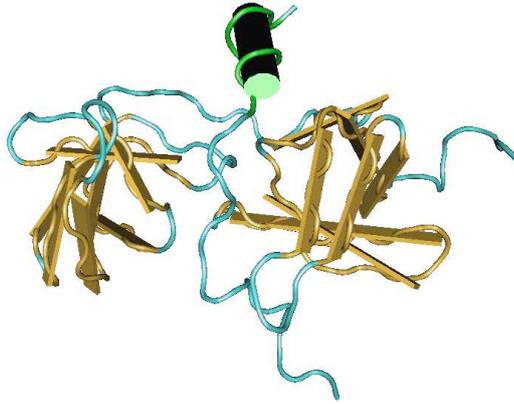


Figure 11 Structure 3D des domaines d'homologie SRC de p47phox complexé avec un peptide riche en proline dérivé de p22phox.

1.3.1.3 p47phox, p67phox et p40.

L'organisateur p47phox est une protéine de 47 kDa qui a pour fonction de réguler l'activité de la NADPH Oxydase. Il est capable de migrer depuis le cytosol vers la membrane après phosphorylation de résidus "sérine" qui sont nombreux dans la région d'auto inhibition (AIR) et d'initier l'assemblage entre p67phox et p40phox (Yuzawa et al., 2004) ; p47phox est capable d'interagir avec p22phox par l'intermédiaire d'un domaine tandem SH3 (Figure 12) qui interagit avec la région riche en proline de p22phox. p47phox contient aussi une région PX (domaine d'homologie phox) qui interagit avec la membrane notamment via la reconnaissance des lipides du phosphatidyl inositol comme : PtdIns(3,4)P₂ ; alors que la région PX de p40phox interagit spécifiquement avec PtdIns(3)P (Kanai et al., 2001).

L'activateur p67, d'un poids moléculaire apparent de 67 kDa est une protéine régulatrice du système NOX, contrairement à p47, p67 interagit directement avec le cœur de la NADPH oxydase. Les interactions se font entre la région riche en "proline" de p47phox et le domaine SH3 de la partie C-terminale de p67phox, (de Mendez, Homayounpour, & Leto, 1997), ce qui permet l'association du système et d'activer NOX. La séquence de p67phox comporte également une région appelée tetratricopeptide (région TPR, Figure 12) qui interagit avec la GTPase Rac (Koga, 1999). Enfin p67phox comporte une région activatrice qui est capable d'interagir directement avec p91phox pour stabiliser le système (Han, Freeman, Lee, Motalebi, & Lambeth, 1998). p67phox a pour fonction de réguler le transfert des électrons depuis le NADPH vers la flavine (Nisimoto, Motalebi, Han, & Lambeth, 1999).

La dernière sous-unité p40 est une protéine de 40 kDa qui contient 3 domaines différents du côté N-terminal : un domaine PX (phox) qui sert de module de couplage aux phospho-inositols, plus précisément au phosphatidylinositol-3 phosphate (PtdIns (3)P) (Bravo et al., 2001), un domaine SH3 (de l'anglais « src homology 3 domain ») qui est une séquence de liaison aux régions riches en proline (Wientjes, Hsuan, Totty, & Segal, 1993) et un domaine PC (phox et cdc24p) connu aussi sous le nom de domaine PB1 ou OPR (Octicosapeptide repeat), il est très important pour l'interaction entre p40phox et p67phox (Nakamura et al., 1998; Ponting, 1996). La fonction exacte de p40phox n'a pas été complètement élucidée, Matute et. al, postulent que p40phox pourrait avoir *in vivo* un rôle de régulateur de l'activité oxydase de NOX pendant la phagocytose dépendante des récepteurs Fcy (Matute, Arias, Dinauer, & Patiño, 2005).

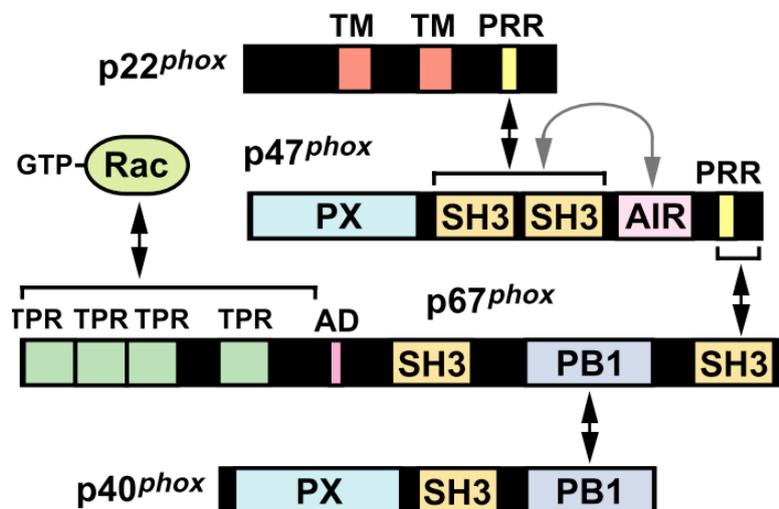


Figure 12 Représentation schématique des interactions entre les sous-unités NOX : p22, p47, p67 et p40

1.3.1.4 NOXO1 et NOXA1

Les sous-unités NOXA1 et NOXO1 ont été décrites par différents auteurs (Botond Bánfi et al., 2003; Takeya et al., 2003) ; NOXA1 est une protéine de 51 kDa également connue sous le nom de p51phox, elle possède 30% d'identité avec p67phox, la principale différence entre NOXA1 et p67phox se situe dans l'absence du domaine SH3 du côté N-terminal, cependant l'activité liée à ce domaine dans p67phox resterait intacte, en effet NOXA1 peut non seulement activer NOX1 mais également NOX2 avec cependant une activité biologique beaucoup plus faible ; les

régions PB1 des deux sous-unités p51nox et p67phox sont également presque identiques si ce n'est, dans le cas de NOXA1, l'absence de la Lysine 355, cette lysine est importante pour l'interaction entre p67 et p40 (T Ito, Matsui, Ago, Ota, & Sumimoto, 2001; Kuribayashi et al., 2002). NOXO1 est la sous-unité organisatrice de NOX1, elle est similaire à p47phox et est également décrite sous le terme de p41nox en raison de son poids moléculaire apparent de 41 kDa. Il manque à NOXO1 une partie AIR (région d'auto inhibition) ce qui fait que NOXO1 n'est pas capable de s'auto-inhiber ; cette protéine est également capable d'interagir avec p22phox plus fortement que ne le fait p47phox (Takeya et al., 2003), la Figure 13 montre les domaines d'interaction tels qu'ils sont décrits entre NOXO1 et NOXA1 dans le complexe NOX.

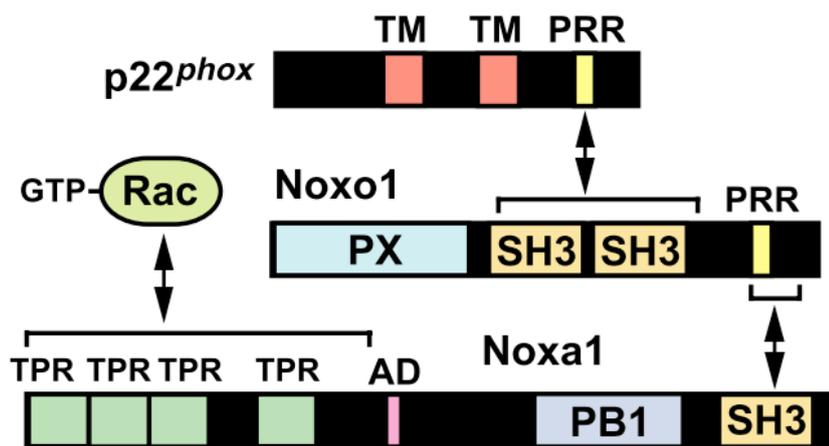


Figure 13 Représentation schématique des interactions entre les sous-unités NOXO1, NOXA1 et p22

1.3.1.5 Rac

La GTPase Rac n'est pas considérée comme faisant partie intégrante du système NOX, cependant son importance dans l'activation et la structuration du complexe actif NOX ont été mises en évidence par différents auteurs (Guangjie Cheng, Diebold, Hughes, & Lambeth, 2006; Kerkhoff et al., 2005; Miyano & Sumimoto, 2007; Ueyama, Geiszt, & Leto, 2006). Rac est une petite protéine G de 21kDa, elle appartient à la famille des Rho GTPases. La partie N-terminale de la protéine peut interagir avec le GTP et présente une activité GTPase. Le remplacement du GDP par le GTP entraîne l'activation de Rac, cette transformation est sous le contrôle d'une protéine inhibitrice qui bloque cette dissociation : Rho GDP (RhoGDI) qui interagit avec la région hydrophobique C-terminale de Rac (Heyworth, Knaus,

Settleman, Curnutte, & Bokoch, 1993), lequel est régulé de son côté par les GEFs (de l'anglais « Guanine Exchange Factor ») normalement inactive quand elle est couplée au GDP mais active une fois couplée au GTP, GEFs participe activement à cet échange (Dudek & Garcia, 2003).

1.3.1.6 DUOX1 et DUOX2

DUOX1 et DUOX2 sont des protéines qui font partie de la famille des NOX, à l'inverse des autres NOX, elles ont d'abord été caractérisées grâce à leur activité oxydase qu'elles exercent dans la thyroïde, par la suite, elles ont été identifiées (Dupuy et al., 1999). DUOX1 et DUOX2 sont des protéines ayant un poids moléculaire apparent de 180 kDa, elles sont très homologues entre-elles (83%). Seule l'extrémité C-terminale des 569 acides aminés de la séquence de DUOX1 et DUOX2 est homologue à NOX2 (53% et 47%, respectivement). La région N-terminale de DUOX1 et DUOX2 n'a pas d'équivalence dans NOX2, cette partie renferme deux domaines EF (domaines de fixation du Ca^{2+}), ainsi qu'un domaine peroxydase (De Deken et al., 2000). Récemment, il a été montré que les protéines du type DUOX ne sont actives qu'en présence d'une autre protéine appelée DUOXA dont la fonction serait d'activer la fonction oxydase des DUOX et de stabiliser le complexe (Morand et al., 2009)

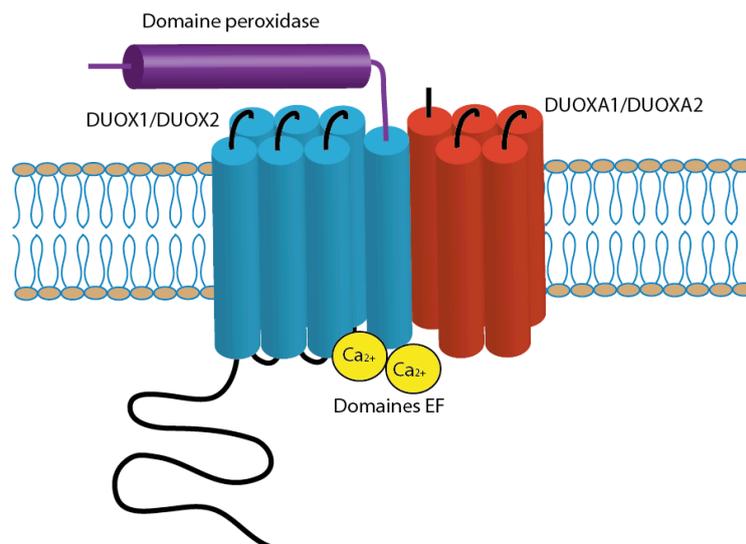


Figure 14 Structure des protéines DUOX

1.3.2 Activation, localisation et fonction des NOX.

Les NOX sont composées de différentes sous-unités dont l'interaction permet l'activation du système et donc le transfert des électrons entre les molécules. En fonction des NOX étudiées, les mécanismes d'activations ne sont pas tout à fait

semblable, et dépendent des sous unités impliquées. Les interactions conduisant à l'activation de la NADPH oxydase la plus amplement étudiée : NOX2, sont représentées Figure 15.

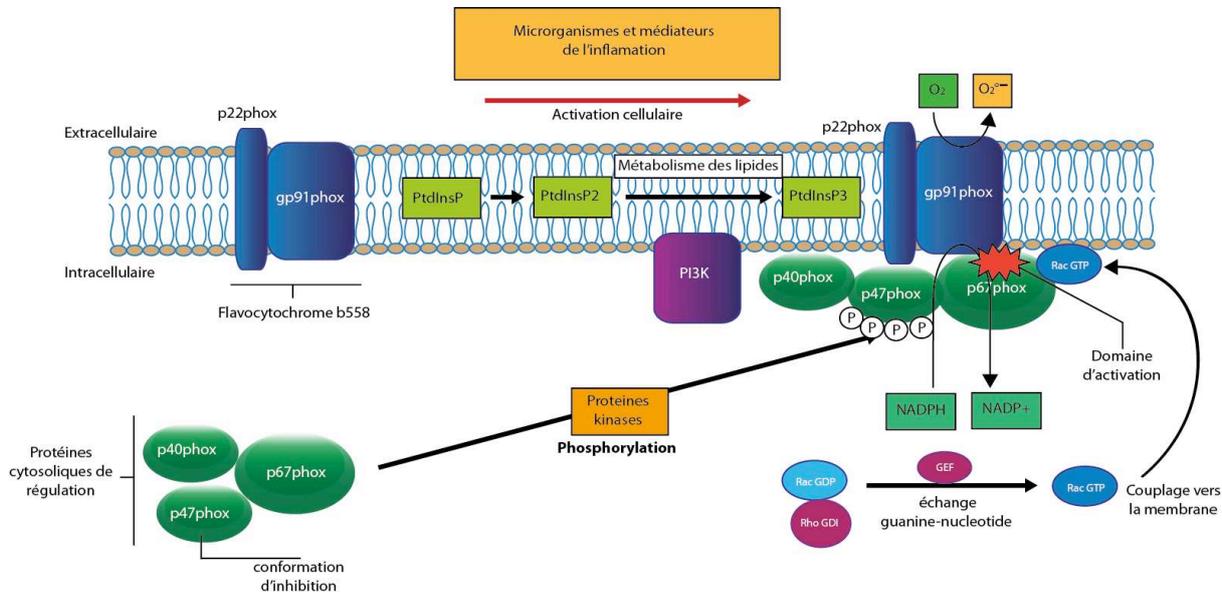


Figure 15 Activation de NOX2 et ses interactions.

Le contrôle de l'activation de NOX2 se fait au minimum par trois voies qui conduisent à l'assemblage des protéines régulatrices cytosoliques (p40phox, p47phox et p67phox) avec le flavocytochrome b558 (correspondant à l'association p22phox et gp91phox). Ces déclencheurs impliquent des kinases, des enzymes du métabolisme des lipides et les protéines d'échange de nucléotides qui activent la GTPase Rac. Les kinases, parmi lesquelles on trouve la protéine kinase C et Akt, catalysent la phosphorylation de la région d'auto-inhibition du p47phox (AIR), ce qui inhibe l'interaction avec le domaine d'homologie 3 bis-SRC (SH3), permettant alors la liaison avec la protéine p22phox. Cela bloque aussi l'inhibition du domaine d'homologie Phox (PX) de p47phox, autorisant ainsi son association avec les lipides membranaires. Comme, en même temps, p47phox se lie à p67phox, cette protéine est considérée comme la protéine organisatrice du complexe. La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et la phospholipase D génèrent le 3-phosphoryl phosphatidylinositols (PtdInsP) et l'acide phosphatique, les domaines PX de p47phox et p40phox se lient aux lipides ainsi produits. Rac subit des modifications post traductionnelles, un groupement hydrophobe geranyl-geranyl est fixé à une extrémité carboxylique-terminal. Lorsque Rac a fixé du GDP, ce groupement est masqué par la protéine

inhibitrice RhoGDP qui bloque la dissociation (RhoGDI), ce qui maintient Rac en solution dans le cytosol. L'activation des facteurs d'échange entraîne le remplacement du GDP par du GTP, ceci induit des changements structurels dans Rac et provoque sa dissociation de RhoGDI et son association à la membrane par le lipide geranyl-geranyl. Simultanément, les changements structuraux entraînent l'interaction de Rac avec la région tetratricopéptide (TPR) de p67phox, et de ce fait aide à l'assemblage du complexe actif. Revue de Lambeth (J David Lambeth, 2004).

Tableau 6 Expression de NOX par différents tissus, d'après (Bedard & Krause, 2007)

NOX	Tissu de haute expression	Tissu d'expression intermédiaire ou basse
NOX1	Colon	Les muscles lisses, l'endothélium, l'utérus, le placenta, la prostate, les ostéoclastes, péricytes rétinien
NOX2	Phagocytes	Les lymphocytes B, les neurones, cardiomyocytes, le muscle squelettique, les hépatocytes, l'endothélium, cellules souches hématopoïétiques, le muscle lisse
NOX3	Oreille interne	Rein foetal, rate foetal, les os du crâne, le cerveau
NOX4	Rein, vaisseaux sanguins	Les ostéoclastes, l'endothélium, muscle lisse, les cellules souches hématopoïétiques, les fibroblastes, les kératinocytes, cellules de mélanome, les neurones
NOX5	Le tissu lymphoïde, testicules	Endothélium, muscle lisse, le pancréas, le placenta, ovaire, utérus, l'estomac, différents tissus foetaux
DUOX1	la thyroïde	Épithélium des voies respiratoires, épithélium lingual, le cervelet, les testicules
DUOX2	la thyroïde	Les glandes salivaires et du rectum, épithélium gastro-intestinal, l'épithélium des voies respiratoires, l'utérus, la vésicule biliaire, les îlots pancréatiques

Les protéines NOX sont retrouvées dans de nombreux tissus qui peuvent également exprimer simultanément plusieurs types de NOX, le Tableau 6 résume les différentes localisations des NOX en fonction des tissus d'après une revue publiée par Bedard et Krause (Bedard & Krause, 2007).

NOX1 a été retrouvée principalement dans les cellules du colon (Botond Bánfi et al., 2003; Szanto et al., 2005), cette enzyme produit des quantités importantes de O₂- dans le colon et dans certains autres tissus, cependant le rôle exact de ces radicaux n'a pas été clairement élucidé ; certains auteurs comparent le rôle de NOX1 dans le colon à celui de NOX2 dans les mécanismes de défense dans lesquels sont impliqués les phagocytes (Miklós Geiszt, Lekstrom, Brenner, et al., 2003). NOX1 est fortement lié à la formation de cancers en raison d'une relation suspectée entre l'expression de NOX1 et les FRO produits lors des transformations cellulaires (R S Arnold et al., 2001; Rebecca S Arnold et al., 2007). Par ailleurs, il a été observé une certaine corrélation entre certains types de cancer (principalement du colon) et l'expression de NOX1 (Kamata, 2009). NOX2 est la NOX dite phagocytaire

essentiellement retrouvée dans les neutrophiles, macrophages (Hideki Sumimoto, Miyano, & Takeya, 2005) et cellules dendritiques (Elsen et al., 2004) ; elle est clairement associée à la dégradation des pathogènes phagocytés par ces cellules (Savina et al., 2006), mais elle est également impliquée dans les mécanismes de la réponse immunitaire et notamment dans la cross-présentation. NOX3, décrite principalement comme étant exprimée dans l'oreille interne, joue un rôle essentiel dans l'équilibre comme cela a été montré en utilisant des souris ayant subi une mutation dans le gène de NOX3 (Botond Bánfi et al., 2004; Paffenholz et al., 2004). NOX4 est connue également sous le nom de "renox", cette protéine est abondamment exprimée dans les reins (M Geiszt, Kopp, Várnai, & Leto, 2000), NOX4 n'est pas activée par des sous-unités cytosoliques comme les autres NOX, et il semblerait qu'elle soit constitutivement active ; sa fonction n'est pas clairement explicitée actuellement, il a été évoqué la possibilité que NOX4 soit un senseur de l'oxygène (Zhu, Qiu, Yoon, Huang, & Bunn, 1999), mais la présence de cette enzyme dans d'autres tissus a permis l'émission de nouvelles hypothèses (C. F. Lee, Qiao, Schröder, Zhao, & Asmis, 2010) comme son implication dans le système de défense immunitaire. NOX5 est exprimée dans de nombreux tissus : testicules, rate, ganglions lymphatiques, muscles lisses vasculaires, moelle osseuse, pancréas, placenta, ovaires, utérus, estomac et dans différents tissus fœtaux (B Bánfi et al., 2001; G Cheng et al., 2001) mais sa fonction n'est pas encore définie. Il faut rappeler que NOX5 est spécifique de l'homme. L'étude de cette enzyme a pâti de l'absence d'expression dans les souris. Comme indiqué précédemment, les enzymes DUOX sont très exprimées dans la thyroïde (De Deken et al., 2000) mais leur fonction, comme pour NOX5, n'est pas entièrement élucidée ; récemment un lien entre DUOX et la TPO (thyroïde peroxydase) a été établi, les auteurs montrent que DUOX et TPO sont colocalisés dans la membrane des thyrocytes, cette association pourrait être une résultante de la sécrétion de H₂O₂. Une perturbation de cette association pourrait affecter la synthèse de l'hormone thyroïdienne, entraînant ainsi une insuffisance et des dommages à la cellule (Song et al., 2010). La lactoperoxydase (LPO) qui fait partie de la famille des peroxydases, a été "découverte" dans le lait pour la première fois 1929 : cette enzyme a non seulement des propriétés anti-oxydantes du fait de sa capacité à détruire le peroxyde d'hydrogène mais aussi permet la production de composés antimicrobiens. Cette enzyme a été identifiée et étudiée par B Reiter, associé à K Pruitt (Oram & Reiter, 1966), en présence de peroxyde d'hydrogène, elle

est capable de catalyser la réduction de l'iode, du Brome ou du thiocyanate pour former des composés tels que l'hypothiocyanite (OSCN⁻), l'hypoiodite (OI⁻) ou hypobromite (OBr⁻).

Cette enzyme est constituée d'un noyau ferrique et ne supporte pas les traitements thermiques. De ce fait, elle peut être utilisée comme indicateur d'un traitement thermique du lait. En présence des cofacteurs iode, thiocyanate ou brome, elle détruit le peroxyde par l'intermédiaire d'un mécanisme suicide : le site catalytique de l'enzyme est détruit lors de la réaction. La LPO, enzyme aux propriétés antimicrobiennes, est présente dans les sécrétions des voies respiratoires et dans la salive ; les enzymes DUOX joueraient un rôle essentiel dans ces mécanismes en fournissant du H₂O₂ au LPO (Miklós Geiszt, Witta, Baffi, Lekstrom, & Thomas L Leto, 2003). Harper et al. a rapporté que l'expression de DUOX1 dans l'épithélium des voies respiratoires est augmenté après traitement avec des cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-13), alors que l'expression DUOX2 serait fortement induite après un traitement avec des cytokines de type TH1 (IFN- γ). L'expression DUOX2 serait également augmentée en présence d'acide polyinosine-polycytidylique et dans le cas d'infection par le rhinovirus (Harper et al., 2005). Récemment Hirakawa *et al.* A montré en accord avec les travaux de Harper que l'expression de DUOX1 était augmentée en présence d'IL-4 et IL-13 dans les keratinocytes humains ; en plus de montrer que l'activité oxydase entraîne une régulation positive dans la voie de signalisation de STAT6 (Hirakawa, Saito, Ohara, Okuyama, & Aiba, 2011).

1.4 Stress oxydant dans les cellules dendritiques.

Comme mentionné précédemment, les CD doivent dégrader des pathogène au niveau des phagosomes afin de pouvoir ensuite coupler les peptides antigéniques produits avec les molécules de classe I ou de classe II ; cette gestion de la dégradation du pathogène est contrôlé au travers du pH phagosomal qui a une influence directe sur l'activité des enzymes protéolytiques impliquées dans la destruction des pathogènes (Colin Watts, 2006).

Les CD ont pour fonction de présenter les antigènes aux lymphocytes T naïfs et pour ce faire ont besoin de produire des peptides antigéniques à partir des pathogènes or ces peptides sont issus de la protéolyse intervenant dans les phagosomes.

C'est dans ce contexte qu'intervient la NADPH Oxydase, elle est capable de générer le superoxyde comme nous l'avons déjà montré à partir du NADPH et de l'oxygène. C'est enfin ce superoxyde qui va interagir avec les protons dans le phagosome acidifié pour former, par dismutation, du peroxyde d'hydrogène, ce qui augmente le pH et contrôle l'activité des enzymes dont le pH optimum est plutôt acide (Savina et al., 2006).

Cette NADPH Oxydase a donc un rôle très important dans tout le domaine des défenses immunitaires. La défaillance fonctionnelle du complexe enzymatique NOX2, a été montré comme étant responsable des pathologies CGD (chronique granulomatose disease) et de leurs impacts sur la santé humaine ; cette maladie se caractérise par la présence récurrente d'infections sans réponse immunitaire (M C Dinauer et al., 1991; Hohn & Lehrer, 1975).

il a été montré, qu'une défaillance de NOX2, été la cause des problèmes d'infection dus principalement à une absence de dégradation des pathogènes par les phagocytes, avec pour conséquence des perturbations de présentation des antigènes et une absence de réponse immunitaire correcte.

Il ya peu de données sur l'impact réel sur les CD, d'un mauvais fonctionnement de NOX2 ; le groupe d'Amigorena avait montré le lien entre l'activité de NOX2 et la « cross-presentation » mais ce n'est pas la seule voie de présentation des antigènes que les CD peuvent emprunter pour induire une réponse immunitaire(Savina et al., 2006). De nouvelles analyses autour des mécanismes de présentation des antigènes du type classe II et classe I doivent être réalisées afin de renforcer l'hypothèse émise par Amigorena.

Par ailleurs, nous savons que, grâce à l'expression de nombreux types de récepteurs, les CD sont capables de reconnaître plusieurs pathogènes qui induisent des voies de signalisation qui leurs sont spécifiques, entraînant d'un coté la production des certaines cytokines et de l'autre, une activation de la protéine NOX2 et en conséquence une production des FRO plus ou moins importante dépendent, là encore, du type d'antigène et de sa concentration (Vulcano et al., 2004).

En résumé dans les CD, le phénomène de stress oxydant induit par la protéine NOX2 a été étudié et montré comme important pour la réponse immunitaire, plus particulièrement dans le système de « cross-presentation ». Cependant, cette activité oxydase qui se traduit par la production des FRO (capables d'interagir dans les voies de signalisation, dans la dégradation des biomolécules et dans le contrôle du pH,

etc.) ne semble pas être complètement élucidée dans le contexte immunologique. C'est pour cette raison que notre projet vise à une meilleure compréhension des phénomènes de stress oxydant dans les CD. Nous voulons mieux comprendre les liens entre FRO et activités fonctionnelles des CD.

Objectif du travail

Une bonne coopération entre les cellules du système immunitaire est essentielle pour le développement d'un système de défense approprié et efficace. La découverte de cellules capables de présenter des antigènes date de 40 ans, cela a été la première étape qui a mis en avant ces interactions cellulaires au cours de la réponse immunitaire et mis l'accent sur l'importance des CD.

La capacité des cellules phagocytaires à sécréter des formes réactives de l'oxygène, avait été proposé comme jouant un rôle important dans le contrôle des agents infectieux par les cellules impliquées dans la réponse immunitaire ; en effet, les « FRO » possèdent la capacité d'interagir avec les biomolécules pour, dans le cas du H₂O₂, détruire les agents pathogènes.

La CD, fait partie de la famille des phagocytes, et est capable de produire des FRO grâce à une activité oxydase principalement via NOX2. Cette activité a été montrée comme étant importante au sein de la réponse immunitaire et de la présentation des antigènes notamment dans les phénomènes de cross-présentation.

L'objectif de mon travail de thèse était d'analyser l'activité et le rôle de la NADPH Oxydase dans le contexte de la réponse immunitaire induite par des CD, ainsi que l'impact sur la production des FRO de la stimulation des cellules. Nous avons donc, dans un premier temps, caractérisé la production des FRO par les CD dans différentes conditions expérimentales, puis dans le cadre d'un projet européen, nous avons caractérisé l'effet des nanoparticules sur la production des FRO par la CD.

Nous avons ensuite recherché par biologie moléculaire l'expression de différentes protéines qui pourraient être impliquées dans le contrôle des systèmes oxydants. Ce travail nous a permis de caractériser deux protéines qui n'étaient pas décrites comme étant exprimées par les CD ; caractérisation que nous avons complétée par des études réalisées par microscopie et biochimie.

Objectifs spécifiques:

1.- Caractérisation du système NADPH Oxydase dans les cellules dendritiques.

2.- Analyse de la présence de différentes protéines du système NADPH Oxydase : expression des ARN messagers, expression des protéines, activité fonctionnelle et localisation à l'intérieur de la cellule.

3.- Analyse des divers systèmes de contrôle de la production des FRO dans la cellule dendritique, et notamment interaction des FRO avec les complexes protéiques capables de contrôler leur formation, transformation et/ou dégradation.

4.- Dans le cadre d'un projet Européen, analyse de l'impact des nanoparticules sur la capacité des cellules dendritiques à sécréter des FRO et à induire un stress oxydatif.

Résultats

1.5 Production des FRO par les cellules dendritiques.

1.5.1 Mesure de H₂O₂ et activation de la NADPH Oxydase dans les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont parmi les cellules immunitaires, celles qui ont le plus important potentiel oxydatif : elles sont capables d'induire un stress grâce à la sécrétion de différents radicaux oxygénés. Afin de mieux comprendre ces phénomènes, dans un premier temps, nous avons analysé la production de H₂O₂ grâce à la chimioluminescence; cette technique nous permet de caractériser la cinétique de production de H₂O₂ que ce soit à l'état basal ou après stimulation de l'activité en présence de différents activateurs.

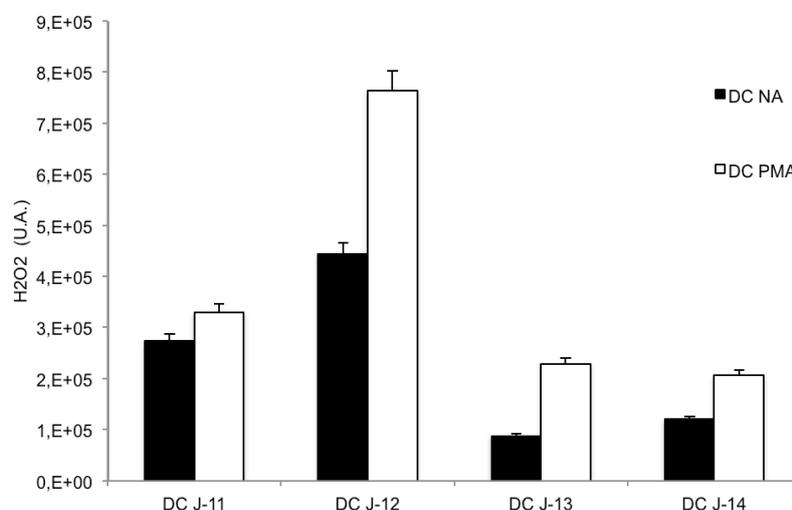


Figure 16 Production du H₂O₂ par les CD selon leur jour de culture.

La capacité des CD à produire du H₂O₂ a précédemment été caractérisée, il a été montré que ces cellules, comme l'ensemble des cellules phagocytaires, produisent en forte quantité des radicaux oxygénés à partir d'une NADPH oxydase de type NOX2, il existe bien évidemment d'autres sources de FRO comme par exemple les mitochondries dont la capacité à produire des O₂⁻ lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire est largement documenté par de nombreuses publications. Nous montrons ici que notre modèle cellulaire (cellules dendritiques de souris produites à partir de progéniteurs myéloïdes) (Figure 16), génère de fortes quantités de H₂O₂,

chaque histogramme représente le signal cumulé correspondant à la production de H₂O₂ pendant 40 minutes tel que nous pouvons le voir dans la Figure 17; De plus, nous avons pu constater que dès que les cellules se différencient (normalement à partir du J-10), elles produisent spontanément (sans activateur exogène) des quantités importantes de H₂O₂. Cette capacité de production augmente régulièrement jusqu'au jour 12 de culture pour ensuite diminuer. On observe également que l'addition de PMA induit une augmentation de production du H₂O₂, en adéquation avec l'activité de type NOX2 qui est dépendante de la phosphorylation de ses sous-unités cytosoliques P40, P47 et P67.

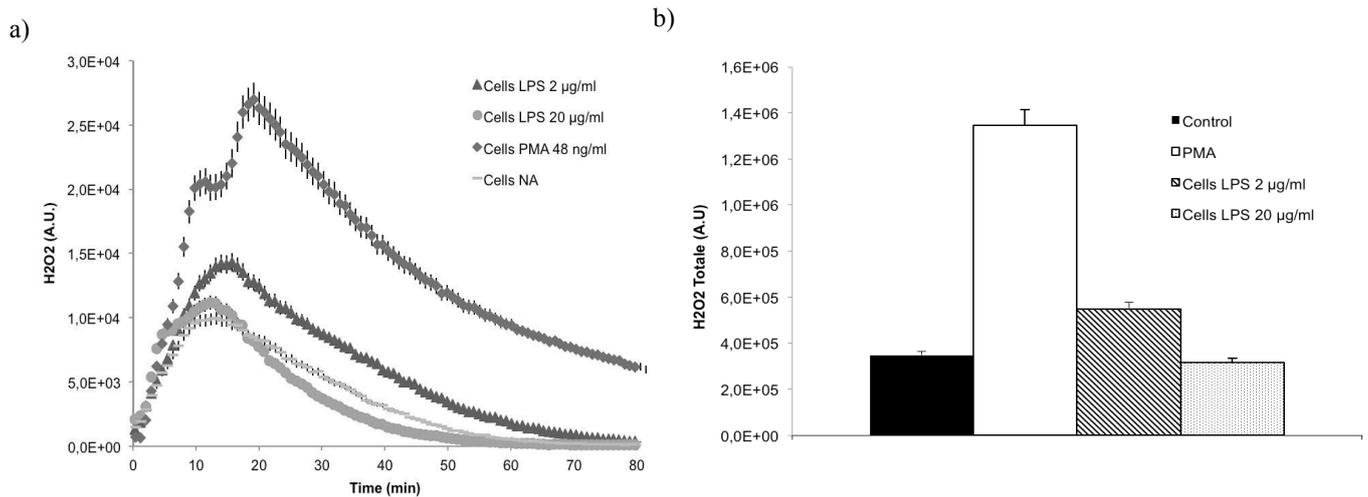


Figure 17 Caractérisation par chimioluminescence de la production de H₂O₂ après addition de PMA et de LPS

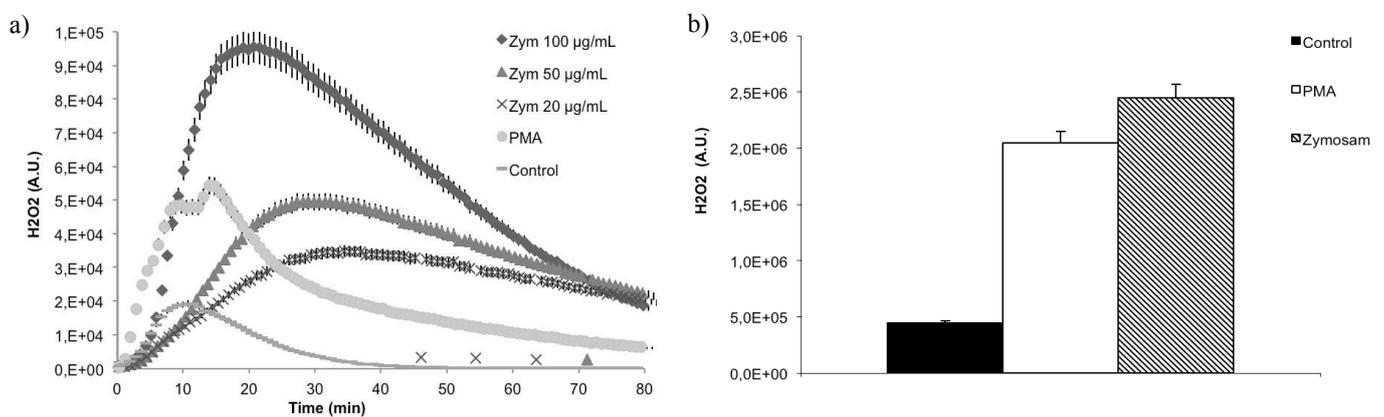


Figure 18 Cinétique de production de H₂O₂ en présence de PMA et de ZYM (mesures réalisées par chimioluminescence)

Afin d'analyser l'activité NADPH oxydase des cellules dendritiques, nous avons tout d'abord étudié l'effet de différents activateurs ou inhibiteurs sur la production des FRO par ce complexe enzymatique. Les cellules contrôles (n'ayant reçu aucun activateur) ont une activité basale qui est fortement stimulée après addition de différentes concentrations d'activateurs tels que le PMA ou le Zymosan. De plus, nous pouvons observer que la forme des courbes reflétant la production de H₂O₂ telle qu'elle est mesurée par chimioluminescence (Figure 18a) varie en fonction de l'activateur. En conclusion, nos résultats montrent une claire stimulation de l'activité de la NADPH oxydase en présence des activateurs classiques de la NADPH oxydase de type NOX2, on observe également que la cinétique de production change en fonction 1) du type d'activateur, 2) de sa concentration.

Les données obtenues à partir des différentes expériences peuvent être traitées de différentes façons, ainsi dans la Figure 18b, nous avons reporté la somme totale des signaux émis pendant toute la mesure, ce qui correspond à la quantité totale de H₂O₂ produite après addition des activateurs, c'est un type de représentation que nous utiliserons souvent et qui permet de comparer plus facilement les résultats entre eux.

Nous avons montré que l'activité oxydase peut être augmentée par l'utilisation des activateurs comme le PMA ou le ZYM. D'autres expériences montrent aussi que le LPS (lipopolysaccharide) est un activateur de NOX ; le LPS est normalement utilisé comme facteur pour induire la maturation des CD, mais comme montré dans la Figure 18, le LPS peut stimuler la production du H₂O₂ lorsqu'il est ajouté juste avant le début des mesures de luminescence, Quel que soit l'activateur (PMA, ZYM, LPS,...) et dans nos conditions expérimentales, il n'y a pas de maturation des cellules, en effet, une telle activation requière au moins 15 heures d'incubation, nous ne mesurons ici que des effets directs du LPS sur l'activité de production de H₂O₂ par le système enzymatique NADPH oxydase.

Au cours de nos expériences, nous avons testé d'autres activateurs afin d'analyser l'influence de différentes molécules sur la production de H₂O₂ par les CD : le peptide W6 (peptide qui interagit avec les récepteurs de chimiotactismes de type C3a, C5a ou FMLP) ainsi que le facteur d'activation des plaquettes « PAF ». Les Figure 19a et Figure 20a représentent les cinétiques de production de H₂O₂ obtenues en présence de ces composés : les stimulations de production sont, dans ces conditions, beaucoup plus rapides qu'avec le PMA, le ZYM ou le LPS ; la courbe

de production de H₂O₂ après injection de W6 présente un aspect bi-phasique, avec un premier pic qui dure environ 4 minutes, puis un second donc la durée est plus importante. L'addition de PAF provoque également une production importante de H₂O₂ avec une cinétique en deux phases, un premier optimum avec une durée approximative d'une minute puis une seconde phase plus longue.

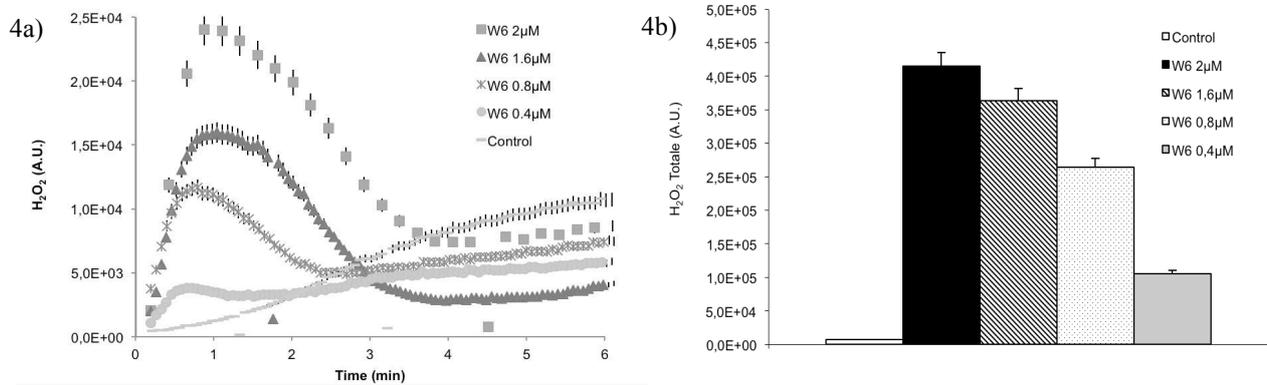


Figure 19 Stimulation de la sécrétion de H₂O₂ par les CD en présence du peptide W6 (mesures réalisées par chimioluminescence).

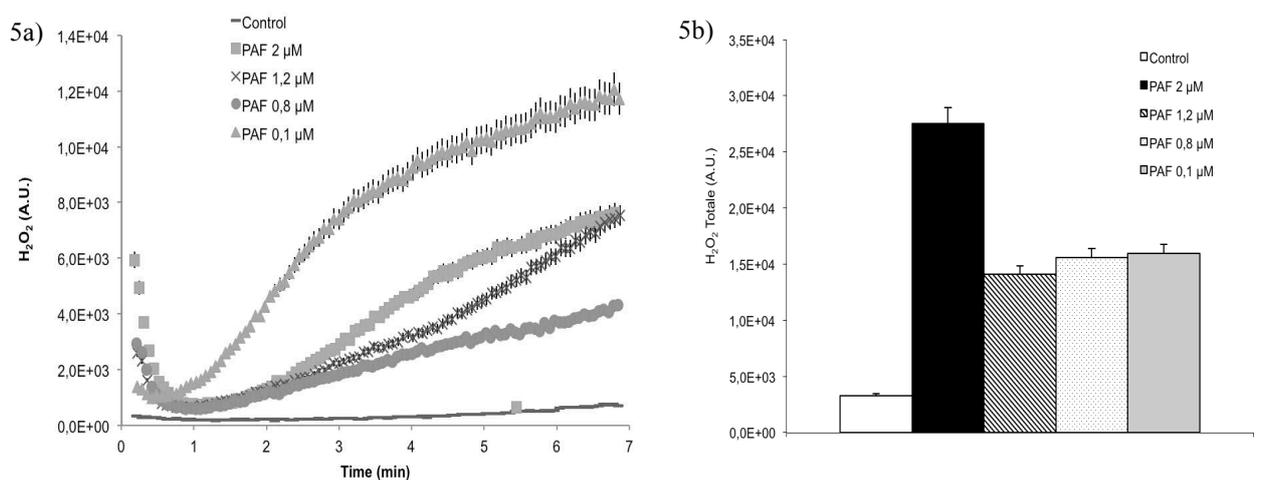


Figure 20 Stimulation de la sécrétion de H₂O₂ par les CD en présence du PAF (mesures réalisées par chimioluminescence).

Les histogrammes (Figure 19b et Figure 20b) montrent que la quantité totale de H₂O₂ mesurée pendant les premières phases de chacune des cinétiques est directement fonction de la dose de l'activateur ajouté. La seconde partie de nos courbes correspond à la production basale de H₂O₂ que nous observons systématiquement avec les cellules dendritiques.

1.5.2 Effet synergique des activateurs de NOX.

Nous avons déjà montré que le LPS entraîne des changements dans l'activité oxydase de NOX2, et ce jusqu'à des concentrations aussi importantes que 20 $\mu\text{g/ml}$. Dans un second temps, nous avons étudié l'effet du LPS sur la production de FRO induite par d'autres activateurs.

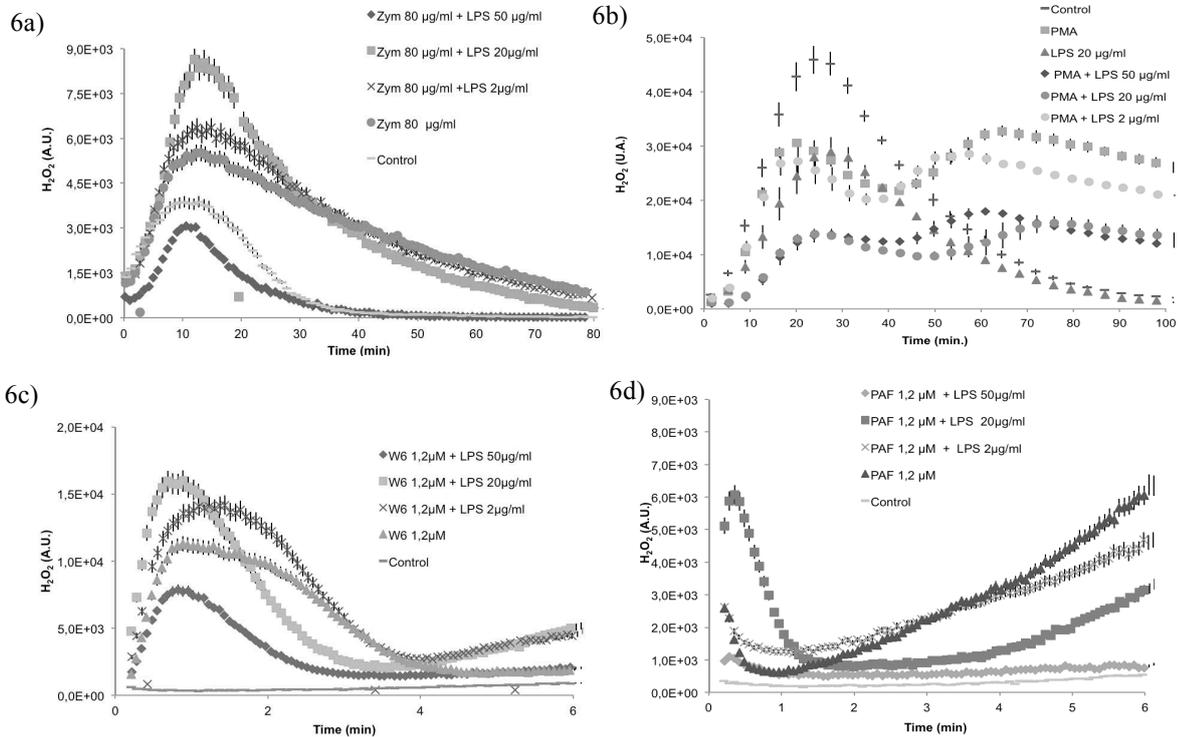


Figure 21 Effet synergique du LPS et des activateurs NOX

Les courbes de production de H_2O_2 par les CD correspondant à une double stimulation, LPS et activateur de NOX sont représentées Figure 21.

La production de H_2O_2 induite par les différents activateurs que nous avons testés (Zym, W6 ou PAF), est modifiée par l'addition de LPS et cet effet dépend de la concentration de LPS ajoutée, nous pouvons voir que la production de H_2O_2 induite par le Zym est augmentée si l'expérience est réalisée en présence de LPS et cet effet est dépendant de la concentration du LPS (sécrétion plus importante avec 20 $\mu\text{g/ml}$ qu'avec 2 $\mu\text{g/ml}$, mais dans le cas des fortes concentrations (50 $\mu\text{g/ml}$), nous avons constaté une inhibition de la production de H_2O_2 . Des résultats tout à fait similaires sont observés lorsque la production de H_2O_2 est induite par addition de W6 ou de PAF (Figure 21c et d) : le LPS de 2 à 20 $\mu\text{g/ml}$ induit une production plus importante de H_2O_2 alors qu'à 50 $\mu\text{g/ml}$ nous avons inhibition de l'effet activateur. A

l'opposé, le PMA (Figure 21b), ne suit pas la même influence fonctionnelle : quand le LPS est utilisé à faible concentration (2 µg/ml), l'effet est presque nul sur la stimulation de production de H₂O₂ induite par le PMA alors que les concentrations plus élevée (20-50 µg/ml) ont un effet inhibiteur.

1.5.3 Effet de différents inhibiteurs sur la production du H₂O₂ par les CD

Nous avons testé les effets de deux inhibiteurs sur la production de H₂O₂ : le DPI et l'azide, ces molécules sont connues respectivement pour bloquer les mécanismes de production de H₂O₂ par les NOX et pour inhiber la chaîne respiratoire mitochondriale.

La production de H₂O₂ après addition des inhibiteurs, est représentée sous forme d'histogramme Figure 22, ce qui correspondant à la quantité totale du H₂O₂ produit. On observe clairement un effet sur la production du H₂O₂ : les deux inhibiteurs induisent une diminution significative du H₂O₂ produit, les tests réalisés à deux concentrations différentes de chaque inhibiteur montrent deux niveaux d'inhibition : partielle ou totale de la production du H₂O₂.

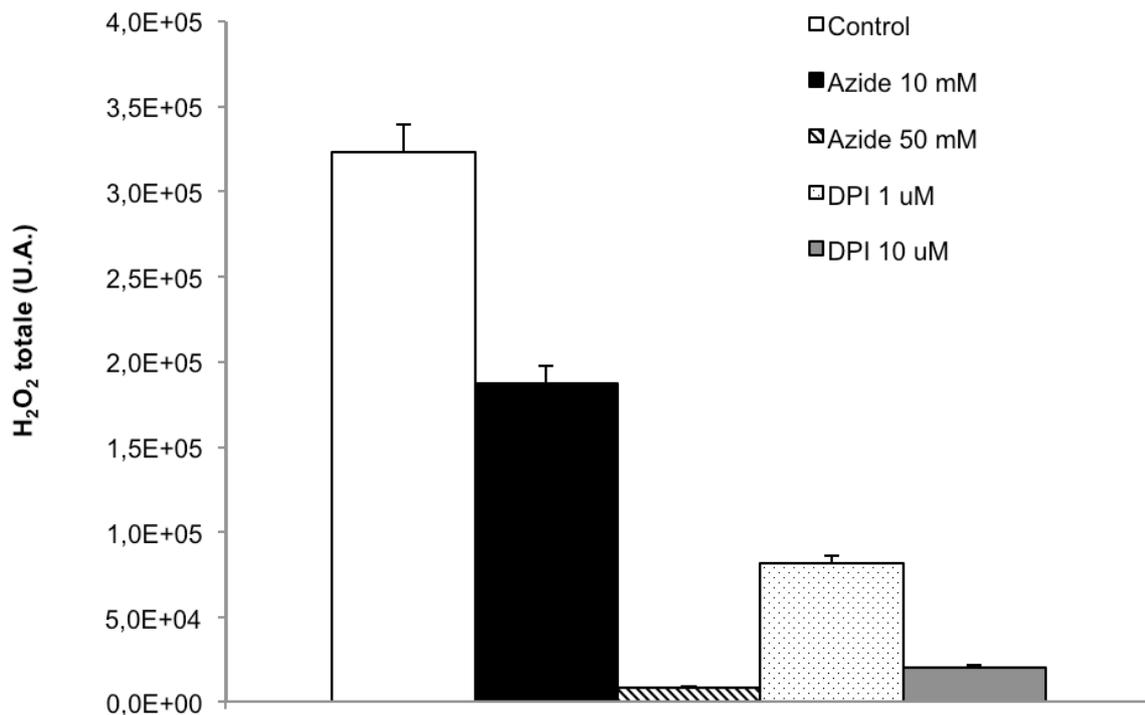


Figure 22 Effet de différents inhibiteurs sur la production de H₂O₂ par les CD

1.5.4 Mesure de la production de O_2^- par les CD.

Jusqu'à maintenant, nous avons caractérisé la production de H_2O_2 par les cellules dendritiques, or les NADPH oxydase de type NOX2 produisent du super-oxyde d'oxygène (O_2^-) qui n'est qu'ensuite transformé en peroxyde (H_2O_2). Nous avons donc caractérisé la production de O_2^- par les cellules dendritiques, pour cela nous avons employé la technique de réduction du nitrobleu tetrazolium ou NBT, les résultats obtenus sont présentés Figure 23.

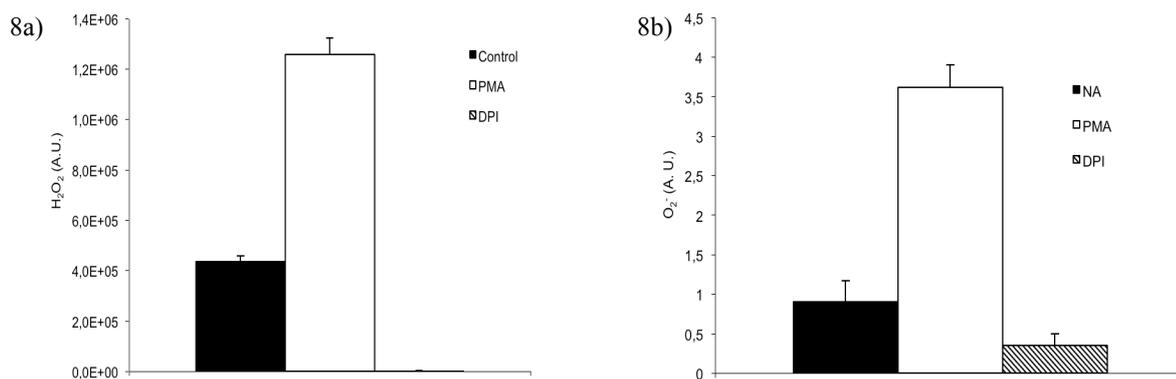


Figure 23 Analyse de la production par les CD de H_2O_2 (mesure par chimioluminescence) et de O_2^- (mesure en présence de NBT)

Nous comparons ici les productions des cellules dendritiques en H_2O_2 (Figure 23a) et en O_2^- (Figure 23b) ; bien évidemment, les système de mesure ne permettent pas de quantifier exactement chacune des espèces produites, cependant on peut observer que les courbes obtenues sont très similaires avec une production basale (c'est-à-dire sans stimulation) non négligeable contrairement à ce qui est observé pour des neutrophiles par exemple, où la production de base est nulle. Dans les deux cas, la production est fortement stimulée après addition de PMA ou inhibée en présence de DPI.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les cellules dendritiques peuvent avoir deux états différents (immature et mature) qui se traduisent par des phénotypes différents et des activités biologiques différentes : le passage de l'état immature à l'état mature est obtenu par incubation des cellules pendant 24 heures en présence d'un activateur comme le LPS. Nous avons analysé la capacité des deux états des cellules dendritiques à produire du H_2O_2 et du O_2^- . Les résultats obtenus sont

présentés Figure 24 ; on peut observer que les productions de H₂O₂ (Figure 24a) par les CD immatures (symboles noirs) et par les cellules matures (symboles blancs) ne présentent pas de différence significative à l'état basal, ainsi qu'après addition de PMA, dans les deux cas la production de H₂O₂ est fortement stimulée mais là encore des productions de H₂O₂ globalement similaires entre cellules matures et immatures.

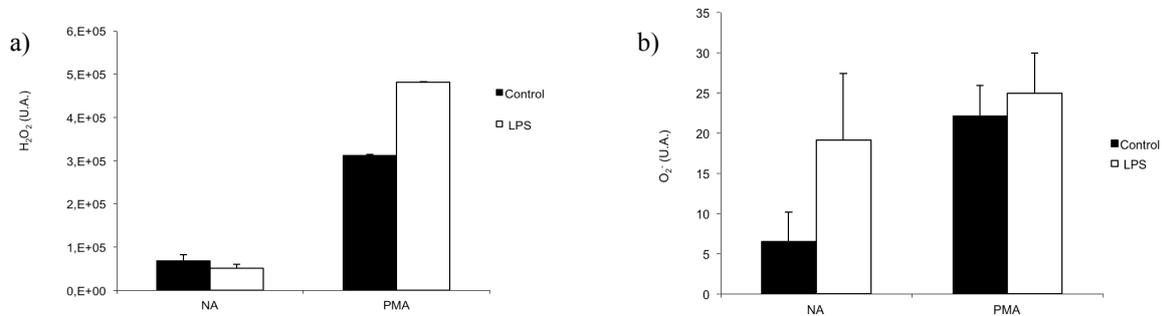


Figure 24 Différences de production des FRO dans les CD immatures et matures (incubées en présence de LPS a) Mesure de H₂O₂ par chemiluminescence, b) Mesure de O₂⁻ en présence de NBT.

La production de O₂⁻ (Figure 24b) a été analysée avec des cellules qui ont été soumises aux mêmes conditions expérimentales : contrairement à ce que nous avons observé dans le cas de la production de H₂O₂ (Figure 24a), le O₂⁻ est produit en plus grande quantité dans les cellules matures que les cellules immatures, par contre, lorsque le PMA est ajouté, nous n'observons pas d'effet majeur sur la production du super-oxyde.

1.6 Nanoparticules et stress oxydant dans les CD.

Les CD constituent une première ligne de défense de l'organisme contre toute intrusion et de ce fait, elles sont localisées en périphérie : épithélium pulmonaire, intestinal ou peau, là où se trouve tout élément étranger. Elles ont la charge d'éliminer tout pathogène, elles ont donc une très forte capacité d'endocytose.

Dans le cadre d'un programme européen où nous devons analyser l'impact des nanoparticules sur le système immunitaire, nous avons étudié l'impact de tels éléments étrangers sur le fonctionnement de la NADPH oxydase.

Les NP testées dans nos expériences font partie de différents programmes dont certains ont pour finalité leur utilisation pour des diagnostics ou des traitements médicaux.

Tableau 7 Types et caractéristiques des nanoparticules testées.

Nanoparticule	Matériaux	Caractéristiques	Usage potentiel	Référence
P601	Ferri-cobalt	Propriétés magnétiques, grâce à son cœur métallique. Propriétés super paramagnétiques qui évitent des auto-agglomérations.	L'imagerie par résonance magnétique, catalyse, nano fluides, biomédecine, etc.	(Mariani et al., 2011)
Au	Or	Propriétés optiques uniques, capables d'absorber et disperser la lumière avec efficacité. Elles peuvent être fonctionnalisées par différence de charge ou avec des groupes thiol-or.	Imagerie biomédical, thérapie du cancer, thérapie cellulaire et thérapie génique.	(Uehara, 2010)
Gadolinium	Gadolinium	Cœur en gadolinium, agent de contraste qui est très rapidement secrété par l'organisme.	Imagerie par Résonance Magnétique. Imagerie par fluorescence.	(Bridot et al., 2007)

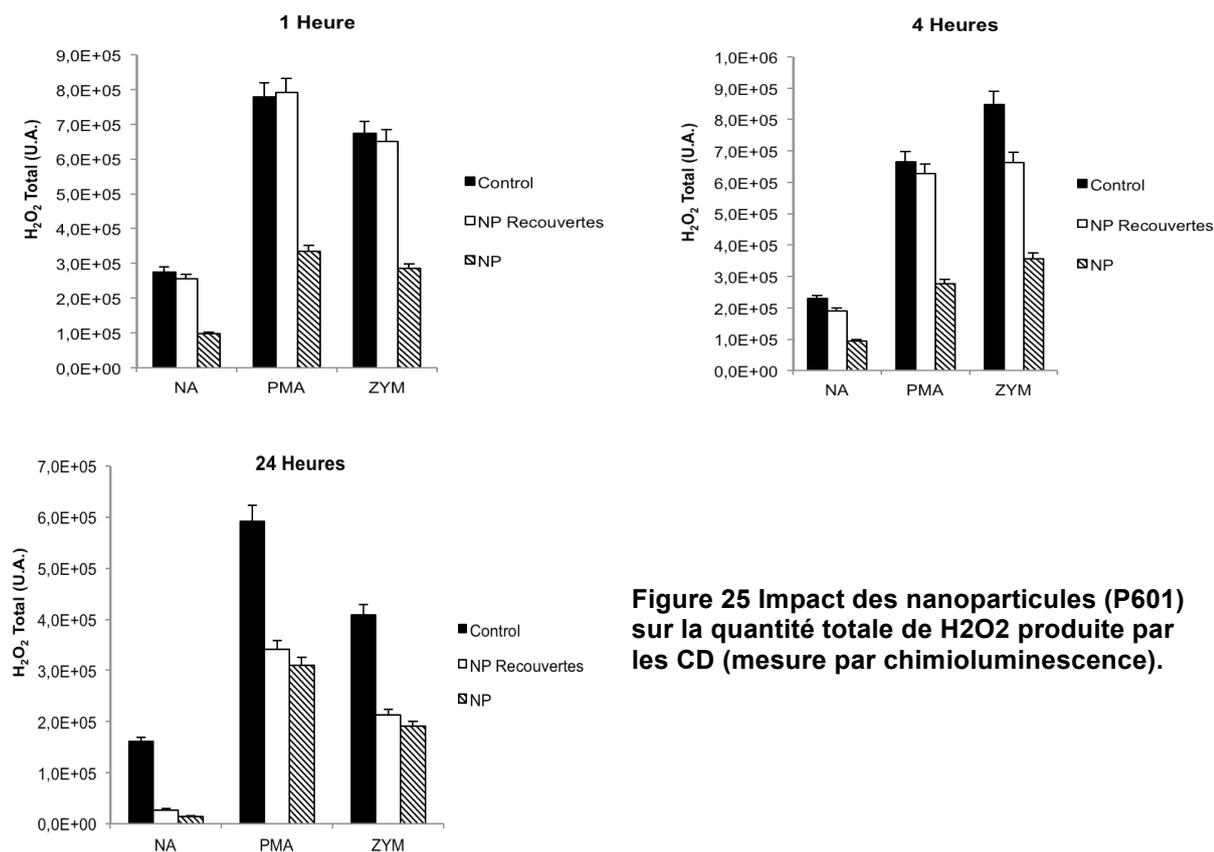


Figure 25 Impact des nanoparticules (P601) sur la quantité totale de H₂O₂ produite par les CD (mesure par chimioluminescence).

1.6.1 Effet des NP P601 sur la production de H₂O₂ par les CD

Les cellules ont été cultivées en présence des nanoparticules de type ferri-cobalt à une concentration de 3% (P/V) recouvertes ou non par de la BSA (bovine sérum albumine), après une incubation de 1, 4 ou 24 heures, la capacité des cellules à produire des radicaux oxygénés a été mesurée par chimioluminescence. Comme illustré Figure 25, dès 1 heure d'incubation, nous observons une diminution très importante du signal de chimioluminescence, quand les CD sont incubées avec les NP dites « nues » (sans pré-incubation avec une protéine) et pas dans le cas des NP recouvertes avec de la BSA.

1.6.2 Effet des NP d'or et de Gadolinium sur la production de H₂O₂ par les CD

Les résultats présentés dans le chapitre précédent démontrent a priori que les nanoparticules ont un effet négatif sur l'activité oxydase des CD ; comme il existe différents types de NP et qu'elles peuvent être constituées de différents matériaux ; nous avons voulu vérifier si l'effet obtenu était spécifique à un type de NP ou était récurrent indépendamment du type de NP.

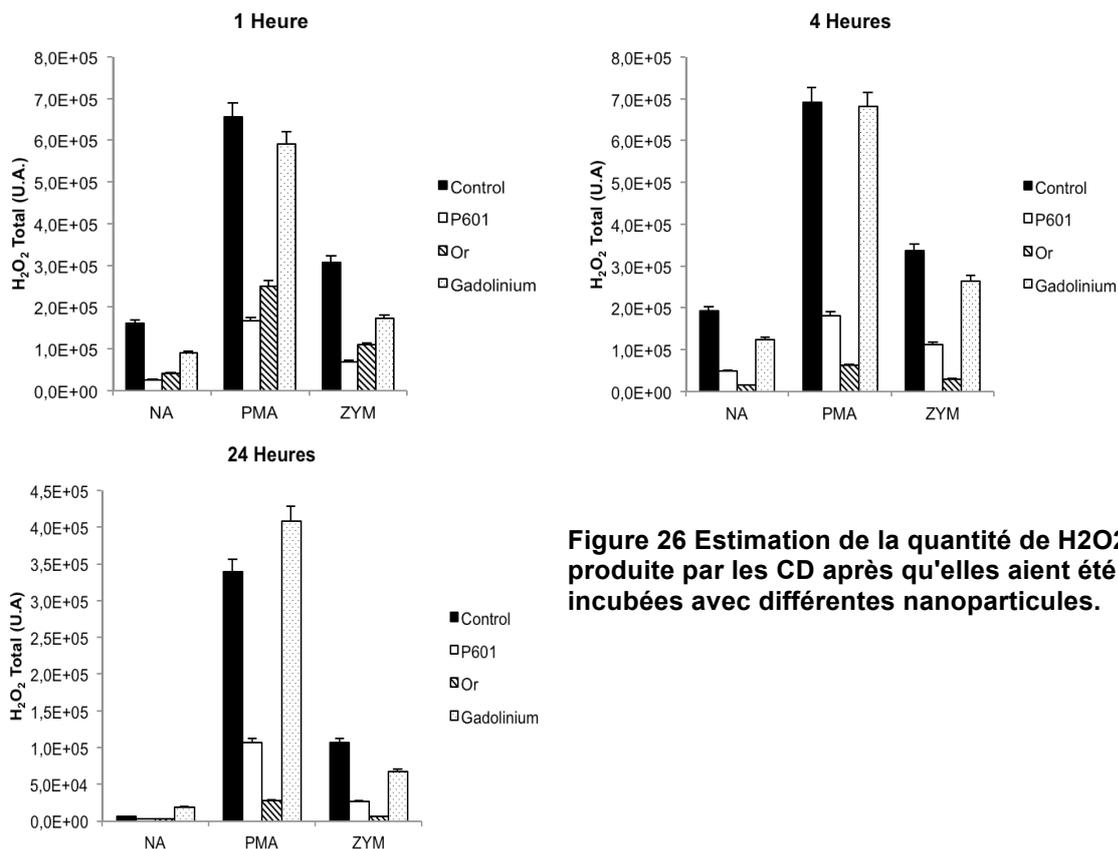


Figure 26 Estimation de la quantité de H₂O₂ produite par les CD après qu'elles aient été incubées avec différentes nanoparticules.

La Figure 26 représente les résultats obtenus pour la quantification du H₂O₂ produit par les CD lorsque les cellules sont mises en contact avec les différentes NP testées : ferri-cobalt (P601 « nues »), Or (Au) et gadolinium. Nous pouvons observer que la présence de la plupart des NP entraîne un effet inhibiteur sur le signal de chimioluminescence qui est mesuré, sauf dans le cas du gadolinium mais pour lequel, nous travaillons à des concentrations de nanoparticules plus faibles (ce choix résulte de contraintes techniques imposées par la faible concentration d'origine des matériaux) ces conditions n'entraîne apparemment pas de modification de la sécrétion de H₂O₂ et donc de la chimioluminescence mesurée.

1.6.3 Masquage de la luminescence et fluorescence par les NP phagocytées par les CD.

Au cours de ces différents tests, nous avons remarqué que les nanoparticules interagissaient très fortement avec les cellules, soit par fixation directe sur les membranes cellulaires soit par phagocytose, de plus nous avons montré que les NP, une fois endocytées, restaient à l'intérieur des cellules, les NP sont alors visibles au microscope et forment des agrégats opaques à l'intérieur des cellules. Une question importante se posait alors : est-ce que la diminution de la chimioluminescence était le résultat d'un réel effet des NP sur les CD ou bien la conséquence d'un masquage de la lumière générée au cours de la mesure de la chimioluminescence.

En effet, nous avons observé (Figure 27) que la luminescence détectée, diminue quand on augmente la concentration des nanoparticules lors de leur incubation avec les CD, une telle diminution pouvant provenir soit d'un réel effet inhibiteur des NP sur l'activité oxydase, soit d'une perturbation directe de la mesure physique par les nanoparticules : la méthode utilisant la quantification de la lumière émise lors de la réaction enzymatique entre le luminol, le H₂O₂ et la peroxydase.

Si la chimioluminescence est sans doute, la technique la plus souvent utilisée pour la mesure des sécrétions de H₂O₂, ce n'est pas la seule existante, l'amplex red (AR) est aussi un réactif permettant de doser le H₂O₂, la réaction chimique entraîne la formation d'un composé fluorescent avec un optimum de fluorescence à 540 nm. Une caractéristique importante de l'AR est de ne pouvoir interagir qu'avec les molécules de H₂O₂ situées à l'extérieur des cellules, à la différence du luminol qui

est capable de traverser les membranes cellulaires et donc de permettre la détection simultanée du H₂O₂ intra et extracellulaire.

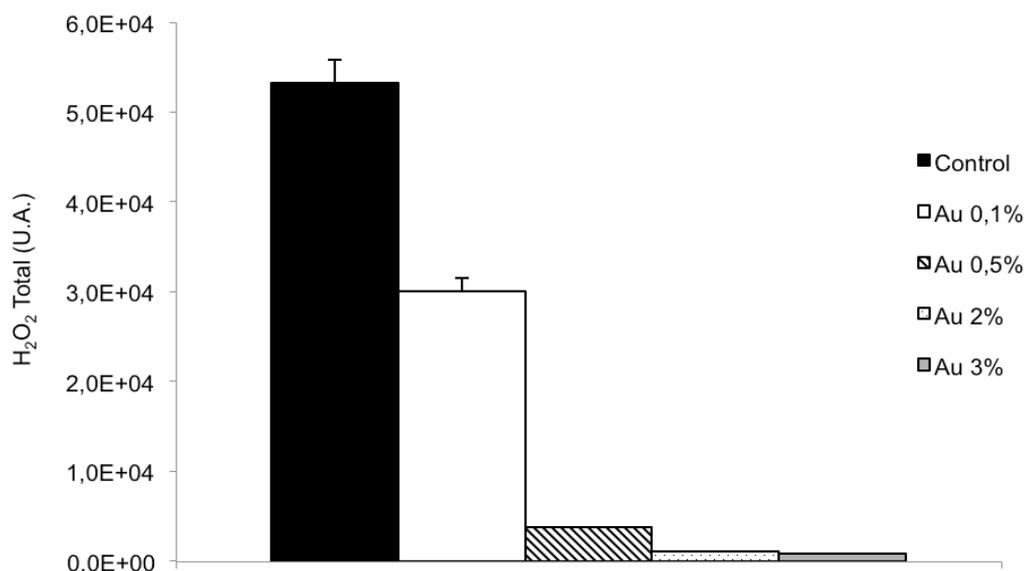


Figure 27 H₂O₂ Total produit par les CD incubées avec différentes concentrations des nanoparticules d'or

La synthèse de nos résultats est présentée Figure 28, afin de mieux les comprendre ces données, il faut rappeler que la chemiluminescence est un phénomène transitoire au contraire de la fluorescence qui, une fois la molécule fluorescente produite, peut être quantifiée ultérieurement, nous nous sommes servi de cet avantage pour doser en continu la production de sondes fluorescentes au cours de l'incubation avec les cellules puis nous avons éliminer les cellules par centrifugation puis remesuré la fluorescence afin de réaliser une lecture où toute perturbation induite par ces mêmes cellules serait éliminée. La Figure 28a présente les résultats obtenus après incubation des cellules pendant 1 heure avec l'AR, ces cellules ayant au préalable été au contact des nanoparticules pendant 1, 4 ou 24 heures. Après centrifugation et élimination des cellules, la fluorescence du milieu est à nouveau mesurée et les résultats sont présentés Figure 28b. Nous pouvons voir que l'inhibition de fluorescence observée lorsque les cellules ont été incubées avec les nanoparticules disparaît totalement lorsque les cellules sont éliminées au moment de la mesure : ces résultats valident notre hypothèse du masquage par les NP de la chimioluminescence ou de la fluorescence lorsque ces dernières sont à l'intérieur ou

à l'extérieur (après interaction avec les membranes cellulaires) des CD. Ces expériences ont été refaites avec les différentes particules utilisées dans nos programmes (gadolinium et ferri-cobalt (P601)), les résultats sont résumés Figure 29 l'inhibition observée lors des mesures avec les cellules (Figure 29a) disparaît en très grande partie après élimination des cellules (Figure 29b). En conclusion, les très légères différences observées ne sont pas significatives et nous considérons et nous conduisent à penser que les nanoparticules n'ont finalement aucun effet sur la capacité des cellules dendritiques à produire du H₂O₂.

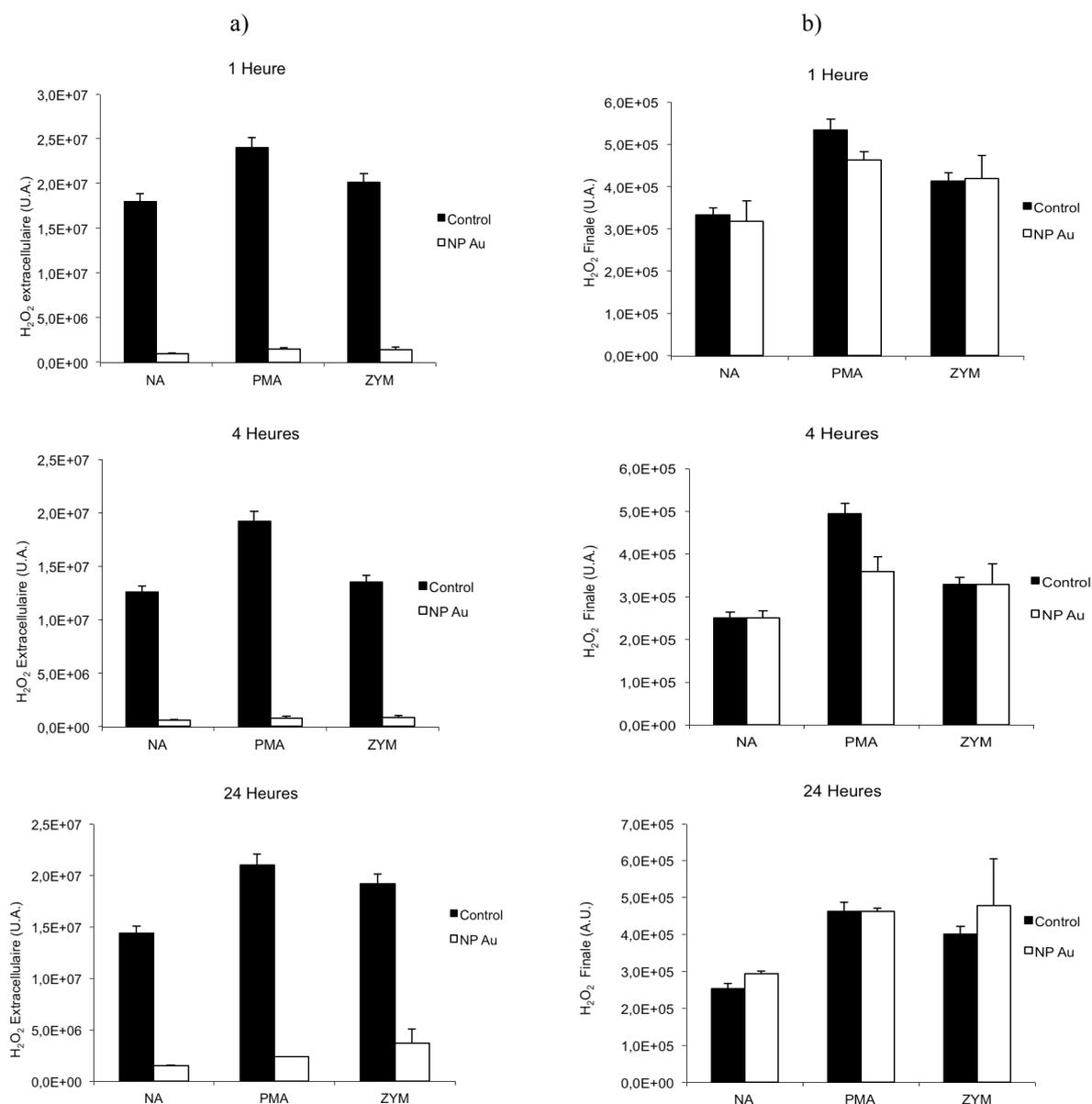


Figure 28 Fluorescence par amplex red, analyse de la production du H₂O₂ extracellulaire par les CD

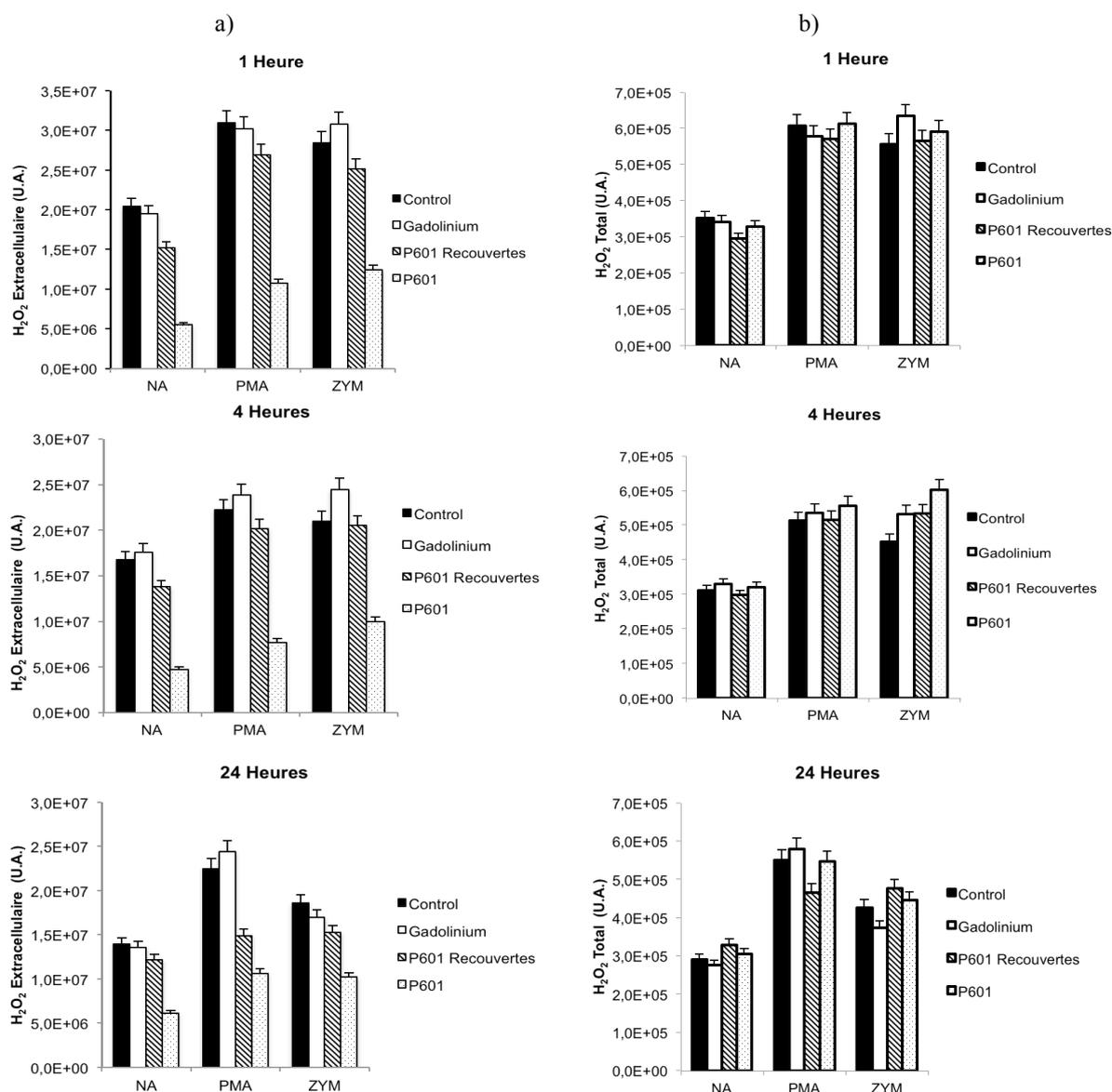


Figure 29 Mesure de la production de H₂O₂ par fluorescence (Amplex Red) par les CD après incubation en présence de NP de gadolinium ou de ferri-cobalt (P601). *a) fluorescence d'ampless red finale avec nanoparticules, et b) fluorescence d'ampless red finale sans nanoparticules*

1.7 Maturation des CD, effets phénotypiques

1.7.1 Analyse par cytométrie en flux de la maturation des CD

Comme nous l'avons précédemment indiqué, les CD existent sous deux formes : cellules immatures et cellules matures. Nous avons montré que ces deux types de cellules ont des capacités différentes concernant la production de H₂O₂ et de O₂⁻. L'impact de l'activation des cellules dendritiques peut être caractérisé par cytométrie en flux, grâce aux modifications de certains des marqueurs membranaires : Nous pouvons ainsi analyser, dans une population globale de cellules lesquelles sont matures grâce à la quantification de certains marqueurs membranaires qui ne sont exprimés que par les cellules de ce type.

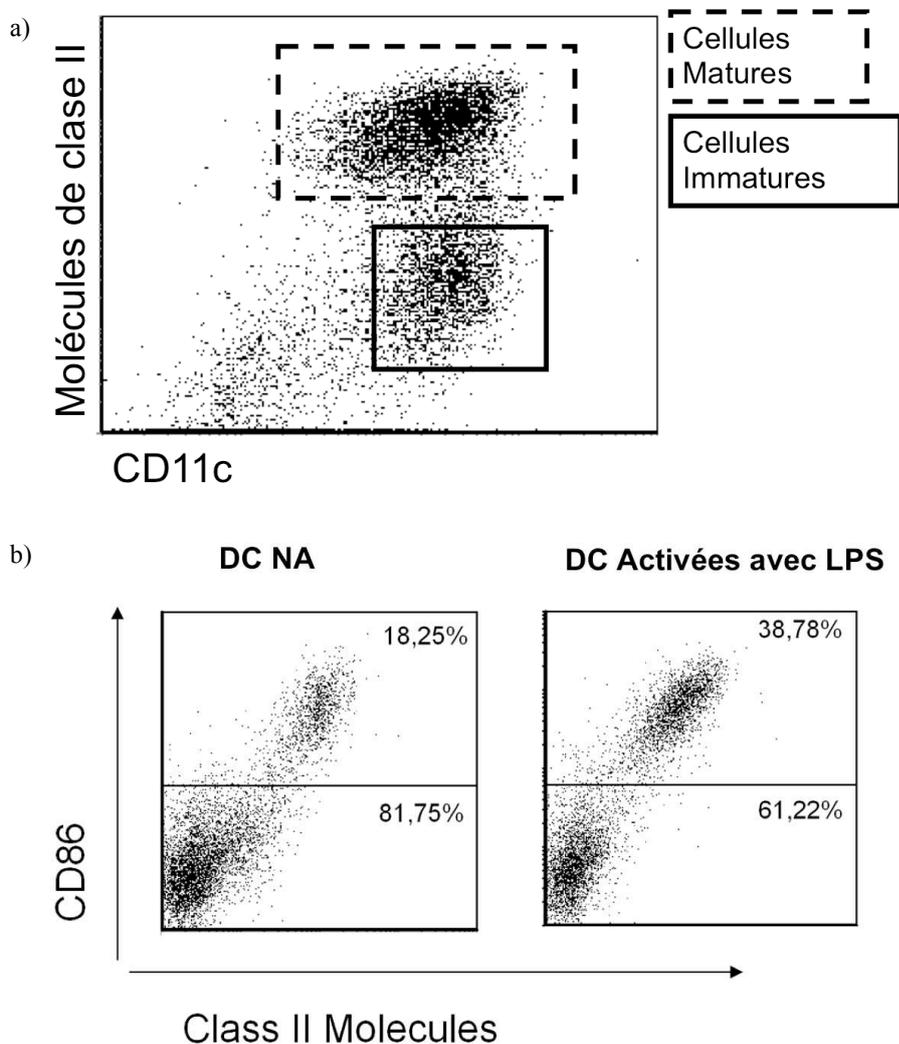


Figure 30 Analyse par cytométrie de flux des CD

Comme illustré Figure 30, nous pouvons quantifier par cytométrie en flux des CD immatures et matures : le LPS ajouté aux cellules pendant 24H est utilisé comme inducteur de la maturation, l'augmentation de la quantité de molécules de classe II (IAb) (Figure 30a), ou de molécules de co-stimulation des lymphocytes T (B7-2 ou CD86) Figure 30b permet une quantification précise des cellules dans les différents états. L'augmentation du pourcentage de cellules matures après incubation avec le LPS est montrée Figure 30b.

1.7.2 Analyse par cytométrie en flux de la production des FRO par les CD

Sur ces mêmes cellules, nous avons utilisé le DHR 123 afin de caractériser la capacité des CD à produire des formes réactives de l'oxygène, ce composé traverse les membranes cellulaires et réagit avec les FRO intracellulaires et devient ainsi fluorescent. En combinant les marquages, nous avons ainsi pu différencier les quantités de FRO produites par les CD immatures et matures.

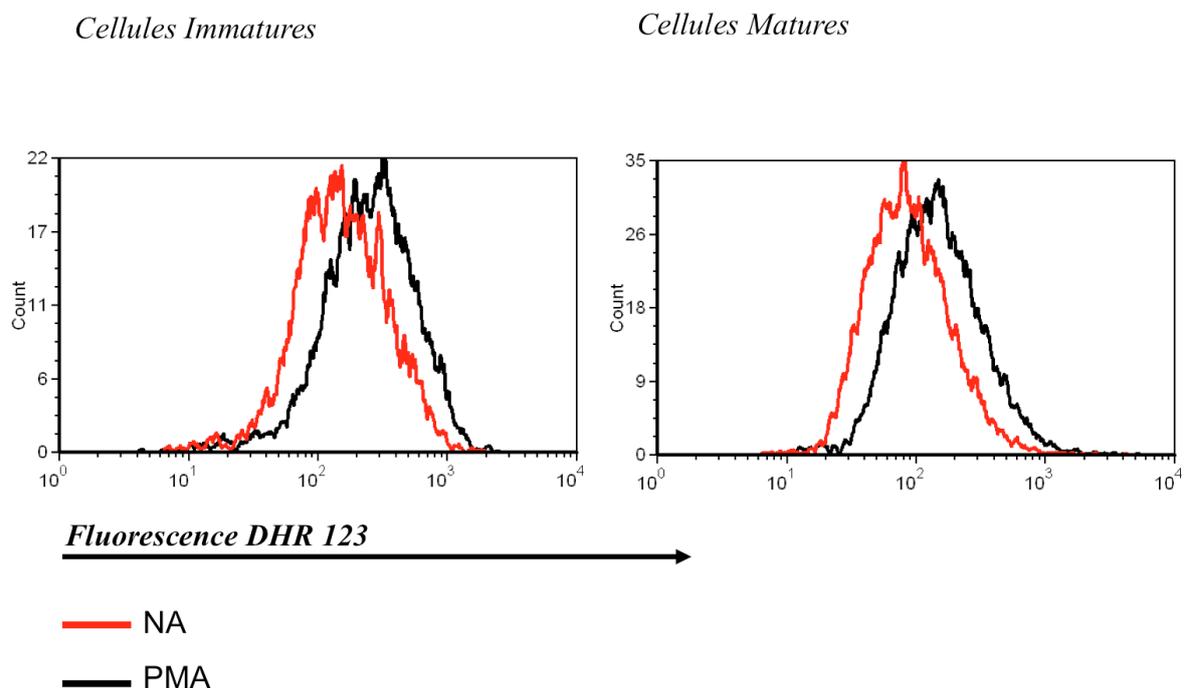


Figure 31 Détection par fluorescence (DHR 123) des FRO produites par les CD matures et immatures, effet du PMA.

Les courbes obtenues sont présentées Figure 31 et les valeurs de fluorescence (valeur moyenne des pics de fluorescence) sont résumées dans le Tableau 8. On

peut voir ainsi que les CD immatures produisent plus de FRO que les cellules matures, ce résultat diffère des analyses précédentes, où les cellules stimulées en présence de LPS produisent plus de O₂⁻ que les immatures. Il est possible que la maturation « naturelle » ou maturation non induite, observée en l'absence d'activateur conduit à des CD ne présentant pas la même régulation de l'activité des NOX que les cellules qui ont été activée en présence de LPS.

Tableau 8 Fluorescence DHR et mesure des FRO dans les CD

	Cellules Immatures	Cellules Matures
<i>NA</i>	148,55*	82,05*
<i>PMA</i>	254,83*	142,02*

**Fluorescence du DHR Unités Abstracts*

1.7.3 Effets des NP sur les CD, étude par cytométrie en flux

Grace à des mesures réalisées avec la sonde fluorescente Amplex Red, nous avons déjà montré que les NP n'entraînent pas de modification de la quantité de FRO produite par les cellules dendritiques, par contre la répartition entre les cellules immatures et matures n'avait pas encore été réalisée.

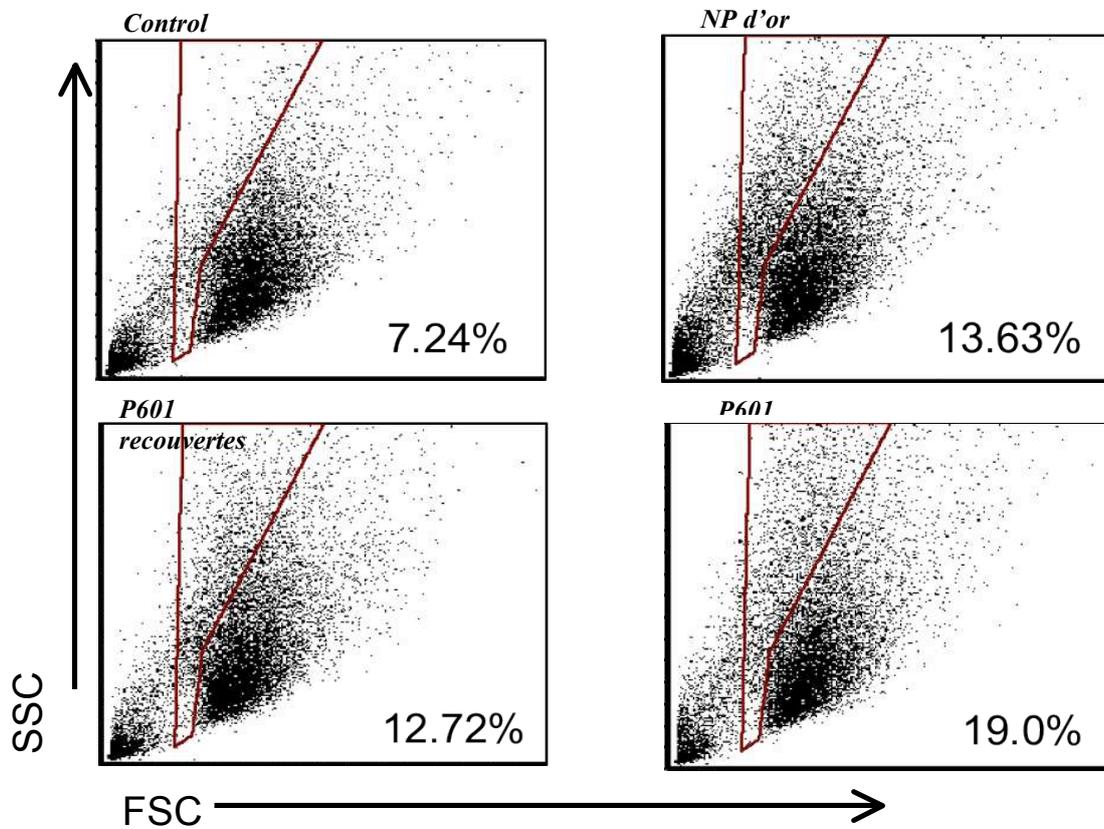


Figure 32 Augmentation de la granulosité des CD incubées avec des NP

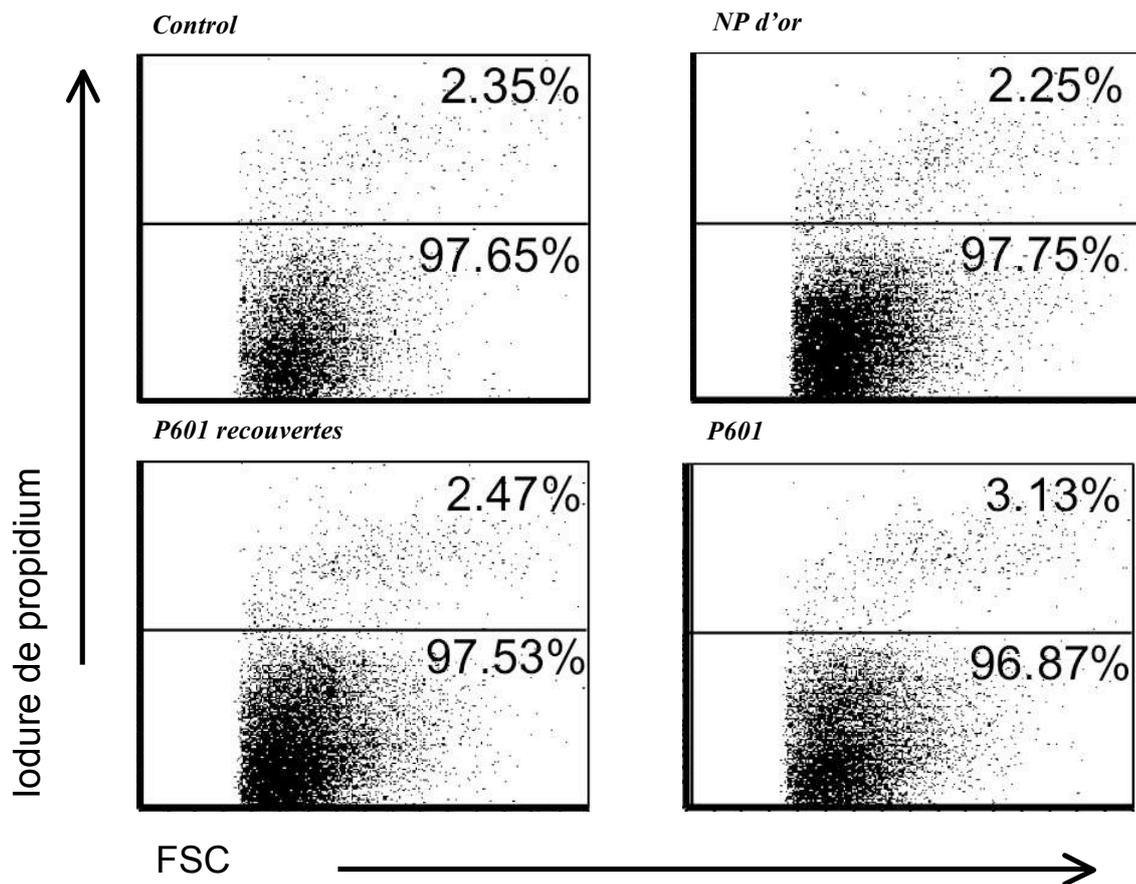


Figure 33 Mesure de la mortalité cellulaire des DC incubées avec des NP

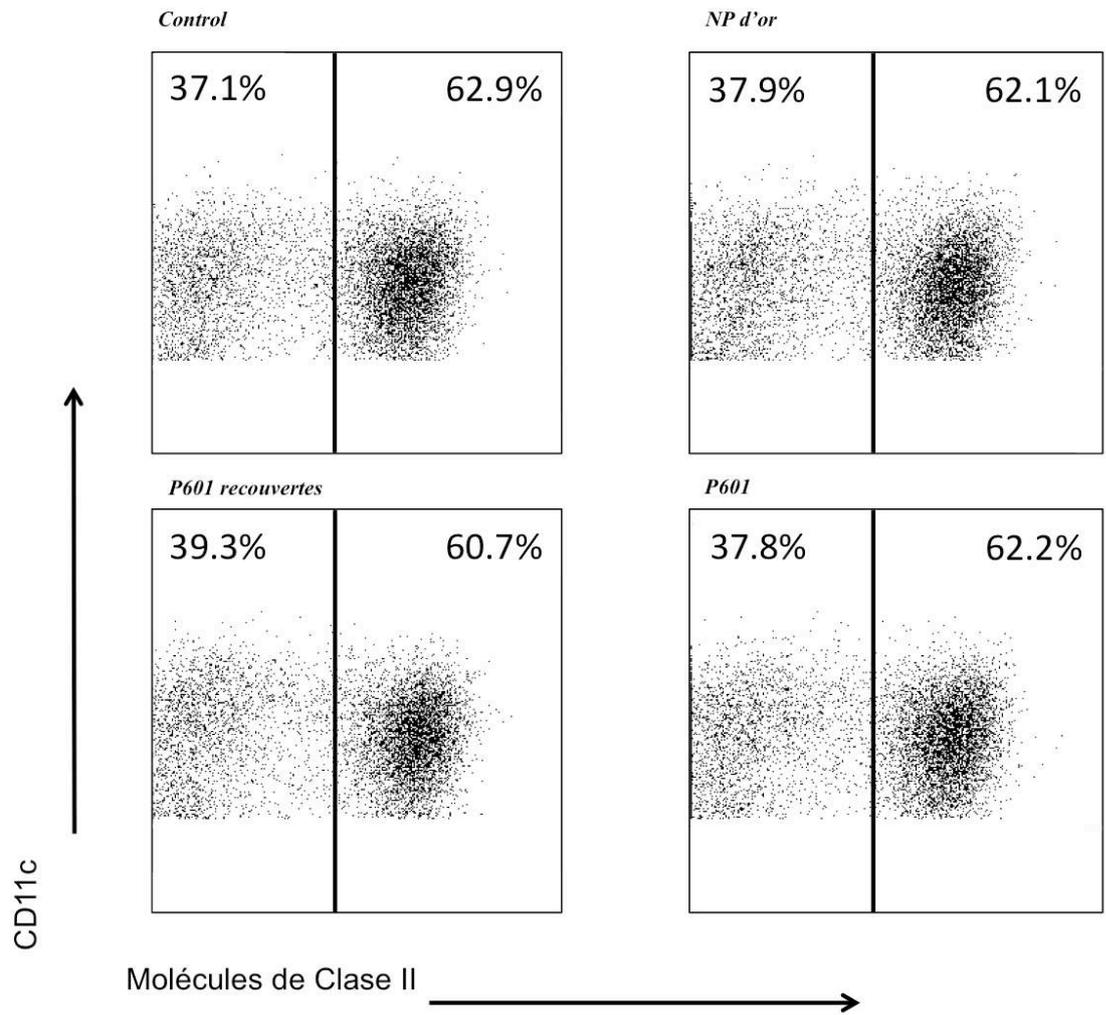


Figure 34 Effet des NP sur l'activation des CD

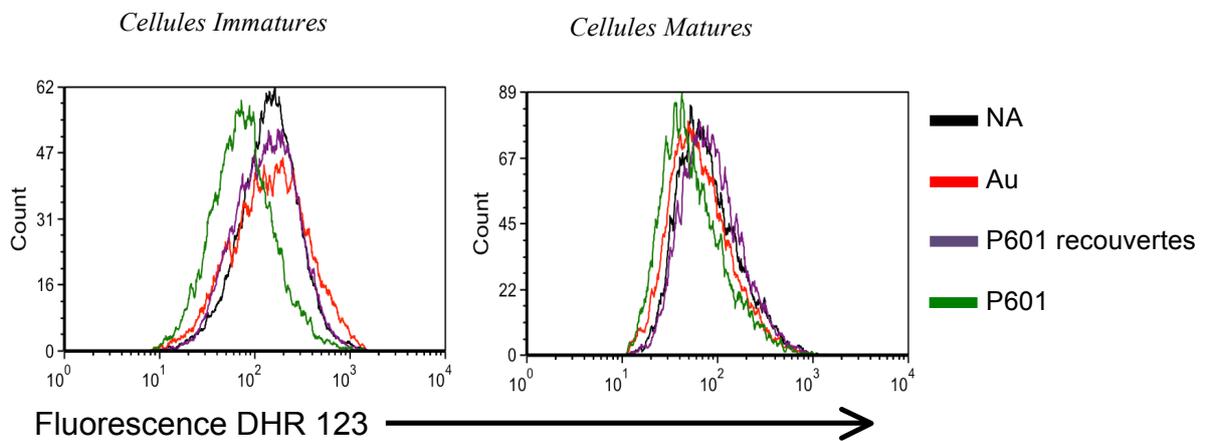


Figure 35 Mesure de la production de FRO par les CD en présence de DHR123, effet des NP.

Tableau 9 DHR Fluorescence dans DC incubées avec NP

	<i>NA</i>	<i>Au</i>	<i>P601r</i>	<i>P601</i>
<i>Immatures</i>	144.6*	147.22*	137.0*	73.65*
<i>Matures</i>	71.05*	59.89*	80.58*	48.26*

**DHR 123 Fluorescence (U.A.)*

Les analyses réalisées par cryométrie de flux présentent quelques difficultés d'interprétation. Premièrement, les cellules ayant phagocyté les NP subissent une augmentation de leur granulosité, cette augmentation est reflétée par le décalage des cellules dans la fenêtre d'acquisition ; on peut observer dans la Figure 32 que le pourcentage des cellules ne répondant pas aux critères de formes classiques des CD augmente quand les cellules sont incubées avec des NP. Ce phénomène est vraisemblablement dû au fait qu'après leur internalisation, les NP induisent une augmentation de la granulosité moyenne des cellules. Afin d'analyser la mortalité cellulaire en présence des NP, celles-ci sont incubées en présence d'un fluorochrome intercalant de l'ADN : l'Iodure de Propidium. Nous pouvons observer dans la Figure 33 que les très faibles variations de fluorescence de l'Iodure de Propidium qui sont observées suite aux différents tests ne sont pas significatives. Ces résultats nous permettent d'affirmer qu'il n'y a pas de mortalité cellulaire induite par la présence des NP. Suite à ces résultats, nous avons voulu analyser si les NP induisaient l'activation des CD : en effet, ces cellules sont très sensibles aux facteurs externes, elles auraient donc pu s'activer en réaction à la présence des NP. Les effets des NP sur les CD sont présentés Figure 34. Le pourcentage de cellules qui expriment les molécules de classe II ne change pas significativement après incubation avec des NP en comparaison de ce qui est mesuré avec les CD contrôle. Les effets d'une incubation des CD avec les NP sur leur capacité à produire des FRO sont représentés dans la Figure 35 et le Tableau 9. Les variations de fluorescence ne semblent pas significatives et ne suivent pas un profil défini : nos expériences ont donné des valeurs très diverses. Nous ne pouvons pas, par conséquent, établir si les NP ont un réel impact sur la production des FRO à l'intérieur des cellules ; ce qui

pourrait résulter d'une absorption de la lumière par les NP (dans le cas notamment de l'or) ; cette capacité pouvant interférer avec la mesure de la fluorescence de sondes intracellulaires par cryométrie en flux.

Des analyses subséquentes ont confirmé nos résultats concernant l'activation des CD par les NP et ont révélé que les NP n'induisaient aucune activation cellulaire significative (Tableau 10). A partir des différents pourcentages de cellules matures à 1, 4 et 24 heures d'incubation, nous pouvons estimer que dans ces conditions, les NP n'ont pas d'influence sur l'état d'activation des CD, les quelques variations observées ne sont pas significatives.

Tableau 10 Effets des NP sur le pourcentage des CD matures et immatures

	<i>NA</i>	<i>Au</i>	<i>P601r</i>	<i>P601</i>
<i>Immatures</i>	29.16%	27.94%	23.09%	29.49%
<i>Matures</i>	70.84%	72.06%	76.91%	70.51%

Pourcentage des cellules par rapport au total des CD11c+ IAb+ ou IAb-

Afin d'analyser si les NP peuvent modifier l'équilibre oxydo réducteur dans les CD, nous avons utilisé une autre approche basée sur la modification de fluorescence du monochlorobimane (MCB) : cette molécule réagit avec le glutathion (GSH) réduit et forme un complexe fluorescent. Le GSH est une des molécules qui intervient dans les mécanismes oxydo-réducteur, sa capacité à protéger les cellules d'un stress oxydant est bien connue (Dröge, 2002) et la modification du rapport GSH/GSSG reflète le stress oxydatif subi par les cellules. Cette méthode nous permet donc de quantifier le GSH réduit intracellulaire, malheureusement les NP ayant été phagocytées perturbent la mesure de fluorescence dans la cellule et par conséquent, de faux positifs et faux négatifs sont générés. Dans le Tableau 11, nous avons réunis les mesures de fluorescence réalisées lorsque les CD ont été incubées avec des NP.

Tableau 11 Analyse par cytométrie en flux du complexe GSH-MCB

	<i>NA</i>	<i>Au</i>	<i>P601r</i>	<i>P601</i>
<i>Immatures</i>	1144.44*	873.39*	865.96*	842.91*
<i>Matures</i>	1064.99*	1036.63*	835.36*	947.46*

**Monochlorobimane Fluorescence à 430 nm (Unités Abstracts)*

En résumé, nous considérons que les nanoparticules qu'elles soient incubées pendant 1, 2, 4 ou 24 heures avec les CD, n'induisent pas leur activation. L'activité oxydase des CD ayant phagocyté les NP n'est pas analysable par les méthodes conventionnelles basées sur des variations photoniques, en raison de la capacité des NP à absorber les rayons. Nous avons pu mettre en évidence une différence de fluorescence de la DHR (mesure de l'activité oxydase) entre les cellules immatures et matures sans NP (condition NA) ; nous observons que les CD immatures génèrent une réponse oxydante plus importante que les cellules qui ont subi une maturation lors de la culture, c'est à dire sans qu'il y ait eu d'addition d'inducteur de maturation comme le LPS, ces résultats sont illustrés Tableau 9 et 11 (condition NA). En effet, la fluorescence du DHR est plus importante dans les CD immatures que dans les CD matures, de même, la fluorescence du monochlorobimane dans les CD immatures est plus importante que dans les cellules matures.

Les conclusions générales de cette première partie sont les suivantes :

- 1.- Les CD sont capables de générer des FRO via un système NADPH Oxydase.
- 2.- Le système NADPH Oxydase est activable via des activateurs directs comme la PMA, et des activateurs indirects comme le zymosan, W6 ou LPS.
- 3.- Le système NADPH Oxydase est inhibable par addition d'inhibiteur des favoprotéines DPI.
- 4.- Les CD à l'état immature produisent plus de FRO que les CD à l'état mature.
- 5.- Les nanoparticules ne semblent pas avoir d'effets sur la capacité des CD à produire des FRO.

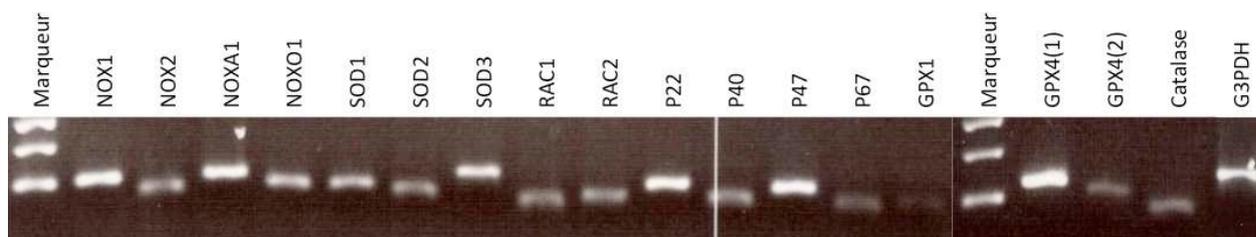


Figure 36 Image du gel d'agarose pour les amplicons des ARNm des protéines du système oxydant.

1.8 Analyse des protéines du système oxydase dans les CD

1.8.1 Etude de l'expression de protéines impliquées dans le système oxydase des CD.

Plusieurs protéines ont été décrites comme pouvant intervenir d'une façon directe (interagissant directement pour produire, contrôler et ou éliminer les FRO, comme les NOX par exemple) ou indirecte (interagissant indirectement pour produire, contrôler ou éliminer les FRO, comme les facteurs de transcription Atox1 par exemple) dans le stress oxydatif de différentes cellules. Nous avons analysé la capacité des CD à exprimer des ARNm codant pour certaines de ces protéines, de NOX1 à NOX4 (Chanock et al., 1994; G Cheng et al., 2001; Suh et al., 1999), les sous-unités de régulation NOXO1, NOXA1 (Botond Bánfi et al., 2003; Takeya et al., 2003), p22phox, p40phox, p47phox, p67phox (Ambasta et al., 2004; Koga, 1999; Wientjes et al., 1993; de Mendez et al., 1997), SOD1-3 (Fridovich, 1997), glutathion peroxydase qu'elle soit de type 1 (C. Cao, Leng, Huang, Liu, & Kufe, 2003) ou 4 (Liang et al., 2007; Yant et al., 2003), catalase (Gaetani et al., 1996), RAC1 (Ueyama et al., 2006), RAC2 (Kwong, Malech, Rotrosen, & Leto, 1993) et DUOX1 et 2 (Miklós Geiszt, Witta, Baffi, Lekstrom, & Leto, 2003).

Nous pouvons observer dans la Figure 36, les protéines pour lesquelles un résultat positif a été obtenu lors des analyses par PCR des ARNm pour les CD. Cette analyse n'est pas exhaustive ; de plus, nous ne représentons pas ici les protéines testées pour lesquelles nous n'avons pas obtenu de résultat positif dans le cas des CD tel que: DUOX1, DUOX2, NOX3 et NOX4.

Plusieurs de ces protéines ont déjà été montrées comme étant présentes dans les CD comme NOX2 et ses sous-unités (Elsen et al., 2004), mais la présence de plusieurs protéines (NOX1 et ses sous-unités ainsi que SOD3) ont particulièrement

attiré notre attention car aucune information sur leur expression par les CD n'est reportée à ce jour. Dans les chapitres suivants, nous verrons que les résultats obtenus pour l'analyse de ces protéines donnent des informations importantes sur la fonctionnalité des FRO produites par les CD.

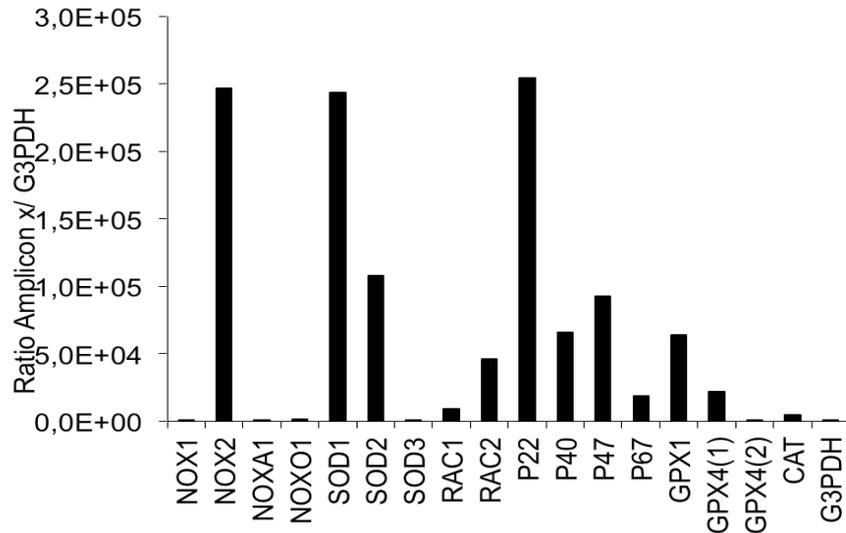


Figure 37 Taux d'expression des ARNm codant pour différentes protéines du système oxydo réducteur dans les CD

Les résultats de l'analyse des différents amplicons sont illustrés Figure 37, on remarque, par exemple, que les niveaux d'expression de NOX2, SOD1 et P22 sont plus importants que ceux des autres ARNm codant pour d'autres protéines du système oxydant ; le niveau moyen d'expression des ARNm pour les protéines SOD2, RAC1, RAC2, P40, P47, P67 GPX1, GPX4 (1 et 2) et CAT sont sensiblement équivalents, ces protéines interviennent pour une partie dans la régulation de l'activité NOX (NOX2 plus précisément) et dans le contrôle des produits de cette activité oxydase comme SOD2 qui est capable de transformer le superoxyde en peroxyde et les GPX capables de réduire le peroxyde en utilisant le glutathion comme récepteur d'électrons (Brigelius-Flohé, 1999); enfin d'autres molécules sont exprimées à un niveau faibles mais non nuls comme NOX1, NOXA1 et NOXO1 ainsi que SOD3.

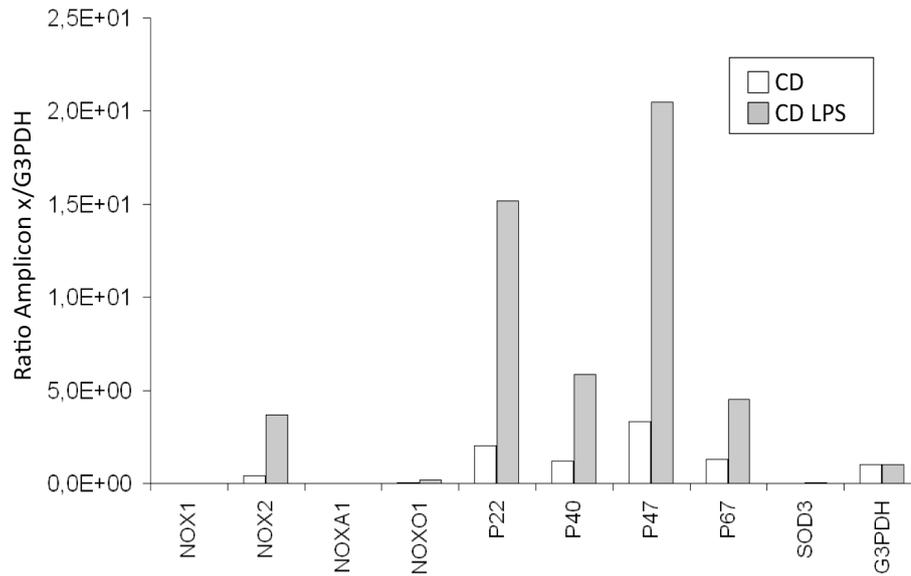


Figure 38 Histogramme de taux d'expression des ARNm codant pour des protéines du système oxydase, cellules NA et LPS

Tableau 12 Quantités relatives des ARNm codant pour différentes protéines du système oxydase

<i>Amplicon</i>	<i>CD NA</i> <i>[U.A.]</i>	<i>CD LPS</i> <i>[U.A.]</i>
<i>NOX1</i>	3.09E-04	1.66E-03
<i>NOX2</i>	4.16E-01	3.69E 00
<i>NOXA1</i>	1.72E-03	9.90E-03
<i>NOXO1</i>	2.32E-02	1.65E-01
<i>P22</i>	2.02E 00	1.52E 01
<i>P40</i>	1.22E 00	5.84E 00
<i>P47</i>	3.31E 00	2.05E 01
<i>P67</i>	1.27E 00	4.51E 00
<i>SOD3</i>	9.83E-03	3.70E-02
<i>G3PDH</i>	1.00E 00	1.00E 00

Nous avons également déterminé par qPCR, la quantité d'ARNm exprimé par les cellules matures (incubées pendant 24 H en présence de LPS), résultats que nous avons comparé avec ceux obtenus avec les cellules immatures. Les résultats nous

montrent que, non seulement, les protéines du système oxydant trouvées dans les cellules immatures sont également exprimées dans les cellules matures mais que de plus elles sont augmentées (Figure 38). Le Tableau 12 résume les quantités obtenues pour les amplicons des protéines testées.

1.8.2 Expression simultanée de NOX1 et NOX2 dans les CD.

1.8.2.1 Article

Dans le cas des cellules dendritiques, la production des FRO obéit à des règles qui ne sont pas encore complètement élucidées. Encore récemment, de nouveaux complexes enzymatiques (NOX1-5, DUOX1-2, Thioredoxines, etc.), ainsi que de nouvelles voies de signalisation (Stat-6, NF-kB) ont été mis en évidence, qui tous peuvent avoir une incidence sur l'équilibre oxydo-réducteur des cellules. Il est indispensable de connaître ces mécanismes, leur fonction, leur contrôle, leur impact sur les cellules ainsi que leur importance dans certaines pathologies comme le cancer ou la granulomatose chronique. Notre article présente une étude fondamentale sur l'expression des NOX ainsi que leur fonctionnement dans les CD, nous montrons l'expression d'une NOX autre que la NOX2 (principale NOX exprimée par les CD), nous avons pu identifier sa localisation intracellulaire et montré son activité oxydase, cela nous permet de présenter de nouvelles hypothèses sur le rôle et le contrôle des FRO en lien avec l'activité de nouvelles protéines.

**NOX1 a new NADPH oxidase expressed around the nucleus of
murine dendritic cells**

Manuel Rodrigo Rangel, Patrice N. Marche, Christine Defert, Marie-José Stasia and
Christian L. Villiers*

INSERM U823 Analytical Immunology of Chronic Pathologies, Institut Albert Bonniot,
BP170, 38042 Grenoble, France
Université Joseph Fourier, F-38041 Grenoble, France,

Other Addresses

* To whom correspondence should be addressed: christian.villiers@ujf-grenoble.fr

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) in dendritic cells are important partners of many biological functions including cell differentiation, cytokine secretion, signal transduction and immune response. Due to the variety of these effects, ROS productions must be tightly controlled for both the amount of reactive species and their intracellular location. In dendritic cells, we have previously described the expression of NOX2 which was later found to be involved in the cross presentation of antigens internalised in phagolysosomes. Here we demonstrate that another NADPH oxydase (NOX1) is produced by dendritic cells simultaneously to NOX2. NOX1 is synthesized in immature DC and it over expressed after cell maturation, furthermore, ROS secreted by NOX1 were observed without stimulation. The activity of NOX1 was measured in NOX2^{-/-} dendritic cells, and in these conditions, there is no measurable amount of H₂O₂ whereas secretion of O₂⁻ in the cells is high. Intracellular location of ROS was analysed by confocal microscopy of the fluorescence of DHR: maximum secretion was observed around the nucleus, where it co-localized with p22 (the membrane cofactor of NOX1), whereas in NOX1^{-/-} dendritic cells, this accumulation of fluorescence is not observed, indicating that the production of these ROS are induced by NOX1 activity. Furthermore, in the absence of NOX1, the cellular division and differentiation of progenitors in dendritic cells are modified indicating that the oxygen radicals generated by NOX1 are implicated in these processes.

Introduction

Reactive oxygen species (ROS) play important roles in defence mechanisms and growing evidences support their involvement as key secondary messengers in signalling pathways such as transcriptional regulation, cell differentiation, and cell death mechanisms.

NADPH oxidase is a multi-component complex producing ROS, especially O_2^- , both in phagocytic cells, where ROS are essential for anti microbial host defence, and in non-phagocytic cells, where ROS contribute to the tuning of cellular signalling, cellular division, differentiation or secretion. NADPH oxidase system in humans is composed of 7 known members (Nox1-5, Duox1 and Duox2), which are differentially expressed in tissues. This enzymatic complex is formed by the association of different proteins: two membrane-associated ones (p22phox and gp91phox), which form the catalytic core of the enzyme, and several cytoplasmic proteins that regulate its activity: (p47phox, p40phox, p67phox, RAC1 and RAC2) (reviewed in P.V Vignais 2002). The phosphorylation of cytoplasmic subunits (P47, P67 and to a less extend P40) induces their association with membrane components and leads to NADPH oxidase activation and the production of superoxide anions (O_2^-), which are rapidly transformed in hydrogen peroxide (H_2O_2). These ROS are well known for their cell damaging activities due to their reactivity to cellular components in eukaryotic systems and to microorganisms (Keyer, Gort & J. a Imlay 1995; J. A. Imlay 2008).

Part of the role of some of these enzymes was lightened by spontaneous or disease related mutations: NOX1 and regulation of vascular tone by angiotensin II (Gavazzi et al. 2006), NOX2 and defence against bacterial infection revealed in chronic granulomatous disease (Dinauer et al. 1991), NOX3 and the development of inner ear (Paffenholz et al. 2004). In each case, due to their strong capacity to damage

tissue, production of ROS is highly regulated, both spatially (tissue specificity of the enzymes) and temporally (expression of regulating enzymes during cell proliferation or activation). NOX2 activity is controlled by p40, p47 and p67 whereas NOX1 and 3 are regulated by NOXA1 and NOXO1 (Bánfi, Clark, Steger & Krause 2003; Ueyama, Geiszt & Thomas L Leto 2006), which share common structural features with NOX2 regulating proteins.

Although many cell types have been shown to be capable of producing ROS (Ellis, Mayer & Jones 1988; DeCoursey 2004), most studies deal with phagocytic cells such as neutrophils, macrophages and dendritic cells (DC) which possess a particularly strong NADPH oxidase activity achieved by NOX2 (Elsen et al. 2004). In, DC, ROS are tightly implicated in biological activities being involved in cell maturation and in cytokine secretion (Werling, Hope, Howard & Jungi 2004; Sheng, Pietersz, Tang, Ramsland, et al. 2010). Moreover, acidification of the phagolysosome is strongly reduced by the concomitant transformation of O_2^- into H_2O_2 which consumes protons produced by vacuolar ATPases. The resulting neutralisation of intravacuolar pH was shown to facilitate cross-presentation of exogenous antigens that constitutes an important step for the establishment of immune responses (Savina et al. 2006).

We have previously characterised the expression of NOX2 by DC, however one can wonder whether other NADPH oxidases might be a source of ROS. In the present study, we seek for the expression of different genes and demonstrate the presence transcripts encoding NOX1 in addition to NOX2. Taking advantage of NOX1 or 2 negative DC, we show NOX1 activity is constitutive, localizes essentially in the cytoplasm, translocates in the peri nuclear space upon cell activation and affects DC fate. We further discuss the respective role of NOX1 and NOX2 as two NADPH oxidase systems endowing DC.

Materials and methods

Purification of mouse borne marrow dendritic cells progenitor recovery and culture

Mice (C57Bl/6) were purchased from *Elevage Janvier* (Le Geneist-Saint-Isle, France) and maintained in animal facility in accordance with current French institutional guidelines. DC progenitors were isolated from mice bone marrow, and cultured as previously described (Lutz et al. 1999; Berthier et al 2000, Son et al. 2002) with minor modifications: progenitors were purified by negative selection using biotinylated anti mouse GR-1 and TER-119 (BD Biosciences) antibodies together with streptavidin substituted magnetic beads (Invitrogen).

DC progenitors were cultured in IMDM medium with SVF 10% v/v, MEM NAA 1% v/v, Sodium Pyruvate 1% v/v, β Mercaptoethanol 0.1% v/v, Penicillin-streptomycin 0.5% v/v. Growth factors were also added: mll-6 (AbCys S.A. Paris, France), Flt3-Igd (Peprotech. London, UK) and GM-CSF. All experiments were performed using cells from day 10 to 14. When indicated, DC were activated by addition of LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (2 μ g/ml) to the culture medium 24 hours before use.

RT-PCR and qPCR of mouse DC mRNA.

RNA extraction was done with RNAeasy extraction kit (Quiagen) using DNase to eliminate all genomic DNA present in the sample. RT-PCR was done using 500 ng of extracted RNA, oligo-dT primers and Super Script II enzyme (both from Invitrogen); resulting cDNA was then used to amplify mRNA of interest using specific primers described in supplementary material.

Sequencing

PCR amplicons were purified using NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following manufacturer's instructions and sequenced by Cogenics-Beckman coulter genomics (Meylan, France). Obtained sequences and chromatograms were validated and aligned to assess the complete NOX1 mRNA sequence. Primers used for amplification and sequencing are described in the supplementary material.

Flow cytometry

Dendritic cells were labelled using the following antibodies: anti-CD11c-APC, anti-CD11b-FITC, anti-CD86-APC and anti-lab-PE (BD Bioscience). Propidium iodide was added for determination of dead cells. Analyses were performed on a LSRII (BD Biosciences) and recalculated using FCS Express V3 (de novo software).

Confocal microscopy

Wild type and NOX2^{-/-} DC with or without activation were fixed on polylysine coated cover slips and incubated in the presence of cholera toxin-FITC for 30 min at room temperature for membrane staining. Then, after permeabilization in presence of BSA and saponin, cells were labelled using rabbit polyclonal anti-P22 protein (Santa Cruz Biotechnology). After washing with permeabilization solution, cells were further incubated with goat antibody anti-rabbit IgG coupled to Alexa fluor 568 (Invitrogen), and nucleus were labelled using ToPro3 (Invitrogen). Observations were done using a confocal microscope Confocor LSM510 (Zeiss). Isotype control was performed using a rabbit polyclonal anti-mouse glial fibrillary acidic protein (Dako) instead of anti-p22.

Luminol enhanced chemiluminescence

H₂O₂ production was measured as follows: 3x10⁵ DC per well were incubated at 37 °C in a 96 well plate in PBS+ with Ca⁺⁺ (0.9 mM) and Mg⁺⁺ (0.5 mM), pH 8.0 (Invitrogen), supplemented with glucose (20 mM), luminol (20 µM) and Horse Radish Peroxydase (10 U/ml).

Chemiluminescence was recorded for 2 hours using a Victor3 1420 multilabel counter (PerkinElmer, France). When indicated, PMA (50 ng/ml) and DPI (10 µM) were added to stimulate and inhibit respectively NADPH Oxidase activity

NBT measurement for superoxide production

O₂⁻ production was measured as follows: 1x10⁶ DC per well were incubated at 37 °C in a 96 well plate in PBS+ with Ca⁺⁺ (0.9 mM) and Mg⁺⁺ (0.5 mM), pH 7.5 (Invitrogen), supplemented with glucose (40 mM) and NBT (10 mM).

Absorbance was measured over 4-6 hours using a Victor3 1420 multilabel counter (PerkinElmer, France). When indicated, PMA (100 ng/ml) and DPI (10 µM) were added to stimulate and inhibit respectively NADPH Oxidase activity.

Measurement of the secretion of ROS in presence of DHR

Mouse bone marrow derived WT, NOX1^{-/-} and NOX2^{-/-} DC in PBS+ (Invitrogen) supplemented with glucose (20 mM) were incubated for 30 minutes at 37° C in lab-tek™ chambered cover glass (Nunc) previously coated with polylysine. Then, Syto-17 (Invitrogen) was added at 5µM final concentration and cells further incubated at 37° C for 15 min. When indicated DPI (10 µM) was added together with Syto-17. For DC activation, cells were incubated in the presence of LPS for 24h (2µg/ml) prior their coating to lab-tek™.

Cells were observed using a confocal microscope (Zeiss, Confocor LSM510). After cells detection using nucleus fluorescence, DHR (10 μ M) was added to the medium and corresponding fluorescence was recorded for 40 min, each cell being analysed on 8-10 stacks, 1 μ m each. When indicated, PMA (50 ng/ μ l) was added together with DHR and the maximum of fluorescence obtained in this case was used to determine tuning parameters for subsequent analyses.

Fluorescence variation upon cell incubation was analysed using ImageJ free software: the same area was used on each image corresponding to the middle z stack, in order to determine the variation of fluorescence in a precise intracellular localisation. This technique allows differentiating production of oxygen radicals between cytoplasm, nucleus and perinuclear regions.

Results

NOX1 mRNA is present in DC

In order to investigate the production of oxygen radicals by DC, the expression of NOX related genes was analysed in mouse bone marrow derived DC. As shown in Fig 1A, beside the expression of NOX2, along its membranous (p22) and cytosolics (p40, p47 and p67) partners which were already characterised in these cells (Elsen et al. 2004), mRNA for NOX1 and its two regulating components (NOXO1, NOXA1) were detected, whereas no transcription of NOX3 and NOX4 was found. Furthermore, expressions of Duox1 and Duox2 genes were also negative (data not shown).

Quantitative analysis of NOX1 expression indicated that the amount of mRNA increased during the differentiation of the progenitors in DC (Fig. 1B). Furthermore,

DC activation by LPS led to increases of the expression of NOX1 mRNA and of its regulating subcomponents NOXO1 and NOXA1 (Fig 1C).

It has been previously shown that beside complete gene transcript, at least two isoforms of NOX1 mRNA may be expressed in mice (Arakawa et al. 2006). In order to determine the nature of transcript synthesised in DC, complete sequence of NOX1 transcript was performed showing that DC expressed the isoform 2 of NOX1 (see supplementary data) which differs from the canonical sequence (NM_172203.1) (Bánfi, Clark, Steger & Krause 2003) by deletion of the fragment 1 to 28. Furthermore, from the three types of transcript known to encode the isoform 2 of NOX1, DC expresses the a-type (Fig 1D). The expression of NOX1 is not dependant on NOX2 as equivalent expression of NOX1 and of its regulating components were found in wild type and in NOX2^{-/-} DC and disappeared only when DC were cultured from progenitors issued of NOX1^{-/-} transgenic mice (Fig 1D).

Reactive oxygen species production by DC

As DC expressed simultaneously two NADPH oxidases, it is important to determine the respective role of these two ROS generators. Both enzymes were shown to produce O₂⁻ which may then be transformed in H₂O₂. First, DC were tested for their capacity to secrete H₂O₂, using luminol enhanced chemiluminescence. In the case of wild type DC, the production of H₂O₂ was low, but not negligible, and increased strongly upon stimulation by PMA (Fig 2A and C). However, NOX2^{-/-} DC were unable to produce H₂O₂ whatever the level of cellular activation or the kind of activator (LPS or PMA) used (Fig 2C). These results indicate that all of the H₂O₂ measured by luminol enhanced chemiluminescence with wild type DC was generated through NOX2 activity.

Then, DC production of O_2^- was analyzed using NBT reduction. Wild type and NOX2^{-/-} DC produced similar low amounts of O_2^- in the absence of stimulation and only wild type DC were able to respond to PMA activation by an increase of O_2^- (Fig 2B, and 2D). Furthermore, both secretions, H_2O_2 and O_2^- were inhibited by DPI (Fig 2A and B).

In order to characterise the intracellular origin of ROS production, DC were incubated with DHR, a compound whose fluorescence is mainly stimulated upon interaction with O_2^- , and imaged using confocal microscopy. Analysis of serial images allowed both the determination of the kinetic of ROS production and the identification of the intracellular site of production.

Image analysis of non-activated DC derived from wild type NOX2^{-/-} and NOX1^{-/-} mice (respectively Fig 3A, 3B and 3C) showed DHR fluorescence was mainly sparse in the cytoplasm. After LPS activation, DHR fluorescence was co-localised around the nucleus in DC expressing NOX1, i.e. wild type and NOX2^{-/-} DC (Fig 3A and 3B), whereas no such fluorescence redistribution was observed in NOX1^{-/-} DC (Fig 3C).

DHR fluorescence of wild type DC and of NOX1^{-/-}, was strongly increased upon addition of PMA (data not shown) whereas in the case of NOX2^{-/-} DC, the same addition did not modify the level of DHR fluorescence in agreement with results obtained on O_2^- measurements using NBT (figure 2D).

In order to confirm that DHR fluorescence imaged around the nucleus was due to ROS generated by NADPH oxidase system and not produced by mitochondria, azide was added at the same time than DHR to wild type DC (Duranteau, Chandel, Kulisz, Shao, et al. 1998). The resulting blockage of the respiratory chain increased the production of O_2^- by mitochondria, inducing the increase of DHR fluorescence in various place in the cytoplasm without modification of the nucleus membrane DHR

fluorescence (Fig 4), indicating that ROS which were visualized around the nucleus were not linked to the activity of mitochondria.

But, when NADPH oxidase activity was blocked by addition of DPI, there was no more DHR fluorescence (Fig 4).

NOX1 and p22 migrate towards nuclear membrane upon activation in NOX2 KO DC and WT DC

In order to characterize NOX1 complex responsible for the accumulation of reactive oxygen species around the nucleus of DC, we performed intracellular location of NADPH oxidase components using confocal microscopy. Various anti-mouse NOX1 antibodies were tested, but none of them was found with a clear confirmed specificity. Therefore, we use anti-p22 antibodies to detect NADPH oxidase complexes since p22 is an obligatory structural partner of the entire mouse NOX (1, 2, 3 and 4) and is involved in the interaction between membrane and cytoplasmic subunits of the NADPH oxidase (Sumimoto 2008). In wild type and NOX2^{-/-} DC, p22 was found to be distributed in the cytoplasm and in the vicinity of the cell membrane, then after activation by LPS, p22 was seen in the cytoplasm mainly around the nucleus (Fig 5A and 5B). In NOX1^{-/-} DC, whether DC were activated or not, p22 was always sparse in the cytoplasm without evidence of peri nucleus accumulation (Fig 5C).

NOX1 and Dendritic cell differentiation

In our experimental conditions, DC differentiation from wild type progenitors occurs in 10 to 14 days: at the immature state, cells are CD11b⁺, CD11c⁺, CD86^{low}, and then become mature (CD11b⁺, CD11c⁺, CD86^{high}) after incubation with LPS as shown Fig 6A and 6D. When the same experiment is performed with NOX1^{-/-} mouse

progenitors, two different stages must be considered. After 10 days culture, DC expressing at their surface CD11b, CD11c^{low}, are activable in the presence of LPS with the resulting overexpression of CD11c and CD86 (Fig 6B), whereas after 14 days differentiation, when the cells are activated by incubation in the presence of LPS; CD11c and CD86 are no longer overexpressed (Fig 6C and 6D).

Discussion

This paper demonstrates, for the first time, that two NADPH oxidases (NOX1 and NOX2) are simultaneously expressed in mouse bone marrow derived DC. We have previously shown that these phagocytic cells express all the components (gp92phox, p22phox, p40phox, p47phox and p67phox) required for the formation a fully active NOX2 complex (Elsen et al. 2004). Concerning NOX1, it has been published that at least three types of NOX1 mRNA may lead to the synthesis of the enzyme (Arakawa et al. 2006): the a, c and f-types corresponding to two NOX1 isoforms; the a-type was described to induce the secretion of the consensus form, whereas the two c and f-type variants contain modification in the 5' untranslated region inducing the secretion of an additional N-terminal peptide of 28 amino acids; these two mutations were described to be cell specific and to be expressed under certain phenotypic conditions. Furthermore, a fourth isoform with exon 11 deletion had also been previously reported (Geiszt, Lekstrom & Thomas L Leto 2004; Harper, Xu, Soucek, Setiadi, et al. 2005). Concerning mouse DC, NOX1 mRNA corresponds to the a-type leading to the consensus sequence of 563 amino acids.

NOX1 was initially associated with colon cells, but more recently, the expression of this protein was extended to various cells: microglia (Chéret et al. 2008), foam cells, macrophages (D. W. Park et al. 2009; S.-H. Lee et al. 2009; J.-S. Kim et al. 2010)

and even liver cells (Paik et al. 2011). As direct intracellular localization of NOX1 in dendritic cells is difficult to determine due to the absence of highly specific antibodies, we have used anti-p22 antibodies: indeed, it has been shown that the interaction between p22 and NOX proteins is strong enough to modify localization of p22: Ambasta et al. had shown that NOX1 facilitate the transfer of P22 to its intracellular location (Ambasta et al. 2004), which may vary according the nature of the cells: indeed, NOX1 was associated with either Rab5 and EEA1 in early endosomes in human vascular smooth cells (Miller et al. 2007), or with plasma membrane (Ueyama, Lekstrom, Tsujibe, Saito, et al. 2007) or even with nucleus in human keratinocytes (Chamulitrat et al. 2003). We have used NOX2^{-/-} dendritic cells as in these conditions, only the formation of p22 NOX1 complexes is possible: as shown by confocal microscopy, in the presence of NOX1, p22 accumulates around the nucleus of dendritic cells. Geiszt (Geiszt et al. 2003) have shown that NOX1 can partially replace NOX2 for ROS production in transfected cells: indeed, NOX1 may associate with the phagocytic NOX2 cytoplasmic components (p47 and p67) leading to a PMA stimuable complex, whereas, when NOX1 is associated to NOXO1 and NOXA1, the secretion of oxygen radicals by the resulting complex occurs even in the absence of any stimulation (Bánfi, Clark, Steger & Krause 2003) and is not increased upon addition of PMA. In dendritic cells, we have shown that NOXA1 and NOXO1 are produced in addition to NOX1, likely forming a fully NOX1 active complex. When the secretion of oxygen radicals by NOX2^{-/-} dendritic cells was analyzed using DHR, the fluorescence was observed in the absence of any exogenous stimulation and maximum around the nucleus of the cells, furthermore, the addition of PMA did not induce an increase of this fluorescence

Whereas, when the same experiment was performed using either WT or NOX1^{-/-} dendritic cells, DHR fluorescence resulting from the secretion of oxygen radicals by NOX2 was mainly localized in the cytosol and strongly increased after PMA addition. It is worth to notice that the human counterparts of NOX1 was shown to be only partially insensible to PMA activation as the production of ROS, which is already important in the absence of stimulation, may still increase in the presence of PMA (Ueyama et al., 2006). The fact that DHR fluorescence is more important around the nucleus than in the cytoplasm in NOX2^{-/-} dendritic cells whereas in NOX1^{-/-} dendritic cells, both p22 accumulation and DHR fluorescence were not observed at the same place indicates that active p22 NOX1 complexes were localized around the nucleus. This assumption is reinforced by the absence of peri nuclear DHR fluorescence after addition of DPI, a potent inhibitor of NADPH oxidase.

As mitochondria were also described to produce ROS, a second set of experiments was realized where DPI was replaced by azide: this molecule blocks electron transfer in the complex IV of mitochondrial respiratory chain (Chen et al., 2003), inducing an over production of oxygen radicals in dendritic cells, this inhibition induced an increase of DHR fluorescence in restricted areas in the cytosol: the absence of modification of DHR fluorescence around the nucleus confirms that ROS produced at this level are not related to mitochondrial activity but due to NOX1 activity.

The implication of NOX1 in the cellular functions may vary according the cells analyzed: cellular transduction as reviewed by David et al., (Brown et al., 2009), formation of invadopodia (Gianni et al., 2010), selective oxidation proteins (ERp72) (Chen et al., 2008). Here, we show that in the absence of NOX1, the division of progenitors and their differentiation in dendritic cells is affected and therefore, that NOX1 expression is important for dendritic cells development.

This enzymatic complex should be taken into consideration for a better understanding of the role of ROS and of dendritic cells in the immune response

Acknowledgments

We are very thankful with Karl-Heinse Krause for the kindly gift of NOX2KO mice. This work was supported by National Institute of Health and Medical Research (INSERM, France), grants from National Council of Research and Technology (Conacyt, Mexico).

References

- Ambasta, R.K. et al., 2004. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry*, 279(44), Pp. 45935-41.
- Arakawa, N. et al., 2006. Novel transcripts of Nox1 are regulated by alternative promoters and expressed under phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells. *The Biochemical journal*, 398(2), Pp. 303-10.
- Bánfi, B., Clark, R. a, Steger, K. & Krause, K.-H., 2003. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *The Journal of biological chemistry*, 278(6), Pp. 3510-3.
- Brown, D. I., & Griendling, K. K. (2009). Nox proteins in signal transduction. *Free radical biology & medicine*, 47(9), 1239-53. Elsevier Inc.
- Chen, W., Shang, W. H., Adachi, Y., Hirose, K., Ferrari, D. M., & Kamata, T. (2008). A possible biochemical link between NADPH oxidase (Nox) 1 redox-signalling and ERp72. *The Biochemical journal*, 416(1), 55-63.
- Chamulitrat, W. et al., 2003. Association of gp91phox homolog Nox1 with anchorage-independent growth and MAP kinase-activation of transformed human keratinocytes. *Oncogene*, 22(38), Pp. 6045-53.
- Chéret, C. et al., 2008. Neurotoxic activation of microglia is promoted by a nox1-dependent NADPH oxidase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(46), Pp. 12039-51.

- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of biological chemistry*, 278(38), 36027-31.
- Chen, W., Shang, W. H., Adachi, Y., Hirose, K., Ferrari, D. M., & Kamata, T. (2008). A possible biochemical link between NADPH oxidase (Nox) 1 redox-signalling and ERp72. *The Biochemical journal*, 416(1), 55-63.
- DeCoursey, T.E., 2004. During the respiratory burst, do phagocytes need proton channels or potassium channels, or both? *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2004(233), P. pe21.
- Dinauer, M.C. et al., 1991. Point mutation in the cytoplasmic domain of the neutrophil p22-phox cytochrome b subunit is associated with a nonfunctional NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), Pp. 11231-5.
- Duranteau, J., Chandel, N.S., Kulisz, A., Shao, Z., et al., 1998. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *Biochemistry*, 273(19), Pp. 11619 -11624.
- Ellis, J. a, Mayer, S.J. & Jones, O.T., 1988. The effect of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium on aerobic and anaerobic microbicidal activities of human neutrophils. *The Biochemical journal*, 251(3), Pp. 887-91.
- Elsen, S. et al., 2004. Cryptic O₂-generating NADPH oxidase in dendritic cells. *Journal of cell science*, 117(Pt 11), Pp. 2215-26. Available at:
- Gavazzi, G. et al., 2006. Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS letters*, 580(2), Pp. 497-504.
- Geiszt, M., Lekstrom, K. & Leto, Thomas L, 2004. Analysis of mRNA transcripts from the NAD(P)H oxidase 1 (Nox1) gene. Evidence against production of the NADPH oxidase homolog-1 short (NOH-1S) transcript variant. *The Journal of biological chemistry*, 279(49), Pp. 51661-8.
- Geiszt, M. et al., 2003. NAD(P)H Oxidase 1, a Product of Differentiated Colon Epithelial Cells, Can Partially Replace Glycoprotein 91phox in the Regulated Production of Superoxide by Phagocytes. *The Journal of Immunology*, 171(1), P. 299.
- Gianni, D., Taulet, N., Zhang, H., DerMardirossian, C., Kister, J., Martinez, L., Roush, W. R., et al. (2010). A novel and specific NADPH oxidase-1 (Nox1) small-molecule inhibitor blocks the formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *ACS chemical biology*, 5(10), 981-93.
- Harper, R.W., Xu, C., Soucek, K., Setiadi, H., et al., 2005. A reappraisal of the genomic organization of human Nox1 and its splice variants. *Archives of biochemistry and biophysics*, 435(2), Pp. 323-30. Available at:

- Imlay, J.A., 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.*, 77(217), Pp. 755–776. Available at:
- Johnson, M. et al., 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), Pp. W5-9. Available at:
- Keyer, K., Gort, a S. & Imlay, J. a, 1995. Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *Journal of bacteriology*, 177(23), Pp. 6782-90.
- Kim, J.-S. et al., 2010. Glycogen synthase kinase 3beta and beta-catenin pathway is involved in toll-like receptor 4-mediated NADPH oxidase 1 expression in macrophages. *The FEBS journal*, 277(13), Pp. 2830-7. Available at:
- Lee, S.-H. et al., 2009. Calcium-independent phospholipase A2beta-Akt signaling is involved in lipopolysaccharide-induced NADPH oxidase 1 expression and foam cell formation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(11), Pp. 7497-504.
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L. J., Roßner, S., Koch, F., Romani, N., & Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Cell* (pp. 77-92).
- Miller, F.J. et al., 2007. Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3. *Circulation research*, 101(7), Pp. 663-71.
- Paffenholz, R. et al., 2004. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes & development*, 18(5), Pp. 486-91.
- Paik, Y.-H. et al., 2011. The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) homologues NOX1 and NOX2/gp91(phox) mediate hepatic fibrosis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 53(5), Pp. 1730-41.
- Park, D.W. et al., 2009. Resveratrol inhibits foam cell formation via NADPH oxidase 1- mediated reactive oxygen species and monocyte chemoattractant protein-1. *Experimental & molecular medicine*, 41(3), Pp. 171-9.
- Savina, A. et al., 2006. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell*, 126(1), Pp. 205-18.
- Sheng, K.-C., Pietersz, G. a, Tang, C.K., Ramsland, P. a, et al., 2010. Reactive oxygen species level defines two functionally distinctive stages of inflammatory dendritic cell development from mouse bone marrow. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(6), Pp. 2863-72.
- Son, Y.-ik et al., 2002. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *Journal of Immunological Methods*, 262, Pp. 145 - 157.

- Sumimoto, H., 2008. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *The FEBS journal*, 275(13), Pp. 3249-77.
- Ueyama, T., Geiszt, M. & Leto, Thomas L, 2006. Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Molecular and cellular biology*, 26(6), Pp. 2160-74.
- Ueyama, T., Lekstrom, K., Tsujibe, S., Saito, N., et al., 2007. Subcellular localization and function of alternatively spliced Noxo1 isoforms. *Free radical biology & medicine*, 42(2), Pp. 180-90.
- Vignais, P V, 2002. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 59(9), Pp. 1428-1459.
- Werling, D., Hope, J.C., Howard, C.J. & Jungi, T.W., 2004. *Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists*, Wiley Online Library.

Figure 1.

A) Agarose gel image showing presence or absence of amplicons for different NOX enzymes and their subunits. B) NOX1 mRNA quantification in different DC culture days. C) effect of LPS in the mRNA concentration of NOX1, NOXO1, NOXA1. D) Agarose gel image for isotype identification of NOX1 present in DC.

Figure 2.

A) Chemiluminescence of DC WT with PMA as activator and DPI as inhibitor. B) Measure of O₂⁻ with NBT using PMA as activator and DPI as inhibitor. C) Total H₂O₂ measure produced by WT DC and NOX2KO DC using PMA and LPS. D) Total O₂⁻ measure in WT DC and NOX2KO DC with PMA and LPS. LPS conditions are cells incubated over 24H with LPS and then recovered and analysed.

Figure 3.

Confocal images of O₂⁻ measuring. A) WT DC measure of O₂⁻ with or without LPS. B) NOX2KO DC with or without LPS and C) NOX1KO DC with or without LPS. LPS conditions are cells incubated over 24H with LPS and then recovered and analysed.

Figure 4.

Confocal images of O₂⁻ quantification in NOX2KO DC, NOX2KO + LPS over 24H, NOX2KO with sodium azide and NOX2KO in presence of DPI.

Figure 5.

Confocal images of P22 subunit localization within DC. A) WT DC with or without LPS. B) NOX2KO DC with or without LPS and NOX1KO DC with or without LPS. LPS conditions are cells incubated over 24H with LPS and then recovered and analysed.

Figure 6.

A) Flow cytometry analyse of WT DC and NOX1KO DC incubated with LPS at a late stage. B) Growth plot of DC, showing increased division of progenitors in early stages of DC development.

Supplemental figure 1.

A) Primer sequence used for identification of NOX mRNA and their subunits. B) Primer sequence used for sequencing NOX1 mRNA for its identification.

Supplemental figure 2.

Kinetic image of O₂⁻ formation in NOX2KO DC each time increase is equal to 3 minutes measured by confocal microscopy.

Fig 1

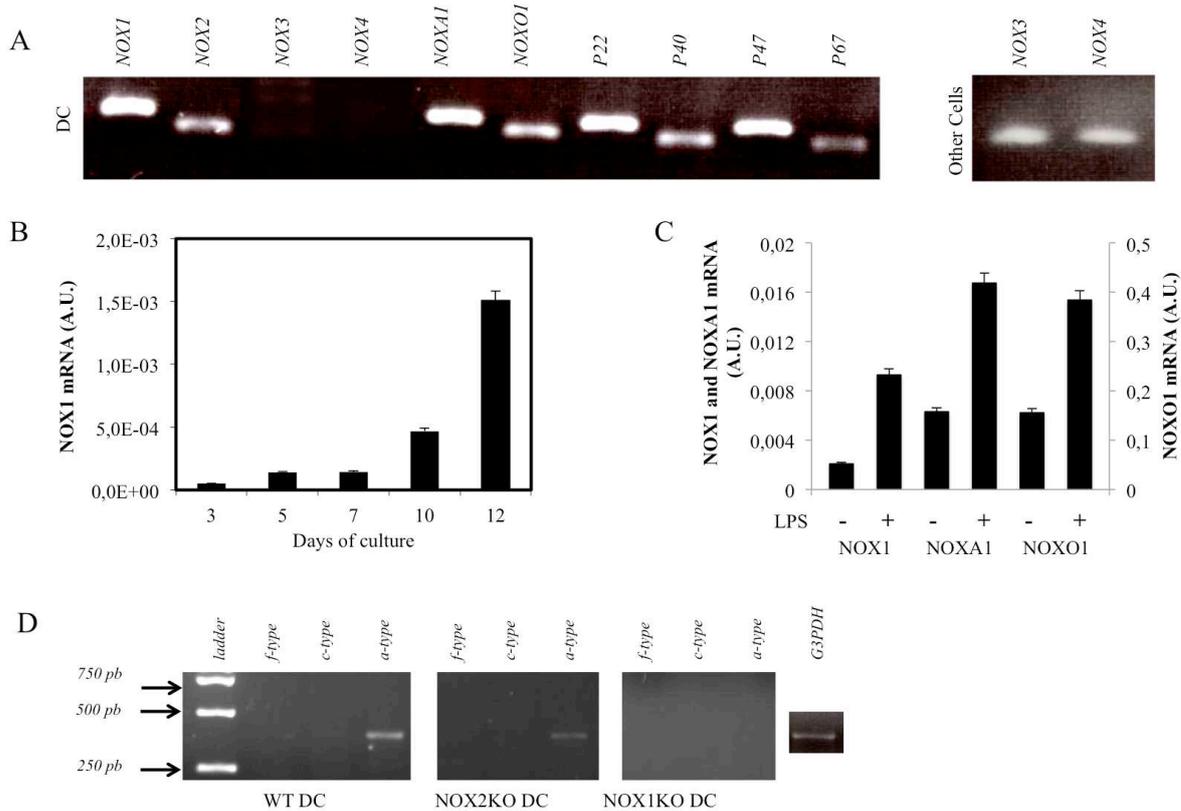


Fig 2

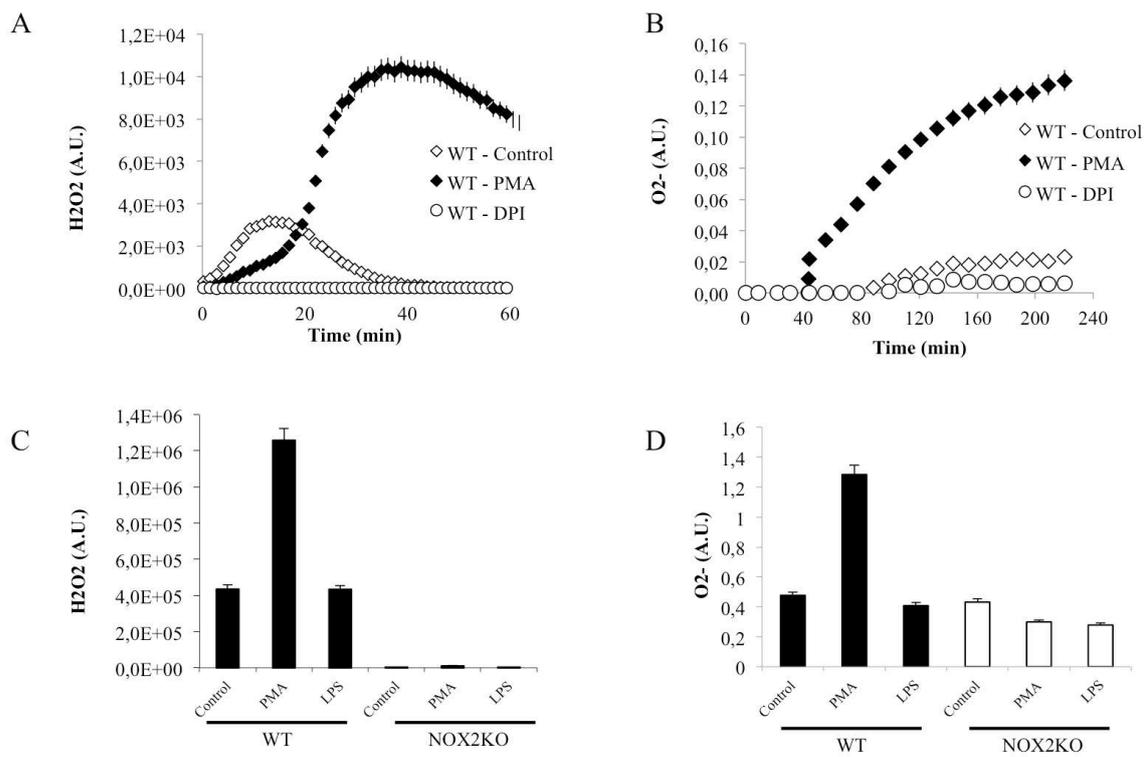


Fig 3

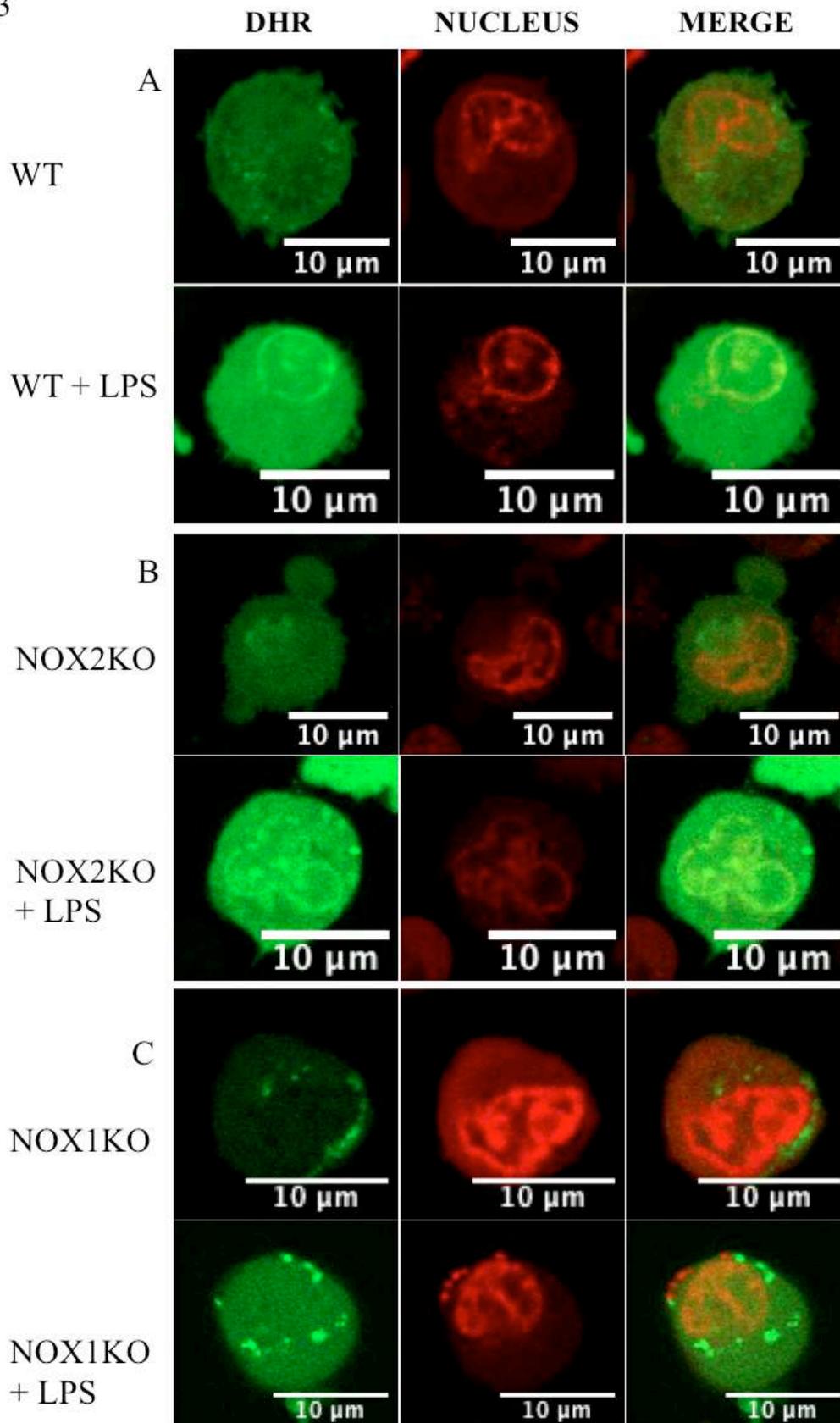


Fig. 4

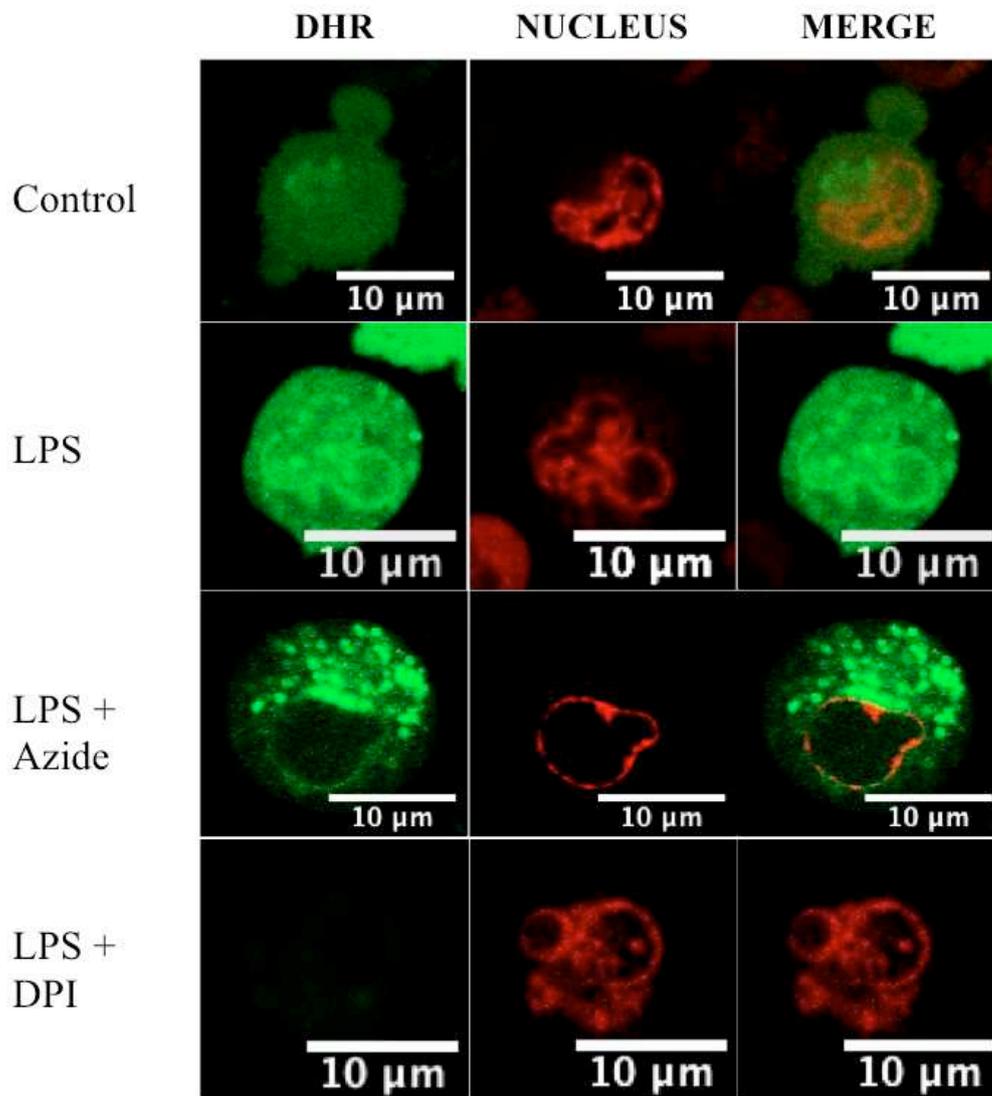


Fig. 5

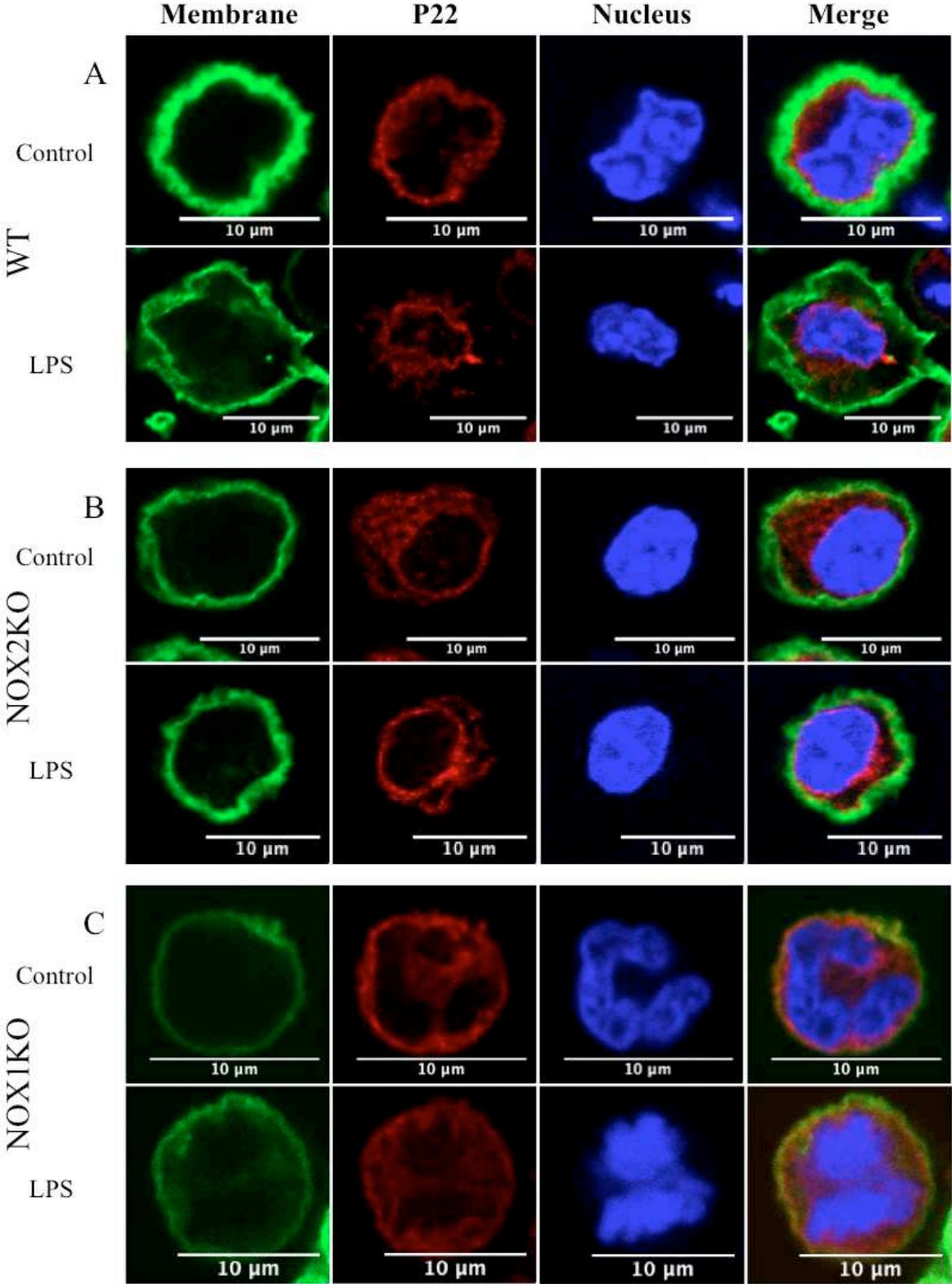
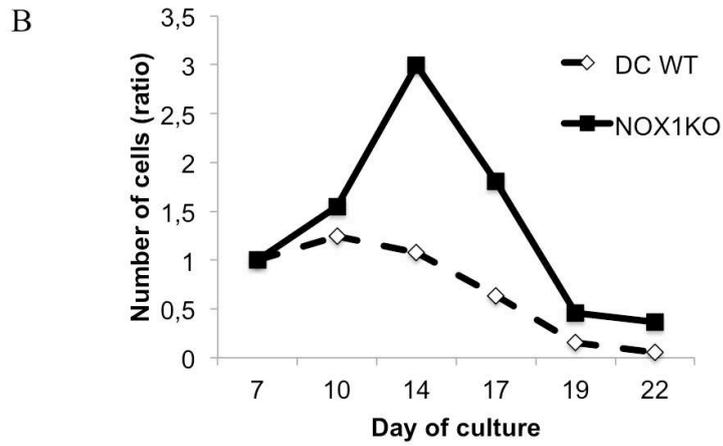
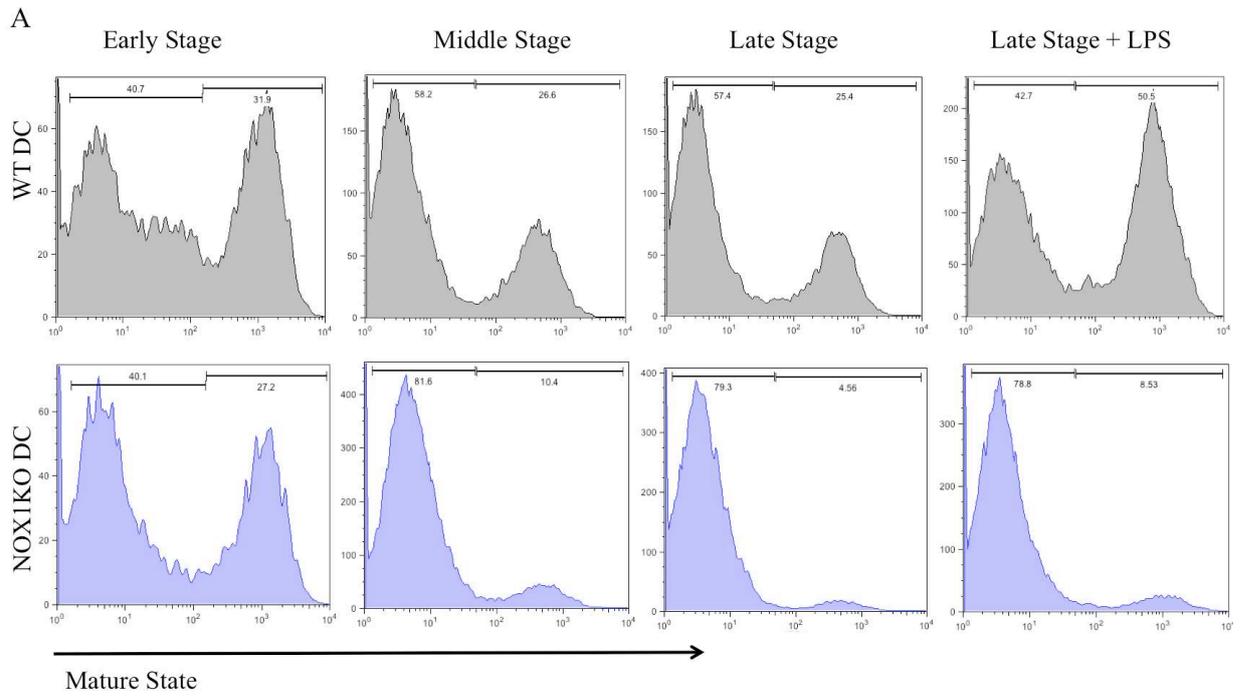


Figure 6



Supplemental Figures

S1A

Primers for NOX and subunits

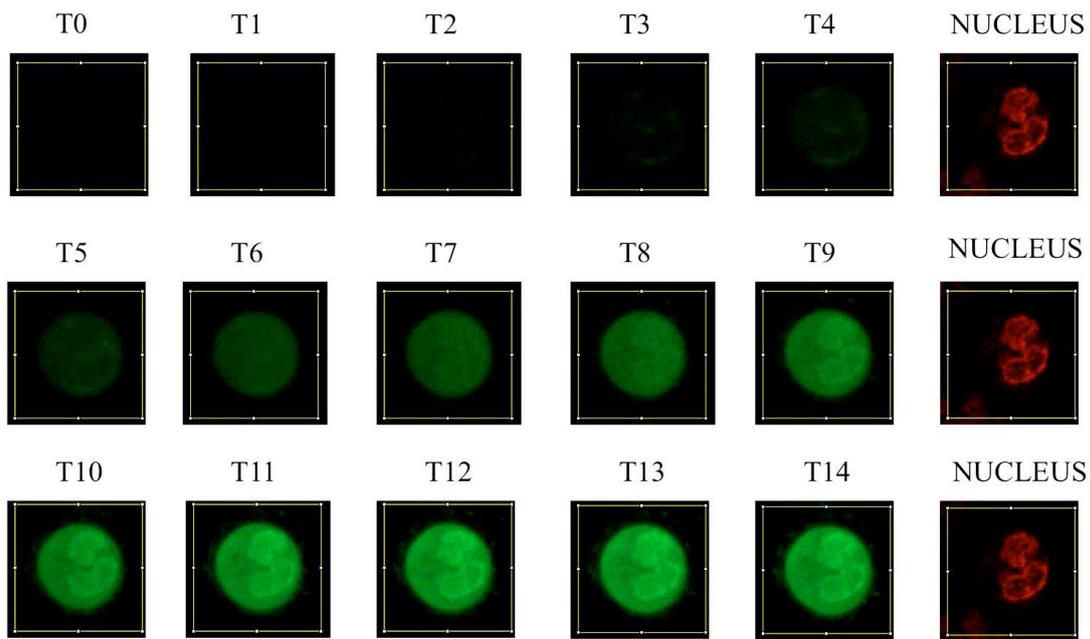
Primer name	Left	Right
<i>NOX1</i>	<i>CTTGCACCGATTGCTTTTAT</i>	<i>CATTAGATGGGTGCATGACAA</i>
<i>NOX2</i>	<i>TGAGAGGTTGGTTCGGTTTT</i>	<i>GTTTTGAAAGGGTGGGTGAC</i>
<i>NOX3</i>	<i>GGAACGACGAATTC AAGCAG</i>	<i>CACAGAAGAACACGCCAATG</i>
<i>NOX4</i>	<i>CTGGAAGAACCCAAGTCCA</i>	<i>AAAGGCACAAAGGTCCAGAA</i>
<i>NOXA1</i>	<i>CATTCTGATGACCACAACG</i>	<i>TCAGGACCCTCTTACCGTAGAT</i>
<i>NOXO1</i>	<i>TGGTCAGACAACAGTGACACATT</i>	<i>GGTTTTCTTAAGGGTCTTCTGGA</i>
<i>p22</i>	<i>TGCCCTCCACTTCTGT</i>	<i>GCAGATAGATCACACTGGCAAT</i>
<i>p40</i>	<i>CTGCTTTTCTGACTACCCACAG</i>	<i>AAGCTGCTCAAAGTCGCTCT</i>
<i>p47</i>	<i>GGACACCTTATTGCCATA</i>	<i>CTGCCACTTAACCAGGAACAT</i>
<i>p67</i>	<i>CTTCGGATTCACCCCTAGTC</i>	<i>GAGGTGGTGAATATCGGATT</i>
<i>G3PDH</i>	<i>TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT</i>	<i>CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC</i>

S1B

Primers for NOX1 sequencing

Primer name	Left	Right	Sequenced with primer
<i>NOX1-1</i>	<i>TGGGAAACTGGCTGGTTA</i>	<i>CCCAAGAATTTCTCTCGTGTA</i>	<i>left</i>
<i>NOX1-2</i>	<i>CTGGTTGGGGCTGAACATT</i>	<i>TTGGAGACTGGATGGGATTT</i>	<i>left</i>
<i>NOX1-3</i>	<i>TTCGAACGCTACAGAAGAAG</i>	<i>CAGGCCATGGATCCCTAAG</i>	<i>right</i>
<i>NOX1-3(2)</i>	<i>TTCGAACGCTACAGAAGAAG</i>	<i>TTGGTAATCACGACCTTCTGC</i>	<i>left</i>
<i>NOX1-4</i>	<i>ACAGAGGAGAGCTTGGGTGA</i>	<i>GCATTGGTGAGTGCTGTTGT</i>	<i>left</i>
<i>NOX1-5</i>	<i>TCTTGGAAAGTGGATCCTTGC</i>	<i>ATGTTGCTATCCAGCCAGT</i>	<i>left</i>
<i>NOX1-6</i>	<i>GCACCCATCTAATGTTTGGGA</i>	<i>TGTGTTTTGAGCTTGTGTCG</i>	<i>left</i>
<i>NOX1-7</i>	<i>TAGAGAGACAGGTGCCTTTGC</i>	<i>GGGGTGGGCAGTAGCTATTCT</i>	<i>right</i>
<i>NOX1-8</i>	<i>GCTGGTCATGCAGCATTAAA</i>	<i>TCAGAACGTTTCTTTGTTGAAG</i>	<i>left</i>

S2



Les conclusions de cette partie sont les suivantes:

- 1.- Les CD murines expriment la protéine NOX1 (expression de la protéine de type a).
- 2.- L'expression de NOX1 augmente au cours de la différenciation des CD.
- 3.- La maturation des CD induite en présence de LPS entraîne une expression plus importante de NOX1, NOXA1 et NOXO1.
- 4.- Les cellules dendritiques matures, présentent un complexe enzymatique NOX1 qui est actif au niveau de la membrane nucléaire.
- 5.- Après maturation des CD en présence de LPS, p22phox se concentre au niveau de la membrane nucléaire.
- 6.- L'absence d'expression de NOX1 dans les cellules dendritiques en cours de différenciation entraîne une augmentation de la division. Les CD qui n'expriment pas NOX1 n'ont pas les mêmes capacités de maturation évalué par l'expression de molécules de classe II.

1.8.3 Expression de SOD3 dans les CD

1.8.3.1 Production des FRO dans différents types de cellules phagocytaires

Les CD sont des cellules phagocytaires dont la capacité à produire des espèces réactives de l'oxygène est très forte, en parallèle, nous avons testé d'autres cellules du système immunitaire afin de déterminer les spécificités des CD : pMo, pDC et Mo-J774.

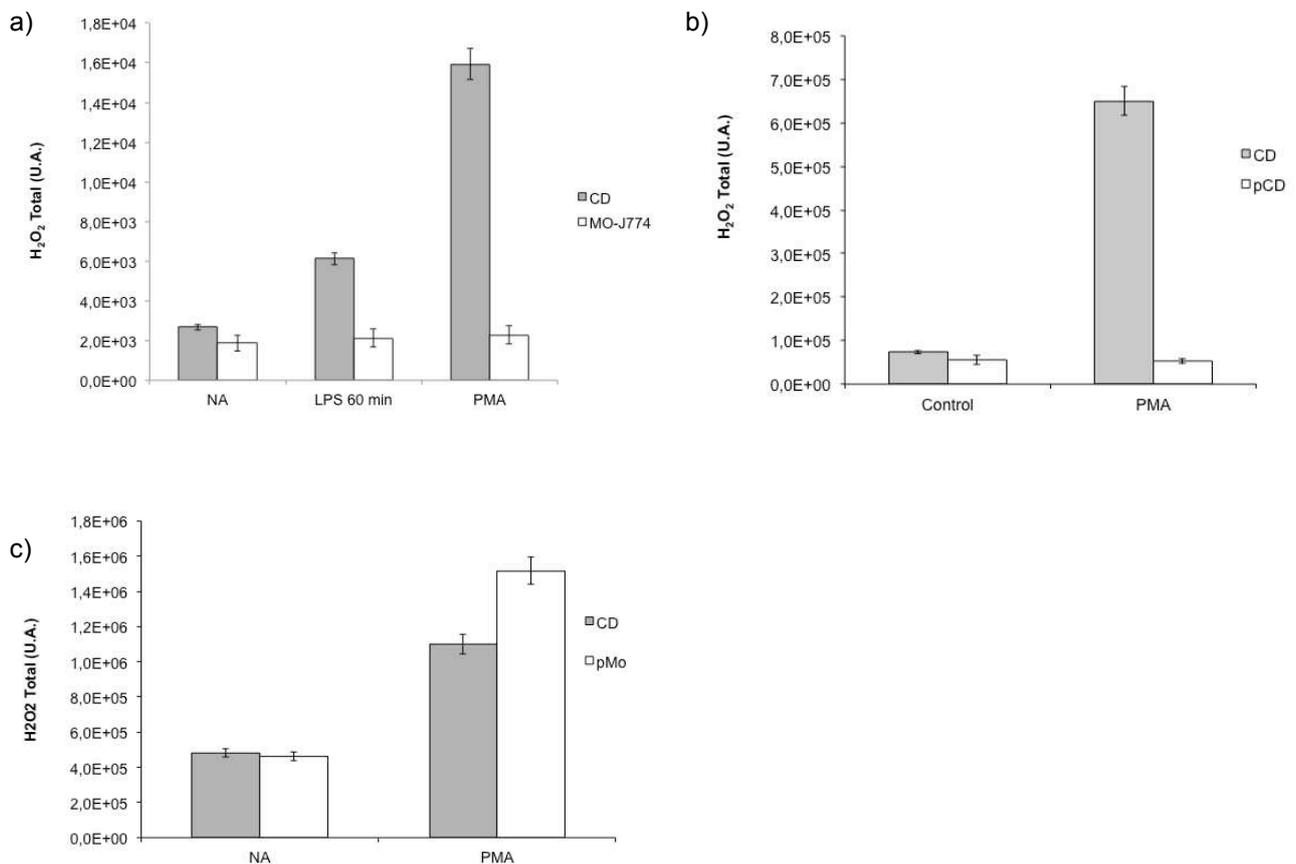


Figure 39 production de H₂O₂ par différentes cellules impliquées dans le système immunitaire (mesure par chimioluminescence)

Nos résultats montrent que les macrophages péritonéaux (pMo) ont une capacité de production de H₂O₂ comparable à celle des CD (Figure 39c). En ce qui concerne les cellules Mo-J774 et pCD, nous avons observé que la production de H₂O₂ n'était pas modifiée par l'addition de PMA et dans les deux cas, la production de H₂O₂ est faible.

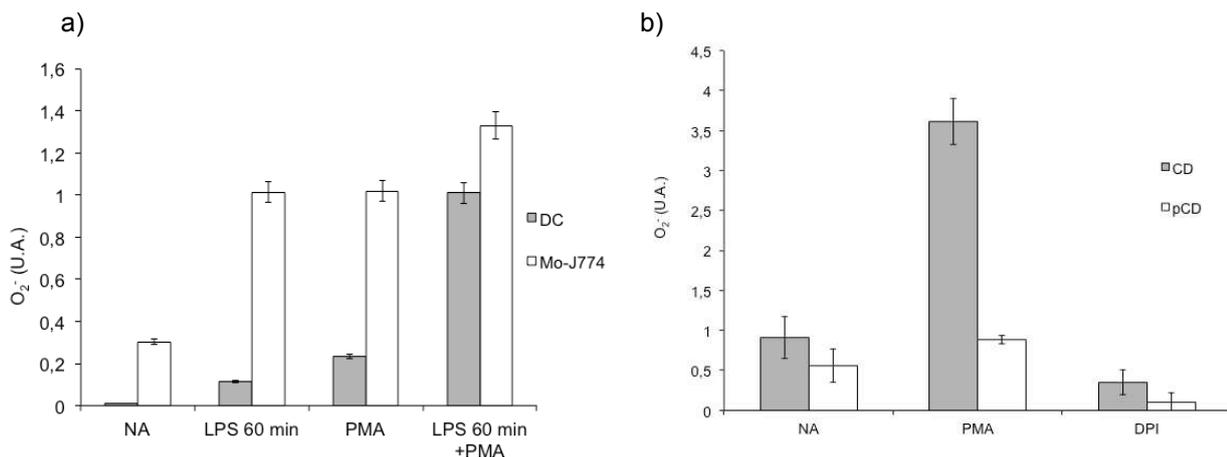


Figure 40 Production de O_2^- par des cellules du système immunitaire

Dans la mesure où les macrophages péritonéaux (MO-J774) et les cellules dendritiques plasmacitoïdes (pCD) ont une production de H_2O_2 qui n'est pas modifiée par des activateurs : nous avons voulu caractériser la production de superoxyde par ces deux types cellulaires. Les résultats sont présentés Figure 40. Ils montrent que la production de O_2^- dans les deux types cellulaires est modifiée en présence d'activateurs : Les cellules MO-J774 produisent des quantités de superoxyde plus importantes que les CD ; alors que les pCD au contraire en produisent moins que les CD. Les productions de O_2^- pCD ont des profils qui ressemblent à celui des CD (Figure 40b), avec une production basale, une augmentation par induction avec du PMA et une inhibition par le DPI. Les cellules pCD sont plus petites que les CD (environ $5\mu m$ contre $8-12\mu m$) alors que le même nombre de cellules a été utilisé dans les analyses. L'absorbance des pCD est moindre peut-être parce que la surface occupée par les cellules est légèrement plus faible du fait de leur taille même s'il y a autant de cellules.

1.8.3.2 Analyse par PCR des ARNm codant pour des protéines SOD

Les protéines du type SOD sont les seules à avoir une activité dismutase, autrement dit une activité qui permet la transformation du superoxyde en peroxyde ; les DUOX ont également cette capacité mais nous avons montré que ces protéines ne sont pas exprimées par les CD. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés à SOD3, nous avons recherché par PCR l'expression de cette protéine dans nos différents modèles cellulaires. Les résultats montrent que les CD et les p-Mo expriment SOD3,

ce qui n'est pas le cas des pDC et des Mo-J774 (Figure 41). Ces résultats ont été confirmés par le séquençage des fragments amplifiés.

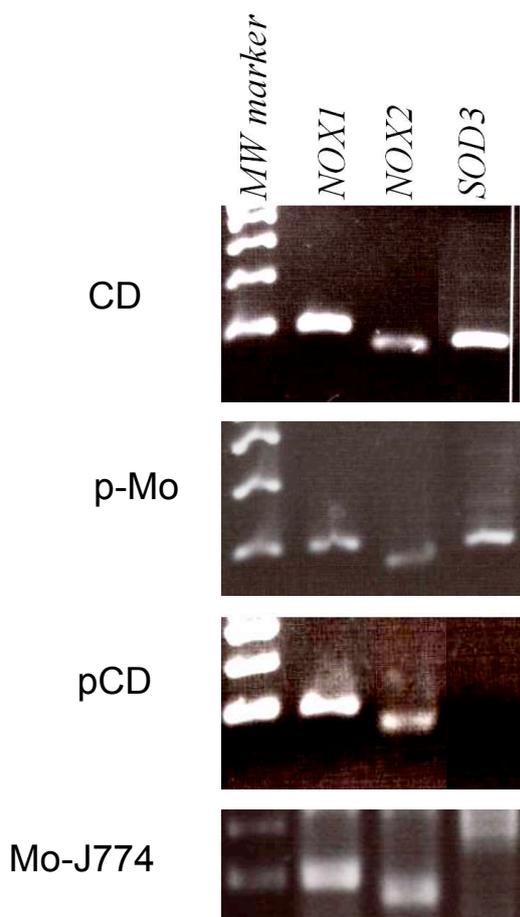


Figure 41 Analyse sur gel d'agarose des amplicons du NOX1, NOX2 et SOD3 dans des cellules phagocytaires

Le Tableau 13 résume nos résultats concernant les expressions de SOD3 et les productions de H₂O₂ par les différents types cellulaires étudiés : nous montrons une corrélation entre ces deux activités.

Tableau 13 Comparaison de la production de H₂O₂ et de l'expression de SOD3 dans les phagocytes étudiés

	<i>H2O2</i>	<i>SOD3 ARNm</i>
<i>CD</i>	+	+
<i>pCD</i>	-	-
<i>p-Mo</i>	+	+
<i>Mo-J774</i>	-	-

Nous montrons ici que les pCD n'expriment pas SOD3. Afin de définir si la faible production de H₂O₂ et de O₂⁻ était due à l'absence de systèmes générateurs, nous avons recherché l'expression et quantifié par qPCR les ARNm codant pour les différentes protéines d'intérêt. Nos résultats sont représentés Figure 42 et Tableau 14. La comparaison entre les ARNm mesurés pour les CD et les pCD a montré que la quantité d'ARNm est significativement diminuée dans le cas des pCD. Les pCD expriment une quantité d'ARNm codant pour des protéines du système oxydant plus faible que les CD. L'échelle de gauche (Figure 42) correspond aux CD (barres) alors que l'échelle de droite correspond aux pCD (cercles). L'absence de bande visible sur gel d'agarose montre qu'il n'y a pas d'ARNm codant pour les protéines SOD3 et NOXO1.

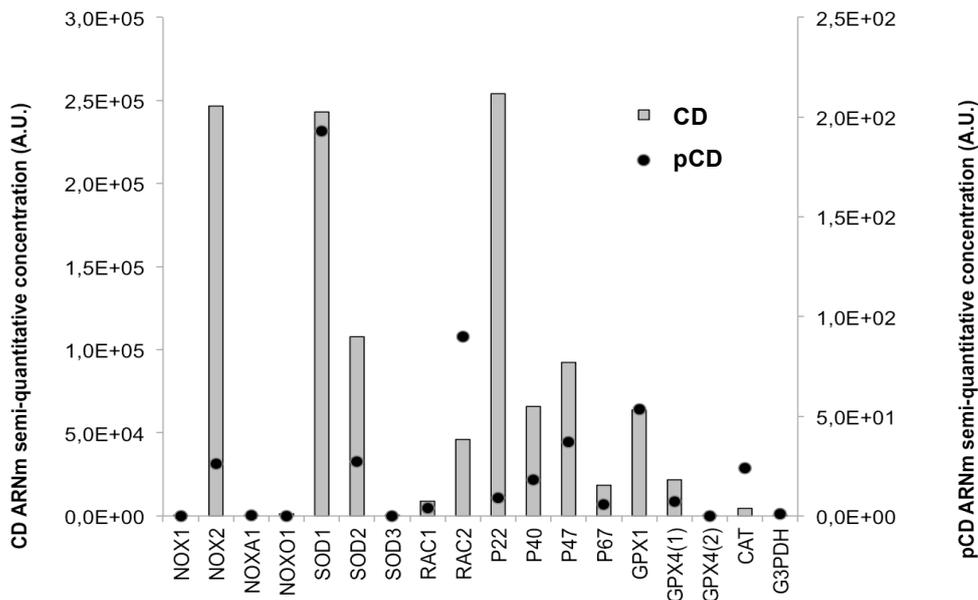


Figure 42 Représentation par histogramme des quantités relatives d'ARNm codant pour différentes protéines du système oxydant dans les CD et les pCD

Ces résultats nous permettent d'émettre une première hypothèse expliquant la si faible quantité de FRO produite par les pDC, un second point très intéressant est le fait que seul la présence d'ARNm de SOD3 pourrait être de nature à expliquer la production de H2O2 par nos cellules.

Tableau 14 Quantités relatives des ARNm codant pour des protéines du système oxydante

Amplicon	pCD [U.A.]	CD [U.A.]
<i>NOX1</i>	1,18E-01	1,60E+01
<i>NOX2</i>	2,61E+01	2,47E+05
<i>NOXA1</i>	3,39E-01	4,98E+00
<i>NOXO1</i>	ND	1,32E+03
<i>P22</i>	8,87E+00	2,54E+05
<i>P40</i>	1,82E+01	6,59E+04
<i>P47</i>	3,71E+01	9,24E+04
<i>P67</i>	5,60E+00	1,85E+04
<i>SOD3</i>	ND	4,88E+02
<i>G3PDH</i>	1,00E+00	1,00E+00

La quantification des ARNm codant pour SOD3 à été réalisée par qPCR au cours de la différenciation des CD depuis le stade précurseur (cellules qui viennent d'être isolées de la moelle osseuse jusqu'au stade final à J-14, de plus les cellules à J-10 et J-12 ont été incubées pendant 24 heures en présence de LPS afin d'analyser le rôle de l'activation des cellules sur l'expression de l'ARN codant pour SOD3. Les résultats obtenus sont présentés Figure 43. On observe une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour SOD3 soit quand les cellules sont complètement différenciés, soit quand elles sont au stade mature.

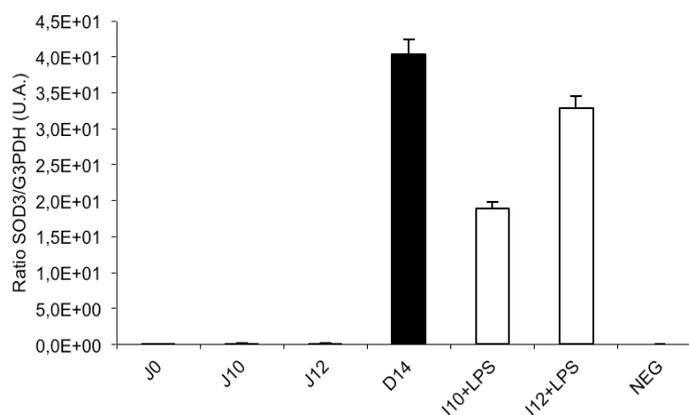


Figure 43 Relation entre la différenciation des CD et l'expression de SOD3, analyse par qPCR des ARNm.

1.8.3.3 Analyse par Western Blot de l'expression de la protéine SOD3

Nous avons montré que les CD expriment constitutivement l'ARNm codant pour SOD3, afin de confirmer la transcription de la protéine correspondante, nous avons effectué une analyse par Western Blot. Nous avons pu visualiser la protéine à la fois dans le lysat et le surnageant cellulaire (Figure 44) ; ce qui est certainement dû au fait que la protéine est sécrétée comme cela a été montré précédemment, cela permettrait de protéger les cellules d'un microenvironnement oxydatif (S L Marklund, 1984a).

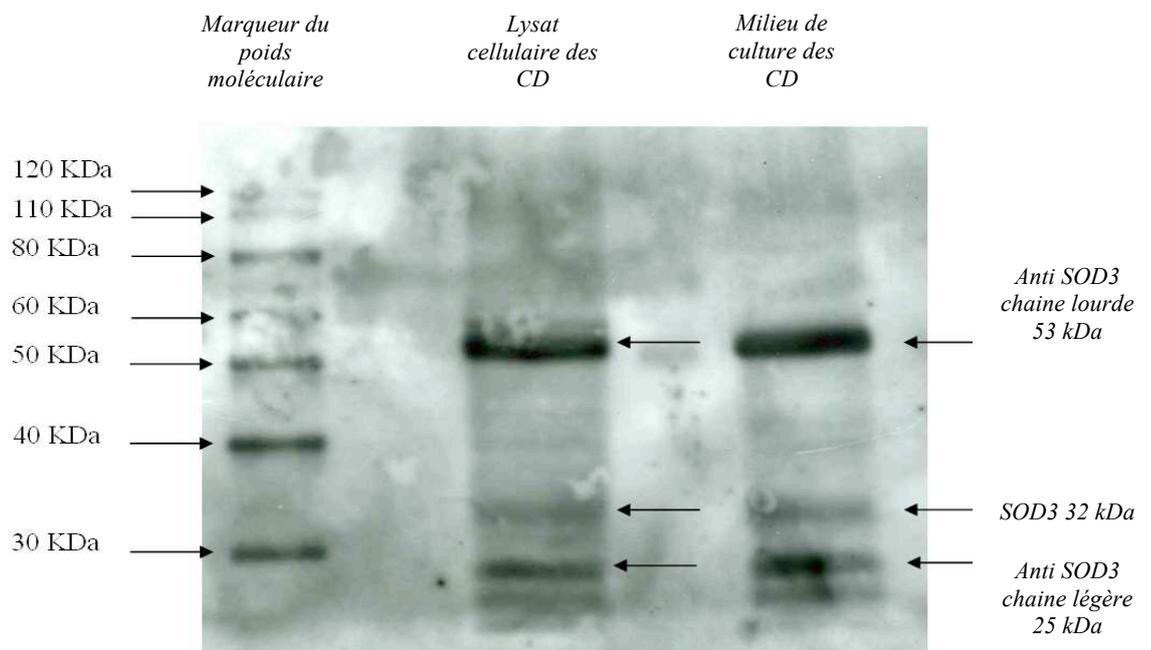


Figure 44 Analyse par Western Blot de l'expression de SOD3 dans les cellules dendritiques

1.8.3.4 Localisation par microscopie confocale de SOD3

Afin de localiser la protéine SOD3 dans les CD, nous avons réalisé des analyses par microscopie confocale ; nous montrons que SOD3 est plus particulièrement localisé au niveau de la membrane cellulaire, et est retrouvé à un moindre degré au niveau du cytoplasme (Figure 45). Lorsque les cellules ne sont pas perméabilisées, le marquage au niveau de la membrane cellulaire est nettement plus important. Cette perte de fluorescence s'explique par la capacité de SOD3 à être dans un premier temps sécrétée à l'extérieur des cellules, ce qui permet sa fixation sur la face extérieure des membranes cellulaires, interaction qui est partiellement détruite lors du traitement de perméabilisation.

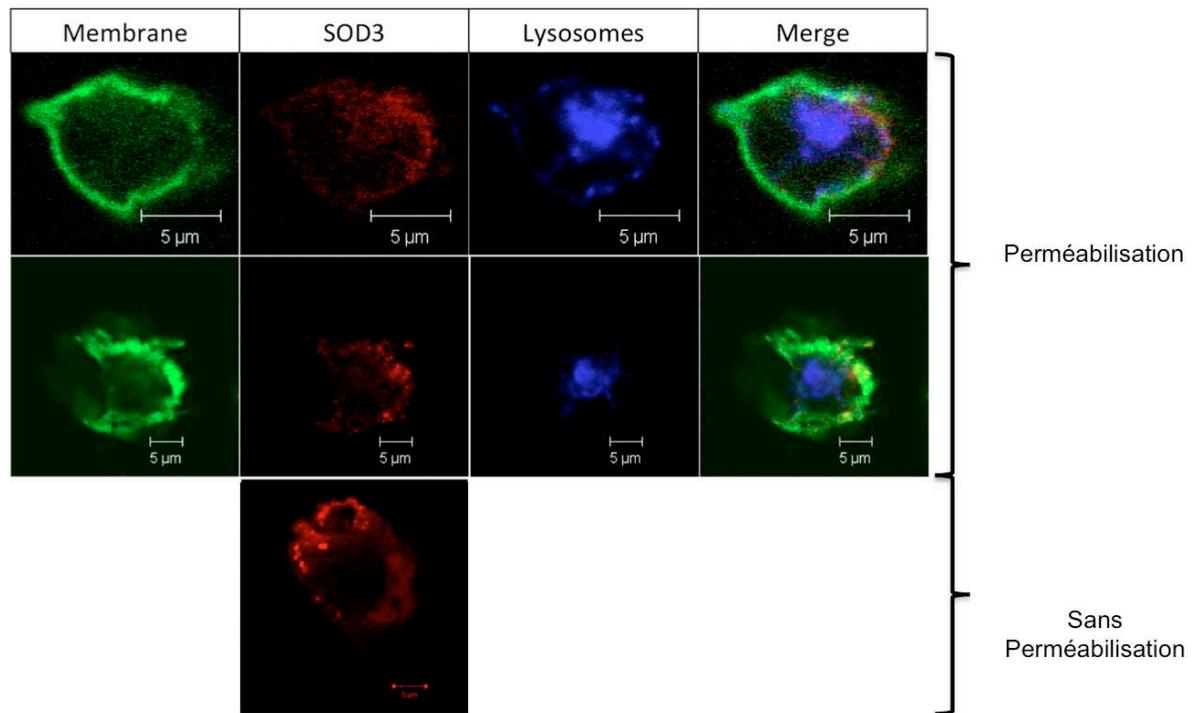


Figure 45 Images confocales des CD, immunomarquage pour SOD3

1.8.3.5 Analyse de la fonctionnalité des SOD à Zn/Cu

Afin de mieux caractériser le rôle des SOD dans les CD, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de ce type d'enzyme : les SOD à Zn/Cu comme SOD1 et SOD3, sont inhibées par les chélatants du Cu comme le DETCA, (S L Marklund, 1984b). Au moment de la quantification du H₂O₂ par chimioluminescence, le DETCA a été ajouté aux CD : nous avons observé une inhibition complète de l'activité dismutase dans les cellules, comme montré Figure 46 même lorsque la production de H₂O₂ est stimulée par addition de PMA, le DETCA inhibe la production de H₂O₂.

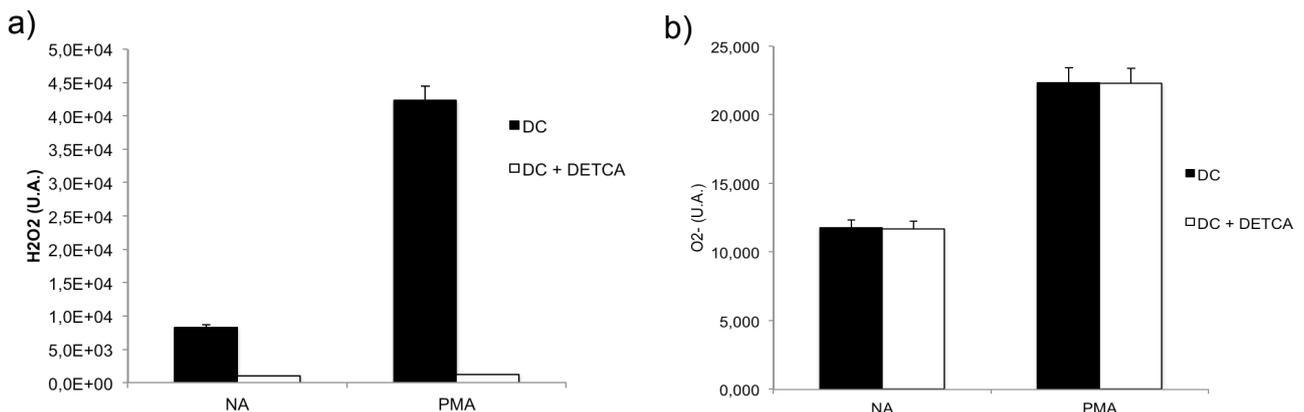


Figure 46 Analyse par chimioluminescence de l'H₂O₂ sécrétée par les CD, effet de l'inhibiteur DETCA.

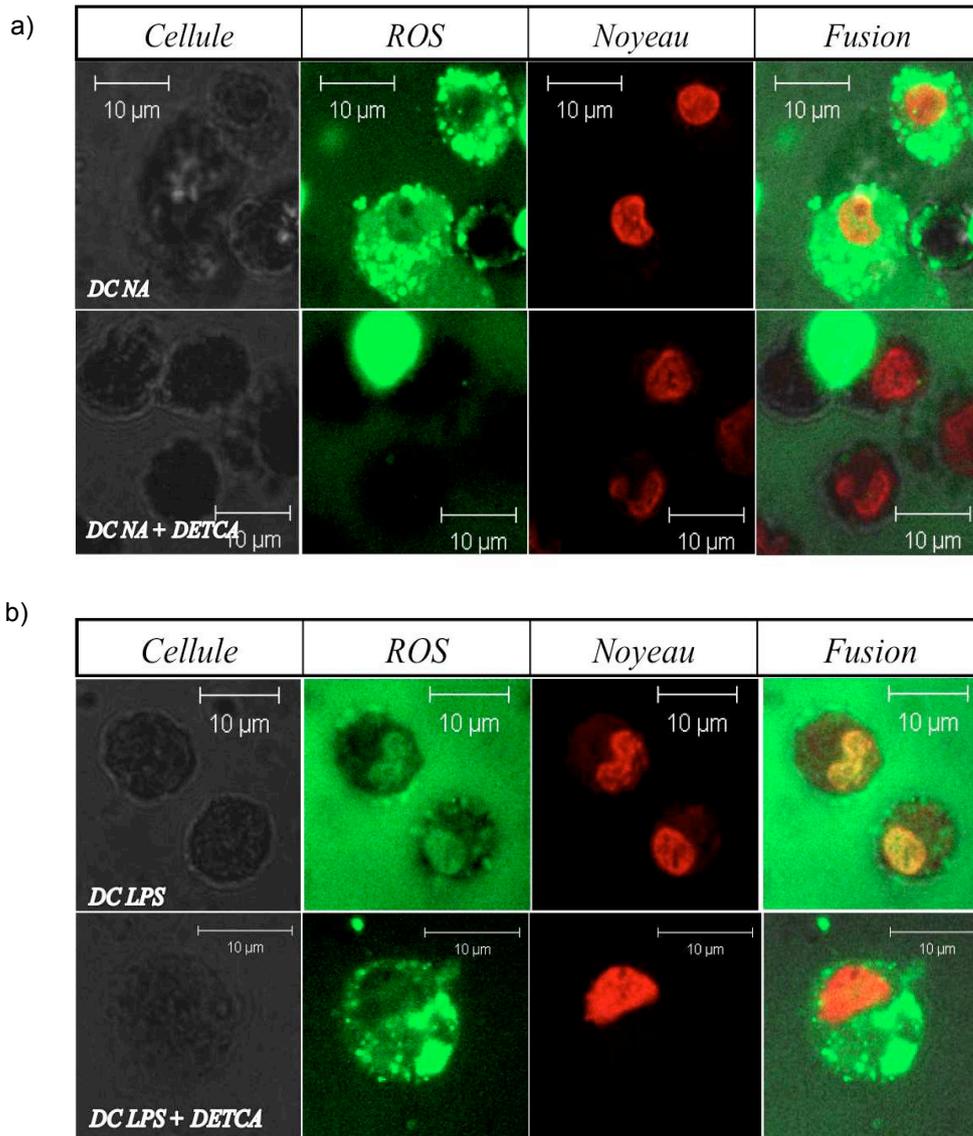


Figure 47 Visualisation, par microscopie confocale, de la production des FRO par les CD. a) cellules contrôle, en haut CD seules, en bas CD avec DETCA ; b) CD incubés avec LPS 24h, en haut CD seules, en bas cellules avec DETCA.

1.8.3.6 Analyse de la cinétique de production des FRO par les CD par imagerie confocale

Des analyses par microscopie confocale ont permis de localiser les FRO dans les CD : comme le montre les tests en présence de DHR, la production de H₂O₂ est totalement bloquée par addition de DETCA, par ailleurs, en l'absence de production de peroxyde d'hydrogène, le superoxyde qui est produit en continu (mesuré par fluorescence du DHR) s'accumule à l'intérieur des CD ; les images obtenues montrent la fluorescence finale des FRO dans les CD (**Figure 47a**). Les images enregistrées en cinétique, pendant 40 minutes, indiquent que la production des FRO

est stable et perdure tout au long de la cinétique dans le cas de fonctionnement normal des CD, dans le cas où les CD sont incubées en présence de DETCA, il y a une accumulation très importante de fluorescence avec une saturation du système qui apparaît après seulement 15 minutes d'incubation. Dans le cas des CD matures, c'est-à-dire qui ont été incubées en présence de LPS pendant 24 heures (Figure 47b), nous montrons également une accumulation substantielle de fluorescence au niveau du cytoplasme cellulaire).

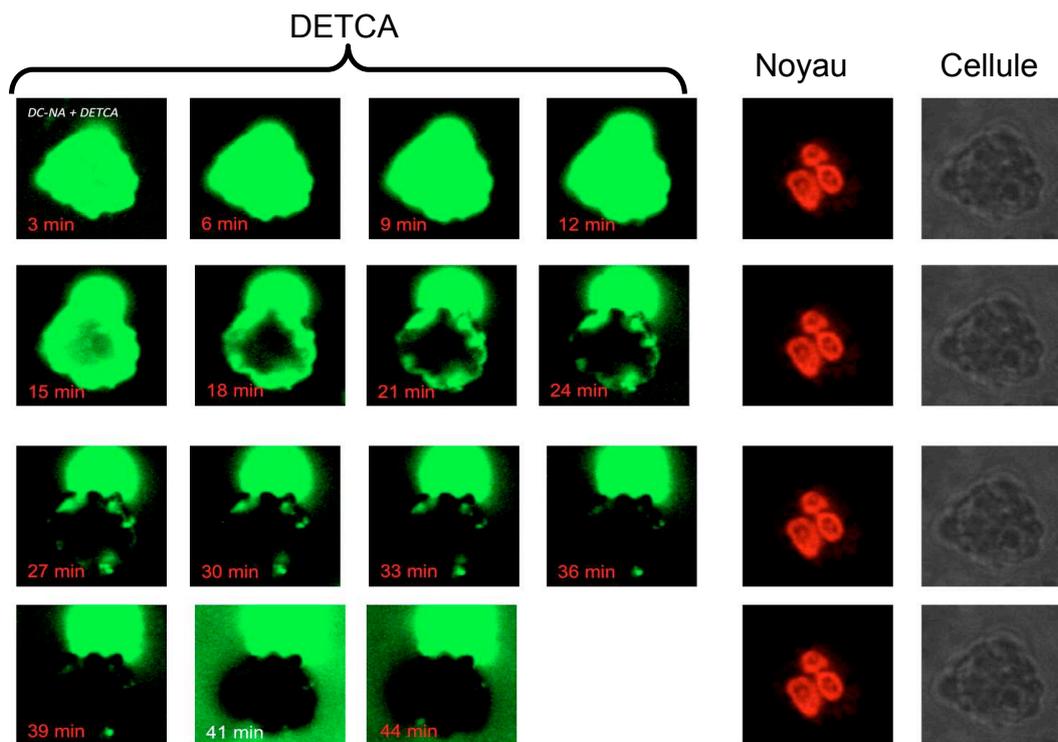


Figure 48 Cinétique de production de O_2^- par les CD en présence de DETCA

Nos conclusions pour cette partie :

- 1.- SOD3 est exprimée par les CD.
- 2.- SOD3 est localisée au niveau de la membrane cellulaire.
- 3.- SOD3 est sécrétée à l'extérieur de la cellule
- 4.- SOD3 est nécessaire pour la dismutation du O_2^- en H_2O_2 .
- 5.- L'inhibition des SOD 1 et 3 entraîne une accumulation du O_2^- dans la cellule.

Discussion

1.9 Cellules dendritiques et FRO

1.9.1 Généralités

Les FRO sont des composés issus de l'activité enzymatique et produits à l'intérieur des cellules dans le cas qui nous intéresse ici. Les FRO ont une durée de vie assez courte (2 ns pour le radical HO^\cdot , (Mikkelsen & Wardman, 2003)) en raison de leur haute réactivité avec d'autres molécules : ils peuvent par exemple réagir avec les protons, ou servir d'intermédiaire pour la production d'autres FRO, via notamment des réactions de dismutation enzymatique ou non. Les FRO sont généralement produites au travers d'activités enzymatiques de type oxydase (enzymes NOX par exemple (R a Clark, 1990)) ou comme résultat de l'activité de la chaîne respiratoire des mitochondries (Q. Chen, Vazquez, Moghaddas, Hoppel, & Lesnefsky, 2003). En ce qui concerne les CD, les principales FRO produites sont le superoxyde et le peroxyde.

1.9.2 Production, activateurs et Inhibiteurs

Dans le cadre de notre modèle d'étude (les CD), nos expériences montrent tout d'abord que ces cellules possèdent une capacité de production des FRO qui augmente tout au long de leur différenciation comme illustré Figure 16. Sheng et col. ont montré que les CD peuvent être différenciées selon la quantité de FRO qu'elles produisent (Sheng, Pietersz, Tang, Ramsland, & Apostolopoulos, 2010). Dans cet article, ils montrent que les CD « immatures » produisent moins de FRO que les CD « matures », le système de production de CD utilisé dans leur cas est assez proche du nôtre, il y a cependant certaines différences dans les concentrations et types de facteurs de croissance utilisés qui expliquent pourquoi ils arrivent à produire des CD « différenciés/immatures » à partir du J3 et des CD « matures » à J6. Alors que notre protocole permet la production de cellules dont la différenciation autorise une production de FRO qui augmente de façon importante à partir de J11 et J12 pour ensuite diminuer à J13 et J14. Les cellules utilisées sont issues de cultures primaires qui peuvent donc varier d'un type de culture à un autre.

Nous avons caractérisé par cryométrie en flux la production des FRO dans les deux types de CD « immatures » et « matures » (Figure 31), nos résultats présentent un certain nombre de différences avec ceux retrouvés par Sheng et col. (Sheng et al., 2010): nos cellules dendritiques « immatures » (MHCII^{lo}) produisent moins de FRO que les CD « matures » (MHCII⁺); nous montrons que les CD ayant évolué spontanément vers un statut de cellules matures présentent une plus grande capacité à produire du H₂O₂. Par contre, les cellules ayant subi une maturation « induite » par incubation en présence de LPS pendant 24 heures, ont une production significativement plus faible de H₂O₂ (Figure 24), alors que la production de O₂⁻ augmente significativement. Apparemment, ce résultat est en opposition avec d'autres données où nous avons montré, qu'au cours de la maturation des cellules, l'expression des enzymes productrices ou génératrices des FRO augmentent (figure 1 du papier NOX1), les molécules de O₂⁻ produites doivent être transformée en H₂O₂ en raison, notamment, de la toxicité de ce superoxyde envers la cellule (Imlay, 2008; Magder, 2006). Nous discuterons dans le chapitre dédié à SOD3 des hypothèses de contrôle de dismutation du superoxyde dans la CD.

Le LPS peut être utilisé comme inducteur de la maturation des CD mais cette transformation nécessite une incubation d'environ 24 heures pour qu'elle soit complètement active. Nous avons également utilisé le LPS, ainsi que d'autres molécules, pour activer les enzymes NOX, le LPS est une molécule qui interagit avec des récepteurs membranaires tel le TLR-4 ; ce TLR est exprimé à la surface des CD et active des voies de signalisation conduisant à la synthèse de certaines cytokines ou chimiokines (Blanco, Palucka, Pascual, & Banchereau, 2008; Gibson et al., 2002). Plusieurs publications montrent qu'il y a un lien entre TLR, FRO et la sécrétion de cytokines (Vulcano et al., 2004; Werling, Hope, Howard, & Jungi, 2004), mais ce lien n'est pas encore identifié en détail, car les FRO sont produits indépendamment des activateurs utilisés. Nous avons utilisé différents activateurs (ZYM, PMA, W6 et PAF) lesquels mettent en jeu différentes voies de signalisation conduisant à l'activation des NADPH Oxydase.

Nous avons montré que la cinétique de production des FRO est complètement dépendante de la nature et de la concentration des activateurs ; le PMA (connu pour sa capacité à activer la PKC et par conséquent à induire la phosphorylation des sous

unités cytosoliques des protéines NOX) induit une forte production de H₂O₂, nettement plus importante que ce qui est mesuré pour les cellules à l'état basal. Le zymosan est connu pour interagir avec le TLR-2, et activer les voies de signalisation dépendantes des récepteurs dectin-1/curdlan (K. J. Liu & Chu, 2006). Ces voies de signalisation induisent également une production de H₂O₂ qui est importante et dépendante de la concentration du zymosan ; la littérature montre que l'activation des cellules par ces voies induit une production de cytokines, mais sans qu'il y ait de lien direct établi entre FRO et cytokines.

Nous avons testé deux autres activateurs : le platelet activating factor (PAF) et le W6 ou WKYMVM, (ce dernier est un peptide synthétique qui mime les interactions entre anaphylatoxines et récepteurs de type FPR (formyl peptide receptors). Il a été précédemment montré que les CD possédaient des récepteurs de ce type et répondaient par chimiotactisme à la présence de W6 et/ou fMLF : les cellules se déplacent suivant un gradient de ces molécules (R. He, Tan, Browning, Wang, & Ye, 2000). Nous avons analysé la réponse des CD à ce type d'activateur en terme de capacité à stimuler des systèmes oxydo-réducteur ; nos résultats montrent que chacune de ces molécules accroît la sécrétion de H₂O₂. L'addition de W6 entraîne une sécrétion rapide et forte de H₂O₂ : alors que les activateurs interagissant soit avec les TLR (LPS) soit directement avec la PKc (PMA), entraîne une sécrétion qui atteint son maximum en environ 10 minutes, le W6 induit un « burst » dont le maximum est à environ 3 minutes après son addition. La quantité de H₂O₂ est directement fonction de la concentration du peptide utilisé. Suite à ce pic, une seconde vague de production de H₂O₂ est observée dont l'ampleur est par contre inversement proportionnelle à la quantité de peptide ajoutée : cette dernière pourrait correspondre à la sécrétion de base que nous avons systématiquement observée dans les CD même en l'absence de tout activateur. Karlsson et col. ont montré une réponse oxydante face au FPR sur des modèles humains de CD (A. Karlsson et al., 2007) : ils ont observé qu'entre différents types de CD (CD dérivées de monocytes, CD myéloïdes et CD plasmacytoïdes) les réponses de sécrétion de O₂⁻ étaient différents. De plus, nos expériences ont montré que la durée du « burst » de O₂⁻ observé dans ces modèles est d'environ 1 minute. Un lien entre chimiotactisme et sécrétion des FRO est envisageable vu l'ensemble de réponses acquises en présence de ces activateurs pour différents modèles de CD.

Un modèle intéressant a été proposé par l'équipe de Luo (Hattori, Subramanian, Sakai, & Luo, 2010) où il lie la production des FRO et le chimiotactisme des neutrophiles. L'auteur propose que la formation de pseudopodes soit liée à la production des FRO : les FRO produits fonctionneraient comme des perturbateurs des pseudopodes formés dans une direction incorrecte pour le mouvement de la cellule ; cette formation de pseudopodes serait très liée au gradient de concentration de la molécule chemoattractante. L'auteur propose que l'activité NADPH Oxydase aurait un effet dans la formation de pseudopodes exclusivement avec les cellules en contact avec le chemoattractant, contrairement aux cellules qui n'étaient pas en contact. Les problèmes de migration directionnelle des cellules serait donc aléatoire et ne serait pas corrélée avec les gradients de concentration des molécules chemoattractantes.

Le second modèle d'analyse est le PAF, c'est d'abord une molécule connue pour sa capacité à activer les plaquettes sanguines, elle est synthétisée par les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes. Elle a été montrée comme inductrice de chimiotactisme dans les CD (Dichmann et al., 2000). Nous montrons dans ce travail que les CD matures et immatures possèdent le PAFr puisque elles répondent à la présence de la molécule par une sécrétion très forte de H₂O₂. Comme avec le W6, la production de H₂O₂ est très rapide, (maximum atteint en moins d'une minute), l'appareil de mesure n'est pas assez rapide pour enregistrer la montée de la sécrétion ; comme dans le cas du W6 les enregistrements montrent la présence d'une seconde vague de sécrétion de H₂O₂ vraisemblablement due comme pour W6 à la sécrétion spontanée de H₂O₂ par les CD.

Quelque soit l'activateur étudié, son effet est amplifié par l'addition simultanée de LPS bien que ce composé par lui-même n'ait pas d'effet sur l'activité NOX dans les CD testées : nos résultats montrent que même la courbe de production du H₂O₂ est modifiée dans ces conditions. En conclusion, bien que le LPS seul n'ait pas d'effet visible sur l'activité oxydase (au moins en niveau de la production H₂O₂), il est capable d'entrer en synergie pour l'activation du système oxydant des CD avec d'autres activateurs. A ce jour, nous n'avons pas de conclusion nette quand aux mécanismes mis en jeu : le LPS est connu pour induire divers effets sur les CD (maturation, régulation des facteurs de transcription, sécrétion des cytokines,

changements morphologiques, etc.) (Y. S. Cho, Challa, Clancy, & Chan, 2010; Gomard et al., 2010; F Granucci et al., 1999; Hofer et al., 2001; Y.-C. Wang et al., 2009; Zanoni & Granucci, 2010), cependant, il faut noter que, dans tous les cas, l'incubation des cellules avec le LPS dure de 1 à 24 heures, ce qui laisse le temps à certaines modifications physiologiques de se produire et aux fonctions d'évoluer : des facteurs de transcription comme NF- κ B ou des cytokines comme TRAIL (ligand inducteur d'apoptose lié au TNF) n'agissent que pendant les premiers temps (à partir de 1 heure) d'incubation avec le LPS. Cependant quand on étudie en détail la seconde partie des courbes (en ce qui concerne les activations W6 et PAF) on remarque que le LPS induit également une augmentation de la quantité de H₂O₂ produite, il est donc probable que la sécrétion des FRO a un rôle dans les mécanismes intervenant dans le chimiotactisme. L'activité synergique du LPS dans la sécrétion des FRO pourrait être liée aux phénomènes des flux du calcium qui est impliqué dans les mécanismes de chimiotactisme (Pettit & Fay, 1998), l'effet du LPS sur la modification des flux calciques a été rapporté par plusieurs auteurs (Letari, Nicosia, Chiavaroli, Vacher, & Schlegel, 1991; Watanabe, Suzuki, & Kobayashi, 1996; Yee & Christou, 1993)

Nous avons jusqu'à maintenant insisté sur les molécules activatrices des NOX, mais il existe également des inhibiteurs capables d'interagir soit directement avec les NOX, soit avec d'autres complexes protéiques capables d'induire un stress oxydatif dans les cellules, comme la chaîne respiratoire des mitochondries ; le DPI (pour les NOX) et l'azide (pour les mitochondries) ; le DPI a été montré comme étant capable d'interagir avec les enzymes de type flavoprotéine, ce qui bloque leur activité (Ellis, Mayer, & Jones, 1988). Dans notre système, nous avons montré une inhibition de la production du H₂O₂ et de O₂⁻ en présence de DPI et ceci de façon tout à fait équivalente à ce qui a été montré pour les neutrophiles par exemple. L'utilisation de l'azide comme inhibiteur des FRO est très répandue, en effet cette molécule est capable d'interagir avec la chaîne respiratoire des mitochondries au niveau du complexe cytochrome oxydase (complexe IV) (Chen et al., 2003) bloquant ainsi le flux d'électrons, cette inhibition entraîne une accumulation des FRO « autres » et empêche l'interaction des électrons jusqu'à l'oxygène moléculaire (Figure 49). Bien que la spécificité du DPI comme inhibiteur ait été mise en cause par différents auteurs (Riganti et al., 2004), pour l'instant il n'y a pas d'autre inhibiteur spécifique

confirmé agissant sur les NOX. Par contre l'inhibition apparente du H₂O₂ en présence d'azide, qui entraîne un blocage de la chaîne respiratoire des mitochondries, semble plutôt être le résultat d'un effet sur les enzymes peroxydases (C. Y. Li, Ziesmer, & Lazcano-Villareal, 1987); il faut rappeler que la méthode utilisée pour le dosage du H₂O₂ par chemiluminescence utilise ce type d'enzyme : la HRP.

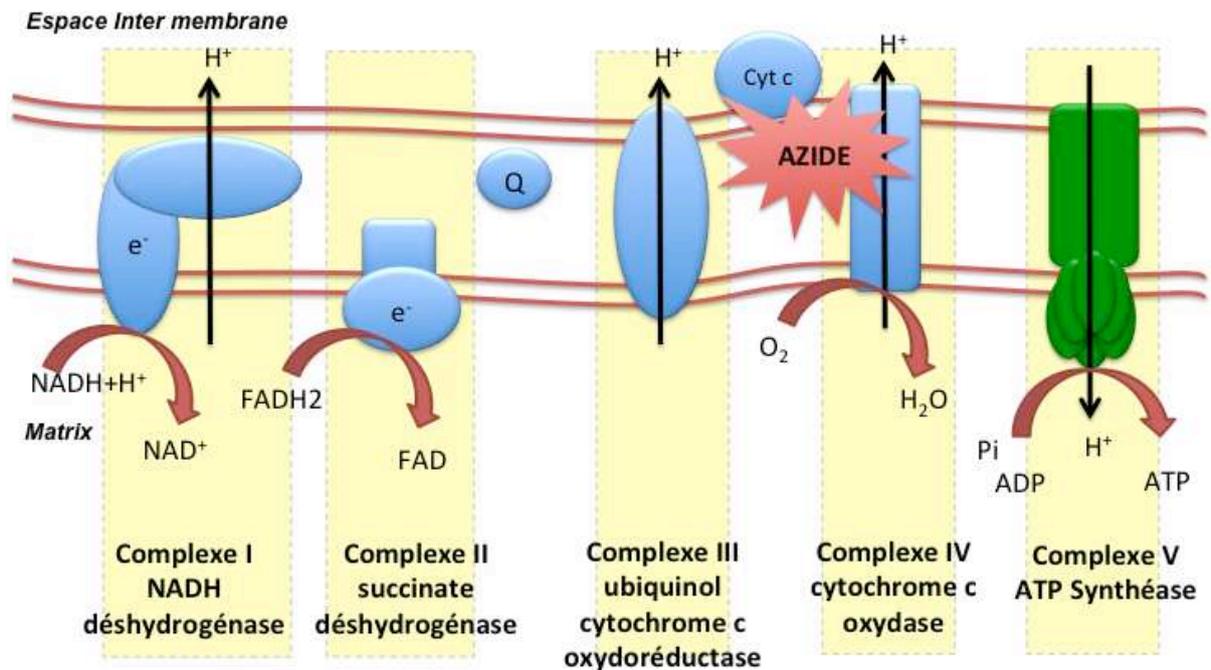


Figure 49 Effet de l'azide dans la respiration Mitochondriale

Nous avons montré que les cellules dendritiques génèrent de fortes quantités de H₂O₂ et de superoxyde (élément initial produit par les NOX) comme décrit Figure 23, La plupart des auteurs montrent que la production de O₂⁻ conduit directement à la formation de H₂O₂ par simple protonation, réaction avec un pKa = 4,8 (Fridovich, 1997) ou par activité des « scavengers » du superoxyde comme les SOD pour le superoxyde et MPO, GSH, Prx, etc. pour d'autres FRO (Storz, 2006), en ce qui concerne les CD, nos résultats montrent que cette dismutation n'est pas proportionnelle, et qu'un contrôle plus complexe de la dismutation du O₂⁻ intervient dans la CD principalement après une activation avec du LPS pour induire la maturation de la cellule. Ce résultat sera discuté plus en détail dans le chapitre dédié à SOD3.

1.10 Enzymes et FRO dans les CD

1.10.1 NADPH Oxydases

En ce concerne les CD, un certain nombre d'enzymes impliquées dans la génération et le contrôle des FRO ont été décrites ces dernières années, avec une mention toute particulière pour **NOX2** qui a été notamment décrite pour son rôle dans le contrôle et la régulation de la « cross-présentation » (Savina et al., 2006). Par ailleurs, les mitochondries ont une activité oxydante importante et génèrent des FRO qui ont été décrit comme intervenant dans la synthèse des cytokines, ils peuvent intervenir également dans le développement des réponses immunitaires (Naik & Dixit, 2011). Au cours de notre travail, nous avons démontré que les CD synthétisent un second type de NADPH oxydase : NOX1 et avons étudié son fonctionnement en lien avec l'activation des CD. Ces résultats seront discutés et remis en perspectives avec la biologie des CD.

1.10.1.1 NOX1

1.10.1.1.1 Expression

NOX1 a été décrit dans plusieurs cellules non phagocytaires et en premier dans les cellules du colon. D'abord appelé MOX1, cette protéine a ensuite été appelée NOX1 (Suh et al., 1999), Il y a peu de travaux relatifs à l'étude de NOX1 au niveau des cellules phagocytaires, où NOX2 a été démontrée comme étant exprimée de façon abondante. Nos résultats montrent que NOX1 est exprimé dans les CD dès les premières étapes de leur différenciation, car nous avons détecté de l'ARNm codant pour NOX1 dès le stade de cellules précurseurs des CD (Figure 1 du papier NOX1). Cette expression est cependant faible en comparaison de l'expression de NOX2. Nous avons montré que l'expression de NOX1 augmente régulièrement au cours de la différenciation des CD, nous avons également montré l'impact de l'activation des cellules qui est obtenu par l'addition de LPS pendant 24 heures ; nos résultats montrent que NOX1 est active tout au long de la différenciation cellulaire y compris au stade de cellules matures, NOX1 pourrait donc jouer un rôle important dans différentes activités cellulaires. Arakawa (Arakawa et al., 2006) avait montré que différents isoformes de NOX1 pouvaient être exprimées dans les cellules de muscle lisse d'origine vasculaire (VSMC), notre étude montre que l'isoforme exprimée dans les CD est de type « a ».

1.10.1.1.2 Activation et inhibition

L'activité de NOX1 est contrôlée de façon similaire à celle de NOX2, c'est à dire, qu'elle nécessite l'interaction du complexe principal membranaire formé par NOX1 et p22, avec des composants cytosoliques NOXO1, NOXA1 et RAC pour produire des O₂⁻ (Bánfi et al., 2003; Ueyama et al., 2006), cette activité peut être inhibée en présence de DPI qui comme pour NOX2, interagit avec les composants flavoprotéiques. Nos résultats ont montré que les cellules ayant suivi une maturation induite par le LPS ont eu une activité NADPH oxydase plus importante au niveau de la membrane nucléaire, ce qui indique qu'à ce stade, la production des FRO par NOX1 est importante (Figure 4 du papier NOX1).

1.10.1.1.3 Activité enzymatique

Le fait que le complexe NOX1 soit localisé au niveau de la membrane nucléaire lorsque les CD se trouvent au stade mature, explique la production de FRO à ce niveau. La production de radicaux oxygénés au niveau nucléaire peut avoir un impact sur de nombreuses activités cellulaires telles que survie cellulaire, induction d'apoptose et synthèse de cytokines. Des CD cultivées à partir de progéniteurs isolés de souris transgéniques dont le gène codant pour NOX1 a été inactivé (Gavazzi et al., 2006) survivent en culture plus de temps que les CD WT ce qui semble indiquer que NOX1 joue un rôle dans le contrôle de la survie cellulaire (Figure 6b du papier NOX1) ou à l'opposé dans l'induction de la mort cellulaire, cependant nos analyses par cryométrie en flux ont montré que les CD NOX1KO ne se différencient pas en CD comme le font les CD WT : la fraction de cellules CD11c positives est plus faible même après maturation des cellules en présence de LPS. Ces résultats nous ont conduit à proposer que NOX1 est important pour la différenciation des progéniteurs en CD car, bien que ce soit à taux faible, NOX1 est exprimé à tous les stades de différenciation, y compris au stade de précurseur, et augmente de façon constante pendant la culture. Au cours de cette culture, le pourcentage de cellules ayant un phénotype correspondant à celui des CD est plus faible mais celles qui se sont différenciées ont le même phénotype que les CD WT : La maturation en présence de LPS entraîne bien une augmentation des Molécules de classe II et des molécules de co-stimulation du type CD86. Nous n'avons pas non plus noté de différence dans le pourcentage de cellules apoptotiques mesurées par cryométrie de flux en présence d'annexine V. Nous pensons que NOX1 joue un rôle

dans la différenciation des CD et pourrait aussi participer au contrôle du cycle cellulaire. La production de FRO au niveau nucléaire pouvant participer au contrôle de l'expression des gènes permettant la différenciation en CD.

1.10.1.1.4 Maladies

Gavazzi a montré que des souris dépourvues en NOX1 ont une diminution de pression artérielle (Gavazzi et al., 2006), Par ailleurs, NOX1 semblerait être surexprimé dans certains cancers (Kamata, 2009). En effet, NOX1 pourrait être intimement lié au développement de certains cancers : Chiera (Chiera et al., 2008) a montré que dans des cellules sur-exprimant NOX1 après transfection, il y a induction d'une instabilité du DNA résultant de l'activité oxydase de NOX1 au niveau du noyau, ce qui pourrait induire un grand nombre de mutations et par conséquent la formation de cellules cancéreuses. Plus récemment le groupe de H. Rosen (Gianni et al., 2010) a utilisé un nouvel inhibiteur qu'ils décrivent comme étant spécifique de NOX1 ; ce qui leur a permis de montrer que la formation d'invadopodia dans les cellules du cancer du colon DLD1 et HT29 est dépendante de la présence de NOX1 et qu'en son absence, le développement d'une tumeur est bloqué. Il y a de nombreuses publications où NOX1 intervient dans le cycle cellulaire et le cancer (R S Arnold et al., 2001; Rebecca S Arnold et al., 2007; McCrann, Eliades, Makitalo, Kuniharu Matsuno, & Ravid, 2009; H. S. Park et al., 2004; X. Wang & Z. Sun, 2010), toutes nos analyses concernant NOX1 réalisées avec notre modèle cellulaire suggère que ce complexe enzymatique est constamment présent durant la différenciation des CD et intervient vraisemblablement dans le contrôle de cette dernière.

1.10.2 Superoxyde Dismutases

L'effet du O₂⁻ sur les cellules est étudié depuis de nombreuses années et les résultats reportés dans les différents articles décrivent des effets délétères de ce dérivé de l'oxygène ; par exemple, une étude faite chez les bactéries montre la capacité du superoxyde à induire des dommages à l'ADN (R S Arnold et al., 2001; Rebecca S Arnold et al., 2007; McCrann, Eliades, Makitalo, Matsuno, & Ravid, 2009; H. S. Park et al., 2004; X. Wang & Sun, 2010), les effets sont amplifiés lorsqu'une enzyme connue pour participer à la dismutation du O₂⁻ en H₂O₂, est absente de ces bactéries. Cette étude montre l'importance des enzymes de type SOD sur la préservation des fonctionnalités cellulaires. Dans le cas des CD, la dismutation du

superoxyde en peroxyde ne semble pas être systématique et totale ; en effet lorsqu'on induit la maturation des CD par incubation en présence de LPS, on observe une production O_2^- qui augmente en comparaison de ce qui est mesuré pour les cellules à l'état immature (voir chapitre cellules dendritiques et FRO), mais par contre si on mesure le H_2O_2 produit, il n'y a pas de différence significative entre les deux états cellulaires (Figure 23). Il faut noter que le comportement des CD lorsqu'elles ont subi une maturation en présence de LPS (Figure 24) diffère de celui des CD qui acquièrent leur état de maturation par simple vieillissement : comme nous l'avons montré, par cytométrie en flux, la production du O_2^- (mesuré par fluorescence du DHR) des CD matures diminue en comparé à celui des CD immatures (Figure 31). Afin de mieux comprendre ces résultats, nous avons analysé plus en détail les enzymes capables de catalyser la réaction de dismutation du O_2^- en H_2O_2 , c'est-à-dire les SOD1, 2 et 3 que nous avons montré comme étant toutes exprimées dans les CD.

1.10.2.1 SOD3

1.10.2.1.1 Expression

Les protéines SOD ont été décrites comme étant localisées dans des zones bien précise des cellules : SOD1 (Cu-Zn) se situe dans le cytoplasme et le noyau, SOD2 (Mg) a été décrite comme étant dans les mitochondries, enfin SOD3 (Cu-Zn) se concentre au niveau de la membrane extracellulaire et dans les espaces extracellulaires (Fridovich, 1997). Nous avons montré par microscopie confocale (Figure 45) que la localisation de SOD3 dans les CD, est principalement péri-cellulaire et accessible de l'extérieur de la cellule puisque les anticorps fluorescents utilisés pour la détection interagissent avec la protéine sans qu'il y ait besoin de perméabiliser la membrane avec un détergent. Il faut noter également que la quantité de SOD3 visualisée après perméabilisation des cellules est beaucoup plus faible, ce qui correspond sans doute à une perte de matériel lors de la perméabilisation. ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature qui montrent que les cellules sécrètent SOD3 vers l'espace extracellulaire. SOD3 a été décrit comme étant exprimé principalement dans le poumon (S. L. Marklund, 1982), la démonstration de la synthèse de cette SOD par les CD est donc originale, elle pourrait s'expliquer par le fait que l'hyperactivité oxydante de ces cellules nécessiterait un système de contrôle des FRO performant afin d'éviter les

dommages que pourrait induire l'activité des FRO. Les analyses par western blot nous ont montré que la protéine, SOD3 est à la fois présente dans les extraits cellulaires (Figure 44), et dans les milieux de culture des CD, ce qui correspond aux données bibliographiques qui montrent que SOD3 est non seulement excrétée par les cellules (Tibell et al., 1987) mais que qu'elle interagisse avec les membranes cellulaires grâce à son affinité pour l'héparine sulfate, le collagène du type 1 et l'acide hyaluronique (Adachi, Yamamoto, & Hara, 2001; Petersen et al., 2004; Sandström, Carlsson, S L Marklund, & Edlund, 1992).

1.10.2.2 *Activation et inhibition*

SOD3 est une protéine possédant en son centre actif un atome de cuivre, son activité est dépendante d'une autre protéine ATOX-1 (Jeney et al., 2005), qui sert de chaperon pour le transport du cuivre jusqu'au golgi, mais le rôle d'ATOX-1 serait plus vaste puisque cette protéine serait également impliquée dans les mécanismes d'induction de l'expression de l'ARNm et de la transcription de SOD3. D'autres études montrent que ATOX-1 est spécifique de SOD3 puisqu'elle n'interviendrait pas dans l'activité de SOD1 qui possède également un Cu au centre actif (Itoh et al., 2009). Nous avons montré par qPCR que la quantité d'ARNm codant pour la protéine SOD3, même si elle est faible dans les premières étapes de différenciation, augmente une fois que les cellules sont différenciées en CD, de plus, cette expression augmente lorsque l'on induit la maturation des cellules par addition de LPS (Figure 43). Nous avons émis l'hypothèse que SOD3 qui interagit avec les membranes cellulaires serait internalisé et pourrait donc agir dans les compartiments intracellulaires comme les endosomes et lysosomes. La forte phagocytose des cellules immatures permet l'introduction de SOD3 qui peut alors dismuter en forte quantité le O₂⁻ intra-phagosomal alors qu'au stade mature, la phagocytose est diminuée (K Matsuno, Ezaki, Kudo, & Uehara, 1996) et donc la dismutation du O₂⁻ serait plus faible, ce qui expliquerait que bien que la production de O₂⁻ soit augmentée à ce stade cellulaire, la formation de H₂O₂ est presque systématiquement plus faible. Nous avons noté au cours de nos différentes expériences que la maturation cellulaire obtenue soit par vieillissement des cellules soit par addition d'un activateur comme le LPS ne conduit pas à la production de cellules en tout point identiques : si les CD ont le même phénotype, elles diffèrent

cependant dans leur capacité à sécréter des FRO que ce soit H₂O₂ ou O₂⁻. Par ailleurs, (Vulcano et al., 2004) a montré que les CD activées par les voies TLR4 (LPS) subissaient une modification de leur activité NOX, par ailleurs, (Bowler et al., 2004) a montré qu'après addition de LPS, SOD3 pouvait inhiber en partie la production de cytokines par les neutrophiles pulmonaires, cette enzyme interviendrait également dans le chimiotactisme des macrophages au niveau des tissus endommagés dans des modèles d'ischémie (Laurila, Laatikainen, Castellone, & Laukkanen, 2009). Une synergie entre la production de cytokines pro-inflammatoires et SOD3 a été caractérisée dans les cellules souches mésenchymateuses (Kemp, Gray, Mallam, Scolding, & Wilkins, 2010). L'ensemble de ces travaux montre qu'il existe un lien fonctionnel entre LPS, TLR4 et SOD3 qui permet d'envisager une relation entre SOD3 et certains processus immunologiques.

L'effet de différents inhibiteurs de SOD3 a été étudié par Marklund (S L Marklund, 1984b), plusieurs molécules capables soit de réduire soit d'inhiber complètement l'activité dismutase de SOD3 ont été testées; parmi ces dernières, le DETCA, en chélatant du cuivre a été montré comme inhibant spécifiquement l'activité de SOD3 et de SOD1.

Nous avons utilisé ce composé afin de mieux caractériser l'effet des SOD dans le cas des CD ; comme le montrent nos résultats (Figure 46), grâce aux mesures réalisées par chimioluminescence, l'DETCA inhibe complètement la production de H₂O₂, le DETCA semble agir sur une activité dismutase localisée à l'intérieur des cellules, simultanément, nous montrons avec des tests utilisant le NBT que la quantité de O₂⁻ produite n'est pas significativement modifiée (Figure 46b). Il est possible que les radicaux O₂⁻, dans la mesure où la dismutation est bloquée, se transforment en peroxy-nitrite par interaction avec l'oxyde nitrique (Squadrito & Pryor, 1998). Grâce à l'utilisation de la sonde fluorescente DHR, nous montrons qu'une forte accumulation de fluorescence et donc de radicaux O₂⁻ a lieu dans la cellule quand la DETCA est utilisé pour bloquer SOD3, (Figure 47) mais la mesure de la production du O₂⁻ ne semble pas très stable dans ces conditions puisque la fluorescence s'éteint en 40 minutes, alors que dans le cas des cellules contrôles, la fluorescence est stable pendant toute la mesure.

L'inhibition de la production du H₂O₂ dans les CD par le DETCA va à l'encontre de l'hypothèse de départ qui suppose que la réaction de dismutation pourrait être un phénomène spontané en présence de protons, nos résultats nous portent à croire que cette dismutation est aussi liée à la présence de protéine SOD dans les compartiments intracellulaires. L'interaction du DETCA vis-à-vis de SOD confirme l'importance de cette protéine, qui serait alors importante non seulement pour la protection des cellules entourant la CD produisant des FRO, mais également pour son rôle dans la dismutation des O₂⁻ au niveau des compartiments intracellulaires et donc dans la protection des CD.

1.10.2.3 *Maladies*

Plusieurs auteurs ont analysé l'implication de SOD3 dans différentes pathologies. L'équipe de Marklund en 2006 (Sentman et al., 2006) a étudié le phénotype de souris dépourvues de SOD3 ou ayant un double KO SOD3/SOD1 : ils n'ont pas réussi à montrer d'effet significatif résultant de l'absence de SOD3, la plupart des conséquences phénotypiques observées étant plutôt liées au manque de SOD1. Dans un contexte, Alfonso et. col., (Alfonso, Champy, Mitrovic, Collin, & Lomri, 2007) ont montré que l'activité dismutase était importante dans le cas de pathologies des articulations : en effet, une forte production de FRO a été observée au niveau des zones présentant des lésions articulaires mais aucune spécificité liée à la présence de SOD3 n'a pu être établie. C'est dans l'étude des mécanismes liés à la respiration qu'ont été caractérisées la plupart des maladies reliées à SOD3 et c'est à ce niveau que la quantité de cette enzyme est la plus importante. Cette protéine est notamment nécessaire en cas de lésions hypoxiques chez la souris, cela permet une récupération du tissu endommagé, (Ganguly et al., 2009), ces résultats montrent que en présence des SNP (single nucleotide polymorphisms) dans le gène SOD3 les capacités protectrices de SOD diminuent dans le poumon. Dans le cas de cancer, une étude a montré la capacité de SOD3, une fois hyper exprimé in vitro, à induire une réduction de la croissance et de l'invasion du cancer de sein (Teoh, Fitzgerald, Oberley, & Domann, 2009), cet effet inhibiteur ne semble pas être lié à la capacité de SOD3 à interagir avec des motifs de type héparine sur la membrane cellulaire. SOD3 joue également un rôle très important dans le contrôle de la pression artérielle, comme le montre des travaux consacrés à l'étude des différents organes impliqués dans le contrôle de cette activité biologique. Il est à noter l'infiltration de cellules du

système immunitaire notamment des macrophages dans les tissus où il y a hypertension (Lob et al., 2011), l'auteur propose que le stress oxydant puisse entraîner l'expression de molécules d'adhésion et de chemokines qui signaleraient les cellules inflammatoires.

En conclusion, il semble que la modification d'activité de SOD3 à elle-seule n'entraîne pas de pathologies, cependant des variations liées aux SNP du gène SOD3 dans le cas de maladies du type vasculaire ou pulmonaire, entraîneraient soit une aggravation soit des problèmes de récupération des tissus endommagés.

L'implications de SOD3 dans le système immunitaire a été très peu étudié pour l'instant, il n'y a pas de travaux publiés traitant du rôle de SOD3 dans la CD, l'activité de cette dismutase pourrait être un élément important pour le contrôle des FRO aussi bien dans le contexte de la réponse immunitaire, que dans les mécanismes inflammatoires puisque il a été montré que SOD3 pouvait contrôler la synthèse des cytokines pro inflammatoires (Laurila et al., 2009).

1.11 Nanoparticules et FRO

L'utilisation des NP dans le traitement de différentes pathologies dont certains cancers (Grobmyer et al., 2011) ainsi que dans l'imagerie médicale in vitro et in vivo (Sen, Deerinck, Ellisman, Parker, & Cahalan, 2008) est maintenant très répandue, cependant les risques liés à l'utilisation de ces NP sont encore très peu connus (Gwinn & Vallyathan, 2006). Dans le cadre de différents programmes nationaux et européens, nous avons analysé l'impact de plusieurs types de NP sur l'activité des CD et notamment sur leur capacité à induire un stress oxydatif, même si de nombreuses difficultés ont surgit au cours de ces études, principalement liées à l'interférence des NP avec les méthodes photométriques et fluorométriques utilisées, nos résultats nous ont cependant permis de tirer un certain nombre de conclusions quant à l'effet de ces matériaux sur les CD.

L'analyse des effets des NP sur le système immunitaire est un pré-requis demandé par les réglementations de sécurité avant toute utilisation de nouveaux nanomatériaux, les CD constituent un bon modèle d'étude car ces cellules très rapidement au contact de tout élément contaminant de l'organisme du fait de leur

position dans les tissus périphériques (peau, poumons, tube digestif) et de leur grande capacité de phagocytose, par ailleurs, les CD jouent un rôle prépondérant dans la mise en place des réponses immunitaires. Nos travaux ont montré que les NP interfèrent d'une façon significative avec les techniques classiquement utilisées pour la mesure des stress oxydatifs, ces techniques étant basées sur des mesures d'absorption ou de fluorescence, qui sont perturbées par les NP se trouvant à l'intérieur des cellules.

Même si nos études ont conclu que les NP n'ont pas d'incidence sur la capacité des CD à induire un Stress Oxydatif, il reste que ce type de test doit être généralisé à tout matériel nanoparticulaire qu'il soit nouveau ou non, il existe des variables dans les NP dont on ne connaît pas encore l'incidence sur les activités cellulaires. Hussain avait montré (Hussain et al., 2009) que la taille (surface volumique) des NP pouvait, d'une part influencer la quantité de NP internalisée et d'autre part induire un stress oxydatif dans des cellules épithéliales. La composition des NP est, elle-aussi importante, et pourrait entraîner des différences dans la réactivité de la cellule.

En conclusion les NP testées ont clairement affecté les méthodes de mesure du stress oxydatif, il est évident que de nouvelles méthodes de mesure doivent être mises au point afin de pouvoir mesurer les effets réels qui sont induits au niveau cellulaire. La composition des NP utilisées a un rôle prépondérant dans l'induction des stress oxydatifs car c'est avant tout des transferts d'électrons et des changements de potentiel (Bandyopadhyay et al., 1999) qui sont à l'origine de ces phénomènes, il est évident que de tels stress peuvent altérer de nombreux paramètres biologiques : survie cellulaire, mécanismes de signalisation, et formation de FRO (Finkel, 2011) et par là-même, avoir des effets nocifs irréversibles in vitro (Donaldson, Borm, Castranova, & Gulumian, 2009).

Conclusion générale

Au cours de ces trois années de travail sur les CD et le stress oxydatif, j'ai pu confirmer l'importance et la haute réactivité du système oxydant dont les CD sont le siège : il est constitué d'un nombre important d'enzymes et de complexes qui travaillent de façon coordonnée dans la cellule et interviennent dans le contrôle de différents processus importants pour les activités biologiques des CD,

chimiotactisme, phagocytose, cycle cellulaire, etc. L'expérience acquise dans l'analyse de ces phénomènes par le croisement de nombreuses techniques m'a permis de développer ma façon d'analyser les problèmes scientifiques. Dans le cadre de ce travail, nous avons décrit pour la première fois dans les CD deux nouvelles protéines (NOX1 et SOD3) qui sont intimement liées au contrôle du stress oxydant dans ces cellules, bien évidemment, elles complexifient un système qui est déjà riche, mais leur mise en évidence ouvre de nouvelles perspectives pour la compréhension du fonctionnement et du rôle et par là même de l'importance du stress oxydant dans les CD qui sont au cœur de la réponse immunitaire.

Perspectives

L'élucidation des mécanismes de contrôle de la production des ROS peut amener à une meilleure compréhension du contrôle de la réponse immune par les CD. On ne connaît pas encore toute l'importance des relations entre NOX2 et les phénomènes de présentation d'antigène classique, la compréhension de ces phénomènes est essentielle pour élucider l'importance des CD dans le contexte immunologique.

Nous démontrons que NOX1 est active dans les cellules dendritiques, une meilleure connaissance de l'expression de cette protéine permettra de définir son rôle dans la signalisation ou le cycle cellulaire des CD, et pourrait amener de nouvelles réponses concernant le développement des CD, les voies de signalisation concernées et la probable nécessité de NOX1 pour la maturation de la CD.

Le contrôle de la production de O₂⁻ amène de nouvelles hypothèses qui méritent d'être étudiées quant à leur possible rôle dans la dégradation des pathogènes et le développement de la réponse immunitaire (peut être lié aux phénomènes de cross présentation), SOD3 est nécessaire à la dismutation du superoxyde, mais on est loin d'établir une vraie dépendance de cette protéine dans le système oxydant des CD, de nouveaux protocoles pourraient être établis afin d'élucider cette importance de SOD dans le contexte du stress oxydatif et de la réponse immunitaire.

Données Bibliographiques

- Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampé, R., & Cresswell, P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), 12889-94. doi:10.1073/pnas.1735556100
- Adachi, T., Yamnamoto, M., & Hara, H. (2001). Heparin-Affinity of human extracellular-superoxide dismutase in the brain. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 24(2), 191-3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11217091>
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*, 74(4), 324-9. doi:10.1016/j.jbspin.2007.02.002
- Ambasta, R. K., Kumar, P., Griending, K. K., Schmidt, H. H. H. W., Busse, R., & Brandes, R. P. (2004). Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry*, 279(44), 45935-41. doi:10.1074/jbc.M406486200
- Arakawa, N., Katsuyama, M., Matsuno, K., Urao, N., Tabuchi, Y., Okigaki, M., Matsubara, H., et al. (2006). Novel transcripts of Nox1 are regulated by alternative promoters and expressed under phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells. *The Biochemical journal*, 398(2), 303-10. doi:10.1042/BJ20060300
- Ardavín, C. (2003). Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nature reviews. Immunology*, 3(7), 582-90. doi:10.1038/nri1127
- Arnold, R S, Shi, J., Murad, E., Whalen, a M., Sun, C. Q., Polavarapu, R., Parthasarathy, S., et al. (2001). Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5550-5. doi:10.1073/pnas.101505898
- Arnold, Rebecca S, He, J., Remo, A., Ritsick, D., Yin-Goen, Q., Lambeth, J. D., Datta, M. W., et al. (2007). Nox1 expression determines cellular reactive oxygen and modulates c-fos-induced growth factor, interleukin-8, and Cav-1. *The American journal of pathology*, 171(6), 2021-32. doi:10.2353/ajpath.2007.061144
- Banchereau, J, & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-52. doi:10.1038/32588

- Banchereau, J, Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, 18(Figure 1), 767-811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767
- Bandyopadhyay, U., Das, D., & Banerjee, R. K. (1999). Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci*, 77(5), 658–666. Retrieved from <http://www.ias.ac.in/currsci/sep10/reviewarticle.pdf>
- Bedard, K., & Krause, K.-heinz. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), 245-313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
- Blanco, P., Palucka, a K., Pascual, V., & Banchereau, J. (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine & growth factor reviews*, 19(1), 41-52. doi:10.1016/j.cytogfr.2007.10.004
- Bowler, R. P., Nicks, M., Tran, K., Tanner, G., Chang, L.-Y., Young, S. K., & Worthen, G. S. (2004). Extracellular superoxide dismutase attenuates lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 31(4), 432-9. doi:10.1165/rcmb.2004-0057OC
- Bravo, J., Karathanassis, D., Pacold, C. M., Pacold, M. E., Ellson, C. D., Anderson, K. E., Butler, P. J., et al. (2001). The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Molecular cell*, 8(4), 829-39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684018>
- Bridot, J.-L., Faure, A.-C., Laurent, S., Rivière, C., Billotey, C., Hiba, B., Janier, M., et al. (2007). Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: multimodal contrast agents for in vivo imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 129(16), 5076-84. doi:10.1021/ja068356j
- Brigelius-Flohé, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10), 951-965. doi:10.1016/S0891-5849(99)00173-2
- Bánfi, B, Molnár, G., Maturana, a, Steger, K., Hegedûs, B., Demaurex, N., & Krause, K. H. (2001). A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *The Journal of biological chemistry*, 276(40), 37594-601. doi:10.1074/jbc.M103034200
- Bánfi, Botond, Clark, R. a, Steger, K., & Krause, K.-H. (2003). Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *The Journal of biological chemistry*, 278(6), 3510-3. doi:10.1074/jbc.C200613200
- Bánfi, Botond, Malgrange, B., Knisz, J., Steger, K., Dubois-Dauphin, M., & Krause, K.-H. (2004). NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *The Journal of biological chemistry*, 279(44), 46065-72. doi:10.1074/jbc.M403046200

- Cao, C., Leng, Y., Huang, W., Liu, X., & Kufe, D. (2003). Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry*, 278(41), 39609-14. doi:10.1074/jbc.M305770200
- Chanock, S. J., el Benna, J., Smith, R. M., & Babior, B. M. (1994). The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.*, 269(40), 24519-24522. Retrieved from <http://www.jbc.org>
- Chen, H., Fre, S., Slepnev, V. I., Capua, M. R., Takei, K., Butler, M. H., Di Fiore, P. P., et al. (1998). Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature*, 394(6695), 793-7. doi:10.1038/29555
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of biological chemistry*, 278(38), 36027-31. doi:10.1074/jbc.M304854200
- Cheng, G, Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G., & Lambeth, J. D. (2001). Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*, 269(1-2), 131-40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11376945>
- Cheng, Guangjie, Diebold, B. a, Hughes, Y., & Lambeth, J. D. (2006). Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *The Journal of biological chemistry*, 281(26), 17718-26. doi:10.1074/jbc.M512751200
- Chiera, F., Meccia, E., Degan, P., Aquilina, G., Pietraforte, D., Minetti, M., Lambeth, D., et al. (2008). Overexpression of human NOX1 complex induces genome instability in mammalian cells. *Free radical biology & medicine*, 44(3), 332-42. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.09.018
- Chijioke, O., & Münz, C. (2011). Interactions of human myeloid cells with natural killer cell subsets in vitro and in vivo. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 251679. doi:10.1155/2011/251679
- Cho, H. J., Shashkin, P., Gleissner, C. a, Dunson, D., Jain, N., Lee, J. K., Miller, Y., et al. (2007). Induction of dendritic cell-like phenotype in macrophages during foam cell formation. *Physiological genomics*, 29(2), 149-60. doi:10.1152/physiolgenomics.00051.2006
- Cho, Y. S., Challa, S., Clancy, L., & Chan, F. K.-M. (2010). Lipopolysaccharide-induced expression of TRAIL promotes dendritic cell differentiation. *Immunology*, 130(4), 504-15. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03266.x
- Clark, R a. (1990). The human neutrophil respiratory burst oxidase. *The Journal of infectious diseases*, 161(6), 1140-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2161041>
- Clark, G. J., Angel, N., Kato, M., López, J. A., MacDonald, K., Vuckovic, S., & Hart, D. N. . (2000). The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes and Infection*, 2(3), 257-272. doi:10.1016/S1286-4579(00)00302-6

- Cresswell, P., Ackerman, A. L., Giodini, A., Peaper, D. R., & Wearsch, P. a. (2005). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunological reviews*, 207, 145-57. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00316.x
- Cupers, P., ter Haar, E., Boll, W., & Kirchhausen, T. (1997). Parallel dimers and anti-parallel tetramers formed by epidermal growth factor receptor pathway substrate clone 15. *The Journal of biological chemistry*, 272(52), 33430-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9407139>
- Dahlgren, C., & Karlsson, a. (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *Journal of immunological methods*, 232(1-2), 3-14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618505>
- De Deken, X, Wang, D., Many, M. C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J. E., et al. (2000). Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *The Journal of biological chemistry*, 275(30), 23227-33. doi:10.1074/jbc.M000916200
- Di Paolo, G., & De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443(7112), 651-7. doi:10.1038/nature05185
- Dichmann, S., Rheinen, H., Panther, E., Herouy, Y., Czech, W., Termeer, C., Simon, J. C., et al. (2000). Downregulation of platelet-activating factor responsiveness during maturation of human dendritic cells. *Journal of cellular physiology*, 185(3), 394-400. doi:10.1002/1097-4652(200012)185:3<394::AID-JCP9>3.0.CO;2-Z
- Dinauer, M C, Pierce, E. a, Erickson, R. W., Muhlebach, T. J., Messner, H., Orkin, S. H., Seger, R. a, et al. (1991). Point mutation in the cytoplasmic domain of the neutrophil p22-phox cytochrome b subunit is associated with a nonfunctional NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), 11231-5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=53108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Drake, M. T., Downs, M. a, & Traub, L. M. (2000). Epsin binds to clathrin by associating directly with the clathrin-terminal domain. Evidence for cooperative binding through two discrete sites. *The Journal of biological chemistry*, 275(9), 6479-89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692452>
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
- Dudek, S. M., & Garcia, J. G. N. (2003). Rho family of guanine exchange factors (GEFs) in cellular activation: who's dancing? And with whom? *Circulation research*, 93(9), 794-5. doi:10.1161/01.RES.0000100844.06166.FF
- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, a, Noël-Hudson, M. S., Dème, D., & Virion, a. (1999). Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase.

- Cloning of the porcine and human cdnas. *The Journal of biological chemistry*, 274(52), 37265-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601291>
- Ellis, J. a, Mayer, S. J., & Jones, O. T. (1988). The effect of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium on aerobic and anaerobic microbicidal activities of human neutrophils. *The Biochemical journal*, 251(3), 887-91. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1149085&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Elsen, S., Doussi re, J., Villiers, C. L., Faure, M., Berthier, R., Papaioannou, A., Grandvaux, N., et al. (2004). Cryptic O₂-generating NADPH oxidase in dendritic cells. *Journal of cell science*, 117(Pt 11), 2215-26. doi:10.1242/jcs.01085
- Fearon, D. T., & Locksley, R. M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5258), 50-3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8600536>
- Ferrari, G., Knight, a M., Watts, C., & Pieters, J. (1997). Distinct intracellular compartments involved in invariant chain degradation and antigenic peptide loading of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. *The Journal of cell biology*, 139(6), 1433-46. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2132617&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ferrero, I., Held, W., Wilson, A., Tacchini-Cottier, F., Radtke, F., & MacDonald, H. R. (2002). Mouse CD11c(+) B220(+) Gr1(+) plasmacytoid dendritic cells develop independently of the T-cell lineage. *Blood*, 100(8), 2852-7. doi:10.1182/blood-2002-01-0214
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology*, 194(1), 7-15. doi:10.1083/jcb.201102095
- Forman, H. J., & Torres, M. (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 166(12 Pt 2), S4-8. doi:10.1164/rccm.2206007
- Fridovich, I. (1997). Superoxide Anion Radical (O₂⁻), Superoxide Dismutases, and Related Matters. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18515-18517. doi:10.1074/jbc.272.30.18515
- Fulton, D. J. R. (2009). Nox5 and the regulation of cellular function. *Antioxidants & redox signaling*, 11(10), 2443-52. doi:10.1089/ARS.2009.2587
- Gabanyi, M. J., Adams, P. D., Arnold, K., Bordoli, L., Carter, L. G., Flippen-Andersen, J., Gifford, L., et al. (2011). The Structural Biology Knowledgebase: a portal to protein structures, sequences, functions, and methods. *Journal of structural and functional genomics*, 12(2), 45-54. doi:10.1007/s10969-011-9106-2

- Gaetani, G. F., Ferraris, a M., Rolfo, M., Mangerini, R., Arena, S., & Kirkman, H. N. (1996). Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, *87*(4), 1595-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608252>
- Ganguly, K., Depner, M., Fattman, C., Bein, K., Oury, T. D., Wesselkamper, S. C., Borchers, M. T., et al. (2009). Superoxide dismutase 3, extracellular (SOD3) variants and lung function. *Physiological genomics*, *37*(3), 260-7. doi:10.1152/physiolgenomics.90363.2008
- Gavazzi, G., Banfi, B., Deffert, C., Fiette, L., Schappi, M., Herrmann, F., & Krause, K.-H. (2006). Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS letters*, *580*(2), 497-504. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.049
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5966), 656-61. doi:10.1126/science.1178331
- Geiszt, M, Kopp, J. B., Várnai, P., & Leto, T. L. (2000). Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(14), 8010-4. doi:10.1073/pnas.130135897
- Geiszt, Miklós, Lekstrom, K., Brenner, S., Hewitt, S. M., Dana, R., Malech, H. L., & Leto, T. L. (2003). NAD(P)H Oxidase 1, a Product of Differentiated Colon Epithelial Cells, Can Partially Replace Glycoprotein 91phox in the Regulated Production of Superoxide by Phagocytes. *The Journal of Immunology*, *171*(1), 299. Am Assoc Immnol. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/171/1/299.short>
- Geiszt, Miklós, 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. *The Journal of biological chemistry*, *278*(22), 20006-12. doi:10.1074/jbc.M301289200
- Geiszt, Miklós, Witta, J., Baffi, J., Lekstrom, K., & Leto, T. L. (2003). Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *17*(11), 1502-4. doi:10.1096/fj.02-1104fje
- Gianni, D., Taulet, N., Zhang, H., DerMardirossian, C., Kister, J., Martinez, L., Roush, W. R., et al. (2010). A novel and specific NADPH oxidase-1 (Nox1) small-molecule inhibitor blocks the formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *ACS chemical biology*, *5*(10), 981-93. doi:10.1021/cb100219n
- Gibson, S. J., Lindh, J. M., Riter, T. R., Gleason, R. M., Rogers, L. M., Fuller, A. E., Oesterich, J. L., et al. (2002). Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cellular immunology*, *218*(1-2), 74-86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470615>

- Gluckman, J., Canque, B., & Rosenzweig, M. (1998). Les cellules dendritiques: un système cellulaire complexe. *Transfusion Clinique et Biologique*, 5(1), 47-55. doi:10.1016/S1246-7820(98)80110-9
- Gomard, T., Michaud, H.-A., Tempé, D., Tholon, K., Pelegrin, M., & Piechaczyk, M. (2010). An NF-kappaB-dependent role for JunB in the induction of proinflammatory cytokines in LPS-activated bone marrow-derived dendritic cells. *PLoS one*, 5(3), e9585. doi:10.1371/journal.pone.0009585
- Granucci, F., Ferrero, E., Foti, M., Aggujaro, D., Vettoreto, K., & Ricciardi-Castagnoli, P. (1999). Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 1(13), 1079-84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10572310>
- Grobmyer, S. R., Morse, D. L., Fletcher, B., Gutwein, L. G., Sharma, P., Krishna, V., Frost, S. C., et al. (2011). The promise of nanotechnology for solving clinical problems in breast cancer. *Journal of surgical oncology*, 103(4), 317-25. doi:10.1002/jso.21698
- Guermónprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., & Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, 425(6956), 397-402. doi:10.1038/nature01911
- Gwinn, M. R., & Vallyathan, V. (2006). Nanoparticles: Health Effects-Pros and Cons. *Environmental Health Perspectives*, (12), 1818-1825. doi:10.1289/ehp.8871
- Haessler, U., Pisano, M., Wu, M., & Swartz, M. a. (2011). Dendritic cell chemotaxis in 3D under defined chemokine gradients reveals differential response to ligands CCL21 and CCL19. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5614-9. doi:10.1073/pnas.1014920108
- 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). *The Journal of biological chemistry*, 273(27), 16663-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240752>
- Harman, B. C., Miller, J. P., Nikbakht, N., Gerstein, R., & Allman, D. (2006). Mouse plasmacytoid dendritic cells derive exclusively from estrogen-resistant myeloid progenitors. *Blood*, 108(3), 878-85. doi:10.1182/blood-2005-11-4545
- Hattori, H., Subramanian, K. K., Sakai, J., & Luo, H. R. (2010). Reactive oxygen species as signaling molecules in neutrophil chemotaxis. *Communicative & Integrative Biology*, 3(3), 278. Landes Bioscience. doi:10.1073/pnas.0914351107.eutrophil
- He, R., Tan, L., Browning, D. D., Wang, J. M., & Ye, R. D. (2000). The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met is a potent chemotactic agonist for mouse formyl peptide receptor. *The Journal of Immunology*, 165(8), 4598. Am Assoc Immunol. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/165/8/4598.short>

- Heath, W. R., & Carbone, F. R. (2009). Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nature immunology*, 10(12), 1237-44. doi:10.1038/ni.1822
- Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M. N., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., et al. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological reviews*, 199, 9-26. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00142.x
- Heyworth, P. G., Knaus, U. G., Settleman, J., Curnutte, J. T., & Bokoch, G. M. (1993). Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Molecular biology of the cell*, 4(11), 1217-23. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=275755&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hirakawa, S., Saito, R., Ohara, H., Okuyama, R., & Aiba, S. (2011). Dual oxidase 1 induced by Th2 cytokines promotes STAT6 phosphorylation via oxidative inactivation of protein tyrosine phosphatase 1B in human epidermal keratinocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(8), 4762-70. doi:10.4049/jimmunol.1000791
- Hochrein, H., O'Keeffe, M., & Wagner, H. (2002). Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Human immunology*, 63(12), 1103-10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12480253>
- Hofer, S., Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S., Francolini, M., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Differential activation of NF-kappa B subunits in dendritic cells in response to Gram-negative bacteria and to lipopolysaccharide. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 3(4), 259-65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334742>
- Hohn, D. C., & Lehrer, R. I. (1975). NADPH Oxidase Deficiency in X-Linked Chronic Granulomatous Disease. *Journal of Clinical Investigation*, 55(April), 707-713. doi:10.1172/JCI107980
- Holt, P. G., Schon-Hegrad, M. a., & McMenamin, P. G. (1990). Dendritic Cells in the Respiratory Tract. *International Reviews of Immunology*, 6(2-3), 139-149. doi:10.3109/08830189009056625
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., et al. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*, 425(6956), 402-6. doi:10.1038/nature01912
- Hubbell, J. a, Thomas, S. N., & Swartz, M. a. (2009). Materials engineering for immunomodulation. *Nature*, 462(7272), 449-60. doi:10.1038/nature08604
- Hussain, S., Boland, S., Baeza-Squiban, A., Hamel, R., Thomassen, L. C. J., Martens, J. a, Billon-Galland, M. A., et al. (2009). Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role

- of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*, 260(1-3), 142-9. doi:10.1016/j.tox.2009.04.001
- Ikuta, Y. (2002). Presentation of a major histocompatibility complex class 1-binding peptide by monocyte-derived dendritic cells incorporating hydrophobized polysaccharide-truncated HER2 protein complex: implications for a polyvalent immuno-cell therapy. *Blood*, 99(10), 3717-3724. doi:10.1182/blood.V99.10.3717
- Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.*, 77(217), 755–776. Annual Reviews. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055
- Ito, T, Matsui, Y., Ago, T., Ota, K., & Sumimoto, H. (2001). Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions. *The EMBO journal*, 20(15), 3938-46. doi:10.1093/emboj/20.15.3938
- Itoh, T., Koshiba, S., Kigawa, T., Kikuchi, a, Yokoyama, S., & Takenawa, T. (2001). Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5506), 1047-51. doi:10.1126/science.291.5506.1047
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5963), 291-5. doi:10.1126/science.1183021
- Jeney, V., Itoh, S., Wendt, M., Gradek, Q., Ushio-Fukai, M., Harrison, D. G., & Fukai, T. (2005). Role of antioxidant-1 in extracellular superoxide dismutase function and expression. *Circulation research*, 96(7), 723-9. doi:10.1161/01.RES.0000162001.57896.66
- Jutras, I., & Desjardins, M. (2005). Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 21, 511-27. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.102755
- Kamata, T. (2009). Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development. *Cancer science*, 100(8), 1382-8. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01207.x
- Kanai, F., Liu, H., Field, S. J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G. E., Cantley, L. C., et al. (2001). The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nature cell biology*, 3(7), 675-8. doi:10.1038/35083070
- Karlsson, A., Nygren, E., Karlsson, J., Nordström, I., Dahlgren, C., & Eriksson, K. (2007). Ability of monocyte-derived dendritic cells to secrete oxygen radicals in response to formyl peptide receptor family agonists compared to that of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 14(3), 328-30. doi:10.1128/CVI.00349-06
- 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. *The Journal of biological chemistry*, 280(36), 31859-69. doi:10.1074/jbc.M501882200
- Kemp, K., Gray, E., Mallam, E., Scolding, N., & Wilkins, A. (2010). Inflammatory cytokine induced regulation of superoxide dismutase 3 expression by human mesenchymal stem cells. *Stem cell reviews*, 6(4), 548-59. doi:10.1007/s12015-010-9178-6
- Kerkhoff, C., Nacken, W., Benedyk, M., Dagher, M. C., Sopalla, C., & Doussiere, J. (2005). The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(3), 467-9. doi:10.1096/fj.04-2377fje
- Koga, H. (1999). Tetratricopeptide Repeat (TPR) Motifs of p67phox Participate in Interaction with the Small GTPase Rac and Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(35), 25051-25060. doi:10.1074/jbc.274.35.25051
- Koopmann, J.-O., Hämmerling, G. J., & Momburg, F. (1997). Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. *Current Opinion in Immunology*, 9(1), 80-88. doi:10.1016/S0952-7915(97)80163-X
- Kronin, V., Wu, L., Gong, S., Nussenzweig, M. C., & Shortman, K. (2000). DEC-205 as a marker of dendritic cells with regulatory effects on CD8 T cell responses. *International immunology*, 12(5), 731-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10784619>
- Kuribayashi, F., Nuno, 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. *The EMBO journal*, 21(23), 6312-20. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=136946&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 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(21), 5711-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8504089>
- Lafer, E. M. (1995). Clathrin Binding and Assembly Activities of Expressed Domains of the Synapse-specific Clathrin Assembly Protein AP-3. *Journal of Biological Chemistry*, 270(18), 10933-10939. doi:10.1074/jbc.270.18.10933
- Lambeth, J David. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature reviews. Immunology*, 4(3), 181-9. doi:10.1038/nri1312
- Laurila, J. P., Laatikainen, L. E., Castellone, M. D., & Laukkanen, M. O. (2009). SOD3 reduces inflammatory cell migration by regulating adhesion molecule and cytokine expression. *PloS one*, 4(6), e5786. doi:10.1371/journal.pone.0005786

- Le Roy, C., & Wrana, J. L. (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(2), 112-26. doi:10.1038/nrm1571
- Lee, C. F., Qiao, M., Schröder, K., Zhao, Q., & Asmis, R. (2010). Nox4 is a novel inducible source of reactive oxygen species in monocytes and macrophages and mediates oxidized low density lipoprotein-induced macrophage death. *Circulation research*, 106(9), 1489-97. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.215392
- Legendre-Guillemain, V., Wasiak, S., Hussain, N. K., Angers, A., & McPherson, P. S. (2004). ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding. *Journal of cell science*, 117(Pt 1), 9-18. doi:10.1242/jcs.00928
- Letari, O., Nicosia, S., Chiavaroli, C., Vacher, P., & Schlegel, W. (1991). Activation by bacterial lipopolysaccharide causes changes in the cytosolic free calcium concentration in single peritoneal macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 147(3), 980-3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1907309>
- Liang, H., Van Remmen, H., Frohlich, V., Lechleiter, J., Richardson, A., & Ran, Q. (2007). Gpx4 protects mitochondrial ATP generation against oxidative damage. *Biochemical and biophysical research communications*, 356(4), 893-8. doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.045
- Liu, K. J., & Chu, C. L. (2006). Current Progress in Dendritic Cell Research. *Journal of Cancer Molecules*, 2(6), 217-220. Retrieved from [http://mupnet.com/JOCM2\(6\)217-220.pdf](http://mupnet.com/JOCM2(6)217-220.pdf)
- Lob, H. E., Vinh, A., Li, L., Blinder, Y., Offermanns, S., & Harrison, D. G. (2011). Role of Vascular Extracellular Superoxide Dismutase in Hypertension. *Hypertension*, 232-239. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.172718
- Magder, S. (2006). Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Critical care (London, England)*, 10(1), 208. doi:10.1186/cc3992
- Mantegazza, A. R., Savina, A., Vermeulen, M., Pérez, L., Geffner, J., Hermine, O., Rosenzweig, S. D., et al. (2008). NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood*, 112(12), 4712-22. doi:10.1182/blood-2008-01-134791
- Mariani, V., Ponti, J., Giudetti, G., Broggi, F., Marmorato, P., Gioria, S., Franchini, F., et al. (2011). Online monitoring of cell metabolism to assess the toxicity of nanoparticles: The case of cobalt ferrite. *Nanotoxicology*, 1-16. doi:10.3109/17435390.2011.572302
- Marklund, S. L. (1982). Human Copper-Containing Superoxide Dismutase of High Molecular Weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(24), 7634-7638. doi:10.1073/pnas.79.24.7634

- Marklund, S L. (1984a). Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *The Biochemical journal*, 222(3), 649-55. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1144226&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Marklund, S L. (1984b). Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *The Biochemical journal*, 220(1), 269-72. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1153619&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Martinon-ego, C., Berthier, R., Cretin, F., Collin, V., Laharie, A.-marie, Marche, P. N., & Laharie, M. (2001). Murine Dendritic Cells Derived from Myeloid Progenitors of the Thymus Are Unable to Produce Bioactive IL-12p70. *The Journal of Immunology*, 166(8), 5008-5017.
- 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. *Cellular signalling*, 18(1), 69-82. doi:10.1016/j.cellsig.2005.03.023
- Matsuno, K, Ezaki, T., Kudo, S., & Uehara, Y. (1996). A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *The Journal of experimental medicine*, 183(4), 1865-78. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192479&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Matute, J. D., Arias, A. a, Dinauer, M. C., & Patiño, P. J. (2005). p40phox: the last NADPH oxidase subunit. *Blood cells, molecules & diseases*, 35(2), 291-302. doi:10.1016/j.bcmed.2005.06.010
- McCarran, D. J., Eliades, A., Makitalo, M., Matsuno, K., & Ravid, K. (2009). Differential expression of NADPH oxidases in megakaryocytes and their role in polyploidy. *Blood*, 114(6), 1243-9. doi:10.1182/blood-2008-12-195883
- Medzhitov, R, Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. a. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-7. doi:10.1038/41131
- Medzhitov, Ruslan, & Janeway, C. A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*, 9(1), 4-9. Elsevier. doi:10.1016/S0952-7915(97)80152-5
- Mikkelsen, R. B., & Wardman, P. (2003). Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*, 22(37), 5734-54. doi:10.1038/sj.onc.1206663

- Miyano, K., & Sumimoto, H. (2007). Role of the small GTPase Rac in p22phox-dependent NADPH oxidases. *Biochimie*, 89(9), 1133-44. doi:10.1016/j.biochi.2007.05.003
- Morand, S., Ueyama, T., Tsujibe, S., Saito, N., Korzeniowska, A., & Leto, T. L. (2009). Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(4), 1205-18. doi:10.1096/fj.08-120006
- Morris, S. M., & Cooper, J. a. (2001). Disabled-2 colocalizes with the LDLR in clathrin-coated pits and interacts with AP-2. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2(2), 111-23. doi:10.1034/j.1600-0854.2001.020206.x
- Mousavi, S. A., Malerød, L., Berg, T., & Kjekens, R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *The Biochemical journal*, 377(Pt 1), 1-16. doi:10.1042/BJ20031000
- Murphy, P. M. (2010). Double duty for CCL21 in dendritic cell trafficking. *Immunity*, 32(5), 590-2. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.004
- Nagler-Anderson, C. (2001). Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nature reviews. Immunology*, 1(1), 59-67. doi:10.1038/35095573
- Naik, E., & Dixit, V. M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *The Journal of experimental medicine*. doi:10.1084/jem.20110367
- Nakamura, R., Sumimoto, H., Mizuki, K., Hata, K., Ago, T., Kitajima, S., Takeshige, K., et al. (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. *European journal of biochemistry / FEBS*, 251(3), 583-9. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2510583.x
- 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). *The Journal of biological chemistry*, 274(33), 22999-3005. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438466>
- Ogura, K., Nobuhisa, I., Yuzawa, S., Takeya, R., Torikai, S., Saikawa, K., Sumimoto, H., et al. (2006). NMR solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox complexed with a p22phox-derived proline-rich peptide. *The Journal of biological chemistry*, 281(6), 3660-8. doi:10.1074/jbc.M505193200
- Oleinikov, A. V., Zhao, J., & Makker, S. P. (2000). Cytosolic adaptor protein Dab2 is an intracellular ligand of endocytic receptor gp600/megalin. *Biochemical Journal*, 347(Pt 3), 613. Portland Press Ltd. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220996/>
- Oram, J. D., & Reiter, B. (1966). The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide. The effect of the inhibitory system on

- susceptible and resistant strains of group N streptococci. *The Biochemical journal*, 100(2), 373-81. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1265145&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Owen, D. J., Vallis, Y., Noble, M. E. M., Hunter, J. B., Dafforn, T. R., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (1999). A Structural Explanation for the Binding of Multiple Ligands by the α -Adaptin Appendage Domain. *Cell*, 97(6), 805-815. doi:10.1016/S0092-8674(00)80791-6
- Paffenholz, R., Bergstrom, R. a, Pasutto, F., Wabnitz, P., Munroe, R. J., Jagla, W., Heinzmann, U., et al. (2004). Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes & development*, 18(5), 486-91. doi:10.1101/gad.1172504
- Park, H. S., Lee, S. H., Park, D., Lee, J. S., Ryu, S. H., Lee, W. J., Rhee, S. G., et al. (2004). Sequential Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Pix, Rac1, and Nox1 in Growth Factor-Induced Production of H₂O₂. *Molecular and cellular biology*, 24(10), 4384. Am Soc Microbiol. doi:10.1128/MCB.24.10.4384-4394.2004
- Pavli, P., Woodhams, C. E., Doe, W. F., & Hume, D. a. (1990). Isolation and characterization of antigen-presenting dendritic cells from the mouse intestinal lamina propria. *Immunology*, 70(1), 40-7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1384079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Petersen, S. V., Oury, T. D., Ostergaard, L., Valnickova, Z., Wegrzyn, J., Thøgersen, I. B., Jacobsen, C., et al. (2004). Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type i collagen and protects against oxidative fragmentation. *The Journal of biological chemistry*, 279(14), 13705-10. doi:10.1074/jbc.M310217200
- Pettit, E. J., & Fay, F. S. (1998). Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiological reviews*, 78(4), 949-67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9790567>
- Ponting, C. P. (1996). Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein science : a publication of the Protein Society*, 5(11), 2353-7. doi:10.1002/pro.5560051122
- Ramachandra, L., Simmons, D., & Harding, C. V. (2009). MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes. *Current opinion in immunology*, 21(1), 98-104. doi:10.1016/j.coi.2009.01.001
- Reis e Sousa, C. (2001). Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity*, 14(5), 495-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11371351>
- Reis e Sousa, Caetano. (2004). Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 21-25. doi:10.1016/j.coi.2003.11.007

- Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H. S., Lewis, K. L., & Sisirak, V. (2010). Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. *Annual review of immunology*, (December 2010). doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101345
- Riganti, C., Gazzano, E., Polimeni, M., Costamagna, C., Bosia, A., & Ghigo, D. (2004). Diphenyliodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 279(46), 47726-31. doi:10.1074/jbc.M406314200
- SEGAL, A. W., & JONES, O. T. G. (1978). Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature*, 276(5687), 515-517. doi:10.1038/276515a0
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., & Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine*, 182(2), 389-400. Rockefeller Univ Press. Retrieved from <http://jem.rupress.org/content/182/2/389.abstract>
- Sandström, J., Carlsson, L., Marklund, S. L., & Edlund, T. (1992). The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase C and formation of variants with reduced heparin affinity. *The Journal of biological chemistry*, 267(25), 18205-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1517248>
- Santegoets, S. J. a M., van den Eertwegh, A. J. M., van de Loosdrecht, A. a, Scheper, R. J., & de Gruijl, T. D. (2008). Human dendritic cell line models for DC differentiation and clinical DC vaccination studies. *Journal of leukocyte biology*, 84(6), 1364-73. doi:10.1189/jlb.0208092
- Savina, A., & Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological reviews*, 219, 143-56. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I. C., Lennon-Duménil, A.-M., et al. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell*, 126(1), 205-18. doi:10.1016/j.cell.2006.05.035
- Schnare, M., Barton, G. M., Holt, a C., Takeda, K., Akira, S., & Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature immunology*, 2(10), 947-50. doi:10.1038/ni712
- Segal, A W. (1987). Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease. *Nature*, 326(6108), 88-91. Nature Publishing Group. doi:10.1038/326088a0
- Segura, E., & Villadangos, J. a. (2009). Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Current opinion in immunology*, 21(1), 105-10. doi:10.1016/j.coi.2009.03.011

- Sen, D., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Parker, I., & Cahalan, M. D. (2008). Quantum dots for tracking dendritic cells and priming an immune response in vitro and in vivo. *PloS one*, 3(9), e3290. doi:10.1371/journal.pone.0003290
- Sentman, M.-L., Granström, M., Jakobson, H., Reaume, A., Basu, S., & Marklund, S. L. (2006). Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*, 281(11), 6904-9. doi:10.1074/jbc.M510764200
- Serrander, L., Cartier, L., Bedard, K., Banfi, B., Lardy, B., Plastre, O., Sienkiewicz, A., et al. (2007). NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *The Biochemical journal*, 406(1), 105-14. doi:10.1042/BJ20061903
- Sheng, K.-C., Pietersz, G. a, Tang, C. K., Ramsland, P. a, & Apostolopoulos, V. (2010). Reactive oxygen species level defines two functionally distinctive stages of inflammatory dendritic cell development from mouse bone marrow. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(6), 2863-72. doi:10.4049/jimmunol.0903458
- Shortman, Ken, & Liu, Y.-J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature reviews. Immunology*, 2(3), 151-61. doi:10.1038/nri746
- Song, Y., Ruf, J., Lothaire, P., Dequanter, D., Andry, G., Willemse, E., Dumont, J. E., et al. (2010). Association of duoxes with thyroid peroxidase and its regulation in thyrocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95(1), 375-82. doi:10.1210/jc.2009-1727
- Squadrito, G. L., & Pryor, W. A. (1998). Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxyxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(4-5), 392-403. doi:10.1016/S0891-5849(98)00095-1
- Storz, P. (2006). Reactive oxygen species-mediated mitochondria-to-nucleus signaling: a key to aging and radical-caused diseases. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2006(332), re3. doi:10.1126/stke.3322006re3
- Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., et al. (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 401(6748), 79-82. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v401/n6748/abs/401079a0.html>
- Sumimoto, Hideki. (2008). Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *The FEBS journal*, 275(13), 3249-77. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06488.x
- Sumimoto, Hideki, Miyano, K., & Takeya, R. (2005). Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 677-86. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.210

- Swanson, J. A., & Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends in Cell Biology*, 5(11), 424-428. doi:10.1016/S0962-8924(00)89101-1
- Szanto, I., Rubbia-Brandt, L., Kiss, P., Steger, K., Banfi, B., Kovari, E., Herrmann, F., et al. (2005). Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. *The Journal of pathology*, 207(2), 164-76. doi:10.1002/path.1824
- Takeda, Kiyoshi, Kaisho, T., & Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annual review of immunology*, 21(1), 335-76. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126
- Takeya, R., Ueno, N., Kami, K., Taura, M., Kohjima, M., Izaki, T., Nunoi, H., et al. (2003). Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *The Journal of biological chemistry*, 278(27), 25234-46. doi:10.1074/jbc.M212856200
- Tebar, F., Bohlander, S. K., & Sorkin, A. (1999). Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Molecular biology of the cell*, 10(8), 2687-702. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=25500&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Teoh, M. L. T., Fitzgerald, M. P., Oberley, L. W., & Domann, F. E. (2009). Overexpression of extracellular superoxide dismutase attenuates heparanase expression and inhibits breast carcinoma cell growth and invasion. *Cancer research*, 69(15), 6355-63. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1195
- Tibell, L., Hjalmarsson, K., Edlund, T., Skogman, G., Engström, a, & Marklund, S. L. (1987). Expression of human extracellular superoxide dismutase in Chinese hamster ovary cells and characterization of the product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(19), 6634-8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=299137&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Troxell, M. L., Schwartz, E. J., van de Rijn, M., Ross, D. T., Warnke, R. a, Higgins, J. P., & Natkunam, Y. (2005). Follicular dendritic cell immunohistochemical markers in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, 13(4), 297-303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16280657>
- Uehara, N. (2010). Polymer-functionalized gold nanoparticles as versatile sensing materials. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 26(12), 1219-28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21157089>
- Ueno, N., Takeya, R., Miyano, K., Kikuchi, H., & Sumimoto, H. (2005). The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent

- manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *The Journal of biological chemistry*, 280(24), 23328-39. doi:10.1074/jbc.M414548200
- Ueyama, T., Geiszt, M., & Leto, T. L. (2006). Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Molecular and cellular biology*, 26(6), 2160-74. doi:10.1128/MCB.26.6.2160-2174.2006
- Vignais, P V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 59(9), 1428-1459. Birkhäuser Basel. doi:10.1007/s00018-002-8520-9
- Vulcano, M., Dusi, S., Lissandrini, D., Badolato, R., Mazzi, P., Riboldi, E., Borroni, E., et al. (2004). Toll receptor-mediated regulation of NADPH oxidase in human dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(9), 5749-56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494527>
- Wang, J. (2001). Antigen Presentation to Lymphocytes. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-5. doi:10.1002/9780470015902.a0001227.pub2
- Wang, X., & Sun, Z. (2010). Thyroid hormone induces artery smooth muscle cell proliferation: discovery of a new TR α 1-Nox1 pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(1-2), 368–380. Wiley Online Library. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2008.00489.x/full>
- Wang, Y.-C., Hu, X.-B., He, F., Feng, F., Wang, L., Li, W., Zhang, P., et al. (2009). Lipopolysaccharide-induced maturation of bone marrow-derived dendritic cells is regulated by notch signaling through the up-regulation of CXCR4. *The Journal of biological chemistry* (Vol. 284, pp. 15993-6003). doi:10.1074/jbc.M901144200
- Watanabe, N., Suzuki, J., & Kobayashi, Y. (1996). Role of calcium in tumor necrosis factor-alpha production by activated macrophages. *Journal of biochemistry*, 120(6), 1190-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010769>
- Watts, Colin. (2006). Phagosome neutrality in host defense. *Cell*, 126(1), 17-9. doi:10.1016/j.cell.2006.06.031
- Watts, Colin. (2011). The endosome-lysosome pathway and information generation in the immune system. *Biochimica et biophysica acta*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.bbapap.2011.07.006
- Werling, D., Hope, J. C., Howard, C. J., & Jungi, T. W. (2004). *Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists*. *Immunology* (Vol. 111, pp. 41–52). Wiley Online Library. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01781.x
- 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. *The Biochemical journal*, 296 (Pt 3, 557-61. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1137734&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Wu, Li, & Dakic, A. (2004). Development of dendritic cell system. *Cellular & molecular immunology*, 1(2), 112-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212897>
- Yant, L. J., Ran, Q., Rao, L., Van Remmen, H., Shibatani, T., Belter, J. G., Motta, L., et al. (2003). The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(4), 496-502. doi:10.1016/S0891-5849(02)01360-6
- Yee, J., & Christou, N. V. (1993). Neutrophil priming by lipopolysaccharide involves heterogeneity in calcium-mediated signal transduction. Studies using fluo-3 and flow cytometry. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 150(5), 1988-97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7679700>
- Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Ogura, K., Sumimoto, H., & Inagaki, F. (2004). A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 9(5), 443-56. doi:10.1111/j.1356-9597.2004.00733.x
- Zanoni, I., & Granucci, F. (2010). Differences in lipopolysaccharide-induced signaling between conventional dendritic cells and macrophages. *Immunobiology*, 215(9-10), 709-12. Elsevier. doi:10.1016/j.imbio.2010.05.026
- Zhu, H., Qiu, H., Yoon, H. W., Huang, S., & Bunn, H. F. (1999). Identification of a cytochrome b-type NAD(P)H oxidoreductase ubiquitously expressed in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 14742-7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24718&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- de Mendez, I., Homayounpour, N., & Leto, T. L. (1997). Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Molecular and cellular biology*, 17(4), 2177-85. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232066&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- den Haan, J. M., Lehar, S. M., & Bevan, M. J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 192(12), 1685-96. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2213493&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- von Andrian, U. H., & Mempel, T. R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature reviews. Immunology*, 3(11), 867-78. doi:10.1038/nri1222

Annexes

Obtention et culture des CD :

Des souris (C57BL/6) ont été achetés chez *Elevage Janvier* (Le Geneist-Saint-Isle, France) et maintenus dans une animalerie agréée avec les normes d'éthique d'expérimentation animale. Des progénitures de CD ont été obtenues à partir de la moelle osseuse des fémurs, la totalité de la moelle a été traité avec des anticorps anti Ter-119 (BD Biosciences) et anti Gr-1 (BD Biosciences) biotinilés . Les cellules en suite ont été traitées avec des billes magnétiques complexées avec la streptavidine. A l'aide d'un iman nous avons récupérée la fraction négative des cellules issues de la moelle osseuse et mise en culture dans du milieu IMDM complémenté avec du SVF 10% v/v, MEM NAA 1% v/v, Sodium Pyruvate 1% v/v, β Mercaptoethanol 0.1% v/v, Penicillin-streptomycin 0.5% v/v. Pendant la culture, le milieu a été complémenté avec des facteurs de croissance tels que l'IL-6 murine (AbCys S.A. Paris, France), Flt3-Igd (Peprotech. London, UK) et du GM-CSF produit directement dans notre laboratoire. Toutes nos expériences ont été faits avec des cellules âgées de 10 à 14 jours de culture. Dans certains cas le LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ($2\mu\text{g/ml}$) a été utilisé pour induire la maturation des cellules dendritiques, par incubation pendant 24h avant l'utilisation des cellules.

Chemiluminescence des CD :

Des cellules dendritiques à différents jours de culture ont été récupérées du milieu et rincées avec du PBS froid trois fois. Les cellules ont été comptées et dispatchées selon le nombre de conditions a tester a raison de 3×10^5 cellules par puits. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C dans une plaque de 96 puits dans une solution du PBS+ (+Ca, +Mg) à pH 8,0, la solution de suspension a été complémenté avec

glucose (20 mM), luminol (20uM) et HRP (10 U/ml). La chemiluminescence a été enregistré pendant 2 heures avec l'utilisation du Victor3 1420 multilabel counter (Perkin Elmer, France). Dans certaines conditions, la PMA (50 ng/ml) et le DPI (10 uM) ont été utilisés pour activer et inhiber le système NOX de production des FRO respectivement.

Cinétique de production de superoxyde par microscopie confocale :

Cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse des souris C57BL6 sauvages, NOX1^{-/-} et NOX2^{-/-}, dans du PBS + (Invitrogen) supplémentées avec glucose (20mM) ont été incubées pendant 30 min à 37 °C dans une plaque lab-tek™ (Nunc) préalablement recouverte avec une solution de polylysine. Les cellules sont lavées avec du PBS+ en évitant de décoller les cellules semi-fixées à la surface de la lamelle. Les cellules sont en suite incubées avec une solution PBS+ contenant le fluorofore Syto-17 (Invitrogen) à une concentration de 5uM et incubées pendant 15 minutes à 37°C. Dans certains conditions, l'inhibiteur des protéines NOX (DPI) ou le chelant du cuivre DETCA ont été ajoutés au même temps que le Syto-17 pour inactiver toute activité NADPH Oxydase. Pour l'activation des CD, les cellules ont été incubées pendant sa culture en présence du LPS pendant 24h (2µg/ml) avant sont incorporation a la surface de la lamelle lab-tek™.

Les cellules ont été observées par microscopie confocale (Zeiss, Confocor LSM510). Après la détection de la fluorescence du noyau marqué préalablement avec Syto-17, on a ajoutée DHR (10uM) et l'apparition de la fluorescence a été mesuré pendant 40 min, en « time laps » sur des stacks en Z d'une épaisseur de 1um de la cellule sur 8-10 stacks. Quand nécessaire, la PMA (50 ng/µl) a été utilisé pour activer la production des FRO et augmenter la fluorescence du DHR, cette mesure est utilisé

pour calibrer le système de détection en conditions de saturation pour les mesures subséquentes.

Les variations de fluorescence ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ : dans une cellule déterminé (issue des différents conditions) on a sélectionné une surface spécifique de 300 nm dans des régions à l'intérieur de la cellules ; on a mesuré l'intensité de la fluorescence dans le temps de la cinétique. Cette technique nous permet de différencier l'apparition de la fluorescence (indicatif de la production des FRO) dans le cytoplasme, l'intérieur du noyau et la surface de la membrane nucléaire.

NADPH Oxydases et système oxydant dans les cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques jouent un rôle prépondérant dans le développement des réponses immunitaires ; les nombreuses activités fonctionnelles de ces cellules dont leur importante capacité de phagocytose leur confèrent le pouvoir d'activer les différents mécanismes de défense de l'organisme qu'ils fassent parties de l'immunité innée ou adaptative. Or de nombreux travaux ont montré que lors du développement des réponses immunitaires, les mécanismes oxydatifs ont un rôle essentiel et sont donc étroitement contrôlés. Dans le cas des cellules dendritiques, la production de radicaux oxygénés est en très grande partie relié au fonctionnement d'une NADPH Oxydase (NOX2) que notre laboratoire a été le premier à identifier dans ces cellules, il y a quelques années. Ce complexe enzymatique à une position centrale dans la production en premier des radicaux superoxydes puis des différentes formes réactives de l'oxygène (FRO) qui en découlent.

Au cours de ma thèse, j'ai tout d'abord mis en place un protocole permettant l'étude de la production des FRO dans les cellules dendritiques. Les différentes méthodes employées m'ont permis de démontrer que d'autres protéines du système oxydant tels NOX1 et SOD3, étaient également produites par les cellules dendritiques. Nos résultats montrent que ces protéines, à l'instar de ce qui avait été montré pour NOX2, jouent un rôle dans la formation et le contrôle des FRO. J'ai également étudié la localisation intracellulaire de ces protéines, ce qui m'a permis de mieux comprendre les rôles respectifs de ces dernières dans le contrôle de la production et de l'activité des FRO dans les cellules dendritiques.

Il avait été préalablement montré que la dégradation des pathogènes dans les cellules dendritiques, après qu'ils aient été phagocytés, était en partie liée à l'activité NOX2. Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse nous permet d'envisager un impact des FRO résultant de l'activité de NOX1 sur le contrôle de l'apoptose des cellules dendritiques ou sur certaines voies de signalisation au niveau de noyau. De plus, la dismutation du superoxyde en peroxyde (H_2O_2) pourrait ne pas être une réaction spontanée comme plusieurs auteurs l'ont proposé, mais pourrait être lié à la présence de SOD3 qui interviendrait dans les compartiments d'endocytose.