



HAL
open science

Mécanismes de régulation de la NADPH Oxydase NOX1 : rôle de la phosphorylation de NOXA1 (NOX Activator 1) et de NOXO1 (NOX Organizer 1)

Maya Debbabi

► **To cite this version:**

Maya Debbabi. Mécanismes de régulation de la NADPH Oxydase NOX1 : rôle de la phosphorylation de NOXA1 (NOX Activator 1) et de NOXO1 (NOX Organizer 1). Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T103 . tel-00769943

HAL Id: tel-00769943

<https://theses.hal.science/tel-00769943>

Submitted on 4 Jan 2013

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

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

UNIVERSITE PARIS XI

FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

ECOLE-DOCTORALE ED419: Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie

BIO-SigNE

Année: 2011-2012

N°attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champs disciplinaire: Médecine

Spécialité: Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Maya DEBBABI

Le 16 Décembre 2011

**MECANISMES DE REGULATION DE LA NADPH OXYDASE
NOX1 : ROLE DE LA PHOSPHORYLATION DE NOXA1 (NOX
ACTIVATOR 1) ET DE NOXO1 (NOX ORGANIZER 1)**

Directrice de thèse: Dr. Pham-My chan DANG

JURY

Pr. Oliver NÜSSE
Pr. Françoise MOREL
Dr. Xavier de DEKEN
Pr. Hervé Kovacic
Dr. Pham My-Chan DANG
Pr. Marie-Anne GOUGEROT-POCIDALO

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
Co-directrice de thèse

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse le Pr **Françoise MOREL** et le Dr **Xavier de DEKEN** pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également aux autres membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : le Pr **Hervé Kovacic** ainsi que le Pr **Oliver NÜSSE** qui a bien voulu présider le jury de ma thèse et qui a, en quelque sorte, fait partie de mon parcours universitaire.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Dr **My-chan DANG** alias Michmich qui a dirigé cette thèse dans la continuité de mon stage de master. Tout au long de ces années, elle a su orienter mes recherches aux bons moments, elle a toujours été disponible pour d'intenses et rationnelles discussions. Pour tout cela, sa confiance, son soutien et tout le reste, je la remercie vivement. Mes remerciements vont également à **Yolande KROVIARSKI** alias YO pour la gentillesse, la disponibilité, la patience qu'elle a manifestées à mon égard durant cette thèse mais aussi pour tous ses conseils scientifiques et de tous les jours. Je remercie aussi le Dr **Jamel EL BENNA** qui m'a accueillie dans son laboratoire suite à la gentille demande de **Mr Abdelhamid SAHLI**. Un autre merci pour le Pr **Marie-Anne GOUGEROT-POCIDALO** qui a toujours fait preuve d'une grande gentillesse, disponibilité et qui a porté un intérêt important à notre bien être au laboratoire, je la remercie aussi de m'avoir aidé pour le concours de thèse et d'avoir relu mon manuscrit en si peu de temps.

Je remercie aussi les autres membres de l'équipe : mes collègues et amis **Karama, Pia, Sahra, Mahmoud, Loic, Riad, Michèle, Grégory, Pascal, Sanae, Eric, Imène, Margarita, Tarek** sans oublier le « staff permanent de l'équipe » : **Odile BOURNIER** pour les manips de microscopie confocale mais aussi sa serviabilité et sa pêche, **Jean claude MARIE** d'avoir toujours apporté une pointe d'humour à notre quotidien au laboratoire, **Françoise BRAUT** pour sa gentillesse, **Axel PERIANIN** pour son esprit « rebelle », **Eric CHASTRE** et **Larissa KOTELEVETS** pour les discussions fructueuses lors des séminaires internes.

Je n'oublie pas **Nicaise COMIN, Marie-Hélène CANOGA, Julien PUTHOD, Mathieu, Pascale et Margot SAUVADET** qui ont facilité les démarches administratives mais aussi pour leurs sourires.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches qui m'ont toujours soutenue et encouragée. Un MERCI particulier à mes parents Coucoulinou et Nonny, qui ont été présents pour moi depuis le jour de ma naissance, qui m'ont inculqué mes valeurs et mes principes et sans lesquels je ne serai pas là aujourd'hui. Merci à mon frère Farrouss et ma sœur Diddy qui ont contribué à ma « maturation ». Merci également à mon très cher mari Wesswess qui a toujours su me faire rire mais aussi m'épauler et me rassurer quand j'en avais besoin. Un autre merci à ma 'tite nièce chérie Bambi qui me fait garder mon âme d'enfant plus longtemps et à sa maman Syrrinne qui s'occupe très bien de mon frère et ma nièce et pour tous nos après-midi jeux. Une pensée pour mes Dia, Papy, Azizi et Ya.

Et le plus important je me remercie d'avoir persévéré et d'être allée aussi loin dans mes études, je rigooooooooole.

Sommaire

Liste des Abréviations	6
INTRODUCTION GENERALE	7
I. NOX2, LE PROTOTYPE DES CELLULES PHAGOCYTAIRES.....	11
I.1- Bref rappel sur les Polynucléaires Neutrophiles (PN).....	11
I. 2- Structure de NOX2	14
I.2.1- Les composants membranaires	15
I.2.1.a- La gp91 ^{PHOX} / NOX2.....	16
I.2.1.b-La p22 ^{PHOX}	18
I.2.1.c- Processus de transfert des électrons par le cytochrome b558.....	21
I. 2.2- Les composants cytosoliques.....	21
I.2.2.a-La p47 ^{PHOX}	22
I.2.2.b-La p67 ^{PHOX}	24
I.2.2.c- La p40 ^{PHOX}	25
I.2.2.d- Rac 1/2.....	26
I.3- Mécanismes d'activation de NOX2.....	28
I.3.1- Importance de la phosphorylation des sous-unités de NOX2 dans l'activation de NOX2	29
I.3.1.a-Phosphorylation de la p47 ^{PHOX}	30
I.3.1.b-Phosphorylation de la p67 ^{PHOX}	32
I.3.1.c-Phosphorylation de la p40 ^{PHOX}	33
I.3.1.d-Phosphorylation de la gp91 ^{PHOX} / NOX2	34
I.3.1.e-Phosphorylation de la p22 ^{PHOX}	34
I.3.2- Rac2, un élément central de l'activation de NOX2	35
I.3.3-Assemblage de NOX2: Importance des interactions protéines-protéines et protéines-lipides	36
II- LES HOMOLOGUES DE NOX2.....	40
II.1- NOX1	42
II.2- NOX3	42
II.3- NOX4	43
II.4- NOX5	45
II.5- DUOX1/DUOX2.....	46
III- DESCRIPTION DETAILLEE DE NOX1	49
III.1- Profil d'expression de NOX1.....	50
III.2- Modulation de l'expression de NOX1	51
III.3- Localisation subcellulaire de la sous-unité NOX1.....	52
III.4- Composition du complexe NOX1	52
III.4.1- La sous-unité catalytique NOX1.....	54
III.4.2- La sous-unité organisatrice NOXO1.....	54
III.4.3- La sous-unité activatrice NOXA1.....	58
III.5 - Assemblage et activation de NOX1	60
III.6- Rôles physiologiques et physiopathologiques de NOX1	62
III.6 .1- NOX1 dans le système vasculaire.....	63
III.6.2- NOX1 au niveau du colon.....	64
IV. OBJECTIFS DU TRAVAIL	68

TRAVAUX DE RECHERCHE.....	69
Article 1: NOXA1 est phosphorylée et sa phosphorylation prévient l'hyperactivation de la NADPH oxydase NOX1	70
Résultats supplémentaires: Etude de la phosphorylation de NOXA1: l'activation de NOX1 par le fMLF est associée à la déphosphorylation de NOXA1.....	88
Article 2: NOXO1β est phosphorylée et sa phosphorylation potentialise l'activité de la NADPH oxydase NOX1	94
DISCUSSION GENERALE	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	136

Liste des Abréviations

Aa	Acide aminé
AD	Activation domain
pcDNA	Plasmide contenant l'Acide Désoxyribo Nucléique complémentaire
AIR	Auto-Inhibitory Region
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
CGD	Chronic Granulomatous Disease
DPI	DiPhenileneIodonium
DUOX	Dual Oxidase
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
fMLF	N-Formyl_methionyl-leucyl-phénylalanine
fPR	Récepteur du fMLF
FRO	Formes Réactives de l'Oxygène
Fsk	Forskoline
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transférase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)
HEK293	Human Embryonic Kidney cells
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukine
Kb	kilobase
kDa	kiloDalton
KO	Knock Out
LPS	LipoPoliSaccharides
MAPK	Mitogene-Activated Protein Kinase
MICI	Maladies Inflamatoires Chroniques de l'Intestin
NADPH	Nicotinamide Adénosine Dinucléotide PHosphate
NF κ B	Nuclear Factor-kappa B
NOX	NADPH Oxydase
NOXA1	NADPH Activator 1
NOXO1	NADPH Organizer 1
O ₂	Oxygène moléculaire
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
PB1	Phox and Bem 1 domain
Phox	Phagocyte oxidase
pl	Point Isoélectrique
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PMA	Phorbol-12-Myristate13-Acétate
PN	Polynucléaire Neutrophile
PRR	Proline Rich Region
PtdIns	Phosphatidylinositols
PX	Phox homology domain
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Rho-GDI	Rho-GDP-Dissociation Inhibitor
SAXS	Small Angle X-ray Scattering
SH3	Src Homology domain
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TPR	Tetratricopeptide Repeat motif
WT	Wild Type

INTRODUCTION GENERALE

Les formes réactives de l'oxygène (FRO), telles que l'anion superoxyde (O_2°), le radical hydroxyl (OH°) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont de petites molécules à forte potentialité oxydante longtemps considérées comme les produits secondaires de différents systèmes enzymatiques comme le cytochrome P450, la chaîne respiratoire mitochondriale, la lipoxygénase ou encore la xanthine oxydase.

La découverte de la NADPH oxydase phagocytaire il y a une trentaine d'années, a permis d'identifier pour la première fois un système enzymatique dont la fonction est uniquement dédiée à la production des FRO. La NADPH oxydase des phagocytes (polynucléaires neutrophiles, macrophages, monocytes), joue un rôle clé dans la défense anti-infectieuse de l'organisme contre divers agents pathogènes (bactéries ou levures principalement) en générant de façon rapide et massive les FRO hautement toxiques. Ce phénomène, connu aussi sous le nom d'explosion oxydative, a été identifié pour la première fois en 1933, bien avant la découverte même de l'identité moléculaire de la NADPH oxydase effectuée en 1978 par l'équipe de Segal. Pendant longtemps, il a été considéré que cette enzyme était restreinte aux phagocytes. Cependant dès 1991, Meier et Jones observent dans les fibroblastes une activité NADPH oxydase faible mais sensible au diphenylène iodonium (DPI), inhibiteur sélectif des flavoprotéines déshydrogénases dont fait partie la NADPH oxydase phagocytaire, suggérant ainsi l'existence de NADPH oxydases non phagocytaires. Ce n'est qu'à partir de 1999 que plusieurs homologues de la NADPH oxydase phagocytaire ont été décrits dans de nombreuses cellules au sein de différents organes. NOX1 (NOX, pour **N**ADPH **O**xidase), fortement exprimée dans les cellules épithéliales du colon, est le premier homologue à avoir été identifié. Par la suite, plusieurs autres homologues ont été clonés dans divers tissus par différentes équipes. Il s'agit de NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2 (DUOX, pour **D**ual **O**xidase). La NADPH oxydase phagocytaire a été renommée NOX2. Les NOXs sont impliquées dans diverses fonctions biologiques telles que la signalisation intracellulaire, l'immunité innée, la prolifération cellulaire, l'apoptose, la régulation de la pression artérielle, la synthèse d'hormones. Cependant, en raison de leur haute réactivité avec les molécules biologiques telles que les lipides, les protéines et les acides nucléiques, les FRO peuvent représenter une arme à double tranchant. Ainsi, lorsqu'elles sont produites de façon inappropriée ou excessive, les FRO peuvent induire un état de stress oxydant responsable de lésions tissulaires contribuant à la

physiopathologie de nombreuses maladies inflammatoires, telles que la polyarthrite rhumatoïde ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

La haute toxicité et réactivité des FRO, impliquent que les NOXs soient soumises à une régulation très fine. Tel est le cas de NOX2. Dans les phagocytes au repos, les différentes sous-unités qui forment NOX2 sont dispersées entre le cytosol (p40^{PHOX}, p47^{PHOX}, p67^{PHOX} et la petite protéine G Rac 1/2) et la membrane plasmique (gp91^{PHOX}/NOX2 et p22^{PHOX} formant le cytochrome b₅₅₈) empêchant ainsi toute activation de l'enzyme. Un des événements majeurs de l'activation de NOX2 est la phosphorylation de certains composants cytosoliques tels que la p47^{PHOX} ou la p67^{PHOX}, conduisant à leur translocation vers le cytochrome b₅₅₈ membranaire pour permettre la formation d'une enzyme catalytiquement active à l'origine de la production de FRO.

Parmi les homologues de NOX2, NOX1 est structurellement et fonctionnellement la plus proche de NOX2. Elle interagit avec la p22^{PHOX} et son activation requiert également des protéines cytosoliques: NOX organizer 1 (NOXO1) et NOX activator 1 (NOXA1), qui sont les homologues respectifs de la p47^{PHOX} et de la p67^{PHOX}. La petite protéine G, Rac1, est aussi nécessaire pour le fonctionnement de NOX1. NOX1, NOXO1 et NOXA1 sont abondamment exprimées dans les cellules épithéliales du colon et pourraient être impliquées dans la défense immunitaire innée de la muqueuse intestinale dans les conditions physiologiques. Cependant les mécanismes qui régulent l'activation du complexe NOX1 demeurent obscurs et la plupart du temps ont été déduits de l'homologie ou de la différence structurelle qui existent entre NOX2 et NOX1.

Dans ce contexte, mon projet de thèse a eu pour objectif de déterminer les mécanismes moléculaires fondamentaux qui régulent l'activation de NOX1. Je me suis en particulier intéressée aux processus de phosphorylation, dont l'importance a été bien établie pour NOX2. Qu'en est-il pour NOX1?

- 1) Dans un premier temps, j'ai étudié la phosphorylation de NOXA1. J'ai ainsi identifié les acides aminés phosphorylés sur NOXA1, déterminé les kinases impliquées et analysé les conséquences de ces phosphorylations sur l'assemblage et l'activation de NOX1.

- 2) Dans un deuxième temps, j'ai étudié la phosphorylation de NOXO1. Comme pour NOXA1, J'ai identifié les acides aminés phosphorylés sur NOXO1, déterminé les kinases impliquées et analysé les conséquences fonctionnelles de ces phosphorylations.

Mes résultats montrent que:

- 1) NOXA1, la sous-unité activatrice du complexe NOX1 est phosphorylée de façon constitutive dans les cellules au repos. Ces phosphorylations diminuent ses interactions avec la sous-unité catalytique NOX1 et la petite protéine G Rac1, ce qui a pour conséquence de prévenir l'hyperactivation de NOX1.
- 2) NOXO1, la sous-unité organisatrice est phosphorylée par les PKC au cours de la stimulation des cellules par le Phorbol myristate acétate (PMA). Cette phosphorylation favorise les interactions de NOXO1 avec la sous-unité cytosolique NOXA1 et avec la sous-unité membranaire p22^{PHOX}, augmente sa localisation membranaire et entraîne une hyperactivation de NOX1.

Dans ce manuscrit, je ferai d'abord un rappel des connaissances actuelles sur les différentes NADPH oxydases et leurs mécanismes de régulation, j'insisterai particulièrement sur NOX1. Je présenterai par la suite mes travaux de recherche et les résultats obtenus. Enfin, je terminerai par une discussion de mes résultats par rapport aux données de la littérature.

I. NOX2, LE PROTOTYPE DES CELLULES PHAGOCYTAIRES

La NADPH oxydase NOX2 est le «patriarche» de la famille des NOXs et est un puissant système générateur de FRO dans les cellules phagocytaires à savoir les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les monocytes. Bien qu'il soit connu depuis 1933 que l'incubation des neutrophiles avec les bactéries entraîne une consommation accrue d'oxygène [Baldrige 1933] insensible au cyanide [Sbarra 1959] et donc distincte de la respiration mitochondriale, ce n'est qu'en 1978 que l'enzyme impliquée dans ce processus, à savoir NOX2, a été découverte par l'équipe de Segal [Segal 1978].

La production massive des FRO par NOX2 joue un rôle essentiel dans la bactéricidie. Ceci est bien illustré par la granulomatose septique chronique (CGD), une maladie génétique caractérisée par la déficience d'un des composants de NOX2, qui se traduit par l'absence de production de FRO et par l'incapacité à éliminer l'agent pathogène, ce qui aboutit à des infections bactériennes ou fongiques graves et répétées, dès le plus jeune âge [Heyworth 2003]. Bien que les monocytes, les macrophages et les lymphocytes B [Morel 1993] expriment également NOX2, les polynucléaires neutrophiles (PN) restent le système où l'enzyme est la mieux étudiée. Par ailleurs, la plupart de ce qui est connu de la structure et de la régulation des autres NOXs découlent directement de notre compréhension de NOX2. Après un bref rappel sur les PN, je détaillerai donc la structure et la régulation de NOX2, en développant tout particulièrement l'importance des phosphorylations dans cette première partie.

I.1- Bref rappel sur les Polynucléaires Neutrophiles (PN)

Les PN humains (**Figure 1**) jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée en intervenant dans la défense anti-infectieuse de l'hôte contre les agents pathogènes (bactéries, levures, virus) [Witko-Sarsat 2000]. Cette cellule va acquérir, lors de sa maturation dans la moelle, des granulations azurophiles (primaires), des granulations spécifiques (secondaires), des granulations riches en gélatinase et des vésicules sécrétoires qui contiennent des peptides antimicrobiens et des enzymes protéolytiques. Après sa maturation, le PN reste 0 à 5 jours dans la moelle puis passe dans la circulation sanguine où sa demi-vie est classiquement de quelques heures. Sous l'influence de différents stimuli, les PN qui sont au repos dans le sang

circulant, vont adhérer à la paroi vasculaire, glisser entre les cellules endothéliales (diapédèse) puis migrer à travers les tissus vers le foyer infectieux en suivant un gradient de substances chimioattractantes (IL8, C5a, LTB₄, PAF, fMLF,...) (**Figure 2**). A ce niveau, l'adhérence à la cible suivie de son englobement aboutissent à la formation du phagolysosome et vont engager le PN dans la réponse bactéricide. Le PN utilise de façon coopérative deux systèmes pour détruire l'agent infectieux: le premier système qui est indépendant de l'oxygène, fait intervenir la libération, dans le phagosome, de peptides anti-microbiens et d'enzymes lytiques initialement contenus dans les granulations. Le deuxième système est dépendant de l'oxygène et fait intervenir une production rapide et massive des formes réactives de l'oxygène (FRO), appelée explosion oxydative. Les FRO ont une activité microbicide et cytotoxique. Ce sont des molécules à potentialité oxydante qui contribuent à la destruction des agents pathogènes en induisant des altérations des lipides, protéines et acides nucléiques.



Figure 1: Le polynucléaire neutrophile (PN)

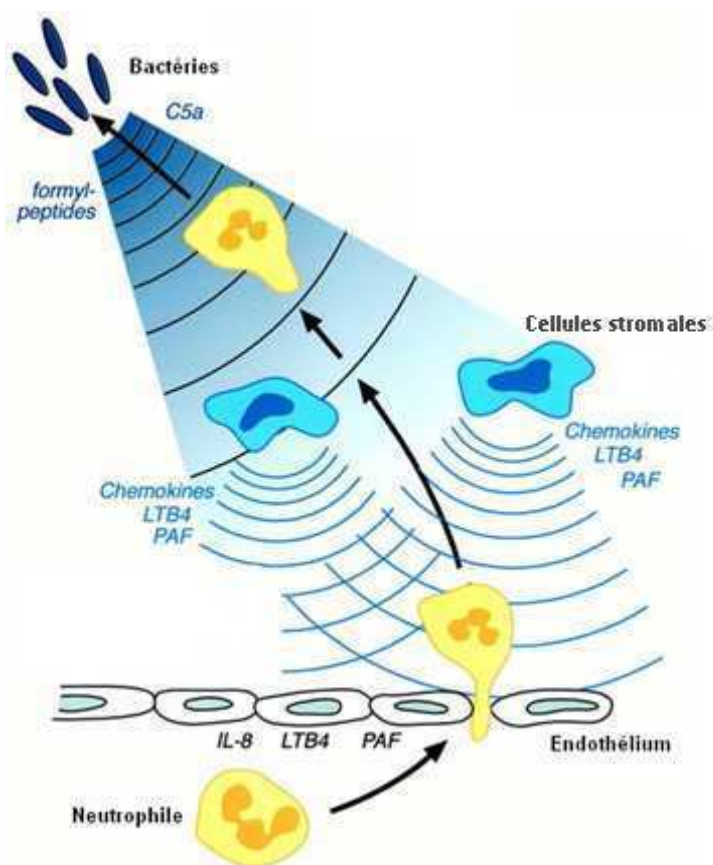
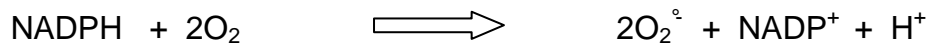


Figure 2: Migration du PN vers le site infectieux [Witko-Sarsat 2000]

I. 2- Structure de NOX2

Comme mentionné précédemment, le système générateur des FRO dans les phagocytes est la NADPH oxydase NOX2. Ce système est étudié depuis quelques décennies. Dès 1961, les travaux de Lyer et coll. montrent que l'explosion oxydative entraîne une production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) [Lyer 1961]. Rossi et Zatti, en 1964, observent que cette réaction est accompagnée de l'oxydation du NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) [Rossi 1964]. En 1973, Babior et coll. démontrent que le produit initial généré est en fait l'anion superoxyde O₂^{•-} et non l'H₂O₂ [Babior 1973]. La somme de ces données renseigne sur l'origine de l'appellation NOX, pour NADPH oxydase. Il est maintenant bien établi que sous l'influence de différents stimuli, cette enzyme catalyse la formation des anions superoxydes (O₂^{•-}) par la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire aux dépens du NADPH cellulaire provenant de la voie des hexoses monophosphates. La production des FRO se fait sur la face externe de la membrane plasmique qui devient la face interne de la membrane du phagosome lors des processus de phagocytose des microorganismes. La réaction conduisant à la production de l'anion superoxyde est la suivante:



Les radicaux O₂^{•-} sont les précurseurs d'autres molécules oxydantes hautement réactives qui sont le radical hydroxyle (OH[•]), l'oxygène singulet (O₂¹), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'acide hypochloreux (HOCl) qui est formé en présence de chlorure (Cl⁻).

La NADPH oxydase NOX2 est un complexe multimoléculaire et les facteurs essentiels à son fonctionnement ont été mis en évidence grâce à la granulomatose septique chronique liée à un dysfonctionnement de l'enzyme mais également grâce à des études de reconstitution de l'activité enzymatique en système acellulaire (notion détaillée plus loin). La NADPH oxydase NOX2 est constituée de plusieurs protéines qui sont réparties entre les fractions membranaires et cytosoliques dans les PN au repos, évitant ainsi toute activation basale de l'enzyme [Chanock 1994, Babior 1999, El Benna 2005]. Les composants membranaires sont la gp91^{PHOX}, renommée NOX2, et la p22^{PHOX} (PHOX pour phagocyte Oxydase); ils forment le flavocytochrome b558.

Les composants cytosoliques sont la p47^{PHOX}, la p67^{PHOX}, la p40^{PHOX} et la petite protéine G Rac2 (ou Rac1) (**Figure 3**).

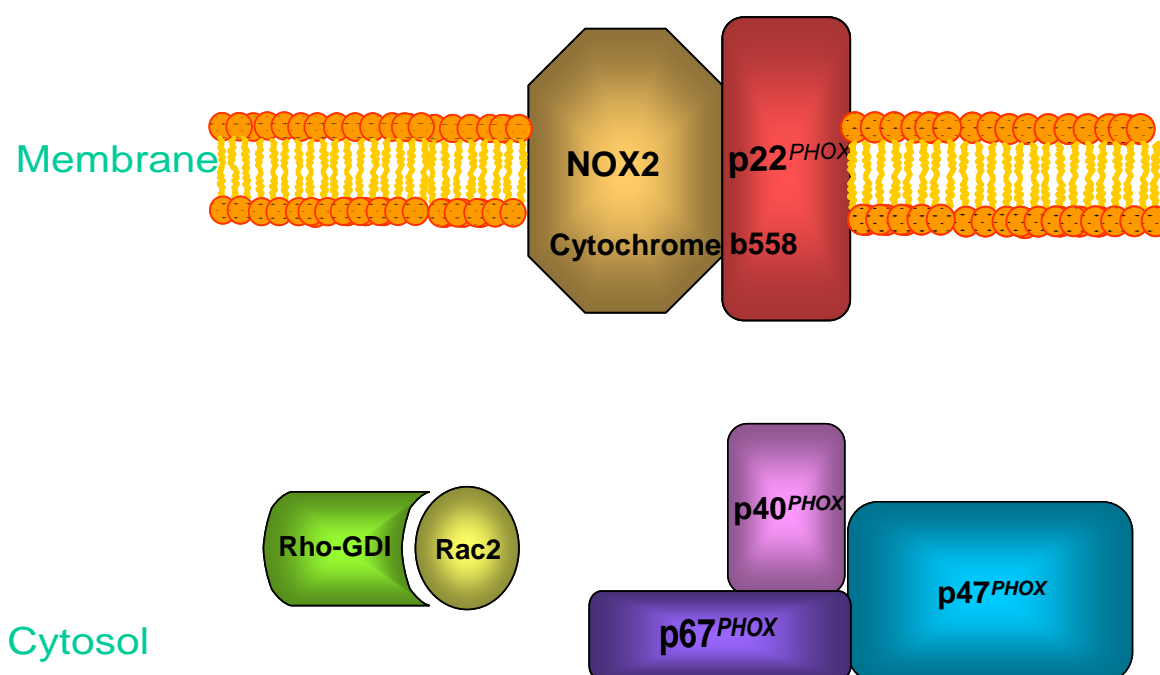


Figure 3: La NADPH oxydase au repos

1.2.1- Les composants membranaires

Le flavocytochrome b558 qui est intégré à la membrane représente le composant ultime de la chaîne de transfert des électrons et doit son nom à son spectre d'absorption (bande α à 558nm) [**Cross 1984**]. Il a été identifié en 1978 par Segal et Jones qui ont noté son absence dans les PN de nombreux patients atteints de CGD [3]. Le cytochrome b558 est une hémoflavoprotéine composée de deux sous-unités: la p22^{PHOX} (sous-unité α) et la gp91^{PHOX} (sous-unité β ou NOX2 qui a donné son nom à l'enzyme), associées de façon non covalente. Les études de densitométrie et de «Cross-linking» effectuées sur des phagocytes ont montré un rapport stœchiométrique de 1:1 entre NOX2 et la p22^{PHOX} [**Huang 1995, Wallach 1996**]. Cette hémoflavoprotéine a un potentiel d'oxydoréduction très bas (-245 mV à pH 7) ce qui lui permet de réduire directement l'oxygène de l'air [**Rotrosen 1992**]. Au repos, le cytochrome b₅₅₈ est présent à 90% au niveau des membranes des granulations spécifiques et à 10% dans la membrane plasmique [**Ginsel 1990**]. Lors

de l'activation du système oxydasique, le cytochrome b_{558} contenu dans les granulations spécifiques est transféré vers les membranes plasmique et phagosomale [DeLeo 1996]. Le cytochrome b_{558} est également le point d'ancrage des autres composants de la NADPH oxydase après stimulation. Dans le PN stimulé, il intervient dans l'organisation du complexe actif par interaction de ses domaines cytosoliques avec les sous-unités cytosoliques en particulier la $p47^{PHOX}$ [Rotrosen 1990], la $p67^{PHOX}$ [Dang 2001a, Dang 2002] et Rac 2 [Babior 2002].

1.2.1.a- La $gp91^{PHOX}$ / NOX2

La $gp91^{PHOX}$ / NOX2 est la sous-unité catalytique du complexe enzymatique NOX2. Le gène codant pour la $gp91^{PHOX}$ a été cloné par Royer-Pokora [Royer-Pokora 1986] et Teahan [Teahan 1987] vers la fin des années 80. Ce gène, *CYBB* (Cytochrome b_{558} Beta chain), de 30kb et formé de 13 exons est situé sur le chromosome X dans la région Xp21.1. L'ARN messager (ARNm) qui lui est spécifique fait 5kb. Le produit de cet ARNm est une protéine de 570 acides aminés ayant un point isoélectrique (PI) égal à 9.

La protéine NOX2 est d'abord synthétisée comme une protéine de 58 kDa puis en tant que précurseur glycosylé de 65kDa dans le réticulum endoplasmique, appelé $gp65$. Seule une partie de la $gp65$ synthétisée est transformée en $gp91^{PHOX}$ ou NOX2 mature. La synthèse de NOX2 et son association avec la $p22^{PHOX}$, constituent une étape importante de la maturation du cytochrome b_{558} dans les cellules phagocytaires [Zhen 1993, Yu 1997]. Par ailleurs, il est connu que l'absence de l'une (NOX2 ou la $p22^{PHOX}$) chez les patients atteints de CGD entraîne l'absence de l'autre, suggérant un rôle stabilisateur des deux protéines [Yu 1998].

L'alignement de la séquence de la $gp91^{PHOX}$ /NOX2 avec les membres de la famille des ferrédoxines réductases prédit une structure topologique comprenant 6 hélices α transmembranaires notées de I à VI dans la partie N-terminale et une région cytoplasmique contenant les sites de fixation pour la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) [Babior 1977, Sumimoto 1992, Nisimoto 1995] et le NADPH [Doussiere 1993] dans la partie C-terminale (Figure 4). Les sites de liaison potentiels du FAD sont localisés au niveau des acides aminés $^{338}\text{HPFTLSA}^{342}$ et $^{354}\text{IRIVGD}^{359}$ [Rotrosen 1992, Segal 1992, Sumimoto 1992] alors que ceux du NADPH sont

situés au niveau des séquences ⁴⁰⁵MLVGAGIGVTPF⁴¹⁶, ⁴⁴²YWLCR⁴⁴⁶, ⁵⁰⁴GLKQ⁵⁰⁷ et ⁵³⁷CG⁵³⁸ [Segal 1992, Sumimoto 1992].

Comme l'indiquent les deux lettres gp (gp: pour glycoprotéine), la gp91^{PHOX}/NOX2 est une protéine fortement glycosylée [Harper 1985, Wallach 1997], qui sur gel de SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel), migre sous la forme d'une trainée de masse moléculaire apparente allant de 70 à 91kDa [Kleinberg 1989], ce qui reflète l'hétérogénéité de la glycosylation: la partie glucidique représente environ 33% du poids moléculaire. La glycosylation a lieu sur les résidus asparagines 132, 149 et 240 situés dans les seconde et troisième boucles extracellulaires [Wallach 1997].

Par ailleurs, la gp91^{PHOX}/NOX2 contient deux hèmes non identiques avec des potentiels d'oxydo-réduction de -225mV et de -265 mV [Cross 1995b]. Ces hèmes se lient à deux paires d'histidines, His 101-209 et His 115-222, localisées dans les hélices α transmembranaires III (His 101 et 115) et V (His 209 et 222) [Biberstine-Kinkade 2001]. La mutation de ces histidines en leucines empêche la maturation et l'adressage vers la membrane du cytochrome b558 et de plus entraîne une perte de la capacité à générer l'anion superoxyde [Biberstine-Kinkade 2001]. Bien que la glycosylation de la gp91^{PHOX}/NOX2 ne soit pas nécessaire à la formation de l'hétérodimère gp91^{PHOX}-p22^{PHOX}, l'acquisition de l'hème l'est impérativement [Yu 1997, Yu 1999]. L'hétérodimère serait plus stable après insertion de l'hème.

La gp91^{PHOX}/NOX2 contient donc tous les éléments nécessaires au transfert des électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire à savoir deux hèmes, des sites consensus de liaison pour la FAD et le NADPH. Elle catalyse ce transfert selon la séquence suivante:



En plus de son rôle catalytique, il a été montré que la gp91^{PHOX} / NOX2 possède plusieurs sites d'ancrage potentiel pour les protéines cytosoliques après stimulation des PN. Ainsi, plusieurs études ont suggéré que la séquence ⁵⁵⁹RGVHFIF⁵⁶⁵ de NOX2 est importante pour son interaction avec la p47^{PHOX} [Kleinberg 1990, DeLeo, 1995], de même la leucine 505 semble jouer un rôle important dans son interaction avec la p67^{PHOX} [Li 2007]. De plus, l'équipe de Bokoch a récemment démontré que

la séquence ⁴¹⁹ILKSVWYKYCNN⁴³⁰ de NOX2 intervient directement dans l'interaction avec Rac afin de promouvoir l'activation de la NADPH oxydase. Ce site est conservé dans les NOXs régulées par les petites protéines G Rac, à savoir NOX1-2-3, mais pas dans les autres membres de la famille NOX dont la régulation ne nécessite pas Rac (NOX4, 5 et DUOX1/2) [Kao 2008].

Il est à noter que 2/3 des cas de CGD sont dus à des mutations dans le gène CYBB [Dinauer 1987, Rotrosen 1992, Roos 1996, Morel 2007]. Ces mutations, hétérogènes sans génotype prédominant [Jurkowska 2004] se traduisent dans 90% des cas par l'absence du cytochrome b558 [Segal 1987]. Certaines formes rares de ces CGD, dites liées à l'X, expriment une protéine NOX2 non fonctionnelle [Cross 1995a].

1.2.1.b-La p22^{PHOX}

La p22^{PHOX}, protéine transmembranaire partenaire de la gp91^{PHOX}, a été identifiée en 1987 par l'équipe de Segal qui a démontré que le cytochrome b558 était en fait composé de deux polypeptides de 91 et 22 kDa [Segal 1987]. Il s'agit d'une protéine de 195 acides aminés et de PI égal à 10. Comme l'indique son nom, elle migre sur gel de SDS-PAGE à un poids moléculaire apparent de 22kDa [Roos 1994]. C'est le produit du gène *CYBA* (Cytochrome b558 Alpha chain) localisé sur le chromosome 16, dans la région 16q24 et faisant 8.5kb de taille [Dinauer 1990]. Ce gène formé de 6 exons est transcrit en un ARNm de 0.8kb [Roos 2003]. Contrairement à NOX2 qui est surtout exprimée dans les cellules myéloïdes, l'ARNm de la p22^{PHOX} est exprimé de façon ubiquitaire [Bedard 2007].

La p22^{PHOX} est une protéine non glycosylée [Parkos 1987] dont la structure topologique comprend une extrémité N-terminale cytosolique, deux hélices α transmembranaires et une longue queue C-terminale cytosolique contenant une Région Riche en Proline (PRR) de type PXXP (Figure 5) [Campion 2009]. Cette région PRR constitue le point de liaison aux domaines SH3 (Src Homology domain 3) des sous-unités cytosoliques [Sumimoto 1994, Leto 1994] notamment la p47^{PHOX} [Sumimoto 1996]. L'interaction p22^{PHOX}-p47^{PHOX} semble être critique pour l'activation de la NADPH oxydase car une mutation de la proline 156 (présente sur le

motif ¹⁵⁶PPRPP¹⁶⁰) de p22^{PHOX} bloque la fixation de la protéine p47^{PHOX} entraînant une absence d'activité NADPH oxydase **[Dinauer 1991]**.

La p22^{PHOX}, qui lie la gp91^{PHOX} avec un rapport 1:1 **[Huang 1995, Wallach 1996]** est essentielle à la maturation et à la stabilité de son partenaire permettant ainsi la formation d'un complexe NOX2 actif **[DeLeo 2000]**. En effet, la gp91^{PHOX} est absente chez les patients atteints de CGD due à une mutation de la p22^{PHOX} **[Parkos 1989, Stasia 2002]**.

Les Sous-unités Membranaires de NOX2

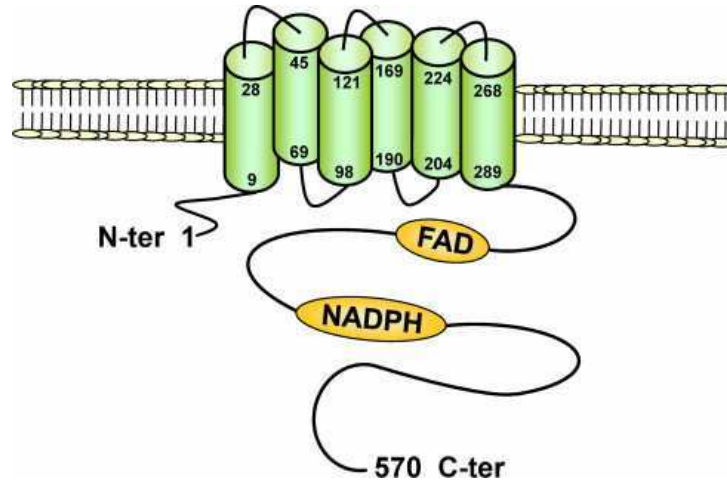


Figure 4: Structure de la gp91^{PHOX} [El-Benna 2010]

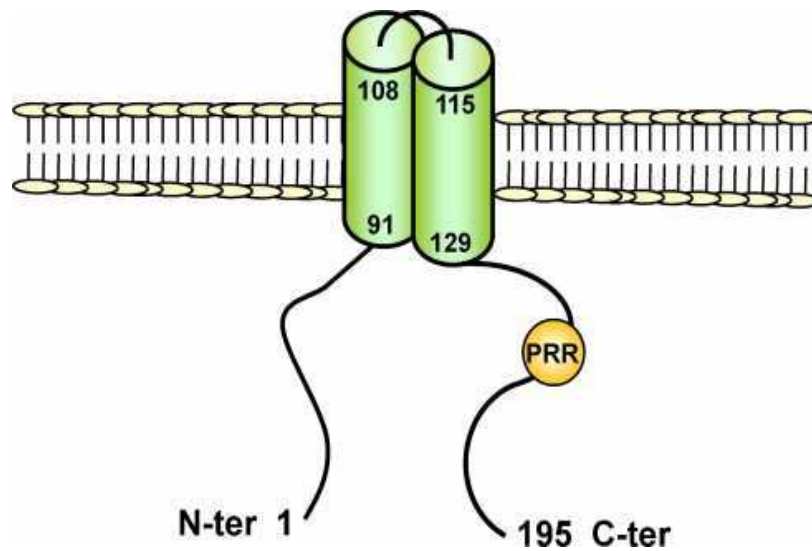


Figure 5: Structure de la p22^{PHOX} [El-Benna 2010]

I.2.1.c- Processus de transfert des électrons par le cytochrome b558

Le transfert d'électrons est un processus qui se fait en sept étapes (**Figure 6**): Tout d'abord, il y a transfert de deux électrons du NADPH cytosolique vers le FAD oxydé, le FAD est alors réduit en FADH₂. Ce FADH₂ va par la suite transférer les électrons un à un à l'hème interne, étant donné que l'hème ne peut en accepter qu'un à la fois. A l'issue du transfert du premier électron, le FADH₂ est transformé en FAD semiquinonique (FAD[•]). L'hème interne qui a reçu l'électron l'utilise pour réduire l'hème externe qui à son tour va le transférer à l'oxygène moléculaire et ainsi produire le premier anion superoxyde. Au cours des étapes cinq, six et sept, le deuxième électron est transféré du FAD[•] vers l'hème interne puis vers l'hème externe et finalement à l'oxygène moléculaire [Cross 2004]. Il y a alors génération de deux anions superoxydes.

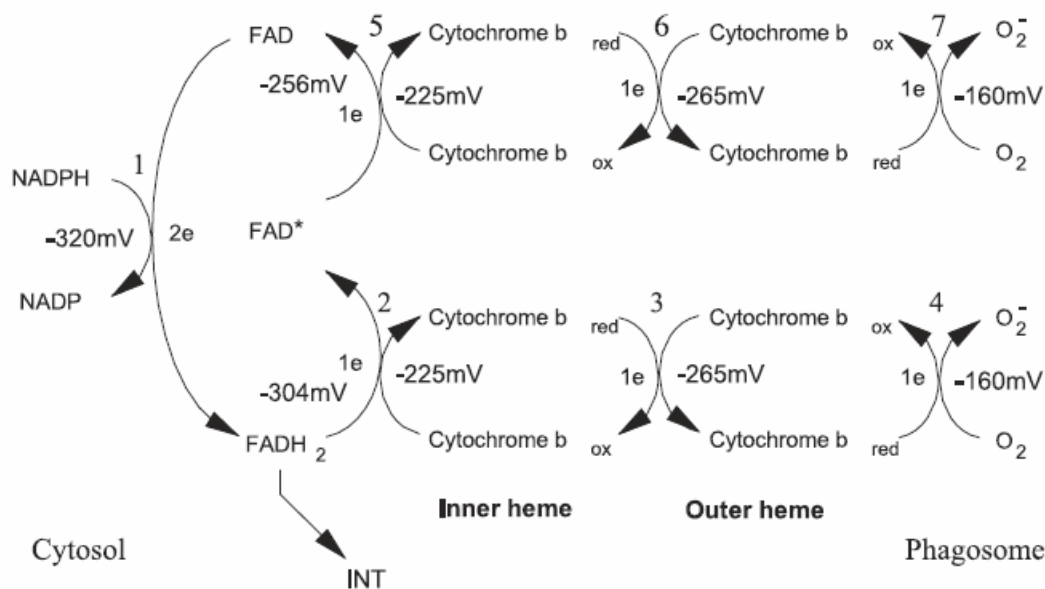


Figure 6: Chaîne de transfert des électrons au sein du cytochrome b
[Cross 2004]

I. 2.2- Les composants cytosoliques

L'implication de facteurs cytosoliques en tant qu'éléments entrant dans la composition de la NADPH oxydase phagocytaire a d'abord été suggérée par l'existence de certaines formes de CGD où la bande d'absorption α du cytochrome b558 est toujours présente [Borregaard 1983]. Le développement du système acellulaire permettant la reconstitution de l'activité NADPH oxydase grâce à

l'incubation de fractions membranaires avec des fractions cytosoliques de PN [Bromberg 1985] en présence d'agents activateurs comme l'acide arachidonique ou le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) a conduit à la découverte de la p67^{PHOX} et de la p47^{PHOX}. Ainsi, contrairement aux cytosols de PN d'individus sains, les cytosols provenant de PN de malades atteints de formes autosomales (non liées au chromosome X) de CGD n'induisent pas d'activité de production de FRO malgré la fonctionnalité des fractions membranaires qui leur sont associées. Ce défaut d'activité est lié à l'absence de l'une ou l'autre des protéines cytosoliques de NOX2 [Nunoi1988, Volpp 1988] à savoir la p47^{PHOX} ou la p67^{PHOX}.

1.2.2.a-La p47^{PHOX}

La p47^{PHOX} est le produit du gène *NCF-1* (Neutrophil Cytosolic Efactor 1) de taille 17-18kb, formé de 9 exons et situé dans la région 7q11.23 du chromosome 7. Le transcrit de ce gène est un ARNm de 1.4kb exprimé essentiellement dans les cellules phagocytaires.

La p47^{PHOX} est formée de 390 acides aminés, a un poids moléculaire apparent de 47kDa et possède un PI avoisinant les 10. A l'état de repos du neutrophile, elle est présente dans le cytosol sous deux formes: une forme libre et une forme complexée avec la p67^{PHOX} et la p40^{PHOX} (à un rapport 1:1:1) [Park 1992, Lyer 1994, Lapouge 2002].

Cette protéine basique est composée d'un domaine PX, pour Phox Homology, (séquence conservée d'environ 120 acides aminés intervenant dans la liaison aux phospholipides) qui lui permet de lier les phosphoinositides [Ago 2001] notamment les phosphatidylinositols(3,4)-bisphosphates (PtdIns(3,4)P2) produits par la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) suite à la stimulation des PN [Kanai 2001, Karathanassis 2002], d'un tandem de domaines SH3 (SH3: domaine d'environ 60 acides aminés assurant les liaisons protéine-protéine par interaction avec les séquences PRR) qui est impliqué dans l'interaction avec le domaine PRR de la p22^{PHOX} [Leto 1994, Leusen, 1994, Groemping 2003], d'une région auto-inhibitrice (AIR) qui prévient l'interaction avec la p22^{PHOX} tant que la p47^{PHOX} n'est pas phosphorylée [Ago 2003, Peng 2003] et enfin d'un domaine PRR qui lui permet d'interagir avec son partenaire: la p67^{PHOX} [Finan 1994] (Figure 7).

Les Sous-unités Cytosoliques composant NOX2

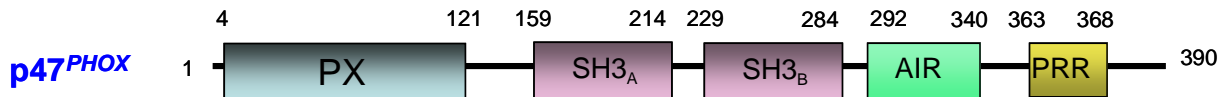


Figure 7: Structure de la p47^{PHOX}

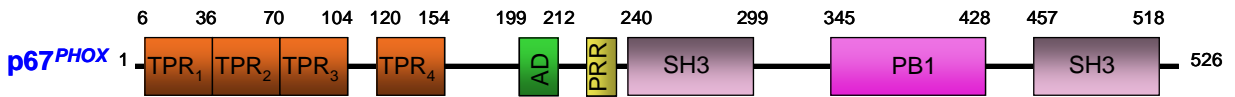


Figure 8: Structure de la p67^{PHOX}

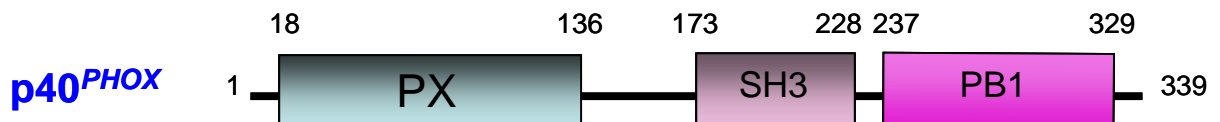


Figure 9: Structure de la p40^{PHOX}

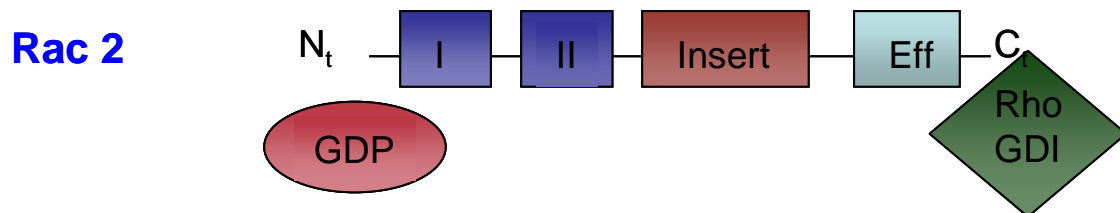


Figure 10: Structure de Rac 2

La p47^{PHOX} est dite sous-unité "organisatrice" car c'est elle qui est responsable de la translocation du complexe protéique cytosolique (p47^{PHOX}-p67^{PHOX}-p40^{PHOX}) vers la membrane et ce grâce à ses interactions: avec les lipides membranaires et avec la p22^{PHOX} d'une part et avec la p67^{PHOX} d'autre part. En effet, les PN de patients CGD déficients en p47^{PHOX} montrent une absence de translocation de la p67^{PHOX} et de la p40^{PHOX} vers la membrane [Heyworth 1991, Dusi 1996].

1.2.2.b-La p67^{PHOX}

La p67^{PHOX} est le produit du gène *NCF-2* (Neutrophil Cytosolic Factor 2) situé dans la région 1q25 du chromosome 1. Ce gène fait 40kb, contient 16 exons et est transcrit en un ARNm de 2.4kb codant pour une protéine non glycosylée de 526 acides aminés [franke 1990] et ayant un poids moléculaire apparent de 67kDa. La p67^{PHOX} a un PI d'environ 6.

Elle possède 4 motifs TPR (TetratricoPeptide Repeats) [Ponting 1996], un domaine d'activation AD (AD pour Activation Domain), une région PRR, un domaine PB1, pour Phox and Bem1, et deux domaines SH3 localisés dans la partie centrale et C-terminale de la protéine (Figure 8). Ces domaines lui permettent notamment d'interagir avec les autres sous-unités composant NOX2.

Les 4 motifs TPR (TPR: séquence d'une trentaine d'acides aminés où le profil des aa hydrophobes est conservé, ce qui constitue une poche pour les interactions protéine-protéine) de la p67^{PHOX} sont nécessaires à l'interaction avec la petite protéine G Rac 1 / 2; notamment le résidu arginine 102 localisé dans le troisième motif semble important car il permet d'établir une liaison ionique avec Rac1/2 [Koga 1999]. Le domaine AD est une séquence de 11 acides aminés (résidus 199 - 210) qui est requise pour l'activation de NOX2 [Han 1998] et qui a été impliquée dans la régulation du transfert des électrons par le cytochrome b558 [Nisimoto 1999]. En effet la mutation en alanine des résidus localisés dans ce domaine, notamment la valine 204, altère le transfert des électrons du NADPH vers le FAD diminuant ainsi la production de FRO. En plus de cette séquence, il a été montré récemment que les acides aminés situés juste en amont du domaine AD semblent aussi importants pour la régulation de l'activité de NOX2 [Maehara 2010]. De par ce rôle dans l'activation de la NADPH oxydase, la p67^{PHOX} est considérée comme la sous-unité «activatrice» du complexe NOX2. Par la technique du système double hybride et des essais d'interaction *in vitro*, il a été démontré que le domaine PB1 (qui est un module

d'interaction protéique conservé) assure l'interaction de la p67^{PHOX} avec la p40^{PHOX} [Dusi 1996, Nakamura 1998]. Quant au domaine SH3 C-terminal, il permet l'interaction de la p67^{PHOX} avec la région PRR de la p47^{PHOX} [Finan 1994, Leto 1994] et en conséquence la translocation de la protéine vers la membrane.

Les fonctions des domaines PRR et SH3 N-terminal de la p67^{PHOX} sont encore mal connues. Cependant, l'analyse structurale de la p67^{PHOX} par SAXS (Small Angle X-ray Scattering) a récemment suggéré l'existence d'une interaction intramoléculaire engageant probablement le domaine SH3 N-terminal avec le domaine TPR [Durand 2010]. Ceci est appuyé par l'existence de sites cryptiques de phosphorylation dans la partie C-terminale de la p67^{PHOX} qui ne sont détectés que lorsque la région TPR de la protéine est délétée [Dang 2003]. Une étude récente de Mahera parue en 2009 [Maehara 2009] montre que la délétion du domaine SH3 N-terminal a pour effet de diminuer la capacité de la p67^{PHOX} à activer NOX2 indiquant un rôle possible de ce domaine dans la régulation du fonctionnement de la p67^{PHOX}. De nouveaux partenaires de la p67^{PHOX} ont récemment été découverts: il s'agit de la sous-unité α des protéines G et de Vav1, une isoforme de la famille des Rho/Rac GEF. Les interactions directes de ces deux protéines avec la p67^{PHOX} vont promouvoir ses interactions respectives avec la p47^{PHOX} et Rac activée [Marty 2006, Ming 2007].

1.2.2.c- La p40^{PHOX}

La p40^{PHOX} est la dernière sous-unité de la NADPH oxydase à avoir été identifiée. Sa découverte s'est faite suite à sa co-immunoprécipitation et co-purification avec la p47^{PHOX} et la p67^{PHOX} [Someya 1993, Wientjes 1993].

La p40^{PHOX} est le produit du gène *NCF-4* (Neutrophil Cytosolic Factor 4) localisé dans la région 22q13.1 du chromosome 22; c'est un gène de 18kb qui comprend 10 exons. L'expression de l'ARNm relatif à ce gène est limitée aux cellules hématopoïétiques à l'exception des cellules érythrocytaires [zhan 1996].

La p40^{PHOX} est une protéine de 339 acides aminés ayant un poids moléculaire avoisinant les 40kDa et un PI de 7.28 [Cross 2004]. Elle est composée d'un domaine PX capable de lier les phosphoinositides membranaires [Kanai 2001] mais également capable de lier les éléments du cytosquelette tels que la coronine, la moésine et l'actine [Grogan 1997, Wientjes 2001, Shao 2010]. Elle possède aussi un domaine SH3 et un domaine PB1 (Figure 9) qui permettent les interactions avec

la p47^{PHOX} et la p67^{PHOX} respectivement [Fuchs 1995, Ito 1996, Fuchs 1996, Wientjes 1996] selon un rapport de 1:1:1 [Lapouge 2002]. L'interaction de la p40^{PHOX} à la p67^{PHOX} la stabilise fortement; en effet, l'expression de la p40^{PHOX} est réduite chez les patients CGD déficients en p67^{PHOX} [Tsunawaki 1994].

Initialement, il a été montré que la p40^{PHOX}, par l'intermédiaire de son domaine SH3, régulait négativement l'activité de NOX2 [Sathyamoorthy 1997]. Par la suite plusieurs données ont indiqué un rôle de la p40^{PHOX} dans la régulation positive de NOX2. Ainsi, il a été montré que: i) la p40^{PHOX} participe à l'activation de NOX2 en augmentant l'affinité de la p47^{PHOX} pour le cytochrome b558 [Cross 2000], ii) L'interaction de la p40^{PHOX} avec la p67^{PHOX} favorise la translocation des facteurs cytosoliques p47^{PHOX} et p67^{PHOX} à la membrane [Kuribayashi 2002] ce qui a pour conséquence d'augmenter l'activité du complexe, iii) la liaison de la p40^{PHOX} avec le phosphatidylinositol-3 phosphate (PtdIns(3)P) potentialise la production des FRO dans un système acellulaire [Ellson 2001], iv) le domaine PX de la p40^{PHOX} lie le cytosquelette d'actine pour stabiliser le complexe NOX2 dans les cellules au repos, alors qu'il lie le PtdIns(3)P dans les cellules stimulées par le PMA et le fMLF pour potentialiser la production d'O₂⁻ [Chen 2007]. En accord avec ces données, un déficit de production de FRO en réponse à des agents particuliers phagocytés a été récemment décrit dans un cas de CGD où la p40^{PHOX} est mutée au niveau du domaine PX (R58A) [Matute 2009]. La structure cristallographique de la p40^{PHOX} a été résolue [Honbou 2007] et révèle l'existence d'une interaction intramoléculaire entre le domaine PB1 et le domaine PX. L'interface du domaine PB1 impliquée dans cette interaction se situe à l'opposé de celle impliquée dans l'interaction avec la p67^{PHOX} et n'empêche donc pas la liaison de la p40^{PHOX} à cette dernière.

I.2.2.d- Rac 1/2

Une autre protéine cytosolique clé impliquée dans la régulation de l'activité de NOX2 est la petite protéine G Rac1/2. L'importance de Rac 1/2 dans la régulation de l'activation de l'oxydase a été mise en évidence en 1991 [Knaus 1991, Abo1991].

Rac 1 et Rac 2 sont des petites protéines G monomériques appartenant à la famille des GTPases de la sous-famille Rho. Contrairement à Rac 1 qui est exprimée de façon ubiquitaire [Moll 1991], Rac 2 est plus spécifique des cellules hématopoïétiques [Didsbury 1989, Moll 1991]. Il existe une troisième isoforme, Rac

3, qui est retrouvée au niveau du cœur, du placenta, du cerveau et du pancréas [Haataja 1997]. Rac 2 est composée de 192 acides aminés, a un poids moléculaire de 21kDa et un PI de 7.87 [Cross 2004]. Le gène dont elle est le produit est *Rac 2* situé dans la région 22q13.1 du chromosome 22. Outre la régulation de NOX2, Rac1/2 jouent un rôle essentiel dans une variété de processus cellulaires parmi lesquels l'organisation du cytosquelette d'actine [Cassimeris 1992] assurant ainsi la motilité et la contraction, la migration et la croissance cellulaires mais aussi l'inflammation et le cancer [Jaffe 2002]. Rac 1 et Rac 2 ont 92% d'identité de structure [Didsbury 1989]. Elles sont toutes les deux essentielles pour la formation d'un complexe NADPH oxydase actif [Abo 1991, Knaus 1991, Gabig 1995]: Rac 2 est la plus abondante dans le PN humain [Knaus 1991, Heyworth 1993] et c'est elle qui est impliquée dans l'activation de NOX2 dans ces cellules, en revanche, c'est Rac 1 qui est mise en jeu lors de l'activation de NOX2 dans les monocytes [Zhao 2003]. Récemment, il a été montré que Rac 3 pouvait également activer NOX2 dans les cellules de rein foetal humain HEK293 où le complexe a été reconstitué par transfection des différentes sous-unités [Miyano 2009].

Rac 2 est composée d'une région «effectrice Ras-like» en N-terminal (aa 20-40) qui assure les interactions avec la $p67^{PHOX}$ [Freeman 1994, Nisimoto 1997]. Cette région chevauche le domaine appelé «switch I» (aa 30-38), domaine qui subit un changement conformationnel important lors de l'activation de Rac. Le domaine dénommé «switch II» (aa 60-78) semble intervenir dans l'activation de l'oxydase puisque la mutation T75D résulte en un défaut d'activité [Freeman 1996]. Elle possède aussi une région appelée «insert region» (aa 124-135) qui serait indispensable à l'activation de NOX2, en assurant la liaison au cytochrome b et en régulant le transfert des électrons [Diebold 2001]. Cependant, plusieurs études ont montré que l'«insert region» n'est pas indispensable à l'activation de NOX2 [Alloul 2001, Gorzalczany 2002, Miyano 2009]. Enfin, l'extrémité C-terminale est impliquée dans l'association de Rac2 à la membrane, via le motif CAAX isoprényle qui assure l'ancrage lipidique. La délétion de cette extrémité bloque l'activation du complexe oxydatif [Kreck 1996] indiquant son rôle dans l'activation de NOX2 (Figure 10).

L'importance de Rac 2 dans le neutrophile est illustrée par un cas de dysfonctionnement congénital à l'origine d'infections bactériennes répétées: les neutrophiles du patient présentent un défaut de polarisation, de chimiotactisme, de

dégranulation azurophile et de production d'O₂⁻. L'origine de ce dysfonctionnement est la mutation D57N de Rac2, ce mutant ne lie que la forme GDP (Guanosine diphosphate) et par conséquent il n'y a pas d'activation de l'oxydase bien que toutes les autres sous-unités du complexe soient présentes [Ambruso 2000].

I.3- Mécanismes d'activation de NOX2

En raison de leur haute réactivité et de leur production massive, les FRO générées par la NADPH oxydase phagocytaire lors de la réponse inflammatoire pourraient entraîner de nombreux dommages tissulaires si elles étaient produites de façon constitutive. Fort heureusement, l'activation de NOX2 est très finement régulée de manière spatio-temporelle; en effet elle n'a lieu qu'après stimulation du phagocyte et, en situation normale, uniquement dans l'enceinte du phagosome.

En l'absence d'agent pathogène, le PN est au repos et NOX2 est inactive: les protéines qui la composent sont dispersées entre la membrane plasmique et le cytosol.

La stimulation de la NADPH-oxydase peut être induite par un grand nombre de facteurs solubles et particulaires. Les facteurs solubles sont le fragment du complément C5a, le Leucotriène B4 (LTB₄), le «platelet activating factor» (PAF), les N-formyl peptides d'origine bactérienne dont le prototype est le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLF), les endotoxines bactériennes (LPS pour lipopolysaccharides) [Forehand 1989, Casatella 1990, DeLeo 1998], les agonistes pharmacologiques comme les ionophores calciques (Ionomycine, A23187) ou les activateurs de PKC de type esters de phorbol (PMA et PdBu) [McPhail 1979, Cohen 1981]. Les agonistes particulaires qui stimulent la production des FRO sont les agents pathogènes, le zymosan (complexe carbohydrate-protéine issu de la paroi cellulaire de levure) ou des particules de latex plus ou moins opsonisées. La conjonction de différents facteurs comme les cytokines pro-inflammatoires (TNF α , GM-CSF, IL-8) exerçant un effet potentialisateur ("priming") envers un autre agoniste appliqué ultérieurement comme le fMLF joue également un rôle important dans l'activation de NOX2 [Khawaja 1992, Kodama 1999].

Ces agents stimulants vont activer des cascades de signalisation intracellulaire distinctes faisant intervenir des protéines G (trimériques et monomériques), des kinases (protéines Kinases C (PKC), mitogene activated protein kinases (MAPK),

protéines Kinases A (PKA), PI3K) des phospholipases (PLC, PLD, PLA2) qui aboutissent à une activation plus ou moins importante de NOX2.

Trois évènements majeurs accompagnent l'activation de NOX2: 1) la phosphorylation des composants cytosoliques, p47^{PHOX}, p67^{PHOX} et p40^{PHOX}. La phosphorylation de la p47^{PHOX} est très intense en comparaison avec la phosphorylation de la p67^{PHOX} et de la p40^{PHOX} [El Benna 1994, Dang 2001b, Dang 2003], 2) l'activation de la petite protéine G, Rac2, 3) la translocation des composants cytosoliques vers la membrane plasmique où ils se regroupent avec le cytochrome b₅₅₈ pour former la NADPH oxydase active responsable de la production des FRO [Babior 1999, Dang 2002, Fontayne 2002]. Cet assemblage au niveau de la membrane fait intervenir des interactions protéines-protéines et protéines-lipides impliquant les domaines SH3, les domaines riches en proline, les motifs TPR et les domaines PX [Babior 1999]. La compréhension de la régulation de NOX2 est primordiale pour la compréhension du fonctionnement des NADPH oxydases non phagocytaires. Cette section développera donc ces trois aspects majeurs de la régulation de NOX2.

1.3.1- Importance de la phosphorylation des sous-unités de NOX2 dans l'activation de NOX2

Dès 1981, il a été montré que la stimulation des PN, chargés au préalable avec l'acide orthophosphorique radioactif (³²P H₃PO₄), par le PMA ou le fMLF induit un changement au niveau des taux de phosphorylations d'un grand nombre de phosphoprotéines [Schneider 1981]. La cinétique d'ajout de groupements phosphates sur ces protéines est en étroite corrélation avec la cinétique de production de l'anion superoxyde (O₂⁻). Cette relation phosphorylation des protéines / production d'O₂⁻ a été confirmée par des essais de cinétique et des études de phosphorylation faits dans les PN de malades atteints de CGD [Babior 1988]. Un lien entre la phosphorylation de ces protéines et leur translocation à la membrane suite à la stimulation des PN a été ensuite mis en évidence par Clark et Nauseef au début des années 90 [Clark 1990, Nauseef 1991]. Bien qu'elles ne constituent pas le seul mécanisme impliqué dans l'activation de NOX2, ces phosphorylations tiennent toutefois une place primordiale.

I.3.1.a-Phosphorylation de la p47^{PHOX}

Avant même l'identification de la p47^{PHOX}, il a été observé un défaut de phosphorylation d'une protéine de 47 kDa associé à une anomalie de production de FRO dans les PN de patients atteints de la forme autosomale de CGD [Segal 1985, Kramer 1987]. La p47^{PHOX} est la sous-unité la plus largement phosphorylée avec un total de 10 à 11 sites phosphorylés situés dans l'extrémité C-terminale (dans les domaines AIR et PRR), allant de la Sérine 303 à la Sérine 379, dans les PN stimulés [El Benna 1994, Faust 1995, El Benna 1996] (Figure 11).

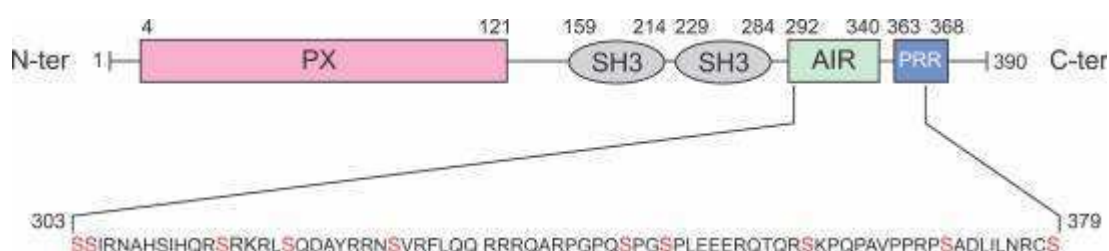


Figure 11: Sites de phosphorylation de la p47^{PHOX} [El Benna 2009]

La protéine étant phosphorylée de façon séquentielle, différents états de phosphorylations sont observés. Au début, survient une phosphorylation primaire de certains résidus sérines dont les sérines S345, S359, S370 [Johnson 1998], puis des phosphorylations supplémentaires se produisent sur les sérines S303, S304, S328 et S379.

La phosphorylation de la p47^{PHOX} est essentielle pour la translocation membranaire de l'hétérotrimère p40^{PHOX}-p47^{PHOX}-p67^{PHOX} et l'activation de l'oxydase [Faust 1995, El Benna 2009]: la mutation individuelle de la S379 en alanine abolit totalement l'activité de NOX2 [Faust 1995] alors que celles des S303, S304, S328, S359 et S370 diminuent (pour chacune d'entre elles) l'activité du complexe de moitié.

Parmi les protéines kinases impliquées dans ces phosphorylations, les protéines kinases C (PKC) ont été identifiées comme indispensables à l'activité de la NOX2 du neutrophile humain [Dang 2001b, Fontayne 2002, El Benna 2008, El Benna 2009]. Par ailleurs les MAPK, ERK1/2 et p38MAPK, sont aussi impliquées dans la phosphorylation de la p47^{PHOX} en réponse aux cytokines pro-inflammatoires telles que le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et le TNF α (Tumor necrosis factor α) [Dang 1999, Dewas 2003].

Les mécanismes par lesquels la phosphorylation de la p47^{PHOX} sur ces différents sites aboutit à l'activation de NOX2 a fait l'objet de nombreuses études. Ainsi notre équipe a démontré que la phosphorylation de la S345 induite par le GM-CSF ou le TNF α entraîne un changement de la conformation de la p47^{PHOX} afin de faciliter sa phosphorylation subséquente par les PKC au niveau des autres sites (S315, S320 et S328 entre autres), et donc, l'assemblage et l'activation de la NADPH oxydase. Ce changement de conformation est catalysé par la proline isomérase Pin-1 qui n'interagit avec la S345 que si cette dernière est phosphorylée **[Dang 2006, El Benna 2008, Boussetta 2010]**.

Par ailleurs il a été montré que la phosphorylation de la p47^{PHOX} au niveau de certaines sérines ciblées par les PKC, entraîne un changement conformationnel de la protéine, changement qui lui permet d'interagir avec ses partenaires membranaires. En effet, dans les cellules au repos, la p47^{PHOX} existe sous une conformation auto-inhibée où le domaine PX et le tandem SH3 sont masqués par une interaction intramoléculaire impliquant la région AIR C-terminale **[Sumimoto 1994, Leto 1994, de Mendez 1997, Hiroaki 2001, Durand 2006, Marcoux 2010] (Figure 12)**. Cette interaction intramoléculaire prévient la liaison de ces domaines avec leurs cibles membranaires que sont les phosphoinositides membranaires et la région PRR de la p22^{PHOX}. Il a été montré que la phosphorylation simultanée des S303, S304 et S328, situées dans le domaine AIR, était cruciale pour rompre cette interaction intramoléculaire **[Ago 1999, Marcoux 2009]** exposant ainsi le domaine PX et le tandem SH3 de la p47^{PHOX} ce qui permet leurs liaisons subséquentes aux PtdIns 3-4 bisphosphates et à la p22^{PHOX}. Ceci a pour conséquence d'initier l'assemblage de NOX2. Ce modèle a été consolidé par des études structurales de la partie de la p47^{PHOX} (aa 156-340) impliquée dans l'auto-inhibition **[Groemping 2003, Yuzawa 2004a, Yuzawa 2004b, Groemping 2005]**.

Quant à la phosphorylation de la S379, elle est impliquée dans la translocation de la p47^{PHOX}; en effet, la mutation de ce site en alanine inhibe la translocation de la p47^{PHOX} à la membrane **[Faust 1995]** ce qui pourrait expliquer la perte d'activité totale observée suite à la seule mutation de cette sérine. Cependant, des études ont également suggéré que la phosphorylation de la S379 de la p47^{PHOX}, déstabilisait l'interaction avec le domaine SH3 de la p67^{PHOX} avec pour conséquence une diminution de l'activité de NOX2 **[Massenet 2005, Mizuki, 2005]**.

La figure 12 résume les différentes étapes du changement de conformation que subit la $p47^{PHOX}$ suite à l'activation de NOX2: de la conformation auto-inhibée à la conformation finale où la protéine est complètement dépliée et capable d'interagir avec ses partenaires.

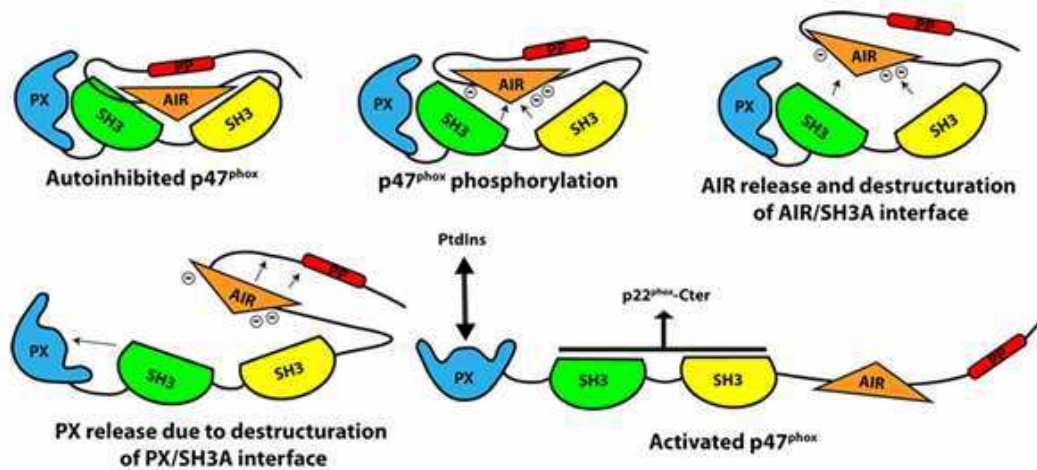


Figure 12: Changement conformationnel de la $p47^{PHOX}$ durant l'activation de NOX2 [Marcoux 2010]

1.3.1.b-Phosphorylation de la $p67^{PHOX}$

C'est en 1993 que les travaux de Dusi et Rossi ont permis de montrer, pour la première fois, que la $p67^{PHOX}$ était phosphorylée au cours de l'activation des PN [Dusi 1993b]. La cinétique de cette phosphorylation est similaire à celle de la $p47^{PHOX}$. Elle a lieu dans le cytosol et est suivie de la translocation de la $p67^{PHOX}$ à la membrane [Dusi 1993b]. La phosphorylation de la $p67^{PHOX}$ au cours de la stimulation des cellules est confortée par l'observation qu'aucune protéine de 67kD phosphorylée n'est détectée dans les PN de malades atteints de CGD liée à une déficience de la $p67^{PHOX}$ [Dusi 1993b]. La phosphorylation et la translocation continues de la $p67^{PHOX}$ permettent de maintenir soutenue l'activité oxydase [Dusi 1993a]. Les travaux de notre équipe ont permis de montrer que la phosphorylation de la $p67^{PHOX}$ impliquait une voie dépendante des PKC et une voie indépendante des PKC, ainsi le GF109203X, inhibiteur sélectif des PKC, diminue fortement la phosphorylation de la $p67^{PHOX}$ sous PMA mais n'exerce aucun effet sous fMLF [El Benna 1997]. De plus, la phosphorylation de la $p67^{PHOX}$ induite par le PMA a lieu sur des résidus sérines. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques nous a permis de

montrer que les voies des MAPK, ERK2 et p38MAPK, étaient impliquées dans la phosphorylation de la p67^{PHOX} au cours de l'activation des neutrophiles par le fMLF [Dang 2003]. Cette observation est appuyée par le fait qu'ERK2 et la p38MAPK sont capables de phosphoryler la p67^{PHOX} *in vitro*, sur des sites sélectifs. De plus la phosphorylation de la partie C-terminale de la p67^{PHOX} (aa 244-526) est inhibée par plusieurs constructions de la partie N-terminale de la protéine (aa 1-243, aa 1-210, aa 1-199) indiquant qu'un changement de conformation est nécessaire pour que la phosphorylation ait pleinement lieu. La thréonine 233 a été identifiée comme étant le site majeur de phosphorylation par les MAP kinases, elle se situe entre les motifs TPR et le domaine d'activation AD [Forbes 1999]. Nos récents travaux montrent également que la p67^{PHOX} est constitutivement phosphorylée dans les PN non stimulés et que cette phosphorylation constitutive est le résultat d'un cycle continu de phosphorylation / déphosphorylation qui est contrôlé d'une part par MEK1/2 et une tyrosine kinase et d'autre part par une sérine/thréonine phosphatase de type 1 /2A (PP1/2A) [Dang 2011].

I.3.1.c-Phosphorylation de la p40^{PHOX}

La phosphorylation de la p40^{PHOX} a été initialement mise en évidence par la technique d'IsoElectroFocalisation (IEF) (Si elle est phosphorylée, une protéine se déplace vers des points isoélectriques plus acides) et confirmée par immunoprécipitation de la p40^{PHOX} dans les cellules chargées avec l'acide orthophosphorique radioactif (³²P H₃PO₄) [Fuchs 1997]. Ces approches ont permis de montrer que dans les cellules HL60 différenciées en PNs, la p40^{PHOX} est phosphorylée au niveau basal et qu'elle subit des phosphorylations supplémentaires suite à la stimulation des cellules par le PMA ou le fMLF. De plus la cinétique de phosphorylation induite par chacun de ces agonistes est en étroite corrélation avec la cinétique de production des FRO [Fuchs 1997]. Les travaux de la même équipe ont montré que la p40^{PHOX} est phosphorylée sur les résidus sérine S315 et thréonine T154, et que cette phosphorylation implique les PKC [Bouin 1998].

Le rôle de la phosphorylation de la p40^{PHOX} dans la régulation de l'activité de NOX2 est controversé: en effet certaines données indiquent qu'en système acellulaire, la p40^{PHOX} phosphorylée inhibe l'activité de la NADPH oxydase en présence de PKC [Lopez 2004] alors que des études plus récentes mettent l'accent sur un rôle potentialisateur de la p40^{PHOX} phosphorylée: ainsi, les neutrophiles provenant de

souris dont la moelle osseuse a été reconstituée par des cellules progénitrices exprimant la p40^{PHOX} mutée au niveau de la thréonine 154 (T154A, mutant non phosphorylable) produisent significativement moins de FRO en réponse au fMLF (40% moins), aux globules rouges opsonisés par des IgG (67% moins) ou à S.aureus opsonisé par le sérum (63% moins) que ceux exprimant la p40^{PHOX} sauvage. Cette perte d'activité est associée à une diminution de la translocation de la p47^{PHOX} à la membrane suggérant que la phosphorylation de la thréonine 154 de la p40^{PHOX} est un signal physiologique important pour l'assemblage et l'activation de la NADPH oxydase du neutrophile [Chessa 2010].

I.3.1.d-Phosphorylation de la gp91^{PHOX} / NOX2

Dès 1988, l'analyse des protéines phosphorylées dans les neutrophiles normaux et les neutrophiles de patients atteints de CGD, autosomale ou liée à l'X, a suggéré que la gp91^{PHOX} était phosphorylée après la stimulation des PNs [Garcia 1988]. Mais ce n'est qu'en 2009 que cette phosphorylation a été clairement démontrée et caractérisée grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques. Notre équipe a ainsi mis en évidence la phosphorylation de la gp91^{PHOX} /NOX2 au cours de l'activation des PNs humains par le PMA, le fMLF ou le zymosan opsonisé (un dérivé de la paroi de la levure *S.cerevisiae*). Cette phosphorylation n'est pas détectée dans les neutrophiles des patients atteints de CGD liée à une déficience en gp91^{PHOX} confirmant ainsi l'identité de la protéine phosphorylée. La phosphorylation de la gp91^{PHOX} (ou NOX2) est médiée par les PKC qui ciblent des résidus sérines et thréonines localisés dans la partie cytosolique C-terminale de la protéine et a pour conséquences l'augmentation de l'interaction de NOX2 avec ses partenaires cytosoliques à savoir la p47^{PHOX}, la p67^{PHOX} et Rac2 mais aussi la potentialisation de l'activité diaphorase du complexe [Raad 2009]. Par conséquent, la phosphorylation de la sous unité catalytique Nox2 constitue un nouveau mécanisme de régulation de l'activité de la NADPH oxydase.

I.3.1.e-Phosphorylation de la p22^{PHOX}

L'étude de l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire en système acellulaire a révélé que l'ajout d'acide phosphatidique dans le mélange réactionnel entraîne la phosphorylation de la p22^{PHOX}. Cette phosphorylation fait intervenir des PKC

conventionnelles et des kinases dépendantes de l'acide phosphatidique [Regier 1999]. Il a été par la suite mis en évidence que la p22^{PHOX} est phosphorylée dans les PNs humains en réponse à différents stimuli comme le PMA, le zymosan opsonisé et le fMLF, et que cette phosphorylation est en corrélation avec l'activation de la NADPH oxydase [Regier 2000]. Cette phosphorylation qui touche des résidus thréonines met en jeu deux mécanismes: l'un est dépendant des phospholipases D (PLD), l'autre en est indépendant [Regier 1999]. Récemment, il a été montré que la phosphorylation de la Thr 147 est indispensable à la formation d'un complexe NOX2 actif. En effet, la mutation de la T147 en alanine, résidu non phosphorylable, inhibe de près de 70% l'activité de NOX2 dans les cellules ovariennes d'hamster chinois CHO transfectées avec le système NOX2 complet (gp91^{PHOX}, p47^{PHOX}, p67^{PHOX}) et empêche l'interaction de la p22^{PHOX} avec la p47^{PHOX}. De façon intéressante, la mutation de ce même résidu en acide aspartique, qui mime la phosphorylation, permet de restaurer cette interaction ainsi que l'activité du complexe [Lewis 2009].

1.3.2- Rac2, un élément central de l'activation de NOX2

Les petites protéines G sont des GTPases qui fonctionnent comme des interrupteurs de la signalisation cellulaire. Elles lient de façon réversible les nucléotides guaniliques et existent par conséquent sous deux conformations, active et inactive. Dans les PNs au repos, Rac 2 est inactif, lie le GDP et est maintenu dans le cytosol par l'inhibiteur Rho-GDI (Rho-Guanine nucléotide dissociation inhibitors) qui interagit avec sa région switch II et avec sa partie isoprénylée en C-terminal [Scheffzek 2000]. Suite à l'activation des PNs, Rac 2 est libéré de Rho-GDI, et sous l'influence de facteurs d'échanges (GEFs) (essentiellement Vav1, PRex1 dans les PNs) et en présence du cofacteur Mg²⁺, va échanger son GDP contre un GTP (Guanosine triphosphate), acquérant ainsi une conformation active [Mizuno 1992, Welch 2002, Kim 2003, Bokoch 2006]. Une fois actif, Rac 2 transloque vers la membrane [Quinn 1993, Abo 1994] indépendamment des autres sous-unités régulatrices [Heyworth 1994, Dusi 1996] et lie ses protéines effectrices afin de réguler les diverses fonctions du PN et notamment l'activité NADPH oxydase. Une protéine GAP (GTPase Activating Protein) interagit ensuite avec la forme active pour stimuler l'activité GTPasique intrinsèque de Rac2 et permettre le retour à la conformation inactive liant le GDP. La GTPase Rac 2, sous sa conformation active, régule ainsi l'activation de la

NADPH oxydase à plusieurs niveaux: 1) sa région «effectrice Ras-like» en N-terminal (aa 20-40) interagit avec les domaines TPR de la p67^{PHOX} [Diekmann 1994, Koga 1999] et aurait une fonction de protéine adaptatrice permettant la translocation de la p67^{PHOX} (en conjonction avec la p47^{PHOX}) vers la membrane [Gorzalczany 2000]. A ce niveau, la p67^{PHOX} interagit directement avec le cytochrome b558 par l'intermédiaire de sa partie N-terminale (aa 1-199) [Dang 2001, Dang 2002], et Rac assurerait le bon positionnement du domaine d'activation (AD) de la p67^{PHOX} par rapport au cytochrome b558 pour la régulation du transfert d'électrons, [Gorzalczany 2002]. 2) l'«insert region» (aa 124-135) de Rac 2 interagit directement avec le cytochrome b558 et stimulerait directement la première étape du transfert d'électrons (du NADPH vers le FAD), alors que l'interaction de Rac 2 avec la p67^{PHOX}, serait indispensable pour assurer la deuxième étape de ce transfert (du FAD vers l'hème puis vers l'oxygène moléculaire) [Diebold 2001]. Cependant plusieurs études ont également montré que la délétion de l'«insert region» n'empêche pas l'activation de NOX2 suggérant au contraire que cette région de Rac 2 ne serait donc pas indispensable à la régulation du transfert d'électrons [Alloul 2001, Gorzalczany 2002, Miyano 2009].

1.3.3-Assemblage de NOX2: Importance des interactions protéines-protéines et protéines-lipides

L'état de repos et l'état actif de NOX2 sont gouvernés par différentes combinaisons d'interactions protéines-protéines et protéines-lipides impliquant différents domaines structuraux.

Dans les PN au repos, les composants protéiques de la NADPH oxydase phagocytaire NOX2 sont répartis entre la membrane plasmique et le cytosol. Au niveau de la membrane plasmique, la sous-unité catalytique gp91^{PHOX} ou NOX2 et la p22^{PHOX} sont associées entre elles. Dans le cytosol (**Figure 13**) sont présentes la p47^{PHOX}, la p67^{PHOX}, la p40^{PHOX} à l'état de trimère et la petite protéine G Rac 2 à l'état inactif car associée à son inhibiteur RhoGDI [Kwong 1993].

Dans cet état basal, les interactions impliquées dans la formation du complexe trimérique sont les suivantes: le domaine PRR de la p47^{PHOX} interagit avec le domaine SH3 situé en C-terminal de la p67^{PHOX}. La p67^{PHOX} et la p40^{PHOX} interagissent entre elles via leurs domaines PB1 respectifs [Lapouge 2002, Leto

1994]. Certaines données de la littérature suggèrent également que la p40^{PHOX}, via son domaine SH3, lie la p47^{PHOX} **[Fuchs 1995, Ito 1996, Fuchs 1996, Wientjes 1996]** mais l'affinité de cette interaction est beaucoup plus faible que celle qui existe entre la p40^{PHOX} et la p67^{PHOX} **[Groemping 2005]**. Mis à part ces interactions protéine-protéine, il existe au sein de ces trois protéines des interactions intramoléculaires qui empêchent leurs liaisons aux protéines membranaires tant que la cellule n'est pas stimulée, maintenant ainsi le complexe NOX2 inactif.

Ainsi, dans les cellules au repos, la p47^{PHOX} est repliée sur elle-même : sa région auto-inhibitrice AIR est associée au tandem SH3 **[Sumimoto 1994, Leto 1994]** formant alors une protéine de structure globulaire et compacte qui l'empêche de lier la p22^{PHOX} membranaire. Cette association prévient également la liaison du domaine PX aux phospholipides membranaires **[Yuzawa 2004]**. Parallèlement à cela, des expériences de SAXS ont mis en évidence l'existence d'une interaction intramoléculaire entre le domaine PX et le domaine SH3A de la p47^{PHOX} **[Durand 2006]**. Cette donnée est confortée par les travaux de Marcoux, qui montre par spectrométrie de masse couplée à la détermination des échanges d'hydrogène que des résidus de ce domaine (SH3A) devenaient en effet accessibles après stimulation de l'oxydase **[Marcoux 2009]**.

La p67^{PHOX} se trouve également dans une conformation auto-inhibée qui l'empêche de lier Rac et NOX2; les domaines TPR situés en N terminal sont masqués par une liaison au SH3 situé à l'extrémité N-terminale **[Durand 2010]**. De plus, la phosphorylation de la partie C-terminale (aa 244-526) est inhibée par plusieurs constructions de la partie N-terminale **[Dang 2003]**. La p40^{PHOX} ne fait pas l'exception : son domaine PX est associé à son domaine PB1 **[Honbou 2007]**, la privant de ce fait de toute liaison à la membrane, via le domaine PX, mais sans pour autant gêner son interaction à la p67^{PHOX}.

Suite à la stimulation du phagocyte, la p47^{PHOX} est phosphorylée sur plusieurs résidus sérines, elle change alors de conformation et ses domaines SH3 en tandem se démasquent et interagissent avec le domaine riche en proline de la p22^{PHOX} **[Huang 1999, Hata 1998, Groemping 2003]** et son PX est alors capable de s'associer aux phosphatidylinositols (4,5) bisphosphates permettant ainsi la translocation de l'ensemble des protéines cytosoliques vers la membrane **[Ago**

2003] (Figure 14). Durant l'activation de NOX2, la p40^{PHOX} est aussi phosphorylée et sa phosphorylation au niveau de la T154 semble favoriser la translocation de la p47^{PHOX} à la membrane et par conséquent potentialiser l'activité de l'oxydase **[Chessa 2010]**. La protéine dépliée est aussi capable de s'associer aux phospholipides membranaires, via son PX démasqué. La p67^{PHOX} est également phosphorylée après stimulation des PNs. Cette phosphorylation entraîne probablement un changement conformationnel de la protéine, lui permettant d'interagir, après translocation à la membrane, avec le cytochrome b pour ainsi réguler la première étape du transfert d'électrons **[Nisimoto 1999]**. Le domaine de la p67^{PHOX} impliqué dans cette interaction n'est pas clairement défini ; le rôle important du domaine AD dans l'activation de NOX2 suggère une interaction directe de ce domaine avec le cytochrome b bien que ceci n'ait pas été clairement démontré. D'autre part, il a été mis en évidence que le fragment [1-199] de la p67^{PHOX}, qui ne possède pas le domaine AD était suffisant pour permettre cette interaction **[Dang 2002]**. Par ailleurs, la p67^{PHOX} interagit avec Rac GTP via ses motifs TPR pour assurer, en synergie avec la petite protéine G, la suite du mécanisme de transfert des électrons **[Koga 1999]**.

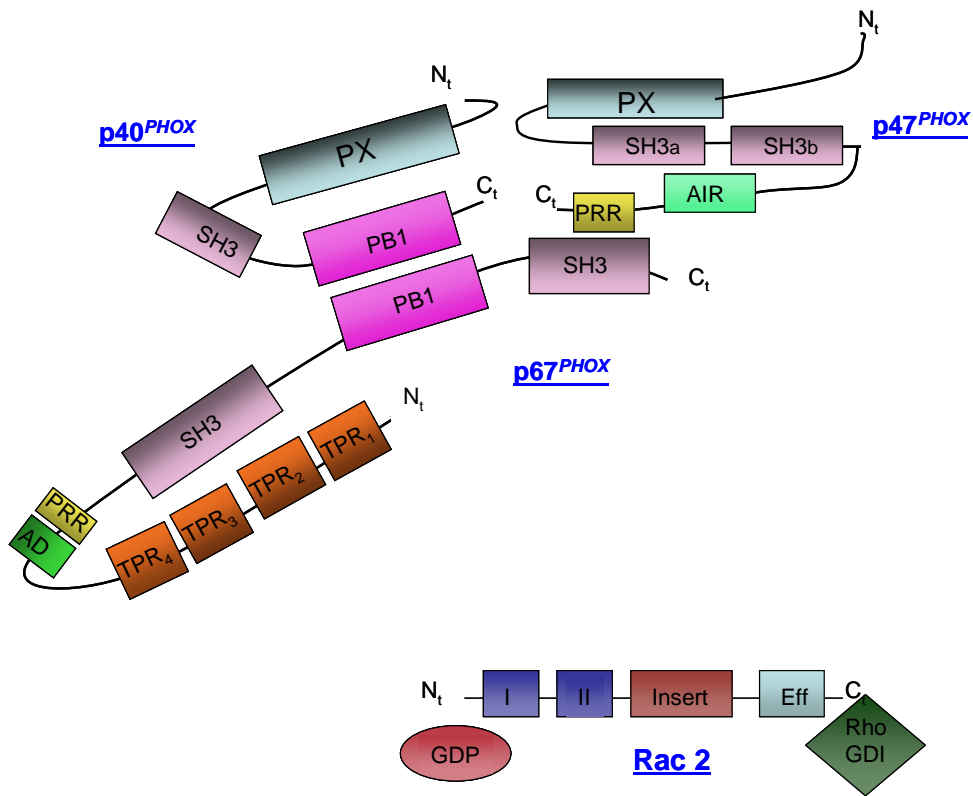


Figure 13 : Les sous-unités cytosoliques de NOX2 à l'état de repos du complexe

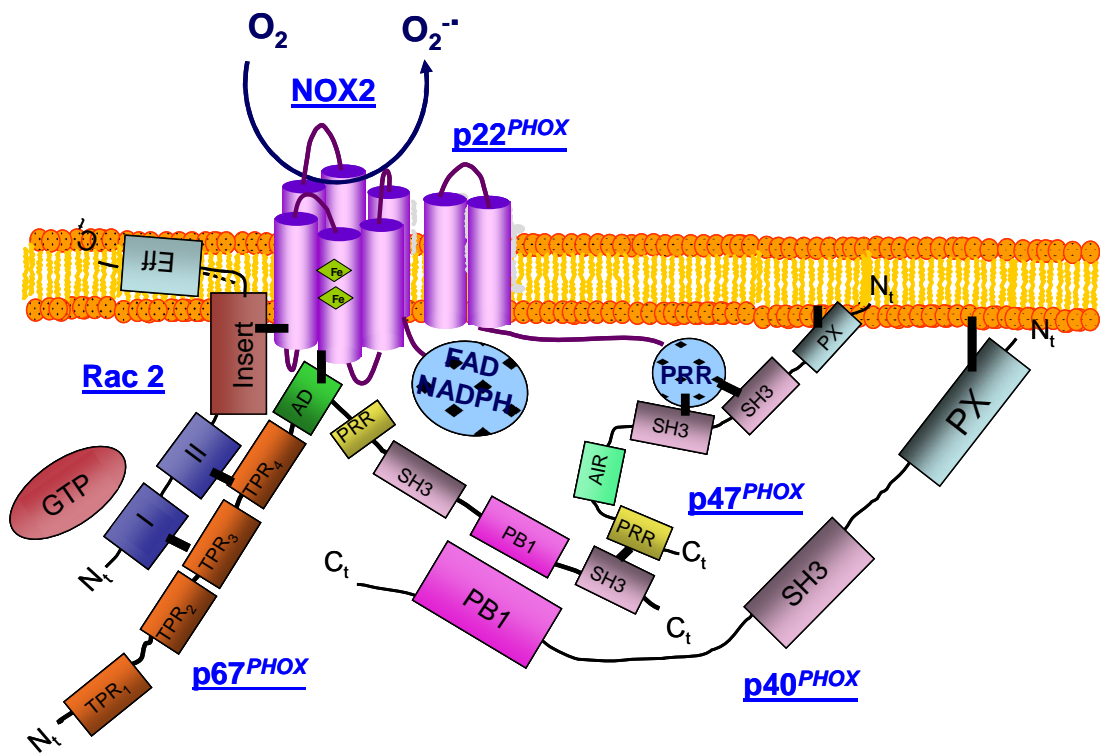


Figure 14 : Le complexe NOX2 à l'état activé

II- LES HOMOLOGUES DE NOX2

En 1991, Meier et coll montrent que les fibroblastes humains possèdent une activité NADPH oxydase inhibable par le DPI, inhibiteur sélectif des flavoenzymes [Meier 1991]. La même équipe a par la suite montré que cette activité était conservée dans les fibroblastes de patients souffrant de CGD, et donc n'exprimant pas NOX2, en réponse à divers stimuli (TNF α , IL-1, calcium ionophores) [Emmendorffer 1993], suggérant ainsi l'existence de NADPH oxydase non phagocytaire. C'est en 1999 que Lambeth et coll clonent le premier homologue, NOX1, qui est fortement exprimé dans les cellules épithéliales du colon. Cet homologue a été d'abord dénommé MOX1 (Mitogene Oxidase 1) pour ses propriétés mitogéniques [Suh 1999]. En très peu de temps, cinq autres homologues ont été clonés par différentes équipes dans différents tissus, il s'agit de NOX3, NOX4, NOX5 et les DUOX1-2 [Lambeth 2004]. Ces homologues, au nombre de 7, ont été regroupés sous l'acronyme NOX pour NADPH Oxydases (NOX-1 à NOX-5) et DUOX pour Dual Oxydases (DUOX1 et DUOX2). La gp91^{PHOX} a été renommée NOX2.

L'étude des profils d'expression des différentes NOX montre qu'elles sont exprimées de manière sélective dans certaines cellules et certains organes (Figure 15) où elles seraient impliquées dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques.

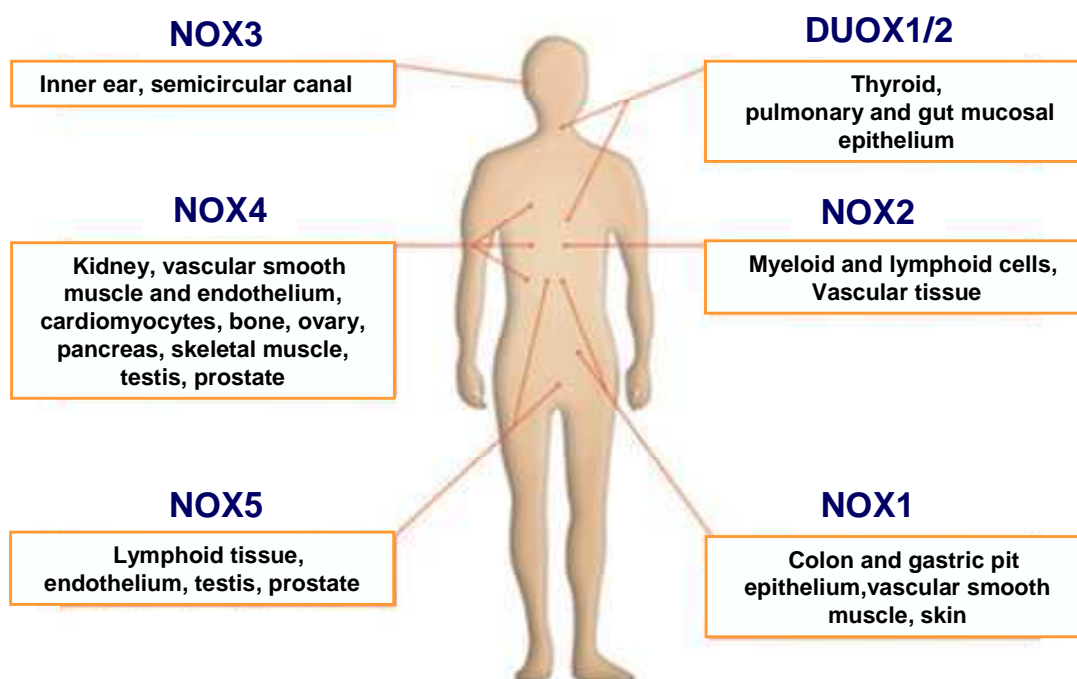


Figure 15: Localisations des NOX dans l'organisme [Quinn 2006]

Les NOX/DUOX peuvent être classées en trois groupes selon la présence ou non de domaines additionnels aux domaines du prototype NOX2 (**Figure 16**). Le premier groupe comprend NOX1, NOX2, NOX3 et NOX4 qui sont formées de six domaines transmembranaires avec à l'extrémité C-terminale des motifs conservés pour la fixation du NADPH et du FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), de plus les quatre histidines impliquées dans la liaison des deux groupements hèmes sont conservées. En plus de ces domaines, NOX5, l'unique membre du deuxième groupe, possède dans la partie N-terminale intra cytoplasmique quatre motifs appelés EF-Hand pouvant lier le calcium. Quant aux DUOX1 et DUOX2, qui font partie du troisième groupe, elles possèdent, dans la région N-terminale, un domaine dit «peroxydase like» en raison de sa forte homologie avec les peroxydases, suivi d'un septième passage transmembranaire et de deux motifs EF-Hand.

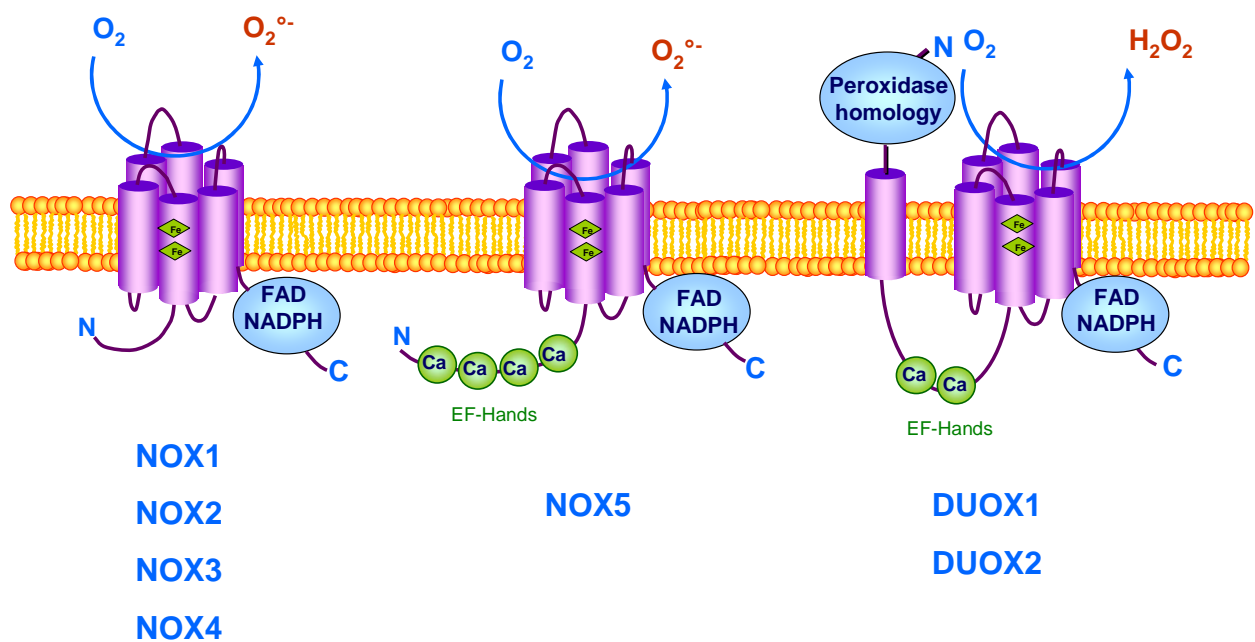


Figure 16: Structure des NOX

II.1- NOX1

La NADPH oxydase NOX1, majoritairement exprimée au niveau des cellules épithéliales du colon, est composée, tout comme NOX2, de protéines membranaires et de protéines cytosoliques. Les composants membranaires sont la sous unité catalytique NOX1 et la p22^{PHOX}. Les composants cytosoliques sont NOXA1 pour «NOXActivator 1», NOXO1 pour «NOXOrganizer 1» et la petite protéine G, Rac1.

La structure, la régulation ainsi que les fonctions de NOX1, homologue qui constitue l'objet de ma thèse, seront détaillées dans le prochain chapitre du manuscrit.

II.2- NOX3

Clonée en 2001, NOX3 est composée de 568 acides aminés et possède 56% d'identité de séquence avec la sous-unité catalytique NOX2 [Cheng 2001]. Elle est fortement exprimée au niveau de l'oreille interne [Banfi 2004b] où elle est impliquée dans la biosynthèse de l'otoconie: une structure constituée de bio-minéraux (cristaux de carbonate de calcium) nécessaires à la perception de la gravité et du mouvement. En effet des souris *het* (Head-tilt) qui ont un défaut de perception de la gravité et du mouvement associé à l'absence de la biosynthèse de l'otoconie, présentent une mutation au niveau du gène de NOX3 [Paffenholz 2004]. NOX3 est également exprimée dans les cellules endothéliales pulmonaires où son expression est régulée par les Toll-Like Receptors 4 (TLR4) [Zhang 2006] ainsi que dans la rate et le rein fœtaux.

En ce qui concerne sa régulation, il a été montré que la sous-unité catalytique, tout comme NOX2, interagit avec la p22^{PHOX} qui la stabilise [Ueno 2005, Nakano 2007]. De plus, lorsqu'il est exprimé dans des systèmes hétérologues, cet hétérodimère possède une forte activité basale qui est augmentée par les sous-unités organisatrices (p47^{PHOX} et NOXO1) et activatrices (p67^{PHOX} et NOXA1). Cependant, le domaine d'activation AD de la p67^{PHOX} ne semble pas être impliqué dans l'activation de NOX3, puisque la mutation du résidu valine 204 en alanine n'affecte pas sa production de FRO [Cheng 2004b, Ueno 2005, Cheng 2004b]. Par ailleurs, NOXO1 peut induire l'activation de NOX3 en l'absence de NOXA1 [Cheng 2004b]. Par ailleurs, la mutation de Rac1 ou sa délétion par des siRNA affecte l'activité de NOX3 indiquant l'importance de cette petite protéine G dans l'activation du complexe

[Ueyama 2006]. Le rôle de NOXO1 comme partenaire essentiel de NOX3 est souligné par le fait que les souris *hslt* (Head slant) qui portent une mutation au niveau du gène codant pour NOXO1, homologue de la p47^{PHOX}, présentent le même phénotype que les souris *het*.

II.3- NOX4

NOX4, initialement décrite dans le rein **[Geiszt 2000, Shiose 2001]**, présente 39% d'identité de séquence avec NOX2. Il existe plusieurs transcrits de NOX4 résultant d'un épissage différentiel **[Goyal 2005]**: NOX4A code pour la forme entière de la protéine, NOX4B ne possède pas de site de liaison au NADPH, NOX4C est tronquée dans toute sa partie C-terminale, NOX4D est tronquée dans sa partie N-terminale et ne possède pas de région transmembranaire, et NOX4E est tronquée dans sa partie N-terminale et ne possède pas de site de liaison au NADPH. Seules NOX4A et NOX4D sont actives. Cependant, il reste à déterminer si ces transcrits sont traduits physiologiquement. Mise à part cette forte expression dans les cellules du cortex rénal, NOX4 est exprimée dans plusieurs types cellulaires dont les cellules du muscle lisse vasculaire **[Hilenski 2004]**, les cellules endothéliales **[Ago 2004]**, les fibroblastes **[Cucoranu 2005]**, les cardiomyocytes **[Li 2006]**, les ostéoclastes **[Yang 2001]**, les kératinocytes **[Chamulitrat 2004]**, les neurones **[Vallet 2005]** et les hépatocytes **[Carmona-Cuenca 2006]**.

Dans le rein, il a été proposé que NOX4 ait le rôle de senseur de l'oxygène et assure le contrôle de l'expression de l'érythropoïétine mais cette fonction reste controversée **[Geiszt 2000, Shiose 2001]**. Les FRO produites par NOX4 interviennent dans d'autres processus physiologiques notamment la sénescence **[Geiszt 2000, Shiose 2001, Schilder 2009]**, l'apoptose **[Pedruzzi 2004]**, la migration **[Meng 2008, Pendyala 2009]**, la différenciation **[Cucoranu 2005, Yang 2004, Li 2006, Clempus 2007]** et plus récemment l'immunité innée. En effet, les cellules HEK293 exprimant NOX4 produisent des FRO en réponse à un traitement au LPS et cette activité est accompagnée de l'activation de NFκB (Nuclear Factor-κ B) connue pour son rôle dans la réponse inflammatoire **[Park 2004]**. Au niveau du poumon, NOX4 serait impliquée dans la fibrose pulmonaire: dans les modèles murins de fibrose pulmonaire, le H₂O₂ produit par NOX4 en réponse au TGFβ1 (Transforming Growth Factor β 1) stimule la différenciation des myofibroblastes et l'accumulation de la

matrice extracellulaire toutes deux marqueurs de la fibrose, mais cette FRO est également impliquée dans la migration des fibroblastes induite par le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) [Hecker 2009, Amara 2010]. De plus, il y a inhibition de l'apoptose des cellules alvéolaires chez les souris où NOX4 a été invalidée [Carneseccchi 2011]. Les souris NOX4 KO sont protégées du stress oxydant et de la survenue d'accident vasculaire cérébral observée chez les souris NOX4 WT suite à l'ischémie reperfusion [Kleinschnitz 2010]; selon Kuroda et coll., les souris où le gène NOX4 a été invalidé de façon spécifique dans les cardiomyocytes ont une meilleure activité cardiaque et sont mieux protégées contre l'hypertrophie cardiaque et la fibrose interstitielle induites par la surcharge de pression [Kuroda 2010] mais de façon contradictoire, Zhang et coll., indiquent, par utilisation de souris NOX4 KO et de souris NOX4 surexprimant NOX4, que cette oxydase améliore les fonctions angiogéniques des cardiomyocytes en augmentant l'activité de HIF1 (Hypoxia Inducible Factor 1alpha) et l'expression du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) d'où le fait que les souris où NOX4 est surexprimée sont mieux protégées contre les risques d'une attaque cardiaque [Zhang 2010].

En termes de régulation, la p22^{PHOX} est indispensable pour la stabilité et l'activation de NOX4 [Ambasta 2004]. Le domaine de la p22^{PHOX} impliqué dans cette interaction comprend les acides aminés 6 à 11; cependant, la région C-terminale cytosolique de la p22^{PHOX}, notamment la région PRR ne semble pas nécessaire [Von Löhneysen 2008]. Sa régulation ne requiert ni les sous unités organisatrices (p47^{PHOX} et NOXO1) ni les sous-unités activatrices (p67^{PHOX} et NOXA1). De même la petite protéine G, Rac, n'est pas nécessaire [Martyn 2006]. Contrairement à NOX1, NOX2 et NOX3, NOX4 produit de l'H₂O₂ et non de l'O₂[°]. Cette particularité est attribuée à la troisième boucle extracellulaire de NOX4 (boucle E) qui contient des acides aminés spécifiques de NOX4 et dont la délétion ou mutation oriente vers la production d'O₂[°] [Takac 2011]. Notamment, cette boucle E contient un résidu histidine qui pourrait accélérer la dismutation spontanée de l'O₂[°] en H₂O₂. Le complexe NOX4/ p22^{PHOX} a une forte activité constitutive qui peut être augmentée suite à l'induction de l'expression protéique de la sous-unité catalytique, notamment par le TGFβ dans les fibroblastes [Cucoranu 2005] et par l'insuline dans les adipocytes [Schroder 2009]. L'activité constitutive de NOX4 a été imputée à sa partie C-terminale contenant le domaine déshydrogénase [Nisimoto 2010]. Une récente étude de l'équipe de Griendling a identifié un nouveau partenaire de la p22^{PHOX} dénommé Poldip2

(Polymerase δ -interacting protein 2) lequel en se liant à celle-ci augmente l'activité de NOX4 dans les cellules musculaires lisses vasculaires [Lyle 2009].

II.4- NOX5

NOX5, clonée en 2001 [Cheng 2001, Banfi 2001] possède 27% d'identité de séquence avec la NADPH oxydase phagocytaire. Elle est absente chez le rongeur [Kawahara 2007]. Il existe 5 transcrits de NOX5, résultant d'épissages alternatifs au niveau du domaine «EF-hand»: NOX5 α , β , δ , γ et ϵ (ou NOX5-S) [Fulton 2009]. La signification fonctionnelle de ces différentes isoformes n'est pas clairement établie. NOX5 est exprimée dans plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales [Belaiba 2007], les cellules musculaires lisses vasculaires [Jay 2008] et les cellules du cancer de la prostate [Brar 2003] mais également dans différents organes tels que la rate [Cheng 2001], les testicules [Banfi 2001], le placenta et les ovaires [Banfi 2001, Cheng 2001]. Certains auteurs pensent que NOX5 joue un rôle dans la prolifération cellulaire [Brar 2003, Krause 2004, Kamiguti 2005, Belaiba 2007, Si 2007, Jay 2008]; cette hypothèse est confortée par la forte expression de la protéine dans les lignées cancéreuses [Brar 2003, Kamiguti 2005, Si 2007, Si 2008] mais aussi par la démonstration récente de la régulation positive de l'activité de NOX5 par la kinase proto-oncogène c-Abl dans les K562, une lignée cellulaire de leucémie érythromyéloblastoïde humaine [El Jamali 2008]. En ce qui concerne les organes reproducteurs mâles, la fonction de NOX5 n'est pas encore bien déterminée mais il est clairement établi que les FRO jouent un rôle primordial dans diverses fonctions vitales de la reproduction à savoir la maturation du sperme, la capacitation, la régulation du pH intracellulaire,... [Baker 2004, de Lamirande 2008, Ford 2004]. L'expression abondante de NOX5 dans ces organes, suggère qu'elle soit la source de ces FRO et par conséquent impliquée dans ces événements.

Contrairement aux autres NOX, NOX5 fonctionne en l'absence de tout autre facteur cytosolique ou membranaire. Son activation est dépendante du calcium [Banfi 2001]: la liaison des ions calcium aux motifs EF-hand résulte en un changement conformationnel de ce domaine qui sera alors capable d'interagir avec le domaine catalytique, localisé en C-terminal, afin d'assurer le transfert d'électrons [Banfi 2004a]. Par ailleurs, la partie C-terminale de NOX5 possède également un site de liaison pour la calmoduline et cette liaison augmente la sensibilité au calcium [Tirone 2007, Tirone 2010]. Il a été également montré que l'interaction de NOX5 avec le

phosphatidyl-inositol(4,5)bisphosphate par l'intermédiaire d'un motif polybasique situé en aval de la région EF-hand module la localisation du complexe à la membrane plasmique **[Kawahara 2008]**. Une autre étude a également mis en évidence le rôle de la phosphorylation de la T494 et de la S498, induite sous PMA, dans la régulation positive de l'activité de NOX5. Cette phosphorylation augmente la sensibilité des domaines EF-hand au Ca^{2+} intracellulaire **[Jagnandan 2007]**. La même équipe a montré que la voie MAPK kinase est également capable de réguler l'activité de NOX5 en modulant la phosphorylation de la S498 **[Pandey 2011]**. Plus récemment, les travaux de l'équipe de Lambeth montrent qu'un processus d'homooligomérisation de protéines NOX5 conduit à la formation d'un tétramère fonctionnel ; les protéines NOX5 s'associant entre elles via les domaines déshydrogénases **[Kawahara 2011]**.

II.5- DUOX1/DUOX2

Le rôle d'une NADPH oxydase, en conjonction avec la thyroperoxidase, dans la synthèse des hormones thyroïdiennes est connu depuis longtemps mais l'identité de cette oxydase au niveau des glandes thyroïdiennes n'a été mise en évidence que récemment, il s'agit des DUOX1 et DUOX2 **[Dupuy 1999, De Deken 2000]**. Les DUOX1 et DUOX2 sont des protéines respectivement de 1551 acides aminés et 1548 acides aminés qui sont très fortement similaires entre elles (83% d'homologie de séquence). Leurs parties NADPH oxydases présentent 50% d'identité de séquence avec NOX2 **[Geiszt 2006]**. Outre la thyroïde, elles sont également exprimées dans l'épithélium pulmonaire, le long du tractus digestif (uniquement DUOX2) **[Geiszt 2003c, El-Hassani 2005, Forteza 2005]** et dans les lymphocytes T **[Kwon 2010]**.

L'identification de patients atteints d'hypothyroïdisme du à des mutations du gène codant pour DUOX2 a confirmé le rôle primordial de cette protéine dans la synthèse des hormones thyroïdiennes **[Moreno 2002]**. DUOX1 ne semble pas jouer de rôle prépondérant dans cette synthèse, en effet les souris déficientes en DUOX1 ne montrent pas de phénotype apparent et ont un niveau de thyroxine sérique normal **[Donko 2010]**. Au niveau de l'épithélium des voies respiratoires, l'augmentation de l'expression de l'ARNm de DUOX1 par les interleukines IL4 et IL13 ainsi que l'induction de DUOX2 par l'IFN γ (Interféron gamma) laissent à penser que DUOX1

est constitutivement exprimée en vue de maintenir les fonctions basales de l'épithélium alors que DUOX2 serait induite en réponse aux infections **[Harper 2005b]**. Il a été également proposé que les DUOX constituent la source d'H₂O₂ qui est utilisé par la lactoperoxydase pour produire, en présence de thiocyanate (SCN⁻), l'hypothiocyanite (OSCN⁻), un oxydant à fort pouvoir microbicide **[Geiszt 2003c, Moskwa 2007]**. Ainsi l'hypothiocyanite permet l'élimination de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa*, mais n'est pas toxique pour l'hôte. Il se trouve également que l'épithélium des patients atteints de mucoviscidose, et donc déficients en CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), ne sécrète pas d'ion thiocyanate rendant ainsi le système inactif **[Moskwa 2007]**. Par ailleurs, il a été démontré que les FRO produites par les DUOX sont des effecteurs majeurs de l'immunité intestinale chez la drosophile. En effet, la délétion de dDUOX (la DUOX de la drosophile) chez la drosophile diminue la production de FRO et augmente la mortalité, en réponse à une charge bactérienne, au niveau de l'intestin **[Ha 2005,]**. Ce rôle chez l'homme n'a pas été clairement établi. Cependant, il a été montré dans la lignée du cancer colique humain Caco 2, que DUOX2 était impliquée dans la production des FRO en réponse à l'activation de NOD2 (Nucleotide Oligomerisation Domain containing protein) par les Muramyldipeptides (MDP), composants de la paroi bactérienne. De plus DUOX2, qui interagit et co-localise avec NOD2, est nécessaire pour les propriétés bactéricides de NOD2 contre *Listeria monocytogenes* **[Lipinski 2009]**. Par ailleurs, l'expression colique de DUOX2 est augmentée dans les colons de patients atteints de la maladie de Crohn en comparaison avec les colons de sujets sains **[Csillag 2007]**. Cette élévation pourrait être induite par l'INF γ connu pour son rôle dans cette maladie. Ces données reflètent une relation étroite entre les DUOX et la défense immunitaire innée mucoale de l'hôte **[Allaoui 2009, Bae 2010]**, cependant aucune anomalie de l'immunité innée n'a jusqu'à présent été rapportée dans les cas d'hypothyroïdisme lié à une mutation de DUOX2.

Pour être fonctionnelles, les DUOX ont besoin de leurs facteurs de maturation, DUOXA1 et DUOXA2, qui leur permettent d'acquérir la bonne conformation (modifications post-traductionnelles) et la localisation à la membrane plasmique **[Grasberger 2006]**. En plus de leur fonction dans la maturation, les DUOXA, forment des hétérodimères fonctionnels stables avec les DUOX **[Morand 2009, Luxen 2009]**

de façon similaire à l'interaction de la p22^{PHOX} avec la gp91^{PHOX}. Bien que la p22^{PHOX} co-immunoprécipite avec les DUOX dans les thyrocytes humains, son implication dans l'activation de ces dernières n'est pas connue [Wang 2005]. Par ailleurs, la protéine EFP1 (EF-Hands Binding Protein1) homologue de la thioredoxine, est un autre partenaire des DUOX dans les thyrocytes mais sa fonction reste à déterminer [Wang 2005]. La petite protéine G Rac, quant à elle, n'est pas impliquée dans la régulation des DUOX, [Fortemaison 2005], et les sous-unités organisatrices et activatrices ne semblent pas non plus nécessaires. Une étude a cependant montré que l'interaction de DUOX avec NOXA1 dans les cellules épithéliales pulmonaires interviendrait dans l'inhibition de l'activité de DUOX et que cette interaction peut être dissociée par le calcium [Pacquelet 2008]; les DUOX sont en effet régulées par le calcium [De Deken 2002, Ameziane-El Hassani 2005] *via* les motifs EF-Hands. De façon intéressante, la protéolyse partielle de Duox par l' α -chymotrypsine résulte en la formation d'une enzyme active en l'absence de calcium [Ameziane-El Hassani 2005]. Les phosphorylations constituent un autre mécanisme par lesquels les DUOX sont régulées. Ainsi DUOX1 est phosphorylée, dans la thyroïde, par la PKA sous l'action de la forskoline (Fsk) et DUOX2 est phosphorylée par les PKC après stimulation par les esters de phorbol [Rigutto 2009]. La phosphorylation de DUOX1 a lieu sur les S955 et S1217, mais alors que la phosphorylation de la S955 intervient dans la régulation positive de DUOX1, la phosphorylation de la S1217 semble au contraire inhiber son activation [Rigutto 2009].

La fonction du domaine «peroxydase like» reste à élucider, certaines données montrent que ce domaine possède une activité peroxydase [Edens 2001] alors que d'autres études suggèrent que pendant le processus de maturation, ce domaine pourrait acquérir une conformation capable de promouvoir la dismutation de l'anion superoxyde. En effet les formes immatures de DUOX, localisées dans le réticulum endoplasmique sont capables de générer l'anion superoxyde de manière calcium dépendante [Ameziane El-Hassani 2005]. Cependant une étude récente a montré que le domaine «peroxydase like» ne possède ni activité peroxydase intrinsèque, ni activité superoxyde dismutase significative [Meitzler 2009].

III- DESCRIPTION DETAILLEE DE NOX1

NOX1 est non seulement le premier homologue de la NADPH oxydase phagocytaire à avoir été identifié mais aussi la NOX la plus proche de NOX2 en termes de structure et de régulation. Elle a été clonée à partir de la lignée cancéreuse du colon, Caco-2 et présente 56% d'identité de séquence avec NOX2 [Suh 1999]. Comme pour NOX2, elle interagit avec la $p22^{PHOX}$ et est régulée par les sous-unités organisatrices et activatrices ainsi que la petite protéine G Rac1 [Geiszt 2006]. La **figure 17** indique que les gènes de NOX2 et de NOX1 sont tous deux localisés sur le chromosome X, tous deux constitués de treize exons et tous deux ont des tailles voisines (30 kb). Il existe plusieurs transcrits du gène de NOX1 résultant d'épissages alternatifs: NOX1 α (ou NOH-1L) code pour la forme entière de 564 acides aminés, NOX1 β (ou NOH-1Lv) ne possède pas l'exon 11 et code pour une protéine inactive (515 acides aminés) en raison de l'absence du domaine liant le NADPH. Cette variante est très abondante dans les cellules du colon [Geiszt 2004, Harper 2005a] mais aussi dans les lignées du cancer de colon à savoir HT29 et Caco2. Un autre transcrit court de NOX1, NOX1 γ (ou NOH-1S) décrit par Banfi, en 2000 [Banfi 2000], s'est révélé être un artéfact résultant de la formation d'une boucle stable au sein de l'ARNm (de l'exon 6 à l'exon 12); de plus aucune séquence d'épissage consensus GT/AG n'est retrouvée dans l'exon 5 au niveau génomique [Geiszt 2004].

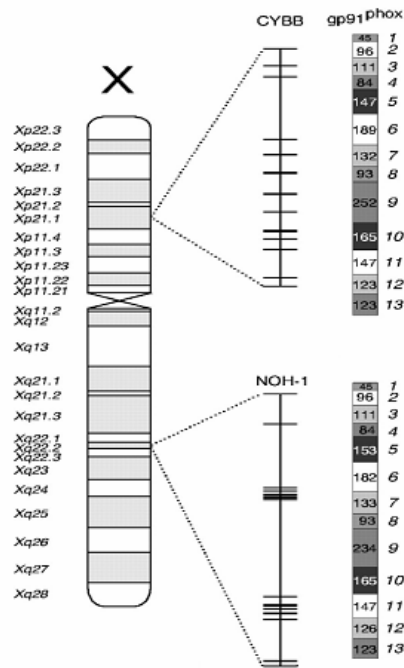


Figure 17: Comparaison des gènes codants NOX1 et NOX2 [Banfi 2000]

III.1- Profil d'expression de NOX1

L'ARNm de NOX1 est très abondant dans le colon [Suh 1999, Banfi 2000, Kikuchi 2000] particulièrement le long de la surface luminale [Szanto 2005, Geiszt 2003b]. Au niveau du colon, l'expression de NOX1 suit un gradient croissant allant du colon ascendant (ou proximal) vers le colon descendant (ou distal). Ce profil d'expression est en étroite corrélation avec la densité de la flore bactérienne [Glebov 2003, Szanto 2005]. Les cellules qui expriment NOX1 dans le colon sont les cellules épithéliales ; de plus l'ARNm de NOX1 est détecté dans plusieurs lignées de cellules épithéliales cancéreuses [Perner 2003, Sadok 2008, de Carvalho 2008]. Cependant, NOX1 est aussi exprimée de façon constitutive ou inductible dans de nombreux autres organes et cellules mais de façon beaucoup plus faible que dans le colon. Il est possible de citer: les cellules épithéliales du poumon [Ranjan 2006], les cellules endothéliales [Goyal 2004, Mittal 2007, Carnesecchi 2009, Ago 2005], les neurones et la lignée neurale PC12 [Ibi 2006, Dai 2006, Cao 2007], les astrocytes et cellules microgliales [Sorice 2009], la prostate [Suh 1999, Banfi 2000, Kikuchi 2000] l'utérus [Suh 1999], les ovaires [Cui 2006, Cui 2010]; les kératinocytes

[Chamulitrat 2003, chamulitrat 2004, Benedyk 2007, Valencia 2008], les ostéoclastes [Lee 2005] mais aussi le système cardiovasculaire [Griendling 2004] et en particulier les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) [Lassègue 2001].

Plusieurs modèles cellulaires ont été utilisés pour l'étude de l'expression et de l'activité de NOX1 parmi lesquels on retrouve les cellules épithéliales gastriques du cochon d'inde [Teshima 2000, Kawahara 2005a], les lignées cancéreuses épithéliales du colon: HT29, Caco2, DLD1 ou encore les T84 [Perner 2003, Clarck 2004] et les cellules musculaires lisses vasculaires de l'aorte de rat [Griendling 2004].

III.2- Modulation de l'expression de NOX1

De nombreux agonistes et agents peuvent induire l'expression de NOX1. Ainsi au niveau des cellules épithéliales coliques, l'expression de l'ARNm de NOX1 peut être augmentée par l'INF γ [Geiszt 2003b, Kawahara 2004, Kuwano 2006], la 1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃ [Geiszt 2003b] ou encore les PAMPs (Pathogen Associated Motif Patterns) dont la flagelline [Kawahara 2004] et au niveau des cellules épithéliales de l'estomac de cochon d'inde, son expression est augmentée par les LPS d'*Helicobacter pylori* et d'*Escherichia coli* [Teshima 1999, Kawahara 2001a, Kawahara 2001b, Kawahara 2005a]. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, ce sont l'angiotensine II [Lassègue 2001, Wingler 2001], la prostaglandine F₂ α (PGF₂ α) via le récepteur à l'EGF (Endothelial Growth Factor) ou encore l'activation de la voie ERK1/2, PI3K, ATF1 (Activating Transcription Factor 1) [Katsuyama 2002, Fan 2005, Katsuyama 2005] et le PDGF [Suh 1999] qui stimulent la transcription de NOX1.

Dans les cellules épithéliales du colon, les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de NOX1 sont GATA, Cdx1/2, HNF-1 α (Hepatocyte Nuclear Factor-1 alpha) et STAT1 (Signal Transducers and Activators of Transcription) [Brewer 2006, Valente 2008, Kuwano 2006]. De plus le niveau d'expression de NOX1 dans le colon coïncide avec le niveau d'expression de GATA, Cdx1/2 et HNF-1 α [Brewer 2006, Valente 2008]. Kuwano et Coll ont analysé la séquence du promoteur de NOX1 dans les cellules épithéliales coliques T84 et ont ainsi démontré la présence d'éléments de réponse à l'INF γ localisés entre -4.3 et -2.6 kb ainsi qu'une séquence GAS (Gamma-Activated Sequence) située entre -3,818 et -3,810 bp. L'INF γ induit la

phosphorylation de STAT1 et la formation d'un complexe STAT1-GAS responsable de l'induction de l'expression de NOX1 et par conséquent de l'augmentation de la production de FRO [Kuwano 2006].

Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de NOX1 sont ATF-1, MEF2B (Mycocyte Enhancer Factor 2B) et JUNB [Katsuyama 2010]. Il est également intéressant de noter que, dans les cellules musculaires lisses vasculaires, sont exprimés deux autres ARNm de NOX1 dénommés c (c-type) et f (f-type) dont la transcription est régulée par une région promotrice différente selon le phénotype des cellules. Ces transcrits codent pour 28 acides aminés supplémentaires situés dans la partie N-terminale de la protéine [Arakawa 2006].

III.3- Localisation subcellulaire de la sous-unité NOX1

Il n'existe pas d'anticorps spécifiques dirigés contre NOX1 qui soient de qualité, ce qui rend les analyses de la distribution cellulaire de NOX1 particulièrement difficiles. Néanmoins, l'analyse immunocytochimique de NOX1 dans les kératinocytes indique une localisation intranucléaire prononcée doublée d'un marquage cytoplasmique [Chamulitrat 2003]. En ce qui concerne les VSMC, NOX1 a été détectée au niveau du réticulum endoplasmique [Janiszewski 2005], de la membrane plasmique [Hilenski 2004, Helmcke 2009], des cavéoles [Hilenski 2004] mais aussi des endosomes précoces où elle colocalise avec le canal chloride-3 (CLC-3) [Miller 2007]. Dans les cellules microgliales du système nerveux central et par utilisation de l'anticorps anti-p22^{PHOX}, Chéret et coll montrent que l'hétérodimère NOX1- p22^{PHOX} localisé dans des compartiments intracellulaires est recruté au niveau des membranes phagosomales suite à la phagocytose [Chéret 2008]. La localisation subcellulaire de NOX1 dans les cellules épithéliales du colon n'est pas connue.

III.4- Composition du complexe NOX1

Dans les systèmes d'expression hétérologue, la transfection de NOX1 seule, n'entraîne qu'une production infime de FRO, conduisant ainsi à l'hypothèse que NOX1 nécessite des partenaires fonctionnels pour être pleinement active. Les travaux de Banfi et coll ont démontré que la co-transfection de la p47^{PHOX} et de la p67^{PHOX} avec NOX1 dans les cellules HEK293 permet la production de l'anion

superoxyde [Banfi 2003], indiquant ainsi une similitude fonctionnelle entre NOX1 et NOX2. L'expression de p47^{PHOX} et p67^{PHOX} étant essentiellement restreinte aux cellules myéloïdes, ceci a laissé suggérer l'existence de protéines homologues dans les cellules et tissus exprimant NOX1. En effet, les cDNAs de NOXO1 «NOX Organizer 1» et de NOXA1 «NOX Activator 1» homologues respectifs de la p47^{PHOX} et de la p67^{PHOX} ont été rapidement identifiés par trois équipes indépendantes à partir de la base de données génomiques [Banfi 2003, Geiszt 2003a, Takeya 2003]. Des expériences de Northern Blot montrent très clairement une co-expression des ARNm de NOX1 et de NOXO1 dans différentes sections intestinales dont le cæcum, l'iléum et particulièrement le colon où l'expression est très élevée. De même l'ARNm de NOXA1 est très fortement exprimé dans le colon [Geiszt 2003a]. Lorsque NOXO1, NOXA1 et NOX1 sont co-exprimées dans les cellules HEK293, les Cos-7 (cellules rénales du singe vert d'Afrique), les CHO ou encore les HeLa (cellules de cancer cervical), une activité constitutive du complexe est détectée, l'absence d'une des protéines est suffisante pour prévenir cette activité [Banfi 2003, Cheng 2004a]. L'activité constitutive du complexe NOX1 peut être augmentée par un traitement au PMA [Geiszt 2003a, Takeya 2003].

En plus de ces deux partenaires cytosoliques, NOX1 interagit, tout comme NOX2, avec la p22^{PHOX} membranaire [Takeya 2003, Ambasta 2004, Kawahara 2005b] qui la stabilise. Ainsi, la surexpression de la p22^{PHOX} dans les cellules CHO, qui n'expriment pas de p22^{PHOX} endogène, en conjonction avec NOX1, NOXA1 et NOXO1, potentialise fortement la production d'anion superoxyde par le complexe NOX1 en comparaison avec les cellules ne surexprimant pas la p22^{PHOX} [Takeya 2003]. La p22^{PHOX} co-immunoprécipite avec NOX1 dans les cellules HEK293 [Ambasta 2004]. Finalement, l'utilisation de mutants mais aussi d'ARN interférents de la p22^{PHOX} inhibent spécifiquement l'activité de NOX1 dans les HEK293 [Kawahara 2005b].

La petite protéine G Rac1 joue également un rôle essentiel dans l'activation de NOX1 [Quinn 2004]; en effet: i) Les mutants et les siRNA de Rac1 inhibent l'activité de NOX1 [Ueyama 2006], ii) Rac1 participe à la production d'anion superoxyde par NOX1 en réponse au LPS d'*H.pylori* [Kawahara 2005a], iii) des expériences de double hybride indiquent que NOXA1 interagit avec la forme constitutivement active de Rac1 (Rac1-Q61L) mais pas la forme dominante négative (Rac1-T17N) [Takeya

2003], iii) lorsqu'on bloque la liaison NOXA1- Rac en mutant l'une ou l'autre, on note un défaut d'activation de l'oxydase [**Miyano 2006**].

A la différence du colon, NOX1 du système vasculaire, notamment des cellules musculaires lisses vasculaires, requiert la sous-unité organisatrice p47^{PHOX} et non NOXO1 lors de son activation [**Patterson 1999, Lavigne 2001, Barry-Lane 2001, Li 2002, Brandes 2002, Landmesser 2002**]. Ceci est conforté par le fait que la production de FRO par NOX1 est fortement inductible par l'angiotensine II ou le PDGF [**Lassègue 2001**].

III.4.1- La sous-unité catalytique NOX1

La sous-unité catalytique NOX1 a un poids moléculaire apparent d'environ 55-60kDa, ce qui suggère qu'elle n'est pas glycosylée malgré la présence de séquences consensus de glycosylation NXT/S dans les boucles extracellulaires. Tout comme NOX2, NOX1 est une protéine membranaire qui, associée à la p22^{PHOX}, transfère les électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire qu'elle réduit pour former l'anion superoxyde. C'est aussi une protéine à six passages transmembranaires; les passages III et V contiennent chacun deux histidines qui vont lier un hème. L'extrémité C-terminale comporte un domaine de liaison au NADPH et un domaine de liaison au FAD tout deux hautement conservés [**Bedard 2007**]. Cette sous unité catalytique a 1000 fois plus d'affinité pour le NADPH que pour le NADH [**Yoshida 2004**].

III.4.2- La sous-unité organisatrice NOXO1

NOXO1, produit du gène situé dans la région 16p13.3 du chromosome 16, est une protéine de 370 acides aminés ayant un poids moléculaire apparent de 41kDa et 27% d'identité de séquence avec la p47^{PHOX}. Il existe quatre variants de NOXO1: α , β , δ et γ issus d'épissages alternatifs de l'exon 3, exon qui code pour le domaine PX [**Cheng 2005, Takeya 2006**] (**Figure 18**). Les formes α et δ ont une délétion de la lysine 50; δ a en plus une insertion de 5 acides aminés. Les formes β et γ n'ont pas de délétion de la lysine 50; γ en plus a une insertion de 5 acides aminés [**Cheng 2005**]. Les ARNm de NOXO1 α et NOXO1 δ sont faiblement exprimés dans les tissus et les cellules, de plus leurs protéines sont instables dans des systèmes d'expression hétérologue (*E. Coli*) [**Cheng 2005**]. Ces isoformes ne semblent donc pas avoir de

rôle biologique significatif. En revanche, les ARNm de NOXO1 β et NOXO1 γ sont très abondants dans le colon et les testicules respectivement, leurs protéines sont stables dans les systèmes d'expression hétérologue. Ces isoformes auraient donc un rôle biologique significatif [Cheng 2005]. L'expression de ces variants dans les cellules HEK293, montre une localisation subcellulaire différentielle: NOXO1 α et NOXO1 δ , sont retrouvées dans les vésicules et les agrégats cytoplasmiques, NOXO1 β est exclusivement localisée à la membrane plasmique, et NOXO1 γ est détectée dans la membrane plasmique et le noyau [Ueyama 2007]. Les isoformes α et δ ne sont pas capables d'activer NOX1, alors que isoformes β et γ le peuvent, l'isoforme β étant celle qui assure la meilleure activation [Cheng 2005, Ueyama 2007, Takeya 2006].

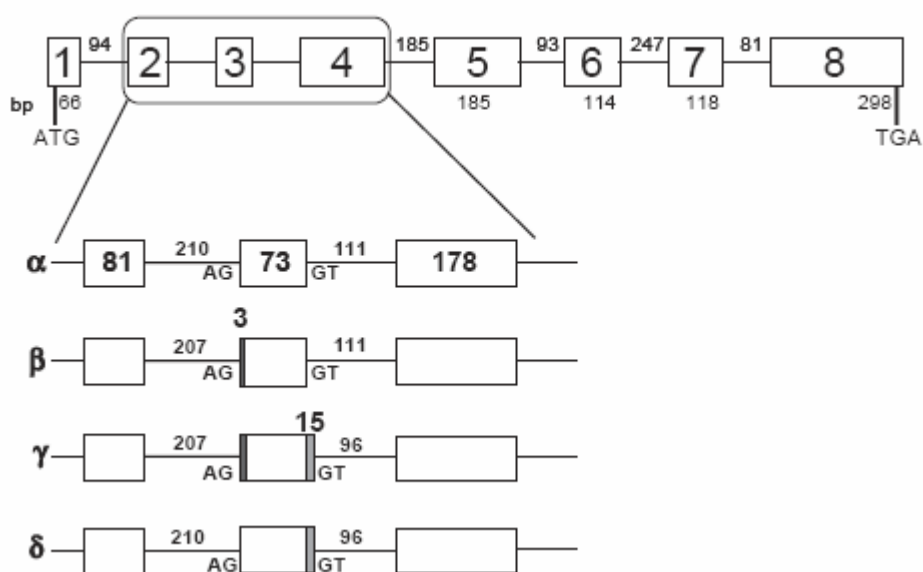


Figure 18: Les différents transcrits issus de l'épissage alternatif du gène de NOXO1 [Cheng 2005]

Hormis une expression prédominante dans le colon (parallèle au profil d'expression de la sous-unité catalytique), NOXO1 est également détectée au niveau du rein, du foie, du pancréas, de l'utérus, des testicules et de l'oreille interne [Banfi 2003, Cheng 2005, Takeya 2003, Kiss 2006]. Son expression peut être induite par différents acteurs de la réponse inflammatoire tels que le TNF α , l'INF γ ou encore le LPS. En effet, la stimulation des cellules gastriques du cochon d'inde par le LPS d'*H.pylori* [Kawahara 2005a] ou encore des cellules T84 (lignée de cancer colique humain) par le TNF α et l'INF γ , entraîne une augmentation de l'expression de NOXO1 au niveau de l'ARNm et de la protéine [Kuwano 2006, Kuwano 2008, Kamizato

2009]. A cette expression corrèle une élévation de l'activité du complexe NOX1 qui cependant reste dépendante du PMA. De plus il a été montré que l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, est capable de prévenir l'augmentation de l'expression de NOXO1 induite par le TNF α et l'INF γ dans les cellules T84 [**Kamizato 2009**].

Dans les cellules transfectées, NOXO1 peut assurer l'activation de NOX1, NOX2 et NOX3 [**Geiszt 2003a, Takeya 2003, Banfi 2004, Cheng 2005**], cependant le niveau d'activation varie fortement selon la combinaison utilisée. NOXO1 active le plus efficacement NOX1 et est donc le partenaire privilégié pour NOX1. Il est probable que dans les différents tissus, cette combinaison dépend du profil d'expression des gènes codant pour ces différentes sous-unités. Lorsque NOXO1 est associée à NOX2, l'activité de NOX2 devient constitutive et n'est plus dépendante de la stimulation des cellules par les agonistes. En ce qui concerne NOX3, NOXO1 peut l'activer en l'absence de sous-unités activatrices (p67^{PHOX} ou NOXA1) suggérant un rôle plutôt dans l'activation directe de NOX3 que dans l'assemblage du complexe [**Cheng 2004b, Ueno 2005, Kiss 2006**]. L'importance de NOXO1 dans la régulation de NOX3 est illustrée par le fait que les souris ayant des mutations dans le gène de NOX3 (souris head *tilt*) ou de NOXO1 (souris head *slant*) présentent le même phénotype c'est à dire des problèmes d'équilibre et de perception du mouvement [**Kiss 2006, Paffenholz 2004**].

Malgré une faible identité de séquence avec la p47^{PHOX}, NOXO1 présente plusieurs motifs structuraux similaires (**Figure 19**): Ainsi elle possède un domaine PX situé en N-terminale qui intervient dans la liaison aux phosphoinositides membranaires [**Sato 2001**] et plus spécifiquement aux PtdIns (4)P, PtdIns (5)P et PtdIns(3,5)P₂ [**Cheng 2004a**]. Deux domaines SH3 en tandem permettent l'interaction à la p22^{PHOX} [**Takeya 2003**] et une région riche en proline (PRR) en C-terminale assure la liaison à la sous-unité activatrice, NOXA1 [**Takeya 2003**]. Il est intéressant de noter que la région AIR, pour «Autoinhibitory region» est absente dans NOXO1. Dans la p47^{PHOX}, cette région est responsable de l'auto-inhibition de la protéine et est le siège des phosphorylations qui sont primordiales pour l'activation du complexe NOX2.

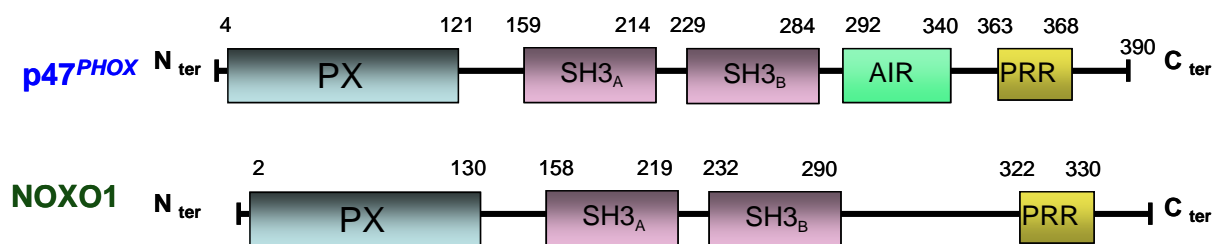


Figure 19: Comparaison des structures et interactions des sous-unités organisatrices

L'absence du domaine AIR dans la séquence de NOXO1 laisse à penser que cette protéine, contrairement à la p47^{PHOX}, existe sous une conformation ouverte qui lui permet d'interagir, de façon constitutive avec la p22^{PHOX} d'une part (*via* le tandem SH3 non masqué) et avec les phosphoinositides membranaires d'autre part (par l'intermédiaire du domaine PX). Cette conformation ouverte et ces interactions pourraient expliquer la localisation constitutive à la membrane de NOXO1 ainsi que l'activité constitutive du complexe NOX1, observées dans les cellules transfectées [Geiszt 2003a, Takeya 2003, Cheng 2005]. De ce fait, il est couramment admis qu'une phosphorylation de NOXO1 n'est pas nécessaire pour induire une production de FRO par NOX1. Mais ceci n'a pas été clairement démontré, d'autant plus que l'activité constitutive du complexe peut être potentialisée par différents agonistes dont le PMA et l'angiotensine II [Geiszt 2003a, Takeya 2003, Choi 2008]. D'autre part, par des approches de «pull-down» et de titration calorimétrique, utilisant différentes constructions de NOXO1, deux équipes différentes ont récemment démontré que malgré l'absence de domaine AIR, une interaction intramoléculaire impliquant le tandem SH3 et le domaine PRR existe au sein de NOXO1 [Yamamoto 2007, Dutta 2010] et préviendrait de ce fait la liaison à la p22^{PHOX}.

Il est important de spécifier l'existence d'autres homologues de la p47^{PHOX} et de NOXO1, les Tks 4 et 5 (Tks pour Tyrosine kinase substrate), qui sont impliqués dans l'activation de NOX1 mais aussi de NOX3 [Gianni 2009]. Ces Tks sont formés d'un domaine PX en N-terminal suivi de plusieurs domaines SH3, (quatre pour Tks4 et cinq pour Tks5) (Figure 20), ils interagissent également avec NOXA1 par l'intermédiaire de leurs domaines SH3 qui reconnaîtraient une région PRR située en

N-terminal (aa 34-37) de la sous-unité activatrice [Gianni 2011], de plus le rôle de ces Tks dans la régulation des NOX est dépendant de Rac [Gianni 2009]. Les TKs 4 et 5 seraient importants pour la formation d'un complexe NOX1 actif au niveau des invadopodes [Gianni 2009], structures invasives riches en phosphotyrosines impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, dégradation qui est observée au cours de la cancérogenèse [Seals 2005, Blouw 2008, Buschmann 2009]. Les FRO produites par NOX1 seraient nécessaires à la formation et stabilisation des invadopodes [Diaz 2009].



Figure 20: Représentation schématique des membres de la superfamille de la p47^{PHOX} [Gianni 2009]

III.4.3- La sous-unité activatrice NOXA1

NOXA1 est le produit du gène situé dans la région 9q34.3 du chromosome 9. Cette protéine formée de 476 aa a un poids moléculaire de 51kDa [Takeya 2003] et présente 38% d'identité de séquence avec la p67^{PHOX}. L'ARNm de NOXA1 est détecté dans plusieurs tissus et organes où l'ARNm de NOX1 est également présent tels que le colon, l'utérus, la prostate, l'intestin grêle et l'estomac [Suh 1999, Teshima 2000]. Cependant l'ARNm de NOXA1 est aussi détecté dans d'autres tissus tels que la thyroïde, les poumons, les glandes salivaires, le foie et les reins [Geiszt 2003a]. Le colon reste le tissu qui exprime le plus abondamment NOXA1. La protéine est également exprimée dans les cellules épithéliales primaires bronchiques humaines (NHBE) [Lavigne 2005] et dans le système vasculaire notamment dans les cellules musculaires lisses vasculaires [Ambasta 2006, Lassègue 2006]. Dans

les cellules endothéliales HUVEC, il a été montré que l'expression de NOXA1 peut être modulée par les LDL oxydés (LDL pour Low Density Lipoprotein), l'augmentation de l'expression étant en corrélation avec la capacité des LDL oxydés à induire la production des FRO [Honjo 2008].

NOXA1 a une structure similaire à la p67^{PHOX} (Figure 21). Elle comprend quatre motifs TPR localisés dans la partie N-terminale et nécessaires à l'interaction avec Rac, un domaine d'activation (AD) dont le contact avec la sous-unité catalytique va induire un changement conformationnel de cette dernière la rendant capable de transférer les électrons, un domaine PB1 qui au contraire de la p67^{PHOX} n'interagit pas avec la p40^{PHOX}; ceci serait dû à l'absence d'une lysine qui normalement est conservée dans les domaines PB1 (Lys-355 dans la p67^{PHOX}). Enfin, à la différence de la p67^{PHOX} qui possède deux domaines SH3, NOXA1 n'en contient qu'un seul, localisé dans la partie C-terminale. Ce domaine, par analogie avec la p67^{PHOX}, serait impliqué dans l'interaction avec la région PRR de la sous-unité organisatrice (NOXO1 ou p47^{PHOX}).

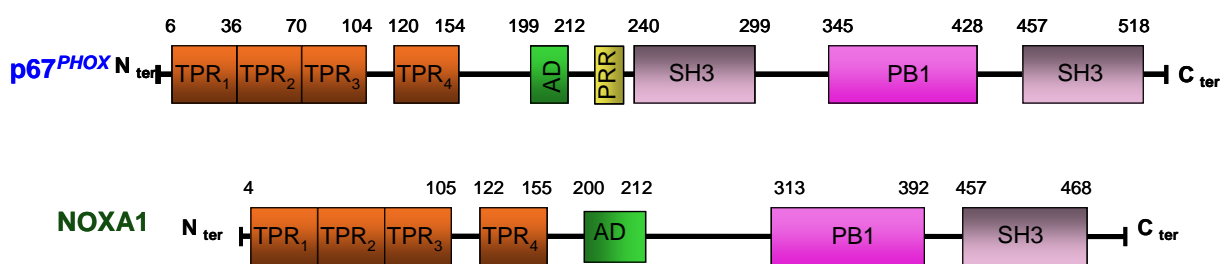


Figure 21: Comparaison des structures et interactions des sous-unités organisatrices

NOXA1 peut participer à la formation d'un complexe actif avec NOX1 et NOX2 dans les cellules transfectées, mais il est clair que NOXA1 active NOX1 de façon beaucoup plus efficace [Banfi 2003, Takeya 2003]. Par ailleurs, son implication dans la régulation de la NOX3 humaine reste controversée: certaines études montrent que NOXA1 potentialise l'effet activateur direct de NOXO1 sur NOX3 [Cheng 2004b] alors que d'autres indiquent que NOXA1 a un effet inhibiteur [Ueno 2006]. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, NOXA1 interagit avec la p47^{PHOX} et non NOXO1 pour participer à la formation d'un complexe NOX1 actif [Ambasta 2006, Niu 2010].

La phosphorylation de NOXA1 apparaît comme un processus important dans la modulation de l'activité du complexe NOX1. Ainsi Kim et coll., par mutagénèse dirigée et utilisation d'anticorps dirigés contre les sites consensus de phosphorylation reconnus par la PKA, ont montré que cette kinase pouvait phosphoryler NOXA1 aussi bien *in vitro* que dans les cellules HEK293, sur les S172 et S461 [Kim 2007]. Cette étude montre que la phosphorylation de NOXA1 par la PKA dans la cellule exerce un effet inhibiteur sur l'activité de NOX1. La phosphorylation de NOXA1 permet en effet son interaction avec la protéine 14-3-3, interaction qui maintient NOXA1 dans le cytosol et prévient la formation d'un complexe NOX1 actif au niveau de la membrane. D'autres travaux de la même équipe, montrent que les toxines de l'anthrax inhibent l'activité de NOX1 dans les cellules HT-29 par ce processus [Kim 2009]. Une autre étude a montré, au contraire, que la phosphorylation de NOXA1 sur la tyrosine 110 par la tyrosine kinase c-src peut potentialiser l'activité de NOX1 en permettant son interaction avec la Tks4 (sous sa forme phosphorylée) dans la lignée épithéliale DLD1 du colon ce qui contribue ainsi à la formation des invadopodes [Gianni 2010] et donc au processus cancéreux.

D'autre part des souris homozygotes invalidées pour le gène NOXA1 ont été récemment générées, cependant le phénotype de ces souris ainsi que la fonction de NOXA1 dans chaque tissu n'ont pas encore été déterminés [Flaherty 2010].

III.5 - Assemblage et activation de NOX1

Les interactions protéines-protéines et protéine-lipides qui gouvernent l'assemblage d'un complexe NOX1 actif seraient très similaires à NOX2 (Figure 22). Ainsi les travaux de Takeya et coll. ont montré par système double hybride et co-précipitation que: 1) Le tandem SH3 de NOXO1 (aa 154-292) interagit avec la partie C-terminale de la p22^{PHOX} (aa 132-195) contenant la région riche en proline 2) NOXA1 par l'intermédiaire de son domaine SH3 C-terminal lie la partie C-terminale de NOXO1 (aa 293-371) contenant la région riche en proline 3) la forme constitutivement active de Rac1 (Rac1-Q61L) interagit avec la partie N-terminale de NOXA1 (aa 1-224) contenant les régions TPR, ce qui n'est pas le cas du dominant négatif de Rac 1(Rac1-T17N) [Takeya 2003]. D'autre part, les travaux de Cheng et coll. ont montré que la partie N-terminale de NOXO1 (1-147) contenant le domaine PX, était capable

d'interagir avec les PtdIns(4)P, PtdIns(5)P et les PtdIns(3,5)P₂ par la technique du «Dot-blot» [Cheng 2004a].

Les mécanismes qui régulent l'activité de NOX1 quant à eux, restent très mal connus. Il a été montré que le complexe NOX1 possède une activité constitutive dans plusieurs systèmes d'expression hétérologue (HEK293, COS-7, NIH-3T3 : lignées de fibroblastes embryonnaires de souris) [Geiszt 2003a, Banfi, 2003, Takeya 2003]. Ceci a été attribué à l'absence du domaine AIR dans NOXO1 qui permettrait son interaction constitutive à la p22^{PHOX} et aux phosphoinositides membranaires et donc d'initier l'assemblage du complexe NOX1. Ceci semble conforté par les observations suivantes: 1) par système double hybride, il a été montré que la forme entière de NOXO1 est capable de lier constitutivement la partie C-terminale cytosolique de la p22^{PHOX} (aa 132-195) contenant la région riche en proline [Takeya 2003] 2) Dans les cellules transfectées NOXO1 localise à la membrane plasmique [Cheng 2004a, Ueyama 2006]. Dans ce cas de figure le seul facteur limitant pour la formation d'un complexe NOX1 actif serait l'activation de Rac 1. Dans la plupart des modèles d'études pour l'activation de NOX1, un faible pourcentage de Rac1-GTP endogène est en fait déjà détecté au niveau membranaire [Cheng 2006, Nisimoto 2008]. Cependant l'observation que l'activité de NOX1 puisse être augmentée par le PMA [Geiszt 2003a, Takeya 2003] suggère que d'autres signaux sont nécessaires pour l'activation optimale du complexe. Excepté la phosphorylation de NOXA1, l'implication des événements de phosphorylation dans la régulation de l'activité de NOX1 reste très mal connue.

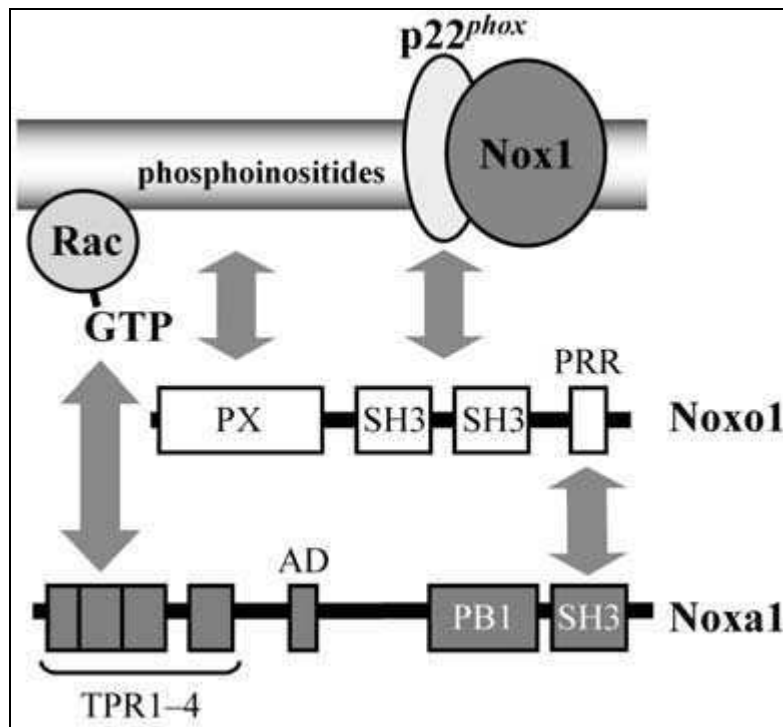


Figure 22: Interactions protéiques au sein de NOX1 [Takeya 2006]

III.6- Rôles physiologiques et physiopathologiques de NOX1

De par la génération des FRO, qui sont des acteurs de la signalisation intracellulaire, NOX1 régule de nombreuses fonctions cellulaires dont la prolifération, l'apoptose, la migration cellulaire et la transcription génique [Brown 2009, Jiang 2011]. Cette signalisation met en jeu la modification de l'activité de certaines kinases ou phosphatases dont les MAP Kinases (JNK, ERK1/2, p38MAPK) [Lassègue 2001, Ranjan 2006] et les protéines phosphatases (PTEN, PTP1B, slingshot phosphatases) [Kwon 2004, Sharma 2008, Maheswaranathan 2011]. Cependant NOX1 possède aussi des fonctions bien spécialisées, notamment au niveau du système vasculaire où son rôle a été bien établi par l'utilisation de souris déficientes en NOX1. D'autre part au niveau du colon, l'expression élevée de tous les éléments du complexe suggère que NOX1 pourrait exercer un rôle physiologique important, bien que ceci n'ait pas été encore clairement démontré. Le dysfonctionnement ou l'expression anormale de NOX1 au niveau de ces tissus pourraient également contribuer à des processus pathologiques.

III.6 .1- NOX1 dans le système vasculaire

Dans le système vasculaire, NOX1 est faiblement exprimée. Cependant son importance dans les fonctions vasculaires, notamment la régulation de la pression artérielle a été mise en évidence grâce à l'utilisation de souris pour lesquelles le gène de NOX1 a été invalidé. Ainsi l'augmentation de la pression artérielle induite par l'angiotensine II est inhibée chez les souris déficientes en NOX1 [Matsuno 2005], de plus chez ces souris, la pression artérielle basale est également diminuée [Gavazzi 2006]. Ces données indiquent donc que NOX1 est impliquée dans le maintien de la pression artérielle basale mais aussi dans son augmentation en réponse à l'angiotensine II. Cependant dans un modèle transgénique d'hypertension murin où la rénine d'origine humaine est surexprimée (TTRhRen), il a été montré que l'invalidation du gène de NOX1 n'avait aucun effet sur la pression artérielle bien que la production des FRO soit diminuée [Yogi 2008]. Il est possible que ce modèle d'hypertension soit trop robuste pour permettre l'observation d'un effet modulateur de NOX1. Les mécanismes par lesquels NOX1 module la pression artérielle pourraient impliquer: i) une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) dont le rôle dans la vasorelaxation est bien connu [Matsuno 2005]. ii) une relocalisation des récepteurs de l'angiotensine II à la surface membranaire au niveau des cavéoles, en effet chez les souris déficientes en NOX1 le récepteur de l'angiotensine II est retenu dans les vésicules en raison d'un défaut de la phosphorylation de la cavéoline et empêche ainsi la signalisation de l'angiotensine II [Basset 2009]. iii) une accumulation de la matrice extracellulaire qui contribue à l'épaississement de la média et à une rigidité vasculaire [Gavazzi 2006]. iv) finalement, NOX1 en inactivant la tyrosine phosphatase SHP-2 favorise la signalisation de l'angiotensine II; en effet les siRNA (small interfering RNA) de NOX1 préviennent l'inactivation de SHP-2 et diminuent la phosphorylation d'Akt (ou encore protéine kinase B) induite par l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses vasculaires de rat [Tabet 2008].

Outre ce rôle dans la régulation de la pression artérielle, NOX1 a été impliquée dans le remodelage vasculaire. Ainsi, chez les souris déficientes en NOX1 la formation de la néointima suite à une lésion mécanique est altérée; ceci est associé à une diminution de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses vasculaires [Lee 2009]. Ces résultats indiquent donc que NOX1 joue un rôle clé dans

la formation de la néointima en facilitant la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.

Plusieurs données indiquent que NOX1 pourrait aussi contribuer au développement de situations physiopathologiques au niveau vasculaire, telles que l'hypertension ou l'athérosclérose. Ainsi des souris transgéniques surexprimant NOX1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires ont une réponse exagérée à l'angiotensine II qui se traduit par une augmentation de l'hypertension et une hypertrophie vasculaire **[Dikalova 2005]**. En ce qui concerne l'athérosclérose, il a été montré récemment que l'inactivation du gène de NOX1 dans un modèle murin d'athérosclérose (souris ApoE^{-/-} x NOX1^{-/-} soumises à un régime riche. APOE pour Apolipoprotein E) diminue de façon significative les lésions aortiques, la production des FRO et l'infiltration des macrophages **[Sheehan 2011]**, ce qui suggère un rôle de NOX1 dans le développement de cette pathologie. Ceci est appuyée par l'observation que l'expression de la sous-unité activatrice NOXA1 est augmentée dans l'aorte et au niveau des lésions athérosclérotiques des souris ApoE^{-/-}. D'autre part, NOXA1 est aussi détectée dans les cellules musculaires lisses vasculaires de l'intima et de la média au niveau des lésions athérosclérotiques de la carotide humaine **[Niu 2010]**.

Les études concernant NOX1 dans le système vasculaire ont été, pour la plupart, effectuées dans des modèles murins. L'implication de NOX1 dans les fonctions physiologiques et physiopathologiques humaines reste donc à éclaircir. Il se trouve en effet que l'expression de NOX1 n'est pas détectée dans les artères humaines **[Touyz 2002]**; de plus la production des FRO induite par l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses vasculaires humaines est inhibée par les siRNA de NOX2 mais pas par ceux de NOX1 **[Chose 2008]**.

III.6.2- NOX1 au niveau du colon

Le colon reste le tissu qui exprime le plus abondamment tous les composants du complexe NOX1 (NOX1, NOXA1 et NOXO1) ce qui laisse suggérer que NOX1 pourrait y jouer un rôle physiologique important. Cependant le rôle précis de NOX1 au sein de ce tissu reste à éclaircir. Deux fonctions ont été proposées: la défense immunitaire innée et la prolifération cellulaire.

Plusieurs arguments appuient l'hypothèse d'un rôle dans la réponse immunitaire innée. Ainsi, il existe une corrélation étroite entre le niveau d'expression de NOX1 et

la densité de la flore bactérienne dans le colon, l'expression étant la plus élevée dans les zones où la flore est la plus abondante [Geiszt 2003b, Glebov 2003, Szanto 2005]. D'autre part, les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires sont capables de moduler l'expression de certaines sous-unités de NOX1: i) l'INF γ , l'IL-1 β et le TNF α , cytokines pro-inflammatoires, augmentent l'expression de NOX1 au niveau de l'ARNm et de la protéine dans la lignée colique épithéliale T84. L'INF γ et le TNF α sont également capables d'induire l'expression de NOXO1 dans ces mêmes cellules. L'augmentation de l'expression de ces sous-unités est en corrélation avec l'augmentation de la production des FRO [Kuwano 2006, Kuwano 2008, Kamizato 2009]. ii) L'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, prévient l'augmentation de l'expression de NOX1 et de NOXO1 ainsi que la production des FRO induites par l'INF γ et le TNF α dans les cellules T84. *In vivo*, chez la souris, cette cytokine inhibe l'augmentation de l'expression de NOX1 liée au vieillissement. En effet l'inactivation du gène de l'IL-10 chez la souris augmente l'expression de NOX1 en relation avec l'augmentation de l'INF γ [Kamizato 2009]. iii) De façon paradoxale l'IL-13, une autre cytokine anti-inflammatoire, active NOX1 dans la lignée colique HT-29 [Mandal 2010]. Par ailleurs, les PAMPs régulent aussi l'expression de NOX1. Ainsi, la flagelline de *S. enteritidis* lie le TLR5, induit l'expression et l'activation de NOX1 dans les cellules épithéliales primaires du colon de cochon d'inde et la lignée colique T84 [Kawahara 2004]. L'augmentation des FRO dans ces cellules conduit à une augmentation de la synthèse de la cytokine chimioattractante, IL-8. Il faut noter que dans les cellules de la muqueuse gastrique du cochon d'inde, les LPS d'*H. pylori* et d'*E. coli* induisent également la transcription de NOX1 et de NOXO1 et la production des FRO [Teshima 1999, Kawahara 2001a, Kawahara 2001b]. Finalement, au niveau des lésions inflammatoires du colon des patients atteints de Crohn ou de colite ulcéreuse, une forte expression de l'ARNm de NOX1 est détectée dans les lymphocytes. Il est intéressant de noter que la maladie de Crohn est associée à la surproduction d'INF γ et de TNF α [Bouma 2003].

En plus de cette fonction dans l'immunité innée, les premières études concernant les effets d'une expression hétérologue de NOX1 dans les cellules NIH3T3 ont suggéré un rôle de cette oxydase dans la prolifération cellulaire et la tumorigénèse. En effet, lorsqu'elles sont transfectées avec NOX1, ces cellules ont une prolifération accrue, développent un phénotype transformé se caractérisant par une élongation et une

perte de l'inhibition de la prolifération de contact **[Suh 1999]**; de plus, elles forment des tumeurs dans les souris athymiques *nude* d'où la première dénomination de Mox1 **[Suh 1999, Arnold 2001]**. Cependant cette première fonction a été remise en cause, du fait de la présence du proto-oncogène K-Ras dans les cellules NIH3T3 utilisées pour ces études **[Lambeth 2004]**. La fonction proliférative de NOX1 prête donc à débat. En faveur d'un rôle dans la prolifération, il a été démontré que la production des FRO est beaucoup plus élevée dans les lignées coliques HT-29 et Caco-2 subconfluentes que confluentes; les cellules subconfluentes étant caractérisées par un taux de prolifération plus élevé **[Perner 2003]**. D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs, a montré que la voie phospholipase-A2/12-lipoxygénase/NOX1 contrôle la prolifération de la lignée HT-29-D4 **[De Carvalho 2008]**. Par ailleurs, il a été montré que NOX1 est en fait un médiateur critique de la transformation oncogénique de Ras incluant la prolifération cellulaire. Ainsi, l'oncogène K-Ras entraîne une augmentation de l'expression de NOX1 et les ARNs interférents de NOX1 suppriment le phénotype transformé dont la prolifération cellulaire **[Mitsushita 2004]**. A l'encontre d'un rôle dans la prolifération, il a été montré que la suppression de NOX1 dans la lignée cancéreuse du colon HT-29 n'altère pas la croissance cellulaire; au contraire les promoteurs de la différenciation cellulaire tel que le métabolite $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de la vitamine D3, connus pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du colon **[Thomas 1992]**, augmentent fortement l'expression de l'ARNm de NOX1 dans les cellules HT-29 et Caco2 **[Geiszt 2003b]**. Cette observation est appuyée par le fait que l'expression de NOX1 est élevée dans les tumeurs du colon bien différenciées et faible dans les tumeurs du colon peu différenciées. Ainsi la surexpression de NOX1 dans les tumeurs bien différenciées corrèle négativement avec le marqueur de prolifération Ki67 **[Fukuyama 2005]**. Indépendamment ou non de son rôle dans la prolifération, il semble cependant clair que l'expression de NOX1 est augmentée dans les adénocarcinomes du colon humain **[Fukuyama 2005, Laurent 2008]**. Cela concerne NOX1 mais également des sous-unités NOXA1 et NOXO1 **[Juhasz 2009]**. Dans les cancers du colon humain, l'augmentation de l'expression de NOX1 pourrait être la conséquence directe des mutations activatrices au sein du proto-oncogène K-Ras. En effet, non seulement NOX1 est fonctionnellement nécessaire pour la transformation cellulaire médiée par K-ras **[Mitsushita 2004]**, mais également la surexpression de NOX1 dans les cancers du colon humain est en étroite corrélation

avec les mutations activatrices de K-Ras [Laurent 2008]. Outre son influence potentielle sur la prolifération cellulaire, lorsqu'elle est surexprimée dans le colon, NOX1 peut participer au développement du processus cancéreux par plusieurs autres mécanismes, i) elle favorise l'angiogénèse des cellules cancéreuses du colon en régulant positivement l'expression du VEGF *via* l'activation du facteur de transcription Sp1 [Komatsu 2008]. ii) elle stimule les voies anti-apoptotiques dépendantes de NF- κ B dans les cellules d'adénocarcinomes du colon [Fukuyama 2005]. iii) elle contrôle la migration des cellules d'adénocarcinomes du colon en affectant le turnover des intégrines [Sadok 2008], cette régulation est liée à l'activité de RhoA [Sadok 2009] iv) elle induirait une inflammation chronique *via* la production soutenue et prolongée de FRO et entraîne ainsi des dommages au niveau de l'ADN qui contribuent directement à la carcinogénèse dans le colon [Meira 2008].

IV. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Comme cela a été décrit dans les paragraphes précédents, NOX1 est structurellement et fonctionnellement la NOX la plus proche de NOX2. Dans les conditions physiologiques, NOX1 pourrait être impliquée dans la défense immunitaire innée de la muqueuse intestinale. Cependant, tout comme NOX2, en cas de dysfonctionnement, elle pourrait contribuer au développement de pathologies inflammatoires, notamment les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) qui prédisposent aux cancers colorectaux. Cependant les mécanismes moléculaires qui régulent son activation demeurent très mal connus.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont eu pour objectif de mieux comprendre les mécanismes moléculaires fondamentaux qui régulent l'activation de NOX1. Je me suis en particulier intéressée aux processus de phosphorylations, dont l'importance a été bien établie pour NOX2 mais dont le rôle dans la régulation de NOX1 reste à éclaircir. Dans un premier temps, je me suis intéressée à la sous-unité activatrice NOXA1 et dans un deuxième temps à la sous-unité organisatrice NOXO1. Pour ces deux sous-unités, j'ai entrepris d'identifier les acides aminés phosphorylés, de déterminer les kinases impliquées dans ces phosphorylations et d'analyser les conséquences de ces phosphorylations sur l'assemblage et l'activation de NOX1.

La compréhension précise des mécanismes impliqués dans la régulation de NOX1 permettrait à plus long terme d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques potentielles pour le développement d'inhibiteurs spécifiques de NOX1. Ceci permettrait de limiter la production des FRO au cours des maladies inflammatoires telles que les maladies inflammatoires intestinales.

TRAVAUX DE RECHERCHE

Article 1: NOXA1 est phosphorylée et sa phosphorylation prévient l'hyperactivation de la NADPH oxydase NOX1

La sous-unité activatrice, NOXA1, possède des domaines structuraux organisés de façon très similaire à son homologue phagocytaire, la p67^{PHOX}. Les travaux de notre équipe ont montré que la p67^{PHOX} était faiblement phosphorylée dans les neutrophiles au repos et que cette phosphorylation était augmentée au cours de l'activation des cellules par le PMA (activateur direct des PKC) et le fMLF [El-Benna 1997, Dang 2003]. Cette phosphorylation induite par le PMA et le fMLF implique les voies PKC et MAPK kinases respectivement. **Qu'en est-il pour NOXA1?** Pour répondre à cette question, nous avons, dans une première étape, étudié la phosphorylation de NOXA1 recombinante par différentes kinases *in vitro* et identifié les sites phosphorylés par mutagenèse dirigée et cartes phosphopeptidiques. Dans une deuxième étape nous avons déterminé si NOXA1 était phosphorylée, sur les mêmes sites dans les cellules intactes en reconstituant le système NOX1 complet dans les cellules HEK293. Finalement dans une troisième étape, nous avons tenté d'évaluer les conséquences de ces phosphorylations sur l'assemblage et l'activation de NOX1.

Notre étude a permis de montrer que NOXA1 recombinante pouvait être phosphorylée par la PKA, la PKC, ERK2 et p38MAPK, *in vitro*. Par mutagenèse dirigée et cartes phosphopeptidiques nous avons montré que: la PKA cible les sérines 172 et 461, la PKC cible la sérine 172, la p38MAPK cible les sérines 282 et 239, ERK2 cible la sérine 282. Cependant, dans les cellules HEK293, nous avons montré que seules les sérines 172 et 282 de NOXA1 étaient phosphorylées. Ces deux sites sont phosphorylés à l'état basal. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques montre que cette phosphorylation basale implique la PKC et ERK et dans une moindre mesure la PKA. La phosphorylation basale de ces sites diminue l'activité constitutive de NOX1. En effet, les simples mutants de NOXA1 où les résidus sérines 172 ou 282 ont été mutés en alanines, résidus non phosphorylables (S172A et S282A respectivement), augmentent significativement l'activité constitutive de NOX1 par rapport à la protéine sauvage et le double mutant S172A/S282A l'augmente encore plus. Enfin des expériences de co-précipitation indiquent que la phosphorylation de NOXA1 sur les sérines 172 et 282 diminue son interaction avec ses partenaires, la sous-unité catalytique NOX1 et la petite protéine G Rac1.

En conclusion, ce travail démontre clairement que la phosphorylation de NOXA1, médiée par les PKC et la PKA au niveau de la S172 et par les MAPK au niveau de la S282 constitue un mécanisme permettant de prévenir l'hyperactivation de NOX1.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante:

Kroviarski Y*, **Debbabi M***, Bachoual R, Périanin A, Gougerot-Pocidallo MA, El-Benna J and Dang PM. Phosphorylation of NADPH oxidase activator 1 (NOXA1) on serine 282 by MAP kinases and on serine 172 by protein kinase C and protein kinase A prevents NOX1 hyperactivation. *FASEB J.* 2010 Jun, 24 (6):2077-2092.

* : Les deux premiers auteurs ont contribué de façon équivalente au travail.

Phosphorylation of NADPH oxidase activator 1 (NOXA1) on serine 282 by MAP kinases and on serine 172 by protein kinase C and protein kinase A prevents NOX1 hyperactivation

Yolande Kroviarski,^{*,†,‡,1} Maya Debbabi,^{*,†,1} Rafik Bachoual,^{*} Axel Périanin,[§] Marie-Anne Gougerot-Pocidallo,^{*,†,‡} Jamel El-Benna,^{*,†} and Pham My-Chan Dang^{*,†,2}

^{*}INSERM, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon (CRB3), Paris, France;

[†]Université Paris 7 Denis Diderot, Paris, France; [‡]Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Centre Hospitalier Universitaire Xavier Bichat, Centre d'Investigation Biomédical (CIB) Phenogen, Paris, France; and [§]Institut Cochin, INSERM U567, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)

UMR 8104, Paris, France

ABSTRACT NADPH oxidase activator 1 (NOXA1) together with NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1) are key regulatory subunits of the NADPH oxidase NOX1. NOX1 is expressed mainly in colon epithelial cells and could be involved in mucosal innate immunity by producing reactive oxygen species (ROS). Contrary to its phagocyte counterpart NOX2, the mechanisms involved in NOX1 activation and regulation remain unclear. Here we report that NOX1 activity is regulated through MAP kinase (MAPK), protein kinase C (PKC), and protein kinase A (PKA)-dependent phosphorylation of NOXA1. We identified Ser-282 as target of MAPK and Ser-172 as target of PKC and PKA *in vitro* and in a transfected human embryonic kidney 293 (HEK293) cell model using site directed mutagenesis and phosphopeptide mapping analysis. In HEK293 cells, phosphorylation of these sites occurred at a basal level and down-regulated constitutive NOX1 activity. Indeed, S172A and S282A single mutants of NOXA1 significantly up-regulated constitutive NOX1-derived ROS production, and S172A/S282A double mutant further increased it, as compared to wild-type NOXA1. Furthermore, phosphorylation of NOXA1 on Ser-282 and Ser-172 decreased its binding to NOX1 and Rac1. These results demonstrated a critical role of NOXA1 phosphorylation on Ser-282 and Ser-172 in preventing NOX1 hyperactivation through the decrease of NOXA1 interaction to NOX1 and Rac1.—Kroviarski, Y., Debbabi, M., Bachoual, R., Périanin, A., Gougerot-Pocidallo, M.-A., El-Benna, J., Dang, P. M. Phosphorylation of NADPH oxidase activator 1 (NOXA1) on serine 282 by MAP kinases and on serine 172 by protein kinase C and protein kinase A prevents NOX1 hyperactivation. *FASEB J.* 24, 2077–2092 (2010). www.fasebj.org

Key Words: reactive oxygen species • innate immunity • inflammation

THE NICOTINAMIDE ADENINE dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases (or NOX) are a family of enzymes,

the function of which is dedicated to the production of reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), by means of the single-electron reduction of molecular oxygen using NADPH as the electron donor (1). This family has been defined based on the structural homology of their members with gp91^{PHOX} (now renamed NOX2), the catalytic subunit of the phagocyte NADPH oxidase. In phagocytes, such as neutrophils and monocytes/macrophages, this enzyme system plays a critical role in antimicrobial host defenses through the robust production of highly cytotoxic ROS in a phenomenon known as the “respiratory burst” (2). The enzymatic activity of the phagocyte NADPH oxidase has been studied for >30 yr, and its structure and regulation have been studied extensively over the past decade (3, 4). The phagocyte NADPH oxidase is a multicomponent enzyme complex constituted of several cytosolic and membrane-bound components: in the cytosol, p47^{PHOX} (phox for phagocyte oxidase), p67^{PHOX}, p40^{PHOX}, and a small GTPase Rac1 or Rac2; and in the membrane, gp91^{PHOX} and p22^{PHOX}, which together comprise cytochrome b558. The catalytic core of the enzyme gp91^{PHOX} contains both flavin and heme groups, which are necessary for electron transfer from NADPH to oxygen. It is only recently that several homologs of gp91^{PHOX} have been described in many nonphagocytic cells within various tissues. This new family of NADPH oxidases (NOX) encompasses 7 members: NOX1, NOX2 (gp91^{PHOX}), NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1, and DUOX2 (5–9). They have been shown to mediate various biological functions, including innate immunity, angiogenesis, cell growth and

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: INSERM U773, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018, Paris, France. E-mail: my-chan.dang@inserm.fr

doi: 10.1096/fj.09-147629

apoptosis, blood pressure regulation, otoconia biosynthesis, and hormone biosynthesis (10). However, contrary to their phagocyte counterpart, NOX2, the molecular mechanisms involved in their activation and regulation remain poorly defined.

As inappropriate or excessive ROS production can damage surrounding tissues and participate in inflammatory disorders, the activity of NOX2 is tightly regulated. Thus, NOX2 is inactive unless 3 major events occur during cell stimulation: 1) phosphorylation of the cytosolic components; 2) small GTPase activation; and 3) translocation of cytosolic components to the plasma membrane, where they assemble with cytochrome *b558* to form the active complex (11, 12). Phosphorylation of p47^{PHOX} on 7 to 8 sites in the AIR (autoinhibitory region) (13), located in its C terminus, allows the disruption of the autoinhibitory internal interactions that exist within the protein (14, 15). This conformational change leads to subsequent binding of p47^{PHOX} with p22^{PHOX}, which is mediated by the SH3 (Src homology 3) and PRR (proline-rich region) domains present, respectively, on p47^{PHOX} and p22^{PHOX} (16). Phosphorylation of p47^{PHOX} also releases its PX domain in the N terminus and allows its interaction with membrane phosphoinositides (17). Both interactions are essential for targeting p47^{PHOX} to cytochrome *b558*. Simultaneously, p47^{PHOX} binds to p67^{PHOX} and by this mean recruits p67^{PHOX} to the membrane-bound cytochrome *b558*; hence, the concept that p47^{PHOX} is the “organizer” protein of the enzyme complex (18). At the membrane, p67^{PHOX} through its activation domain (AD) together with Rac activates NOX2; therefore, p67^{PHOX} is considered to be the “activator” protein of the enzyme complex (19). P67^{PHOX} has also been reported to be phosphorylated by PKC, p38MAPK, and ERK during phagocyte NADPH oxidase activation, although the functional significance of this phosphorylation remains to be determined (20, 21).

Among the new NADPH oxidase homologs, NOX1 is the most structurally and functionally related to NOX2. It interacts with p22^{PHOX} (22), mRNA of which is expressed in various cell types. Also, its activation requires binding with regulatory partners: NOX organizer 1 (NOXO1), the homologue of p47^{PHOX}; NOX activator 1 (NOXA1), the homologue of p67^{PHOX} (23, 24); and Rac1 GTPase (25). NOX1 and its regulatory partners, NOXO1 and NOXA1, are mainly expressed in colon epithelial cells where they could be involved in mucosal innate immunity under physiological conditions (26, 27). However, since oxidant-mediated injury has been shown to play an important role in the pathophysiology of inflammatory bowel disease (IBD) (28), NOX1 system dysfunction might contribute to the development of these inflammatory disorders (29). The physiological agonists and molecular mechanisms that modulate NOX1 activity are still poorly understood because of the lack of colon epithelial cell models expressing sufficient amounts of the endogenous components of the colon NOX1 system (NOX1, NOXA1, and NOXO1) at the protein level (30). In various host

cells lines transfected with human NOX1, NOXO1, and NOXA1 cDNAs, the superoxide production appears to be partially constitutive (23, 31). Indeed, although both NOXO1 and NOXA1 possess similar structural features to those of their respective homologs, a major difference between NOXO1 and p47^{PHOX} resides in the lack of the AIR domain in NOXO1. This characteristic might explain the constitutive activity of the NOX1 complex due to the constitutive binding of NOXO1 to p22^{PHOX} and the plasma membrane (32). Consequently, NOXA1 is also located constitutively at the plasma membrane in a NOXO1-dependent manner (25). Thus, it appears that NOX1 activation by NOXO1 and NOXA1 is less dependent on a cell-stimulating signal than NOX2 activation by p47^{PHOX} and p67^{PHOX}.

To examine the molecular mechanisms involved in NOX1 activation and regulation further, we investigated the role of phosphorylation events focusing on the “activator” subunit NOXA1. Here we report that NOX1 activity is regulated through MAPK, PKC, and PKA-dependent phosphorylation of NOXA1. We identified the amino acid residues targeted by these kinases and examined the consequences of their phosphorylation on NOX1 activity in transfected human embryonic kidney 293 (HEK293) cell model.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and reagents

The pcDNA3.1 plasmids containing the complete sequence of human NOX1, NOXA1, and NOXO1 α were provided by Dr. Tom Leto [U.S. National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA]. Human NOXO1 β in pcDNA3.1 was made by adding codon Lys⁵⁰ to NOXO1 α using the Quick-Change II XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The cDNA encoding for the C-terminal domain of NOX1 containing the flavin and pyridine nucleotide binding sites [NOX1(217–550)] in pGEX-4T-1 was a kind gift from Dr. Yun Soo Bae (Ewha Womans University, Seoul, Korea). The cDNA encoding for Rac1 in pGEX-4T-3 was a kind gift from Dr. Alan Hall (University College, London, UK). The plasmid encoding for the constitutively active MEK1 mutant in which serine 218 and 222 were replaced with glutamic acid was a kind gift from Dr. Anne Brunet and Dr. Jacques Pouyssegur (Université de Nice, CNRS UMR 6543, Nice, France) (33). Production of antibodies directed against NOXA1 and NOXO1 by NeomPS SA (Strasbourg, France) was performed by injecting rabbits with the ovalbumin-crosslinked peptide sequences of NOXA1 (RMSGAPGRLPR-SQQGDQP) and NOXO1 (RGCVDSVPHPTTEQ). The antibodies were then affinity purified by using the AminoLink Kit from Thermo Fisher Scientific (Brebieres, France). Anti-Rac1 antibody was from BD Bioscience (Palo Alto, CA, USA), and anti-GST antibody was from Santa-Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). MEK1 antibody was from Cell Signaling (Saint Quentin Yvelines, France). Phospho-ERK1 (T202/Y204)/ERK2 (T185/Y187) was from R&D Systems Europe (Lille, France). Phorbol myristate acetate (PMA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), diisopropyl fluorophosphate (DFP), diphenylethylidene diisopropyl carbodiimide (DIPCDI), flavin adenine dinucleotide (FAD), formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF), and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis,

MO, USA). Active recombinant P42MAPK was from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), p38MAK from Upstate (Temecula, CA, USA), PKC from Promega (Charbonnières-Bains, France), and PKA from Sigma. Forskolin (Fsk), GF-109203X, and SB-203580 were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA); U0126 was from Promega; and H-89 was from Upstate. [γ - ^{32}P]-ATP and [^{32}P]-orthophosphoric acid were from PerkinElmer (Waltham, MA, USA). SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) and Western blotting reagents were purchased from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France).

Cell culture and transfections

HEK293 cells were cultured in Eagle's minimal essential medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 2 mM glutamine, and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin) at 37°C in 5% CO_2 . At 48 h prior to transfection, cells were seeded in 60-mm dishes at 350,000 cells/dish to reach a 60% confluence. They were then transfected in serum-free medium using FuGene HD reagent (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) prepared in complexes with plasmids DNA according to the manufacturer's instructions [15 μl FuGene reagent for 5 μg total DNA: 1.66 μg of pcDNA3.1-NOX1, 1.66 μg of pcDNA3.1-NOXO1 β , 1.66 μg of pcDNA3.1-NOXA1 wild-type (Wt) or pcDNA3.1-NOXA1 mutant]. In some assays, a plasmid encoding for a constitutively active MEK1 mutant plasmid was cotransfected with the NOX1 system. Serum-free medium was then replaced by serum-containing medium 6 h after transfection, and cells were cultured for 48 h before being assayed.

^{32}P labeling, stimulation, immunoprecipitation, and Western blotting

Transfected-HEK293 cells were deprived of serum and phosphate 18 h prior to ^{32}P labeling. Adherent cells were then loaded with 0.1 mCi/ml of [^{32}P]-orthophosphoric acid in serum and phosphate-free medium for 90 min at 37°C, washed, then stimulated or not with 500 ng/ml of PMA or 50 μM Fsk for 15 min at 37°C. In some experiments, cells were preincubated with GF-109203X, U0126, SB-203580, or H-89 for 20 min at 37°C prior to stimulation. Cells were lysed by resuspending them in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.5% Triton X-100; 150 mM NaCl; 2.5 mM EGTA; 2.5 mM EDTA; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin; 2 mM PMSF; 1 mg/ml NaF; 1 mg/ml Na_3VO_4 ; 0.5 mg/ml β -glycero-phosphate; 0.5 mg/ml PNPP; 0.2 mg/ml levamisole; and 8% sucrose) in the presence of 1 mg/ml DNase I and 2.5 mM DFP. The suspension was sonicated on ice for 3×15 s. The lysate was centrifuged at 100,000 g for 20 min at 4°C in a TL100 Ultracentrifuge (Beckman, Fullerton, CA, USA). An aliquot of the postcentrifugation supernatant was kept for Western blot with anti-NOXA1, anti-NOXO1, and Rac1 antibodies. In brief, the samples were subjected to SDS-PAGE in 11% polyacrylamide gels, using standard techniques (34). The separated proteins were transferred to nitrocellulose with Towbin's procedure (35). The membranes were blocked for 1 h at room temperature in TBS/T (20 mM Tris-HCl, pH 7.6; 137 mM NaCl; and 0.1% Tween 20) containing 5% fat dry milk and then incubated overnight with the primary antibody at the following dilutions: 1:2000 for NOXA1, 1:2000 for NOXO1 β , and 1:500 for Rac1. Antibody binding was detected using horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG. Blots were visualized using ECL Western blotting reagents (GE Healthcare, Little

Chalfont, UK). NOXA1 immunoprecipitation was performed by incubating the remaining postcentrifugation supernatant overnight with anti-NOXA1 antibody (1:200) in the presence of immobilized protein A agarose (Thermo Fisher Scientific). Immunoprecipitate was washed 4 times with lysis buffer. The samples were then subjected to electrophoresis and electroblotting as described above. Phosphorylated NOXA1 was detected by autoradiography.

ROS production assays

Transfected HEK293 cells were detached using nonenzymatic cell dissociation solution (Sigma-Aldrich). ROS production was measured by luminol-amplified chemiluminescence in the presence of horseradish peroxidase (HRPO). Briefly, HEK293 suspensions (2×10^5 cells) in 0.5 ml of serum-free MEM without phenol red, containing 10 μM luminol and 2.5 U/ml HRPO, were preheated to 37°C in the thermostat-regulated luminometer chamber (Berthold-Biolumat LB937, Berthold Technologies, Wildbad, Germany) and allowed to stabilize. After a baseline reading was established, changes in chemiluminescence were monitored for 60 min. DPI, a flavoprotein inhibitor, was added in some assays.

Expression of recombinant NOXA1, GST-Rac1, and GST-NOX1(217–550)

NOXA1 cDNA was subcloned in pGEX-6P1 vector (GE Healthcare) and was expressed in *Escherichia coli* (BL21) as GST fusion proteins and purified with glutathione Sepharose beads. In brief, bacteria were inoculated overnight in 100 ml of LB medium containing 100 μg of ampicillin/ml at 37°C. The overnight culture was then diluted 10-fold and allowed to grow until the optical density at 600 nm reached 0.8. Expression of NOXA1 was induced with IPTG (100 μM) overnight at 15°C. Bacteria were pelleted by centrifuging at 4000 rpm for 20 min at 4°C, suspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin; and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin) and lysed by sonication. The bacterial lysate was then centrifuged at 10,000 g for 20 min at 4°C, and the resulting supernatant was incubated with glutathione Sepharose beads. The proteins were then separated from GST while on the beads, by cleavage with PreScission protease (GE Healthcare). GST-Rac 1 was expressed in *E. coli* as described previously (36). GST-NOX1(217–550) was expressed as described for NOXA1, excepted that the induction was performed with 50 μM IPTG at 22°C for 7 h and that bacteria were lysed in PBS (pH 7.5) containing 1% TX-100, 30 μM FAD, and protease inhibitors (37). GST-NOX1(217–550) was eluted from the glutathione Sepharose beads with elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT; and 0.1% Triton X-100), containing 10 mM glutathione. Glutathione was removed by dialysis against a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% TX-100, and 30 μM FAD. Protein concentrations were determined with the Bio-Rad assay kit, using bovine serum albumin as standard.

Site-directed mutagenesis of NOXA1

Site-directed mutagenesis of NOXA1 was performed using the QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's suggested protocol with the following primers: NOXA1-S172A, forward primer (CAGAGACGGGGCGCACTGCCGCCAC), reverse primer (GTGGCGGCAGTGCGCCCGTCTCTG); NOXA1-S239A, forward primer (CTAATCATGGACGCCCAAGAGCTG), reverse primer

(CAGCTCTTGGGGCGTCCATGATTAG); NOXA1-S282A, forward primer (CAGGCTCCTCTCGCCCCAGGGCTGC), reverse primer (GCAGCCCTGGGGCGAGAGGAGCCTG); NOXA1-S461A, forward primer (GGCCCTCGGATGGCAGGAGC-CCCCG), reverse primer (CGGGGGCTCCTGCCATCCG-AGGGCC); NOXA1-S172E, forward primer (CAGAGACG-GGGCGAACTGCCGCCACG), reverse primer (CGTGGCGG-CAGTTCCGCCCCGTCTCTG); NOXA1-S282E, forward primer (CAGGCTCCTCTCGAACCCAGGGCTGCCG), reverse primer (CGGCAGCCCTGGTTCCGAGAGGAGCCTG). All the sequences were confirmed by DNA sequencing (GEXbyweb, Meylan, France).

In vitro phosphorylation of NOXA1

Wt or mutated NOXA1 was phosphorylated by ERK2, p38MAPK, PKC, and PKA by incubating 10 μ g of protein in a reaction mixture containing 40 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 μ M ATP, and 3 μ Ci of γ [³²P]-ATP in a total volume of 50 μ l at 30°C for 30 min. Phosphorylation with PKC was performed in the presence of 2 mM calcium, 5 μ g/ml diacylglycerol, and 150 μ g/ml phosphatidylserine. The reaction was stopped by adding hot 2 \times Laemmli sample buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE on 11% Tris-glycine gel using standard techniques; proteins on the gel were stained by Coomassie blue or transferred to nitrocellulose and revealed by autoradiography.

Phosphoamino acid analysis

NOXA1 phosphorylated by various kinases was separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF, excised, and then subjected to hydrolysis with 6 N HCl for 90 min at 110°C (20). The supernatant was dried in a speed-vac and lyophilized. Phosphoamino acids were collected and mixed with or without 2 μ g of standard markers (phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosine) and separated by thin-layer chromatography. Samples were then applied to a cellulose plate and separated by electrophoresis at 1100 V for 45 min at 4°C in a buffer consisting of water/acetic acid/pyridine (189:10:1), pH 3.5. Standard phosphoamino acids were visualized by spraying with 0.2% ninhydrin, and phosphorylated amino acids were detected by autoradiography.

Two-dimensional tryptic phosphopeptide mapping

The nitrocellulose area containing ³²P-labeled NOXA1 was incubated for 30 min at 37°C with polyvinylpyrrolidone and incubated overnight with trypsin (50 μ g/ml) in 50 mM bicarbonate buffer. Released peptides were washed 3 times, redissolved in electrophoresis buffer (15% formic acid), and applied to one corner of a cellulose thin-layer plate. After electrophoresis (1100 V for 35 min), ascending chromatography was performed in isobutyric acid buffer (21). The plates were autoradiographed at -75°C.

Spectroscopic analysis of membranes

Membranes of untransfected and transfected HEK293 cells were prepared as described by Nakano *et al.* (38). In brief, cells were harvested, suspended in relaxation buffer (10 mM PIPES, pH 7.3; 100 mM KCl; 3 mM NaCl; 3.5 mM MgCl₂·6H₂O; 1 mM ATP; and 1.25 mM EGTA), and lysed by cavitation. The lysate was first centrifuged at 1000 *g* for 10 min at 4°C to remove nuclei and unbroken cells. The resulting supernatant was centrifuged at 8000 *g* for 10 min at 4°C to pellet mitochondria. A final centrifugation at 14 000 *g* for 60

min was performed to obtain the plasma membrane-enriched pellet, which was then suspended in relaxation buffer. Spectroscopy was performed using an UVIKON 860 spectrophotometer (Kontron Instruments, Montigny Le Bretonneux, France) according to the procedure described by Cross *et al.* (39). The reduced minus oxidized spectrum of the plasma membrane-enriched pellet was measured by adding a few grains of sodium dithionite to the reduced sample. The presence of NOX1 catalytic subunit was demonstrated by the peak at 558 nm.

GST pulldown assay

NOXA1 (204 nM) that had been phosphorylated or not with ERK2 and PKC was incubated with 204 nM of GST, 204 nM of GST-NOX1(217–550), or 204 nM of GST-Rac1 loaded with GTP γ S for 30 min at 4°C in interaction buffer (PBS, pH 7.4; 10 mM DTT; and 0.1% TX-100) on a rotating wheel. When coprecipitation was performed with GST-Rac1, 100 μ M of GTP γ S was added to the interaction buffer; when coprecipitation was performed with NOX1, 30 μ M of FAD was added to the interaction buffer. Glutathione Sepharose beads were then added, and the assay was incubated for 1 h at 4°C on the rotating wheel. After several washes in the buffer (PBS, pH 7.5; 10 mM DTT; and 0.5% TX-100), the complex was eluted with 10 mM glutathione and analyzed by SDS-PAGE and Western blots using protein-specific antibodies.

Statistical analysis

All results are expressed as means \pm SE. Significant differences were identified with Student's *t* test and by 1-way ANOVA followed by a Scheffe's *post hoc* test when multiple variables were analyzed (significance threshold *P*<0.05).

RESULTS

ERK2, p38MAPK, PKC, and PKA phosphorylate NOXA1 on selective sites

To understand the role of phosphorylation events in the regulation of NOX1 activity, we determined whether the “activator” partner NOXA1 could be phosphorylated *in vitro* by various protein kinases, namely ERK2, p38MAPK, PKC, and PKA, and identified the sites targeted by each protein kinase. For this purpose, purified recombinant NOXA1 was produced. The resulting protein migrated with the expected molecular weight of 51 kDa and was recognized by a specific antibody directed against NOXA1. Two lower molecular weight bands, one of which was recognized by the NOXA1 antibody, were also observed and might correspond to degradation products of the protein (Fig. 1A). *In vitro* phosphorylation of recombinant NOXA1 showed that it was phosphorylated strongly by ERK2 and PKA and to a lesser extent by PKC and p38MAPK (Fig. 1B, top panel). Phosphopeptide mapping analysis revealed that PKC phosphorylated NOXA1 on one major peptide, designated peptide a (Fig. 1B, bottom panel). Peptide a was also a major target for PKA in addition to 3 minor peptides, designated b, c, and d. The MAP kinase, ERK2, phosphorylated NOXA1 on two major peptides, designated e and f. Peptides e and

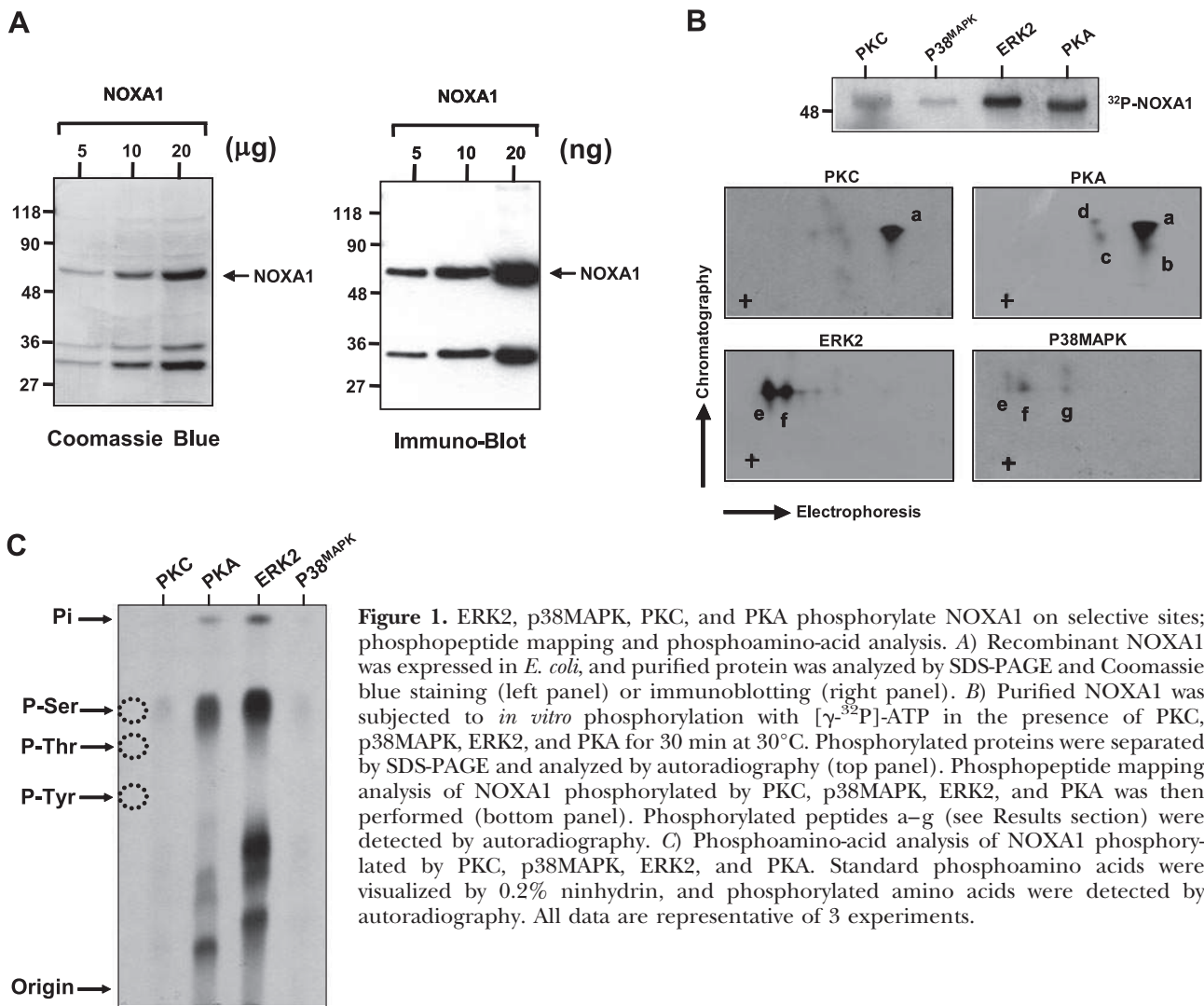


Figure 1. ERK2, p38MAPK, PKC, and PKA phosphorylate NOXA1 on selective sites; phosphopeptide mapping and phosphoamino-acid analysis. **A)** Recombinant NOXA1 was expressed in *E. coli*, and purified protein was analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining (left panel) or immunoblotting (right panel). **B)** Purified NOXA1 was subjected to *in vitro* phosphorylation with [γ - ^{32}P]-ATP in the presence of PKC, p38MAPK, ERK2, and PKA for 30 min at 30°C. Phosphorylated proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by autoradiography (top panel). Phosphopeptide mapping analysis of NOXA1 phosphorylated by PKC, p38MAPK, ERK2, and PKA was then performed (bottom panel). Phosphorylated peptides a–g (see Results section) were detected by autoradiography. **C)** Phosphoamino-acid analysis of NOXA1 phosphorylated by PKC, p38MAPK, ERK2, and PKA. Standard phosphoamino acids were visualized by 0.2% ninhydrin, and phosphorylated amino acids were detected by autoradiography. All data are representative of 3 experiments.

f were also weakly phosphorylated by p38MAPK, in addition to the minor peptide designed g. Phosphorylation of NOXA1 by ERK2, p38MAPK, PKC, and PKA all occurred exclusively on serine residues, as shown by the phosphoamino acid analysis (Fig. 1C).

To identify the phosphorylation sites, we thus searched in the amino acid sequence of NOXA1 serine residues that could be potentially phosphorylated by these protein kinases, referring to their recognition consensus sequences: R-R/K-X-S/T for PKA; (R-K¹⁻³, X^{2,0})-S/T-(X^{2,0},RK^{1,3}) for PKC; and P-X-S/T-P for MAP kinases (40, 41). We identified serine 172 (Ser-172) and serine 461 (Ser-461) as potential targets for PKC and PKA; serine 239 (Ser-239) and serine 282 (Ser-282) as potential targets for ERK2 and p38MAPK. Then we generated mutants of NOXA1 in which these amino acids were changed to alanine, a nonphosphorylatable residue. Phosphorylation of these mutants by ERK2, p38MAPK, PKC, or PKA was then analyzed by phosphopeptide mapping. Phosphorylation of the mutants by ERK2 showed that mutation of Ser-282 to alanine (S282A) resulted in a complete loss of NOXA1 phosphorylation, while mutation of Ser-172, Ser-239, and Ser-461 to alanine (S172A, S239A, and S461A,

respectively) did not affect NOXA1 phosphorylation by ERK2 (Fig. 2A, top panel). Phosphopeptide mapping analysis of these mutants phosphorylated by ERK2 showed that phosphorylation of peptides e and f could not be detected anymore in the S282A mutant as compared to the Wt protein, whereas it was preserved in the S172A, S239A, and S461A mutants (Fig. 2A, bottom panel). These results indicated that peptides e and f contained Ser-282, which is a target for ERK2. The same analysis was performed with p38MAPK. The phosphopeptide map showed that mutation of Ser-282 to alanine also resulted in a loss of the phosphorylation of peptides e and f by p38MAPK as compared to the map of NOXA1 Wt (Fig. 2B, bottom panel). In addition, mutation of Ser-239 to alanine led to the loss of phosphorylation of peptide g, whereas phosphorylation of peptides e and f was preserved in this mutant (Fig. 2B, bottom panel). However, mutation of Ser-172 and Ser-461 to alanine did not affect phosphopeptide maps of NOXA1 phosphorylated by p38MAPK (Fig. 2B, bottom panel). These results showed that Ser-282 is targeted by p38MAPK and ERK2 and that peptide g, which contained Ser-239, is only targeted by p38MAPK. Concerning PKA, the phosphopeptide map showed that

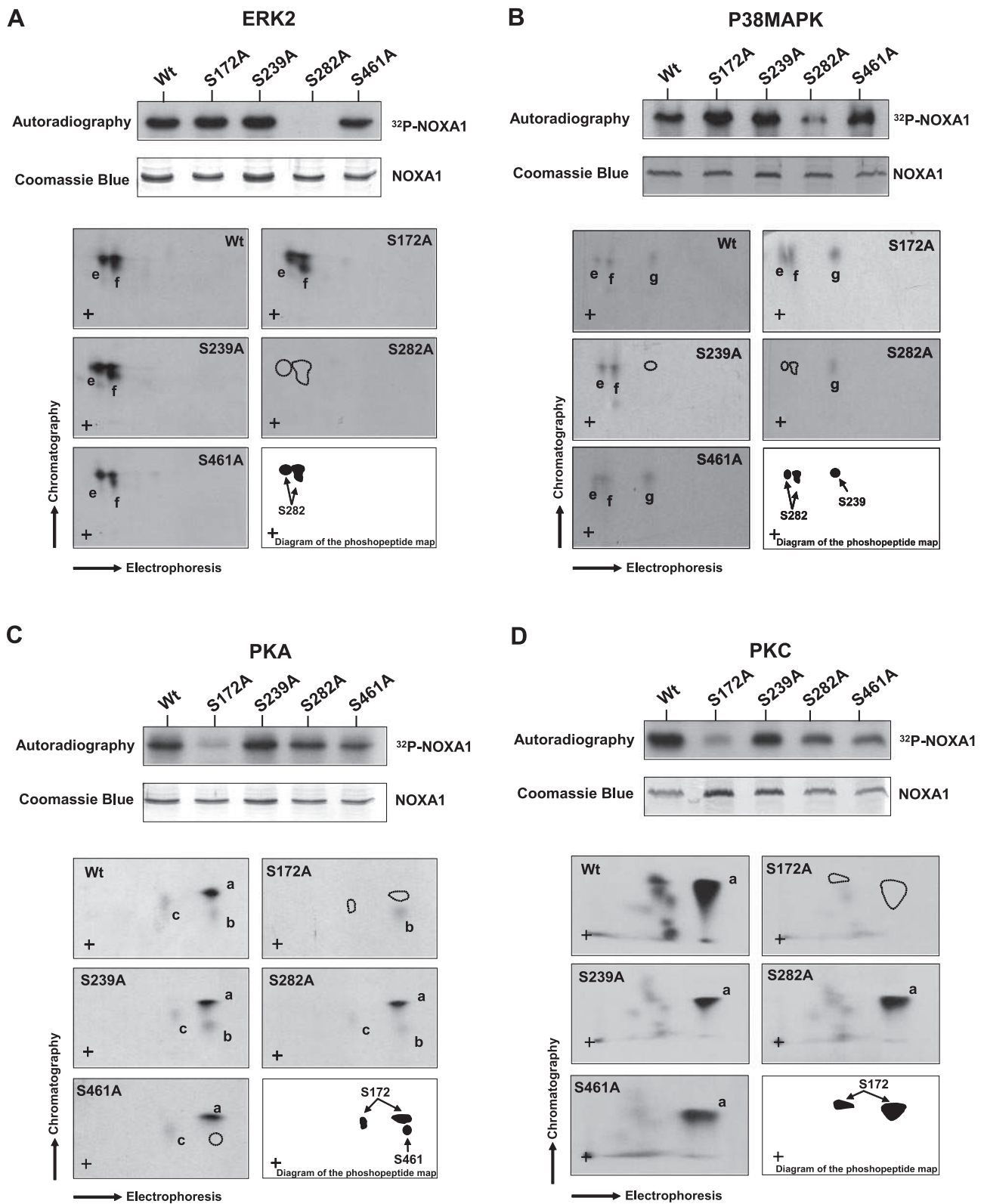


Figure 2. Identification of NOXA1 sites phosphorylated by ERK2, p38MAPK, PKC, and PKA. *A*) Wt NOXA1, S172A, S239A, S282A, and S461A mutants of NOXA1 were subjected to *in vitro* phosphorylation with [γ - ^{32}P]-ATP in the presence of ERK2. Phosphorylated proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by autoradiography and Coomassie blue staining (top panel). Wt NOXA1, S172A, S239A, S282A, and S461A mutants of NOXA1 were then analyzed by phosphopeptide mapping (bottom panel). Phosphorylated peptides (designated by letters; see Results section) were detected by autoradiography. Dotted circles indicate loss of phosphopeptide. Results are summarized in a diagram with the identity of the peptides indicated. *B*) Same as *A*, except that Wt NOXA1, S172A, S239A, S282A, and S461A mutants of NOXA1 were phosphorylated by p38MAPK. *C*) Same as *A*, except that Wt NOXA1, S172A, S239A, S282A, and S461A mutants of NOXA1 were phosphorylated by PKA. *D*) Same as *A*, except that Wt NOXA1, S172A, S239A, S282A, and S461A mutants of NOXA1 were phosphorylated by PKC. Data are representative of 2 experiments.

mutation of Ser-172 to alanine resulted in the loss of phosphorylation of the major peptide a and the minor peptide c, whereas phosphorylation of the minor peptide b was preserved (Fig. 2C, bottom panel). In contrast, mutation of Ser-461 to alanine led to the lack of phosphorylation of the minor peptide b, whereas phosphorylation of the major peptide a and the minor peptide c were not altered (Fig. 2C, bottom panel). Mutation of Ser-239 and Ser-282 to alanine did not modify the phosphopeptide maps of NOXA1 phosphorylated by PKA (Fig. 2C, bottom panel). Thus, peptides a and peptide c contained Ser-172, whereas peptide b contained Ser-461. Both Ser-172 and Ser-461 were targeted by PKA *in vitro*, although Ser-461 to a lesser extent. Phosphorylation of the mutants by PKC also showed that the S172A mutation clearly led to the disappearance of phosphorylation of the major peptide a, whereas the S239A, S282A, and S461A mutations did not significantly affect the phosphopeptide maps of NOXA1 phosphorylated by PKC (Fig. 2D, bottom panel). Therefore, in addition to being a target for PKA, Ser-172 is also a major target for PKC.

NOXA1 is phosphorylated on Ser-172 and Ser-282 in intact cells: involvement of MAPK, PKC, and PKA pathways

To determine whether NOXA1 could be phosphorylated by MAPK, PKC, and PKA in intact cells on the previously identified serine residues, we reconstituted the functional NOX1 complex in a heterologous expression system. Full-length NOXA1 Wt was cotransfected with the catalytic subunit NOX1 and the organizer subunit NOXO1 β (the most abundant and active isoform in the colon; ref. 42) in HEK293 cells. Shiose *et*

al. (43) showed that HEK293 cells do not express endogenous NOX1, and we checked that they express neither endogenous NOXA1 nor endogenous NOXO1 β . Indeed both proteins could not be detected by Western blot even when large amounts of cells (4×10^6 cells) were loaded on the SDS-polyacrylamide gel (data not shown). Rac1 and p22^{PHOX} were shown to be expressed endogenously in these cells (25, 31). Phosphorylation of NOXA1 in the context of a functional NOX1 system was then studied in resting, phorbol-myristate-acetate (PMA)-activated cells, or Fsk-activated cells. We used PMA as it is a direct activator of PKC and can also indirectly activate MAPK *via* the activation of Raf (44). Furthermore, we have shown that ERK and p38MAPK were activated in PMA-stimulated HEK293 cells (data not shown). Fsk activates adenylate cyclase and thus increases the intracellular level of cyclic AMP (cAMP), which is responsible for the activation of PKA.

Using specific antibodies directed against NOXA1 and NOXO1 that we developed as described in Materials and Methods, we first checked that both proteins were expressed in transfected HEK293 cells but not in untransfected (control pcDNA3.1) cells (Fig. 3A, left panel). As no good working antibody directed against NOX1 catalytic subunit was available (commercial antibodies were found to recognize several nonspecific bands in transfected and untransfected cells), we verified the presence of NOX1 by performing spectroscopic analysis of dithionite-reduced minus oxidized spectra of plasma membrane from transfected *vs.* untransfected cells. The presence of NOX1 was demonstrated by a peak at 558 nm, characteristic of heme, in transfected HEK293 cells; this peak was not detected in untransfected cells (Fig. 3A, right panel). In contrast, Rac1, which was endogenously expressed in HEK293

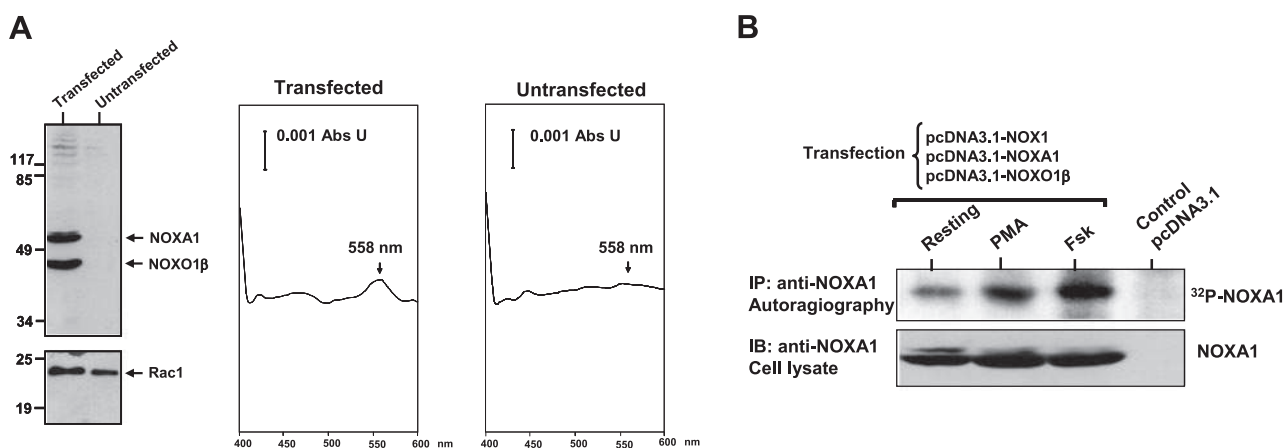


Figure 3. NOXA1 is phosphorylated *in vivo* in resting and PMA- and Fsk-stimulated cells. *A*) NOX1-based system was reconstituted in HEK293 cells by transfecting pcDNA3.1(NOX1), pcDNA3.1(NOXA1), and pcDNA3.1(NOXO1 β) plasmids. Expression of NOXA1 and NOXO1 β was checked by immunoblotting in comparison to untransfected cells (pcDNA3.1) (left panel). Expression of NOX1 was checked by spectroscopy analysis of the reduced minus oxidized spectrum of the plasma membrane-enriched pellet of transfected HEK293 cells in comparison to untransfected cells (pcDNA3.1) (right panels). *B*) Transfected HEK293 cells were labeled with [³²P]-orthophosphoric acid. Cells were stimulated or not with PMA (500 ng/ml) or Fsk (50 μ M) for 15 min at 37°C. NOXA1 was immunoprecipitated with anti-NOXA1 antibody, separated by SDS-PAGE, and analyzed by autoradiography (top panel). An immunoblot was performed on the cell lysate as loading control (bottom panel). Data are representative of 3 experiments.

cells, could be detected in both transfected and untransfected cells (Fig. 3A, left panel). HEK293 cells transfected with NOX1, NOXO1, and NOXA1 were then loaded with [³²P]-orthophosphoric acid, stimulated or not with PMA or Fsk. The phosphorylation state of NOXA1 was analyzed by SDS-PAGE and phosphopeptide mapping analysis after NOXA1 immunoprecipitation with the specific antibody that we have developed. As shown in Fig. 3B, we found that NOXA1 was phosphorylated at a basal level in resting cells and that its phosphorylation increased in PMA- and Fsk-stimulated cells. Phosphopeptide mapping analysis of *in vivo* phosphorylated NOXA1 revealed that basal phosphorylation occurred on 3 peptides in resting cells (Fig. 4A). Taking into account their localization on the map, these peptides might correspond to Ser-282 (peptides e and f) and Ser-172 (peptide a), respectively. When cells were stimulated by PMA, phosphorylation of all three peptides clearly increased (Fig. 4). In contrast, when cells were stimulated by Fsk, only phosphorylation of peptide a dramatically increased, while phosphorylation of peptides e and f did not change (Fig. 4). In addition, no phosphorylation of peptides corresponding to Ser-239 (peptide g) and Ser-461 (peptide b) could be detected *in vivo* under these conditions. We thus focused on Ser-282 and Ser-172 in the rest of the work.

To confirm that the *in vivo* phosphorylated sites are effectively Ser-282 and Ser-172, we cotransfected NOXA1 (S172A), NOXA1 (S282A) mutants, or NOXA1 (S172A/S282A) double mutant with NOX1 and NOXO1β

in HEK293 cells and analyzed their phosphorylation state as described previously, in resting, PMA or Fsk-stimulated cells. As shown in Fig. 5A, the single mutation of Ser-282 or Ser-172 to alanine (S282A or S172A) reduced the phosphorylation of NOXA1 in resting and PMA-stimulated cells, while the double mutation of Ser-172 and Ser-282 to alanine (S172A/S282A) led to a complete loss of NOXA1 phosphorylation in resting and PMA-stimulated cells. Phosphorylation of NOXA1 mutants *in vivo* was also analyzed by phosphopeptide mapping. Figure 5B clearly shows that phosphorylation of peptide a was lost with the single mutant S172A in resting and PMA-stimulated cells. In contrast with this same mutant, phosphorylation of peptides e and f was still preserved at the basal level, and their phosphorylation still increased in PMA-stimulated cells (Fig. 5B). The opposite results were observed with the single mutant S282A; phosphorylation of peptides e and f was lost in resting and PMA-stimulated cells, while phosphorylation of peptide a was still preserved at the basal level, and its phosphorylation still increased in PMA-stimulated cells. Finally, the double mutation of Ser-172 and Ser-282 to S172A/S282A resulted in a complete loss of phosphorylation of peptides e, f, and a. The same analysis was performed in Fsk-stimulated cells. As shown in Fig. 6A, phosphorylation of NOXA1 induced by Fsk was clearly prevented with the S172A mutant, while it was not with the S282A mutant; rather, it was increased with this mutant (Fig. 6A). The S172A/S282A double mutation also prevented NOXA1 phosphoryla-

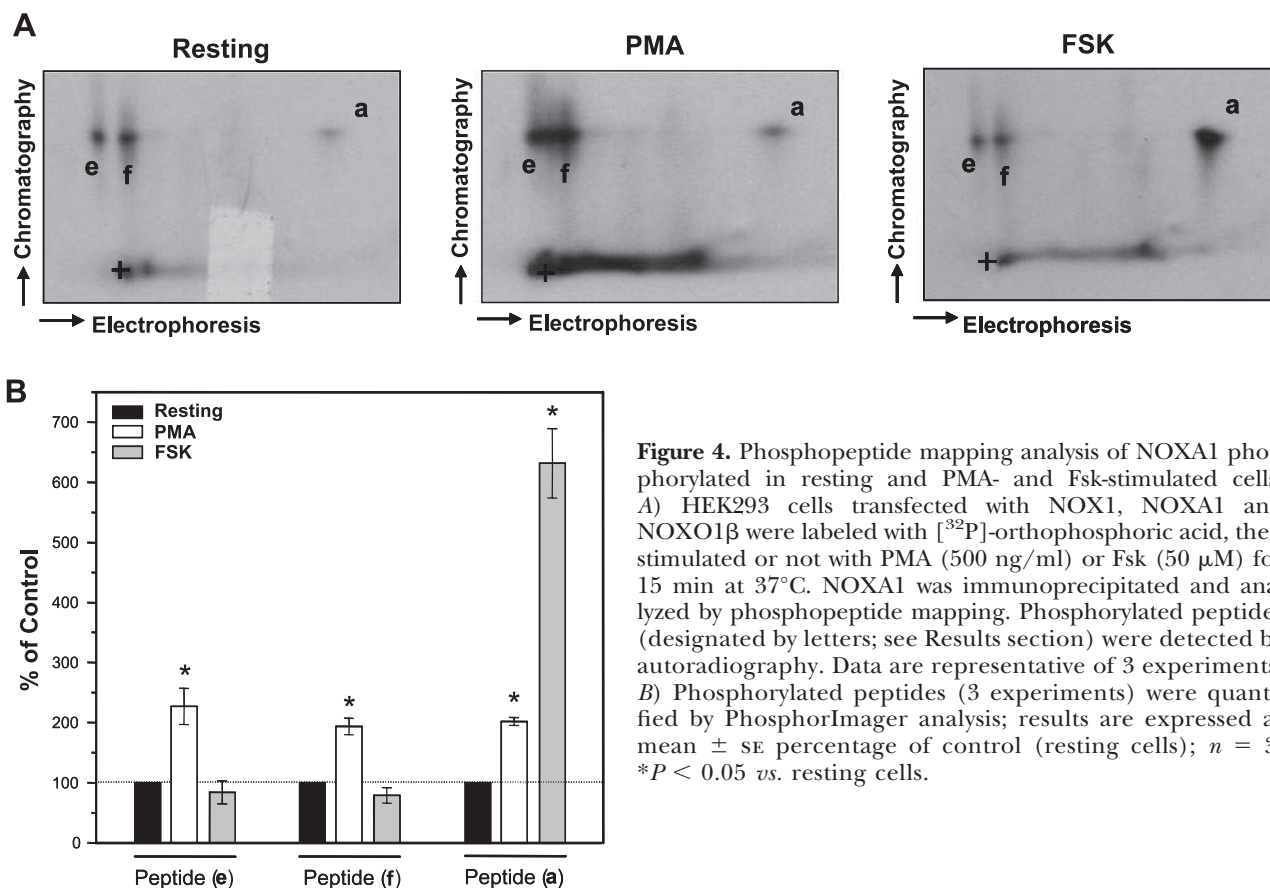


Figure 4. Phosphopeptide mapping analysis of NOXA1 phosphorylation in resting and PMA- and Fsk-stimulated cells. A) HEK293 cells transfected with NOX1, NOXA1 and NOXO1β were labeled with [³²P]-orthophosphoric acid, then stimulated or not with PMA (500 ng/ml) or Fsk (50 μM) for 15 min at 37°C. NOXA1 was immunoprecipitated and analyzed by phosphopeptide mapping. Phosphorylated peptides (designated by letters; see Results section) were detected by autoradiography. Data are representative of 3 experiments. B) Phosphorylated peptides (3 experiments) were quantified by PhosphorImager analysis; results are expressed as mean ± SE percentage of control (resting cells); n = 3. *P < 0.05 vs. resting cells.

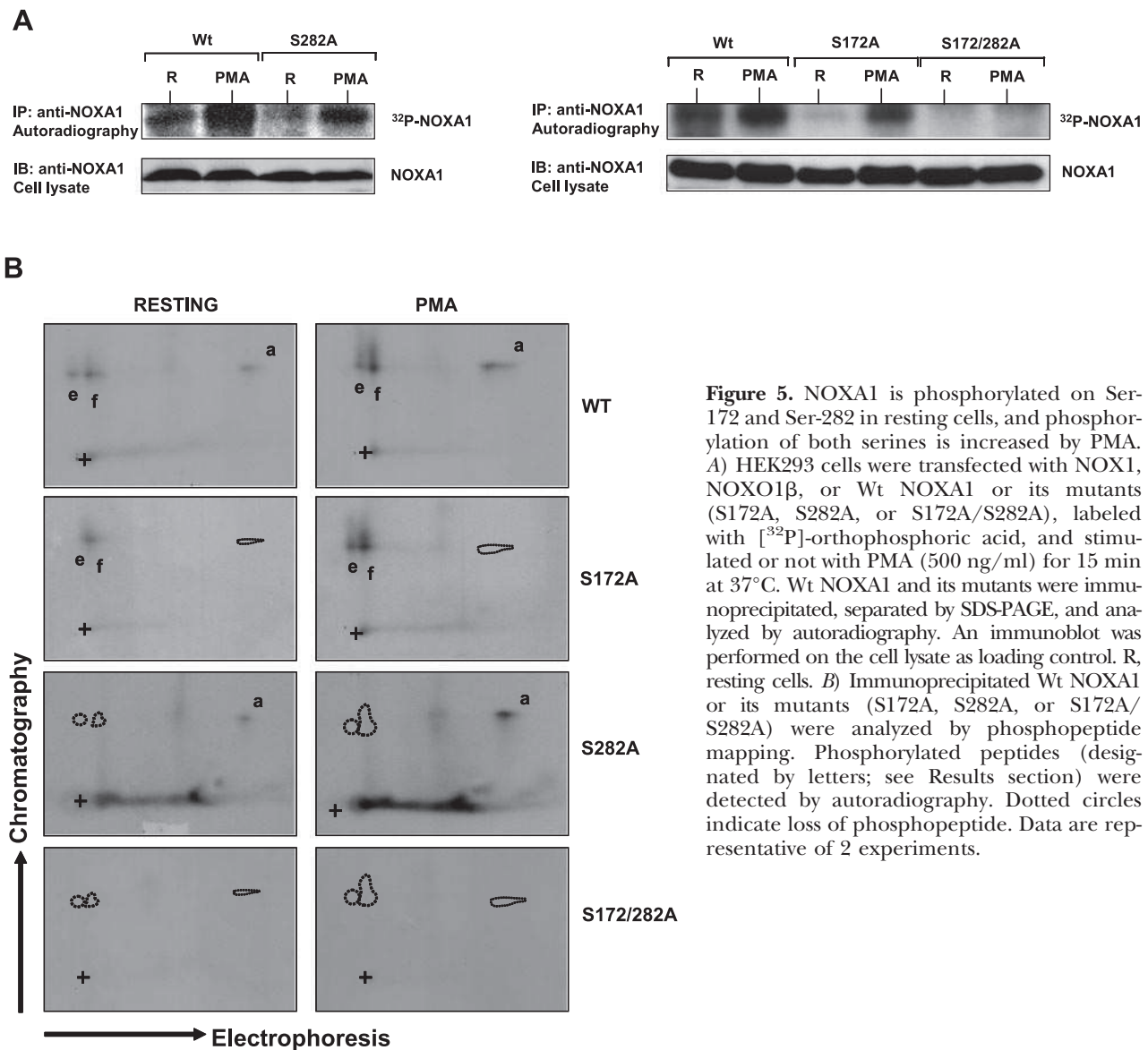


Figure 5. NOXA1 is phosphorylated on Ser-172 and Ser-282 in resting cells, and phosphorylation of both serines is increased by PMA. *A*) HEK293 cells were transfected with NOX1, NOXO1 β , or Wt NOXA1 or its mutants (S172A, S282A, or S172A/S282A), labeled with [32 P]-orthophosphoric acid, and stimulated or not with PMA (500 ng/ml) for 15 min at 37°C. Wt NOXA1 and its mutants were immunoprecipitated, separated by SDS-PAGE, and analyzed by autoradiography. An immunoblot was performed on the cell lysate as loading control. R, resting cells. *B*) Immunoprecipitated Wt NOXA1 or its mutants (S172A, S282A, or S172A/S282A) were analyzed by phosphopeptide mapping. Phosphorylated peptides (designated by letters; see Results section) were detected by autoradiography. Dotted circles indicate loss of phosphopeptide. Data are representative of 2 experiments.

tion induced by Fsk (Fig. 6A). Phosphopeptide map analysis of the S172A mutant showed that phosphorylation of peptide a could not be detected either at the basal level or in Fsk-stimulated cells (Fig. 6B). In contrast, with this same mutant, phosphorylation of peptides e and f could be still detected at the basal level, but their phosphorylation was not increased by Fsk, as noted earlier in Fig. 4. With the S282A mutant, peptides e and f could not be phosphorylated in resting or in Fsk-stimulated cells, whereas peptide a was still phosphorylated at the basal level and its phosphorylation strongly increased in Fsk-treated cells (Fig. 6B). Finally, as expected, peptides e, f, and a were not phosphorylated in resting or Fsk-treated cells when both Ser-172 and Ser-282 were mutated to alanine (Fig. 6B).

Together, these data clearly demonstrated that Ser-172 and Ser-282 were both phosphorylated at a basal level in resting cells and that their phosphorylation could be increased by PMA. In contrast, only phosphorylation of Ser-172 could be increased by Fsk in intact cells. In addition, although PKA triggers weak phosphorylation of

Ser-461 *in vitro*, Fsk-mediated PKA activation did not induce phosphorylation of Ser-461 *in vivo*.

Taking into account the *in vitro* and *in vivo* data, it is probable that PMA-induced phosphorylation of Ser-172 and Ser-282 in intact cells could be mediated by direct activation of PKC and indirect PKC activation of MAPK (ERK1/2 or p38MAPK), respectively. Indeed, in addition to the fact that Ser-172 could be targeted by PKC but not by MAPK *in vitro*, and that Ser-282 could be targeted by MAPK but not by PKC *in vitro*, we have shown that PMA, a direct PKC activator, could also increase the level of phospho-ERK and phospho-p38MAPK in HEK293 cells (data not shown). To confirm that MAPK (ERK1/2 or p38MAPK) and PKC were involved in PMA-induced phosphorylation of NOXA1 *in vivo*, HEK293 cells transfected with all the components of the NOX1 system were loaded with [32 P]-orthophosphoric acid, then treated with SB-203580, U0126, or GF-109203X, which inhibit p38MAPK, MEK1/2 (the kinase upstream of ERK1/2), and PKC, respectively. Cells were then stimulated with PMA, and NOXA1 was

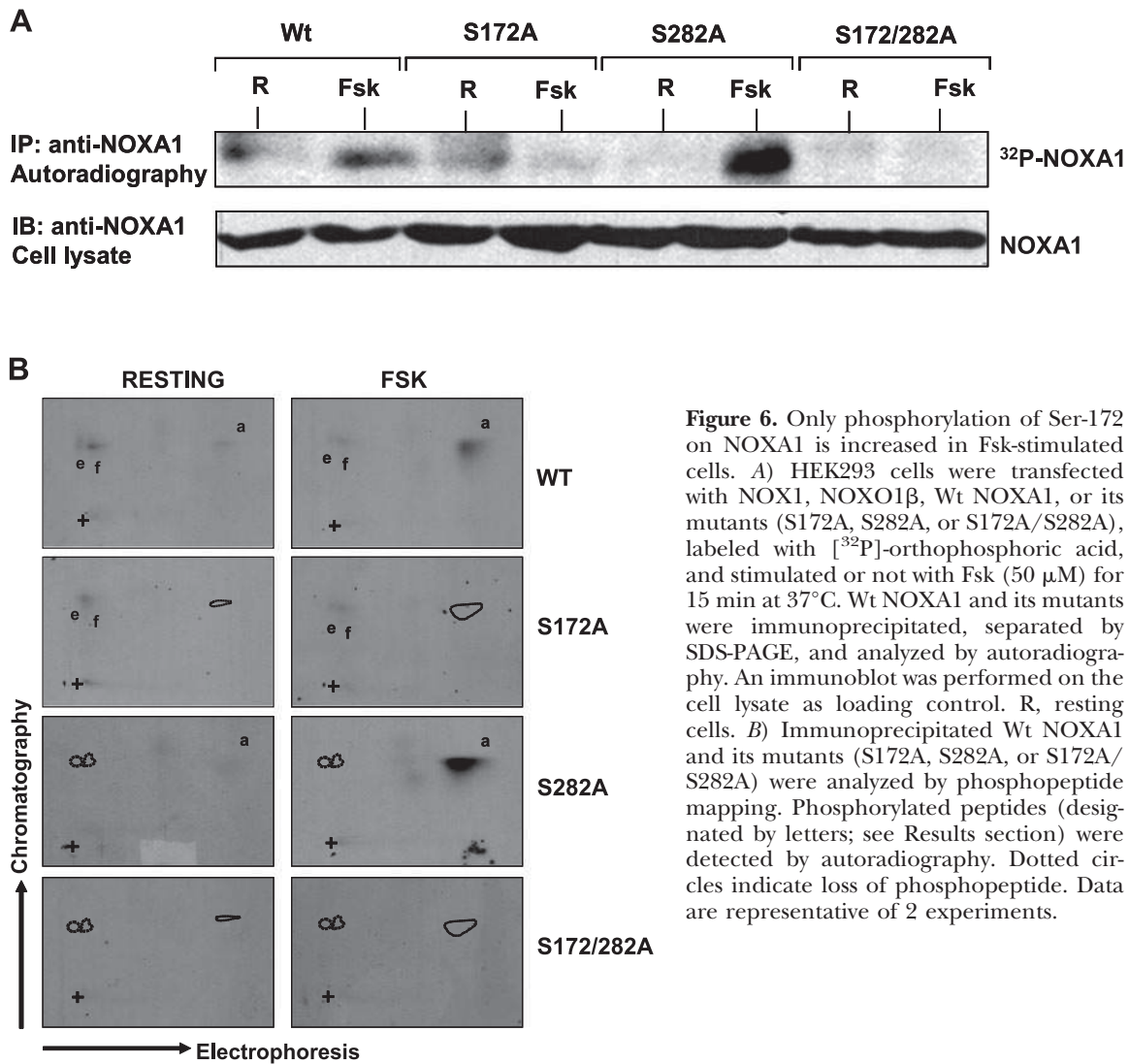


Figure 6. Only phosphorylation of Ser-172 on NOXA1 is increased in Fsk-stimulated cells. *A*) HEK293 cells were transfected with NOX1, NOXO1 β , Wt NOXA1, or its mutants (S172A, S282A, or S172A/S282A), labeled with [³²P]-orthophosphoric acid, and stimulated or not with Fsk (50 μ M) for 15 min at 37°C. Wt NOXA1 and its mutants were immunoprecipitated, separated by SDS-PAGE, and analyzed by autoradiography. An immunoblot was performed on the cell lysate as loading control. R, resting cells. *B*) Immunoprecipitated Wt NOXA1 and its mutants (S172A, S282A, or S172A/S282A) were analyzed by phosphopeptide mapping. Phosphorylated peptides (designated by letters; see Results section) were detected by autoradiography. Dotted circles indicate loss of phosphopeptide. Data are representative of 2 experiments.

immunoprecipitated. **Figure 7A** shows that PMA-induced phosphorylation of NOXA1 was inhibited by SB-203580, U0126, and GF-109203X, confirming that MAPK (ERK1/2 and p38MAPK) and PKC were involved in phosphorylation of NOXA1 in PMA-stimulated cells. We also confirmed that phosphorylation of Ser-172 induced by Fsk was mediated by PKA, as the PKA inhibitor, H-89, prevented Fsk-induced phosphorylation of NOXA1 (Fig. 7B). In resting cells, basal phosphorylation of NOXA1 was inhibited in a concentration-dependent manner by U0126, GF-109203X, and to a lower extent by H-89, indicating that ERK1/2, PKC, and PKA are involved in basal phosphorylation of NOXA1 (Fig. 7C, D). In contrast, SB-203580 at 25 μ M had no inhibitory effect on NOXA1 basal phosphorylation, ruling out a role of p38MAPK in NOXA1 basal phosphorylation (Fig. 7C).

Phosphorylation of NOXA1 on Ser-172 and Ser-282 prevents NOX1 hyperactivation by decreasing NOXA1 interaction to NOX1 and to Rac1-GTP γ S

We next investigated the functional consequences of NOXA1 phosphorylation on Ser-172 and Ser-282 on

NOX1-derived ROS production. For this purpose, NOXA1 Wt, S172A mutant, S282A mutant, S172A/S282A double mutant, or phosphomimetic S172E/S282E double mutant of NOXA1 were cotransfected in HEK293 cells with NOX1 and NOXO1 β , and ROS production was measured by luminol-amplified chemiluminescence in the presence of horseradish peroxidase.

NOXA1 is constitutively phosphorylated in resting cells (Figs. 3–7, resting), in contrast to NOXO1 β , which appears to be phosphorylated only when cells were stimulated (Fig. 8A). Therefore, we first decided to examine the effect of NOXA1 mutants on ROS production under basal conditions in order to attribute the effect seen specifically to NOXA1 and not to another component of the NOX1 complex (*i.e.*, NOXO1 β). As shown in Fig. 8B (solid columns) and in accordance with previous studies (23, 31), cells cotransfected with human Wt NOXA1, NOX1, and NOXO1 β constitutively produced ROS as compared to control cells that were transfected with pcDNA3.1. Furthermore, this ROS production activity was inhibited by DPI, a flavoprotein inhibitor. Individual mutations of Ser-172

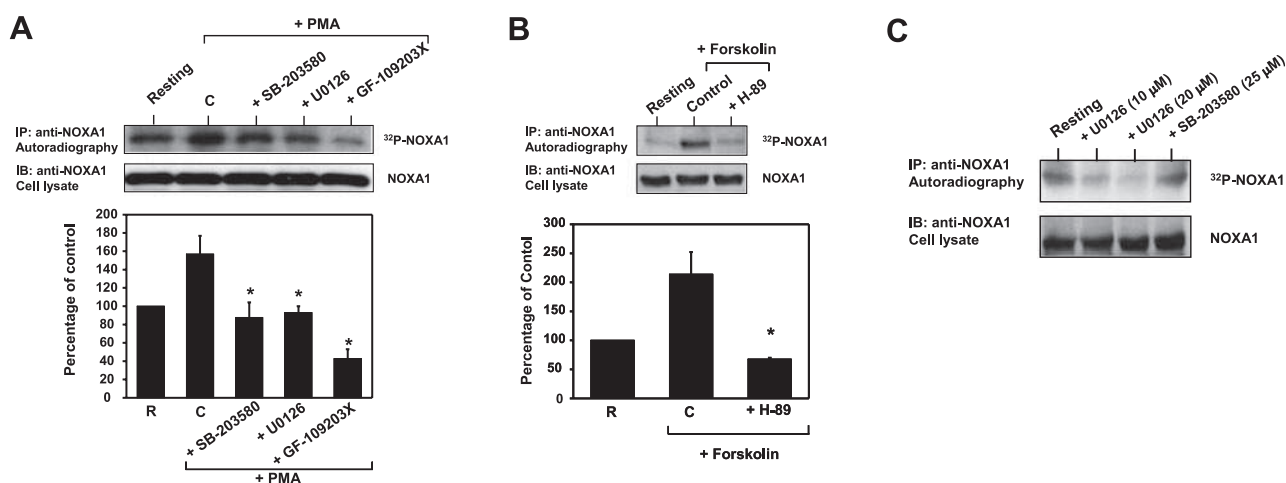


Figure 7. Phosphorylation of NOXA1 in intact cells is mediated by MAPK, PKC, and PKA pathways. *A*) HEK293 cells were transfected with NOX1, NOXO1 β , or NOXA1 and labeled with [32 P]-orthophosphoric acid. Cells were preincubated in the presence or absence of 25 μ M SB-203580 (p38MAPK inhibitor), 20 μ M U0126 (MEK inhibitor) or 5 μ M GF-109203X (PKC inhibitor) for 20 min at 37°C prior to stimulation or not with PMA (500 ng/ml) for 15 min at 37°C. Top panel: NOXA1 was immunoprecipitated, separated by SDS-PAGE, and analyzed by autoradiography. An immunoblot was performed on the cell lysate as loading control. Bottom panel: phosphorylated NOXA1 (3 experiments) was quantified by PhosphorImager analysis. R, resting cells; C, PMA control cells. *B*) HEK293 cells were transfected and labeled as in *A*. Cells were preincubated in the presence or absence of 10 μ M H-89 (PKA inhibitor) for 20 min at 37°C prior to stimulation or not with Fsk (50 μ M) for 15 min at 37°C. Top panel: NOXA1 was immunoprecipitated, separated by SDS-PAGE, and analyzed by autoradiography. An immunoblot was performed on the cell lysate as loading control. Bottom panel: phosphorylated NOXA1 (3 experiments) was quantified by PhosphorImager analysis. R, resting cells; C, Fsk control cells. *C, D*) HEK293 cells were transfected and labeled as in *A*. Basal phosphorylation was analyzed in the presence or absence of various concentrations of U0126, GF-109203X, H-89, or SB-203580 as described above, except that cells were not stimulated. Graphed results are expressed as mean \pm SE percentage of R; $n = 3$. * $P < 0.05$ vs. C; # $P < 0.05$ vs. R.

control cells. *B*) HEK293 cells were transfected and labeled as in *A*. Cells were preincubated in the presence or absence of 10 μ M H-89 (PKA inhibitor) for 20 min at 37°C prior to stimulation or not with Fsk (50 μ M) for 15 min at 37°C. Top panel: NOXA1 was immunoprecipitated, separated by SDS-PAGE, and analyzed by autoradiography. An immunoblot was performed on the cell lysate as loading control. Bottom panel: phosphorylated NOXA1 (3 experiments) was quantified by PhosphorImager analysis. R, resting cells; C, Fsk control cells. *C, D*) HEK293 cells were transfected and labeled as in *A*. Basal phosphorylation was analyzed in the presence or absence of various concentrations of U0126, GF-109203X, H-89, or SB-203580 as described above, except that cells were not stimulated. Graphed results are expressed as mean \pm SE percentage of R; $n = 3$. * $P < 0.05$ vs. C; # $P < 0.05$ vs. R.

and Ser-282 to S172A and S282A significantly increased constitutive ROS production by the NOX1 system, and double mutation of Ser-172 and Ser-282 to S172A/S282A further increased this constitutive ROS production activity (Fig. 8B, solid columns). Interestingly, the phosphomimetic double mutant of NOXA1, S172E/S282E, did not increase constitutive NOX activity. Rather, it tended to inhibit it (Fig. 8B, solid columns). NOX1 system was expressed in an equivalent manner in Wt and mutant NOXA1 cell lines, as shown by the same expression level of NOXA1 and NOXO1 β (Fig. 8B, bottom panel). These results indicate that basal phosphorylation of NOXA1 on Ser-172 and Ser-282 in resting cells synergistically prevents NOX1 hyperactivation. Paradoxically, treatment of cells by PMA enhanced NOX1 activity (Fig. 8B, shaded columns), although under these conditions phosphorylation of Ser-172 and Ser-282 of NOXA1 were increased (Fig. 5). This could be due to the positive effect of PMA on other components of the NOX1 system, such as NOXO1 β , phosphorylation of which was increased by PMA (Fig. 8A). Furthermore, the stimulatory effect of PMA on NOX1 activity was kept with the S172A, S282A, and S172A/S282A mutants of NOXA1 (Fig. 8B, shaded columns), supporting the idea that another component of the NOX1 system was targeted in a positive manner by PMA. However, note that hyperphosphorylation of NOXA1, mimicked by the use of S172E/S282E mutant,

can overcome the PMA-stimulatory effect (Fig. 8B, shaded column). To confirm that hyperphosphorylation of NOXA1 had an inhibitory effect on NOX1 activity, and as ERK1/2 was involved in this phosphorylation, we cotransfected a constitutively active MEK1 mutant (the kinase that activates ERK1/2) along with the NOX1 system in HEK293 cells and determined consequences on NOX1 activity. Overexpression of MEK1 mutant in HEK293 cells, checked by immunoblot, increased endogenous ERK1/2 activity, as indicated by a marked increase in ERK1/2 phosphorylation (Fig. 8C, bottom panel). The increase of ERK1/2 activity in MEK1 mutant-transfected cells was accompanied by a significant decrease in NOX1 activity under resting and PMA-stimulated conditions (Fig. 8C, top panel), as compared to control cells transfected with the NOX1 system alone. This finding suggests that ERK1/2-induced NOXA1 hyperphosphorylation was involved effectively in the inhibition of NOX1 activity. We checked that NOX1 system was expressed in an equivalent manner in control and MEK1-transfected cells, as shown by the same expression level of NOXA1 and NOXO1 β (Fig. 8C, bottom panel). Fsk, which was found to increase NOXA1 phosphorylation on Ser-172, inhibited NOX1 activity as expected, and mutation of this serine to alanine prevented this inhibitory effect (Fig. 8D).

NOX1 activity is dependent on the interactions among the different subunits that compose the NOX1

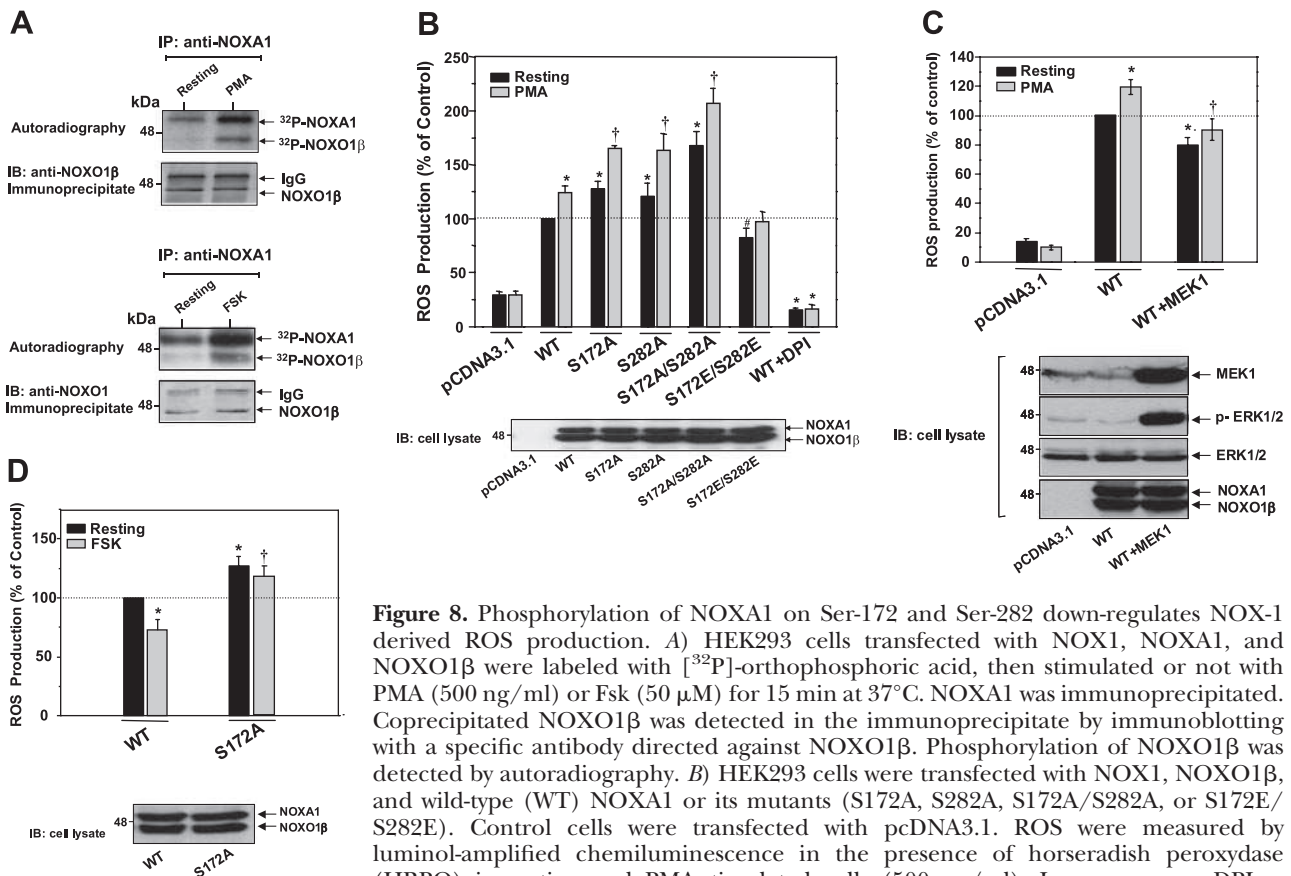


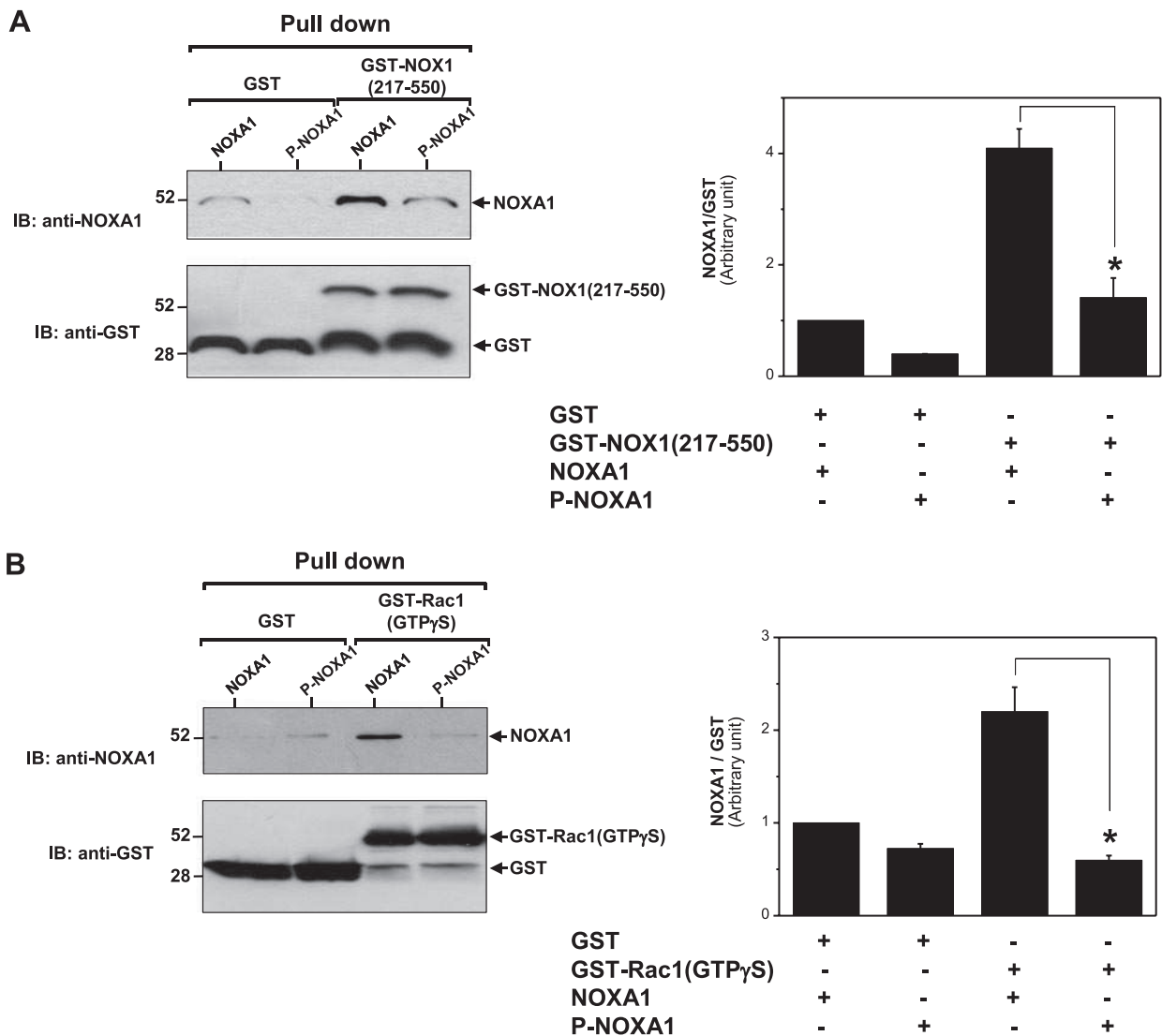
Figure 8. Phosphorylation of NOXA1 on Ser-172 and Ser-282 down-regulates NOX1-derived ROS production. **A)** HEK293 cells transfected with NOX1, NOXA1, and NOXO1 β were labeled with [³²P]-orthophosphoric acid, then stimulated or not with PMA (500 ng/ml) or Fsk (50 μ M) for 15 min at 37°C. NOXA1 was immunoprecipitated. Coprecipitated NOXO1 β was detected in the immunoprecipitate by immunoblotting with a specific antibody directed against NOXO1 β . Phosphorylation of NOXO1 β was detected by autoradiography. **B)** HEK293 cells were transfected with NOX1, NOXO1 β , and wild-type (WT) NOXA1 or its mutants (S172A, S282A, S172A/S282A, or S172E/S282E). Control cells were transfected with pCDNA3.1. ROS were measured by luminol-amplified chemiluminescence in the presence of horseradish peroxidase (HRPO) in resting and PMA-stimulated cells (500 ng/ml). In some assays DPI, a selective NOX inhibitor, was added. Changes in chemiluminescence were monitored for 60 min. Results are expressed as mean \pm SE percentage of resting WT; $n = 10$. * $P < 0.05$ vs. resting WT; † $P < 0.05$ vs. resting counterpart; # $P < 0.05$ vs. resting S172A/S282A. An immunoblot was performed on the cell lysate with NOXA1 and NOXO1 β antibodies to check that an equal amount of NOX1 system was expressed in WT and mutant NOXA1 cell lines. **C)** A constitutively active MEK1 mutant (kinase that activates ERK1/2) was cotransfected along with NOX1, NOXO1 β , and WT NOXA1, and ROS were measured by luminol-amplified chemiluminescence in the presence of horseradish peroxidase (HRPO) in resting and PMA-stimulated cells (500 ng/ml) as described above. Results are expressed as mean \pm SE percentage of resting WT; $n = 3$. * $P < 0.05$ vs. resting WT; † $P < 0.05$ vs. stimulated WT. An immunoblot was performed in cell lysate with anti-MEK1, anti-phospho-ERK1 (T202/Y204)/ERK2 (T185/Y187), anti-ERK1/2, anti-NOXA1 and anti-NOXO1 β antibodies to check for expression. **D)** HEK-293 cells were transfected with NOX1, NOXO1 β , WT NOXA1, or S172A-NOXA1 mutant and stimulated or not with Fsk (50 μ M). ROS were measured by luminol-amplified chemiluminescence in the presence of HRPO as described above. Results are expressed as mean \pm SE percentage of resting WT; $n = 3$. * $P < 0.05$ vs. resting WT; † $P < 0.05$ vs. stimulated WT.

system. Especially, the presence of an AD in NOXA1, similar to the AD of p67^{PHOX}, suggests that it might interact directly with NOX1 protein to regulate its electron transfer activity (23). Furthermore, binding of NOXA1 to Rac1 (a significant proportion of which was found in the GTP-bound form in resting HEK293 cells; ref. 45) is crucial for NOX1 activity (25). We thus determined whether NOXA1 phosphorylation on Ser-172 and Ser-282 could change its interaction with its binding partners, NOX1 and Rac1. For this purpose, pull-down experiments were performed with the GST-C-terminal domain of NOX1 containing the flavin and pyridine nucleotide binding sites [GST-NOX1(217–550)] or with GST-Rac1 loaded with GTP γ S (GST-Rac1-GTP γ S). This was performed in the presence of non-phosphorylated recombinant NOXA1 or recombinant NOXA1 that had been phosphorylated *in vitro* with both ERK2 (phosphorylation of Ser-282) and PKC (phosphorylation of Ser-172). As shown in **Fig. 9**,

nonphosphorylated NOXA1 interacted with GST-NOX1(217–550) and GST-Rac1-GTP γ S compared with the GST control. Phosphorylation of NOXA1 on both Ser-282 and Ser-172 by ERK2 and PKC, respectively, clearly decreased the binding capacity of NOXA1 to NOX1(217–550) and Rac1-GTP γ S (Fig. 9). Western blot using antibodies directed against GST showed an equivalent amount of GST protein in each assay. Altogether, these results demonstrated a critical role of NOXA1 phosphorylation on Ser-282 and Ser-172 in preventing NOX1 hyperactivation through the decrease of NOXA1 interaction to NOX1 and Rac1.

DISCUSSION

Our data show that NOX1 activity is regulated through MAPK, PKC, and PKA-dependent phosphorylation of NOXA1. *In vitro* and *in vivo* studies revealed that



GST

NOXA1 P-NOXA1

IB: anti-NOXA1

GST-Rac1 (GTPγS)

NOXA1 P-NOXA1

IB: anti-NOXA1

GST

NOXA1 P-NOXA1

IB: anti-GST

GST-Rac1(GTPγS)

NOXA1 P-NOXA1

IB: anti-GST

NOXA1 / GST (Arbitrary unit)

GST	+	+	-	-
GST-Rac1(GTPγS)	-	-	+	+
NOXA1	+	-	+	-
P-NOXA1	-	+	-	+

Figure 9. Phosphorylation of NOXA1 on Ser-172 and Ser-282 by PKC and ERK2, respectively, decreases its interaction with NOX1 (217–550) C-terminal domain and Rac1-GTP γ S. Recombinant NOXA1 was phosphorylated (P-NOXA1) or not (NOXA1) by both ERK2 and PKC, then incubated with GST (control) or either GST-NOX1(217–550) C-terminal domain (A) or GST-Rac1-GTP γ S (B) in the presence of glutathione Sepharose beads for 1 h. After washing, the complex was eluted with reduced glutathione and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using NOXA1 and GST antibodies (left panels). Graphs represent mean \pm SE ratio of precipitated NOXA1 to total amount of GST protein; $n=3$ (right panels). * $P < 0.05$ vs. NOXA1.

NOXA1 is phosphorylated by MAPK (ERK1/2 and p38MAPK) on Ser-282, while it is phosphorylated by PKC and PKA on Ser-172. Furthermore, phosphorylation on these sites occurs at the basal level and synergistically prevents NOX1 hyperactivation through the decrease of NOXA1 interaction with NOX1 catalytic subunit and Rac1. These results define a new critical role of NOXA1 phosphorylation in regulating NOX1-system activity.

The colon remains by far the tissue that expresses most abundantly NOX1 and its known regulators, NOXA1 and NOXO1, *in vivo* (23, 31). The function of NOX1-derived ROS in the colon epithelium is not well elucidated. As epithelial cells represent the first barrier against external pathogens, NOX1-derived ROS have been suggested to be involved in host defense, thus contributing to the normal inflammatory process (27).

Consequently, one can assume that any NOX1 system dysfunction might participate to the development of inflammatory disorders, such as inflammatory bowel disease (IBD), implying that NOX1 activity must be controlled closely. However, contrary to its NOX2 counterpart, the molecular mechanisms that modulate NOX1 activity are still poorly understood. The main reason resides in the lack of an epithelial cell model that expresses sufficient amounts of endogenous, NOX1, NOXA1, and NOXO1 proteins.

In the present study, we provide for the first time clear evidence that NOX1 activity could be regulated through MAPK (ERK1/2 and p38MAPK) and PKC-dependent phosphorylation of NOXA1. We also found that NOXA1 could be targeted by PKA, as described previously by Kim *et al.* (46). *In vitro* and *in vivo* studies using a HEK293-transfected cell model reconstituted with the complete

NOX1 system (NOX1, NOXA1, and NOXO1 β) demonstrated that phosphorylation of NOXA1 by MAPK (ERK1/2 and p38MAPK) occurs mainly on Ser-282, while phosphorylation of NOXA1 by PKC, as for PKA, occurs mainly on Ser-172. We also showed that phosphorylation of NOXA1 on these sites occurs at a basal level and acts in synergy to down-regulate constitutive NOX1-derived ROS production. Thus, individual mutations of Ser-172 and Ser-282 to alanine significantly increased constitutive ROS production by the NOX1 system, and double mutations of Ser-172 and Ser-282 to S172A/S282A further increased it. On the contrary, the phosphomimetic double mutant S172E/S282E of NOXA1 did not increase constitutive NOX1 activity; rather, it inhibited it. The mechanisms by which phosphorylation of NOXA1 on Ser-282 and Ser-172 prevents NOX1-derived ROS production could be mediated by a direct effect on the binding capacity of NOXA1 to both Rac1 and NOX1. Indeed, NOXA1 that had been phosphorylated by MAPK and PKC shows a decrease in its binding to both Rac1 and NOX1.

Negative regulation of ROS production by NADPH oxidase is often associated with an elevation of the intracellular cAMP level and subsequent activation of PKA in many cell systems. In phagocytes, for example, several cAMP-elevating agonists or agents, such as epinephrine, prostaglandin E₂, lysophosphatidylcholine, and anthrax toxins, have been shown to down-regulate the respiratory burst (47–50). This effect has been suggested to be mediated by the down-regulation of phosphorylation and membrane translocation of the organizer protein, p47^{PHOX} (49). Likewise, ROS production by nonphagocytic cells, such as vascular smooth muscle cells, is inhibited by the cAMP signaling pathway (51, 52). Recently, NOX1 activity was shown to be regulated by a cAMP/PKA inhibitory pathway (46). However, our present study further demonstrated that, in addition to the PKA pathway, MAPK (ERK1/2 and p38MAPK) and PKC pathways also participate in negative regulation of NOX1 activity. Indeed, phosphorylation of NOXA1 on Ser-282 and Ser-172, under conditions in which these residues are targeted by MAPK and PKC, respectively, decreases the level of NOX1-derived ROS production as well as its interaction with Rac1 and NOX1. Although surprising, negative regulation of superoxide production through MAPK activation has been already demonstrated in bronchoalveolar lavage enriched in neutrophils by a mechanism that is independent of cAMP and PKA (53). In the case of PKC, phosphorylation occurs on a serine residue that is also targeted by PKA (Ser-172) and which was previously shown to participate in negative regulation of NOX1 activity (46). Using antibody directed against PKA consensus sequence, the researchers showed that Fsk, an activator of the PKA pathway, induced phosphorylation of NOXA1 on Ser-172 and Ser-461 in intact HEK293 cells and that these phosphorylations are required for binding of NOXA1 to 14-3-3 protein, thus preventing the formation of a fully active NOX1 complex. However, using a more sensitive approach that

consists of labeling HEK293 cells with [³²P]-orthophosphoric acid, followed by immunoprecipitation of NOXA1 and phosphopeptide mapping, our data clearly indicate that only phosphorylation of Ser-172 could be induced by Fsk in intact cells, while no phosphorylation of Ser-461 could be observed. Since we showed that PKC and PKA targeted the same residue (Ser-172), it would be interesting to determine whether PKC could prevent assembly of the NOX1 system by the same mechanism as PKA, involving 14-3-3 protein. However, it should be noted that in intact cells, Ser-172 of NOXA1 is a much better substrate for PKA than for PKC; quantitative analysis in Fig. 4B showed that phosphorylation of Ser-172 increased by 632 \pm 58% of control in Fsk stimulated-cells while it increased by 202 \pm 6.5% of control in PMA stimulated cells. Thus, it is possible that phosphorylation of Ser-172 by PKC alone is not sufficient for interaction with 14-3-3 protein. However, we showed that phosphorylation of Ser-172 and Ser-282 synergistically down-regulate NOX1-derived ROS production and that this response might be mediated by a direct inhibitory effect on NOXA1 binding capacity to both Rac1 and NOX1 that seems to be independent of 14-3-3 protein. Indeed, NOXA1 that had been phosphorylated by MAPK and PKC showed a decrease in its interaction with NOX1(217–550) and Rac1-GTP γ S in pulldown experiments. Ser-172 and Ser-282 surround the AD, and Ser-172 is near the tetratricopeptide domain. Thus, phosphorylation of these residues might influence the accessibility of these domains to their respective targets, namely NOX1 and Rac1. However, whether phosphorylation of NOXA1 on Ser-172 and Ser-282 induces its conformational change remains to be determined.

Site-directed mutagenesis of Ser-172 and Ser-282 into alanine (a nonphosphorylatable amino acid) or into glutamic acid (a phosphomimetic amino acid) indicates that phosphorylation of NOXA1 on these residues has an inhibitory effect on NOX1 activity. This finding was confirmed further by cotransfection of a constitutively active mutant of MEK1 along with the NOX1 system, which triggers both activation of ERK1/2 and decrease of NOX1 activity. Paradoxically, we found that PMA has a stimulatory effect on NOX1 activity, although it increases phosphorylation of both Ser-172 and Ser-282. This could be explained by the fact that PMA could also act positively on other components of the NOX1 complex (such as NOXO1 β , Rac1, p22^{PHOX}, or the catalytic subunit NOX1 itself), thereby resulting in a global stimulatory effect. We actually found that PMA induced NOXO1 β phosphorylation in HEK293-transfected cells. However, we cannot exclude the possibility that PMA also acts on Rac1, p22^{phox}, or NOX1. In a recent study (54), we showed that PMA could induce phosphorylation of NOX2 in two fragments of the C-terminal cytosolic flavoprotein domain containing Ser-333, Thr-509, and Ser-550. In addition, this phosphorylation had a stimulatory effect on the catalytic activity of NOX2. Sequence alignment of NOX1 and NOX2 showed that these amino acid resi-

dues were retained in NOX1, which suggests that NOX1 might be phosphorylated under cell stimulation by PMA. Therefore, regulation of NOX1 system activity by PMA might be more complex than what was expected, the resulting response depending on a balance between negative and positive signals that is exerted on the different subunits that compose the NOX1 system. It would be interesting to determine the effect of physiological agonists, such as cytokines or pathogen-associated motif patterns (PAMPs), on the phosphorylation state of Ser-282 and Ser-172 of NOXA1 (increase of phosphorylation or dephosphorylation). Such studies, however, are limited by the unavailability of epithelial cell models that express sufficient amounts of the endogenous components of the colon NOX1 system at the protein level (NOX1, NOXA1, and NOXO1).

The present study clearly shows that phosphorylation of NOXA1 on Ser-282 and Ser-172 occurs in resting cells. Since cells were deprived of serum 18 h before labeling with [³²P]-orthophosphoric acid, it is unlikely that the basal phosphorylation was due to serum. It is probable that the basal phosphorylation of NOXA1 is physiologically relevant. The NOX1 system is considered to be a constitutive enzyme with low levels of superoxide production (5). This permanent constitutive activity could be necessary in view of a host defense function in the colon, as it is known that this tissue is normally colonized with an abundant bacterial flora. Phosphorylation of NOXA1 at the basal level in resting cells, by down-regulating NOX1 system activity, could prevent excessive ROS production, which is associated with intestinal chronic inflammation (28), while allowing an adequate level of production for host defense of the colon.

In summary, we have shown that NOX1 activity could be down-regulated through MAPK, PKC, and PKA-dependent phosphorylation of NOXA1. NOXA1 is phosphorylated by MAPK (ERK1/2 and p38MAPK) on Ser-282, while it is phosphorylated by PKC and PKA on Ser-172. Phosphorylation of NOXA1 on these sites occurs at a basal level and synergistically prevents NOX1 hyperactivation through the decrease of NOXA1 interaction with NOX1 catalytic subunit and Rac1. These results define a new critical role of NOXA1 phosphorylation in regulating NOX1 system activity. **[F]**

The authors thank Dr. Yun Soo Bae (Ewha Womans University, Seoul, Korea) for the pGEX-4T-1-NOX1 (217–550) plasmid, Dr. Alan Hall (University College, London, UK) for the pGEX-4T-3-Rac1 plasmid, and Dr. Anne Brunet and Dr. Jacques Pouyssegur (Université de Nice, CNRS UMR 6543, Nice, France) for the constitutively active MEK1-mutant plasmid. The authors are grateful to Dr. Tom Leto (NIH, Bethesda, MD, USA) for providing pcDNA3.1 plasmids encoding NOX1, NOXO1, and NOXA1 and for comments on the manuscript. M.D. is a recipient of fellowships from the French Research Ministry.

REFERENCES

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

2. Babior, B. M., Kipnes, R. S., and Curnutte, J. T. (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* **52**, 741–744
3. Groemping, Y., and Rittinger, K. (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J.* **386**, 401–416
4. Mizrahi, A., Berdichevsky, Y., Ugolev, Y., Molshanski-Mor, S., Nakash, Y., Dahan, I., Alloul, N., Gorzalczy, Y., Sarfstein, R., Hirshberg, M., and Pick, E. (2006) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex: chimeric constructs derived from the cytosolic components as tools for exploring structure-function relationships. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 881–895
5. Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K., and Lambeth, J. D. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase MOX1. *Nature* **40**, 79–82
6. Geiszt, M., Kopp, J. B., Várnai, P., and Leto, T. L. (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **9**, 8010–8004
7. Bánfi, B., Molnár, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedűs, B., Demarex, N., and Krause, K. H. (2001) A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J. Biol. Chem.* **276**, 37594–37601
8. Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G., and Lambeth, J. D. (2001) Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* **269**, 131–140
9. Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noel-Hudson, M. S., Deme, D., and Virion, A. (1999) Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs. *J. Biol. Chem.* **274**, 37265–37569
10. Lambeth, J. D. (2007) Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 332–347
11. Sheppard, F. R., Kelher, M. R., Moore, E. E., McLaughlin, N. J., Banerjee, A., and Silliman, C. C. (2005) Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 1025–1042
12. Bokoch, G. M., and Diebold, B. A. (2002) Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood* **100**, 2692–2696
13. El Benna, J., Faust, L. P., and Babior, B. M. (1994) The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J. Biol. Chem.* **269**, 23431–23436
14. Ago, T., Nunoi, H., Ito, T., and Sumimoto, H. (1999) Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J. Biol. Chem.* **274**, 33644–33653
15. Groemping, Y., Lapouge, K., Smerdon, S. J., and Rittinger, K. (2003) Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* **113**, 343–355
16. Leusen, J. H., Bolscher, B. G., Hilarius, P. M., Weening, R. S., Kaulfersch, W., Seger, R. A., Roos, D., and Verhoeven, A. J. (1994) 156Pro→Gln substitution in the light chain of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase (p22-phox) leads to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. *J. Exp. Med.* **180**, 2329–2334
17. Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D., and Sumimoto, H. (2003) Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4474–4479
18. Koshkin, V., Lotan, O., and Pick, E. (1996) The cytosolic component p47(phox) is not a sine qua non participant in the activation of NADPH oxidase but is required for optimal superoxide production. *J. Biol. Chem.* **271**, 30326–30329
19. Han, C. H., Freeman, J. L., Lee, T., Motalebi, S. A., and Lambeth, J. D. (1998) Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J. Biol. Chem.* **273**, 16663–16668
20. El-Benna, J., Dang, P. M. C., Gaudry, M., Fay, M., Morel, F., Hakim, J., and Gougerot-Pocidalo, M. A. (1997) Phosphoryla-

- tion of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. *J. Biol. Chem.* **272**, 17204–17208
21. Dang, P. M., Morel, F., Gougerot-Pocidallo, M. A., El Benna, J. (2003) Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry* **42**, 4520–4526
 22. Ambasta, R. K., Kumar, P., Griendling, K. K., Schmidt, H. H., Busse, R., and Brandes, R. P. (2004) Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **279**, 45935–45941
 23. Geiszt, M., Lekstrom, K., Witta, J., and Leto, T. L. (2003) Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 20006–20012
 24. Bánfi, B., Clark, R. A., Steger, K., and Krause, K. H. (2003) Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J. Biol. Chem.* **278**, 3510–3513
 25. Ueyama, T., Geiszt, M., and Leto, T. L. (2006) Involvement of rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2160–2174
 26. Geiszt, M., Lekstrom, K., Brenner, S., Hewitt, S. M., Dana, R., Malech, H. L., and 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. *J. Immunol.* **171**, 299–306
 27. Rokutan, K., Kawahara, T., Kuwano, Y., Tominaga, K., Sekiyama, A., and Teshima-Kondo, S. (2006) NADPH oxidases in the gastrointestinal tract: a potential role of Nox1 in innate immune response and carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1573–1582
 28. Grisham, M. B. (1994). Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* **344**, 859–861
 29. Kuwano, Y., Tominaga, K., Kawahara, T., Sasaki, H., Takeo, K., Nishida, K., Masuda, K., Kawai, T., Teshima-Kondo, S., and Rokutan, K. (2008) Tumor necrosis factor alpha activates transcription of the NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1) gene and upregulates superoxide production in colon epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 1642–1652
 30. Nauseef, W. M. (2008) Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *J. Biol. Chem.* **283**, 16961–16965
 31. Takeya, R., Ueno, N., Kami, K., Taura, M., Kohjima, M., Izaki, T., Nunoi, H., and Sumimoto, H. (2003) Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J. Biol. Chem.* **278**, 25234–25346
 32. Cheng, G., and Lambeth, J. D. (2004) NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 4737–4742
 33. Pagès, G., Brunet, A., L'Allemain, G., and Pouyssegur, J. (1994) Constitutive mutant and putative regulatory serine phosphorylation site of mammalian MAP kinase kinase (MEK1). *EMBO J.* **13**(13), 3003–3010
 34. Leammli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
 35. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354
 36. Dang, P. M., Cross, A. R., and Babior, B. M. (2001) Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3001–3005
 37. Park, H. S., Park, D., and Bae, Y. S. (2006) Molecular interaction of NADPH oxidase 1 with betaPix and Nox organizer 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**, 985–990
 38. Nakano, Y., Banfi, B., Jesaitis, A. J., Dinauer, M. C., Allen, L. A., and Nauseef, W. M. (2007) Critical roles for p22phox in the structural maturation and subcellular targeting of Nox3. *Biochem. J.* **403**, 97–108
 39. Cross, A. R., Higson, F. K., Jones, O. T., Harper, A. M., and Segal, A. W. (1982) The enzymic reduction and kinetics of oxidation of cytochrome b-245 of neutrophils. *Biochem. J.* **204**, 479–485
 40. Kennelly, P. J., and Krebs, E. G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, 15555–15558
 41. Clark-Lewis, I., Sanghera, J. S., and Pelech, S. L. (1991) Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J. Biol. Chem.* **266**, 15180–15184
 42. Cheng, G., and Lambeth, J. D. (2005) Alternative mRNA splice forms of NOXO1: differential tissue expression and regulation of Nox1 and Nox3. *Gene* **356**, 118–126
 43. Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., and Sumimoto, H. (2001) A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J. Biol. Chem.* **276**, 1417–1423
 44. Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marmé D, and Rapp, U. R. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**, 249–252
 45. Cheng, G., Diebold, B. A., Hughes, Y., and Lambeth, J. D. (2006) Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J. Biol. Chem.* **281**, 17718–17726
 46. Kim, J. S., Diebold, B. A., Babior, B. M., Knaus, U. G., and Bokoch, G. M. (2007) Regulation of Nox1 activity via protein kinase A-mediated phosphorylation of NoxA1 and 14-3-3 binding. *J. Biol. Chem.* **282**, 34787–34800
 47. Savitha, G., and Salimath, B. P. (1993) Cross-talk between protein kinase C and protein kinase A down-regulates the respiratory burst in polymorphonuclear leukocytes. *Cell. Signal.* **5**, 107–117
 48. Ottonello, L., Morone, M. P., Dapino, P., and Dallegri, F. (1995) Tumour necrosis factor alpha-induced oxidative burst in neutrophils adherent to fibronectin: effects of cyclic AMP-elevating agents. *Br. J. Haematol.* **91**, 566–570
 49. Lin, P., Welch, E. J., Gao, X. P., Malik, A. B., and Ye, R. D. (2005) Lysophosphatidylcholine modulates neutrophil oxidant production through elevation of cyclic AMP. *J. Immunol.* **174**, 2981–2989
 50. Crawford, M. A., Aylott, C. V., Bourdeau, R. W., and Bokoch, G. M. (2006) *Bacillus anthracis* toxins inhibit human neutrophil NADPH oxidase activity. *J. Immunol.* **176**, 7557–7565
 51. Yasunari, K., Kohno, M., Kano, H., Minami, M., and Yoshikawa, J. (2000) Dopamine as a novel antioxidative agent for rat vascular smooth muscle cells through dopamine D(1)-like receptors. *Circulation* **101**, 2302–2308
 52. Saha, S., Li, Y., and Anand-Srivastava, M. B. (2008) Reduced levels of cyclic AMP contribute to the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **86**, 190–198
 53. Jacob, C., Szilagy, C., Allen, J. M., Bertrand, C., and Lagente, V. (2004) Role of PDE4 in superoxide anion generation through p44/42MAPK regulation: a cAMP and a PKA-independent mechanism. *Br. J. Pharmacol.* **143**, 257–268
 54. Raad, H., Paclet, M. H., Boussetta, T., Kroviarski, Y., Morel, F., Quinn, M. T., Gougerot-Pocidallo, M. A., Dang, P. M., and El-Benna, J. (2009) Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J.* **23**, 1011–1022

Received for publication October 5, 2009.
Accepted for publication January 7, 2010.

Résultats supplémentaires: Etude de la phosphorylation de NOXA1: l'activation de NOX1 par le fMLF est associée à la déphosphorylation de NOXA1.

Dans la première partie de ce travail, qui a fait l'objet de l'article mentionné précédemment, nous avons démontré que la phosphorylation de NOXA1 sur la Sérine172 par les PKC et PKA et sur la Sérine 282 par les MAPK ERK1/2 et p38MAPK constitue un mécanisme de régulation négative de l'activité constitutive du complexe NOX1. Dans cette deuxième partie, nous avons voulu déterminer l'effet d'agonistes physiologiques sur l'état de phosphorylation de NOXA1 et par conséquent sur l'activation du complexe NOX1. Ces agonistes sont le fMLF (formyl-méthionyl-leucine-phénylalanine; un peptide d'origine bactérienne) et l'IGF1 (l'Insulin like **G**rowth **F**actor 1); les récepteurs qu'ils activent étant le fPR-1 et l'IGF1R respectivement.

Le récepteur du fMLF dénommé fPR (formyl peptide receptor) est un récepteur à 7domaines transmembranaires couplé aux protéines G trimériques. Il est principalement exprimé dans les cellules phagocytaires où il est impliqué dans l'activation de plusieurs voies de signalisation: Par sa sous-unité $G_{\alpha i}$, il permet d'activer Ras et par conséquent les MAPK ainsi que les phospholipases C et D responsables de l'activation des PKC. Sa sous-unité γ médie l'activation de la PI3K (Phosphatidyl Inositol 3kinase) et la sous-unité β celle de Ser/Thréo-kinases et phosphatases et de Tyr- kinases et Tyr-phosphatases **[Bokoch 1995]**.

Il est bien connu que les peptides formylés, tels que le fMLF, produits par les bactéries de la lumière intestinale, constituent aussi de puissants agonistes des fPR et il a été démontré que l'épithélium colique humain qui exprime abondamment NOX1, possède également un pool fonctionnel de récepteurs au fMLF localisés au niveau du pôle apical des cellules épithéliales intestinales **[Babbin 2007]**. Or, il est intéressant de noter que le fMLF, qui stimule la production de FRO par NOX2 dans les PN, augmente la phosphorylation de la $p67^{PHOX}$, l'homologue phagocytaire de NOXA1 **[El Benna 1997, Forbes 1998]**. L'effet du fMLF est médié par une protéine tyrosine kinase situé en amont de MEK1/2 **[Dang 2011]**.

Quant au récepteur de l'IGF1, il s'agit d'un récepteur à activité tyrosine kinase qui fait partie de la famille du récepteur de l'insuline. Il est exprimé de façon endogène dans les cellules épithéliales du colon où il serait impliqué dans le processus de cancérisation de par son rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire **[Sekharam 2003]**. Sa signalisation est principalement médiée par les voies de la PI3K/Akt (Akt ou encore PKB pour protéine kinase B) via l'IRS-1 (insulin receptor substrate 1) et des MAPK via Ras **[Peruzzi 1999]**.

Etant donné que NOXA1 est phosphorylée par ERK1/2, la kinase en aval de MEK1/2, nous avons voulu déterminer si le fMLF régule la phosphorylation de NOXA1 et donc l'activation de NOX1, pour cela, nous avons transfecté de manière stable le récepteur fPR-1 fusionné à la protéine YFP (yellow fluorescent protein) dans les cellules HEK293 et reconstitué le système NOX1 complet dans ces cellules. Dans un premier temps nous avons vérifié que le récepteur était bien exprimé. L'analyse par microscopie confocale montre que les cellules transfectées avec le récepteur fPR-1-YFP ont une fluorescence localisée à la membrane plasmique comme attendu, indiquant ainsi une bonne expression du fPR-1 (figure 1). Ces cellules produisent de façon constitutive les FRO et leur stimulation par le fMLF à 10^{-6} M, augmente encore plus cette production (figure 2). De façon intéressante, l'activation de NOX1 est associée à une déphosphorylation de NOXA1 comme le montrent les expériences d'immunoprécipitation réalisées avec l'anticorps spécifique de NOXA1 (Figure 3). Cet effet n'est pas restreint au fMLF. En effet, nous montrons par ces expériences préliminaires que l'IGF1, qui est aussi exprimé dans les cellules HEK293 entraîne également une déphosphorylation de NOXA1 (Figure 4).

En conclusion, ces résultats préliminaires montrent que les agonistes physiologiques tels que le fMLF ou l'IGF1 pourraient activer NOX1 via la déphosphorylation de NOXA1.

Figure S1. Expression stable du récepteur fPR-1 dans les cellules HEK293: localisation à la membrane plasmique.

3 µg du plasmide pEYFP contenant le cDNA entier de fPR-1 fusionnée à l'YFP ainsi que le gène de résistance à la néomycine ont été transfectés dans les cellules HEK293. Les clones positifs ont été sélectionnés avec 750 µg/mL de G418. L'expression stable du récepteur fPR dans les HEK293 est confirmée par fluorescence à une longueur d'onde excitatrice de 514nm (spécifique de l'YFP, émission à 527 nm).

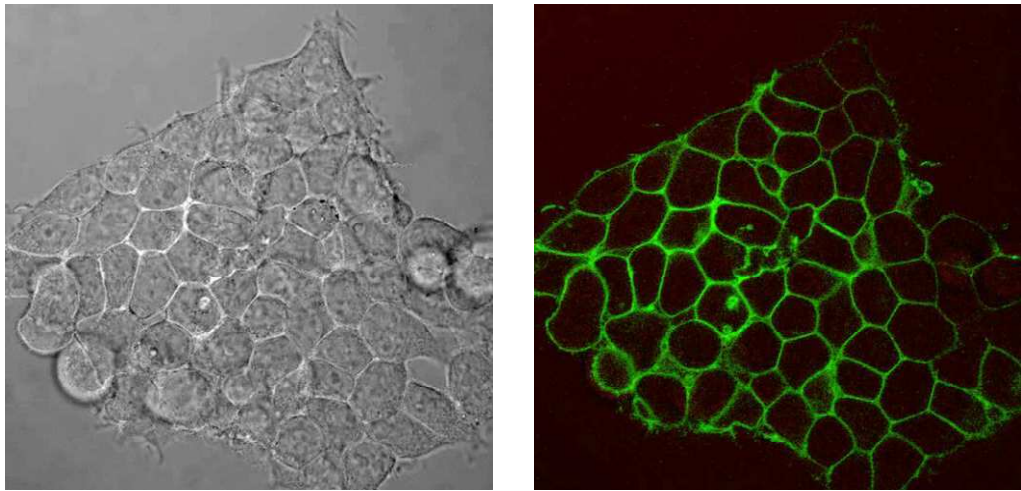


Figure S1

Figure S2. La stimulation des cellules HEK293 par le fMLF potentialise l'activité de NOX1.

Les cellules HEK293 exprimant de manière stable le fPR-1 ont été co-transfectées avec les plasmides pcDNA3.1 (NOX1), pcDNA3.1 (NOXA1) et pcDNA3.1 (NOXO1 β) ou avec le plasmide contrôle pcDNA3.1. La production de FRO est mesurée par chimioluminescence amplifiée au luminol. Pour cela, 200 000 cellules ont été pré-incubées 15 minutes à 37°C dans 0.5 mL de milieu DM EM sans sérum et sans rouge de phénol contenant 10 μ M final de luminol et 2.5 U/mL de HRPO, puis stimulées ou non avec 10⁻⁶M final de fMLF. L'activité des cellules a été mesurée toutes les 40 secondes pendant 30 minutes.

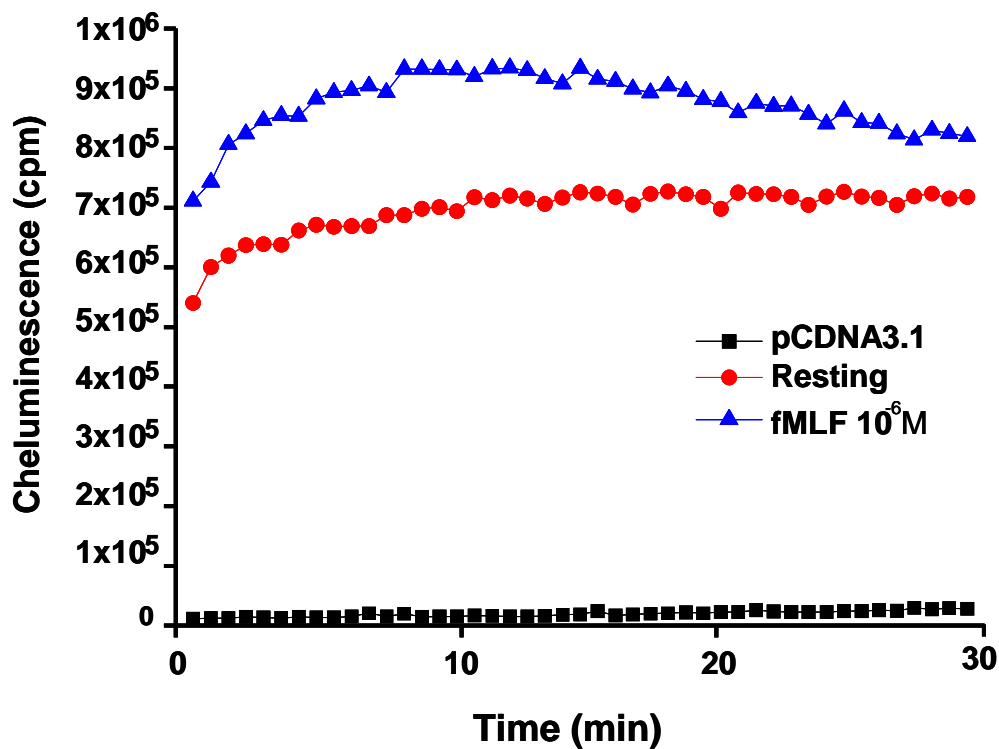


Figure S2.

Figure S3. La stimulation des cellules HEK293 par le fMLF entraîne une déphosphorylation de NOXA1.

Les cellules HEK293 exprimant de manière stable le fPR-1 ont été co-transfectées avec les plasmides pcDNA3.1 (NOX1), pcDNA3.1 (NOXA1) et pcDNA3.1 (NOXO1 β), chargées par l'acide orthophosphorique ^{32}P [H_3PO_4] à 37°C pendant 1h20 et stimulées ou non avec 10^{-6}M de fMLF pendant 5, 10 ou 15 minutes à 37°C. Les cellules ont été ensuite lysées et NOXA1 a été immunoprécipitée avec un anticorps spécifique. *En bas*: immunoblot des lysats totaux; *en haut*: autoradiographie de NOXA1 immunoprécipitée. Les données sont représentatives de 3 expériences.

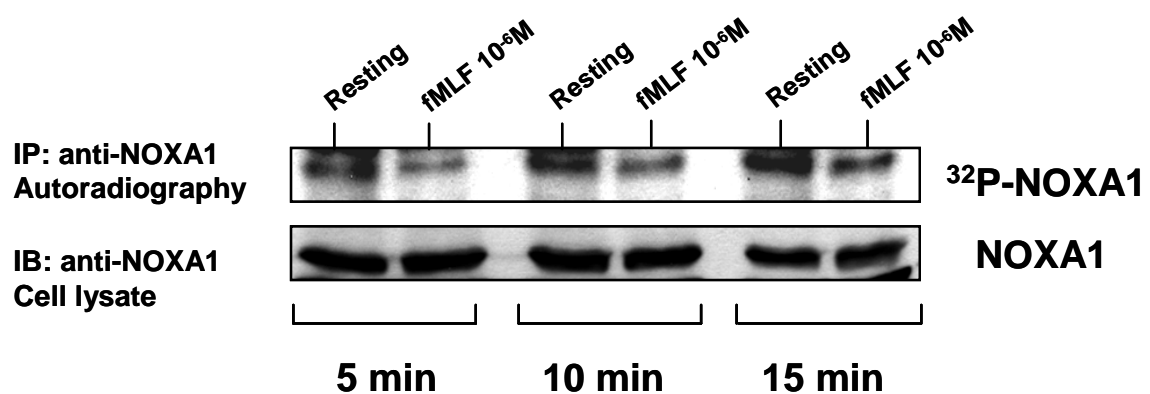


Figure S3.

Figure S4. La déphosphorylation de NOXA1 n'est pas restreinte au fMLF, l'Insulin Growth Factor 1 (IGF-1) entraîne également la déphosphorylation de NOXA1.

Les cellules HEK293 ont été co-transfectées avec les plasmides pcDNA3.1 (NOX1), pcDNA3.1 (NOXA1) et pcDNA3.1 (NOXO1 β), chargées par l'acide orthophosphorique ^{32}P [H_3PO_4] à 37°C pendant 1h20 et et stimulées ou non avec 100 nM d'IGF-1 pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules ont été ensuite lysées, et NOXA1 immunoprécipité avec un anticorps spécifique. *En bas*: immunoblot des lysats totaux; *en haut*: autoradiographie de NOXA1 immunoprécipitée. Le contrôle négatif correspond aux cellules transfectées avec le plasmide pcDNA3.1 sans insert.

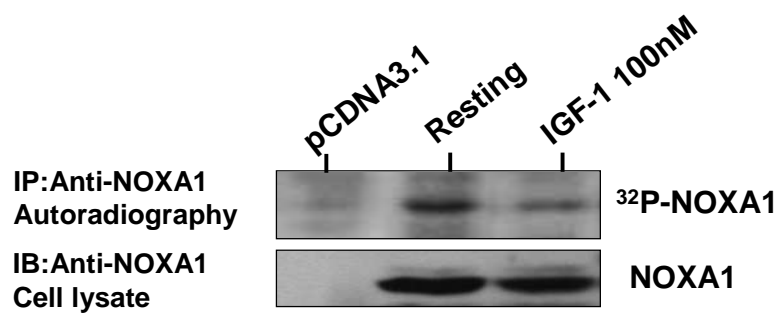


Figure S4.

Article 2: NOXO1 β est phosphorylée et sa phosphorylation potentialise l'activité de la NADPH oxydase NOX1

Dans cette deuxième partie du travail, nous nous sommes intéressés à la sous-unité organisatrice NOXO1, l'homologue de la p47^{PHOX}. Ces deux protéines partagent les mêmes motifs structuraux: un domaine PX, un tandem SH3 (SH3_A et SH3_B) et une région PRR. La principale différence entre ces deux protéines réside dans la région auto-inhibitrice (ou AIR) qui est présente dans la p47^{PHOX} mais absente dans NOXO1. Dans la p47^{PHOX}, ce domaine entraîne un repliement intramoléculaire qui empêche toute interaction de la protéine avec la p22^{PHOX} et les phosphoinositides membranaires. C'est la phosphorylation de la p47^{PHOX} sur plusieurs sérines localisées dans ce domaine qui va permettre de rompre le repliement intramoléculaire et d'initier l'assemblage du complexe NOX2 au niveau de la membrane plasmique.

L'absence du domaine AIR dans NOXO1 combinée au fait que le complexe NOX1 soit constitutivement actif (de par la localisation constitutive à la membrane de NOXO1) lorsqu'il est transfecté dans différentes lignées cellulaires, a laissé penser que la phosphorylation de NOXO1 n'est pas nécessaire pour l'activation de NOX1 bien que ceci n'ait jamais été clairement établi. **Nous avons donc entrepris, au cours de ce deuxième travail, de déterminer si NOXO1 β (l'isoforme la plus abondamment exprimée dans le colon) était phosphorylée dans les cellules HEK293 transfectées, et si tel est le cas d'en étudier les conséquences sur l'assemblage et l'activation du complexe NOX1.**

Nos résultats montrent que NOXO1 β est phosphorylée au cours de l'activation des cellules par le PMA *via* les PKC. Par mutagenèse dirigée et carte phosphopeptidique, nous avons identifié la sérine 154 comme étant le site majoritairement phosphorylé. Dans les cellules stimulées par le PMA, la phosphorylation de NOXO1 β sur la sérine 154 favorise ses interactions à NOXA1 et à la p22^{PHOX}, augmente sa localisation membranaire et potentialise l'activité de NOX1. Ainsi, la mutation de la sérine 154 en alanine, résidu non phosphorylable, est suffisante pour prévenir tous ces effets. De façon intéressante, des expériences de pull-down révèlent que l'interaction de NOXO1 β à la p22^{PHOX} est un processus finement régulé. En effet, nous montrons que la phosphorylation de NOXO1 β ne suffit pas, par elle-même, à favoriser son interaction avec la p22^{PHOX}; cette interaction nécessite la présence simultanée de

NOXA1. En revanche la phosphorylation de NOXO1 β est suffisante à elle seule pour augmenter très fortement son interaction à NOXA1. Un modèle d'activation de NOX1 est proposé à partir de ces données.

L'ensemble de ces résultats montre, pour la première fois, que NOXO1 β est phosphorylée au cours de l'activation des cellules par le PMA. Cette phosphorylation a lieu sur la Sérine 154 et est indispensable pour permettre une interaction optimale entre NOXO1 β et ses partenaires NOXA1 et la p22^{PHOX} et donc une activation optimale de NOX1. Cette étude identifie un nouveau mode de régulation de NOX1.

Ces travaux font l'objet d'un article en cours de soumission:

Debbabi M, Kroviarski Y, Bournier O, Gougerot-Pocidal MA, El-Benna J and Dang PM. Phosphorylation of NOXO1 on serine 154 is a prerequisite for its full interaction with NOXA1 and p22^{PHOX} and thus NOX1 hyperactivation.

**Phosphorylation of NOXO1 on serine 154 is a prerequisite for full interaction with
NOXA1 and p22^{PHOX} and thus NOX1 hyperactivation**

Maya Debbabi^{1,2,3}, Yolande Kroviarski^{1,2,4}, Odile Bournier^{1,2,4}, Marie-Anne Gougerot-Pocidallo^{1,2,4}, Jamel El-Benna^{1,2} and Pham My-Chan Dang*^{1,2}

¹INSERM U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3, Paris F-75018, France

²Université Paris 7 site Bichat, UMR 773, Paris F-75018, France

³ Université de Paris-Sud, Orsay F-91405, France

⁴AP-HP, Centre Hospitalier Universitaire Xavier Bichat, CIB Phenogen, Paris F-75018, France

* Corresponding author: Dr. Pham My-Chan Dang, INSERM U773, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. Phone: 33-157-27-74-72; Fax: 33-157-27-74-61; E-mail: my-chan.dang@inserm.fr

Word count: 28415

Abstract

NADPH oxidase 1 (NOX1) is mainly expressed in colon epithelial cells and could be involved in mucosal innate immunity. NOX1 activation requires interaction between NOXO1 (NOX Organizer 1) and the membrane-bound component, p22^{PHOX}, and the presence of NOXA1 (NOX Activator 1). Contrary to its phagocyte counterpart NOX2, which is tightly regulated by phosphorylation events, the molecular basis of NOX1 regulation is unclear. Here we demonstrate that phosphorylation of human NOXO1 is a previously unrecognized mechanism required to fully activate NOX1, through a process that involves enhanced binding to NOXA1 and to p22^{PHOX}. We show that PMA stimulates NOXO1 phosphorylation in HEK-293 transfected cells *via* PKC, and identify Ser-154 as the major phosphorylated site. In PMA-stimulated cells, phosphorylation of NOXO1 on Ser-154 promoted its binding to NOXA1 and to p22^{PHOX}, increased its plasma membrane localization, and induced NOX1 hyperactivation. Mutation of Ser-154 to alanine, a non phosphorylatable residue, prevented all these events. Furthermore, pull-down experiments revealed that NOXO1 binding to p22^{PHOX} is a tightly regulated process that requires not only NOXO1 phosphorylation but also the simultaneous presence of NOXA1, indicating a synergistic effect between these two events. In contrast, phosphorylation of NOXO1 alone is sufficient to markedly enhance the binding capacity of NOXO1 to NOXA1. Together, these findings demonstrated that NOXO1 phosphorylation on serine 154 is a prerequisite for optimal NOXO1 interaction with NOXA1 and p22^{PHOX}, and hence for NOX1 hyperactivation, thus unravelling a new mechanism of NOX1 regulation.

\body

Introduction

The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases (or NOX) are a unique family of enzymes dedicated to the production of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), through single-electron reduction of molecular oxygen with NADPH as the electron donor (1). This family includes NOX1-5, DUOX1 and DUOX2 and has been defined on the basis of its members' structural homology with gp91^{PHOX} (now renamed NOX2), the catalytic core of the phagocyte NADPH oxidase.

ROS production by the phagocyte NADPH oxidase is a cornerstone of host defenses against microbial infection (2). However, with the discovery of different NOX family members and their distinct tissue distributions, ROS have recently been recognized as important mediators of various cellular and biological functions, including signalling and innate immunity (3). However, inappropriate or excessive ROS production by NOX enzymes can contribute to a wide variety of diseases, many of which are related to inflammatory disorders, such as rheumatoid arthritis (RA) and inflammatory bowel disease (IBD) (4, 5).

ROS are therefore a double-edged sword, and the phagocyte NADPH oxidase NOX2 is known to be tightly regulated. NOX2 is composed of a number of cytosolic and membrane-bound proteins: p67^{PHOX}, p47^{PHOX}, p40^{PHOX}, and Rac1/Rac2 in the cytosol, and gp91^{PHOX} and p22^{PHOX} (which together comprise cytochrome b₅₅₈), in the membrane. When activation takes place, p47^{PHOX}, p67^{PHOX} and p40^{PHOX}, which form a trimeric complex, become phosphorylated and then migrate to the membranes, together with Rac1/2, where they associate with cytochrome b₅₅₈ to assemble the catalytically active oxidase (6, 7). Phosphorylation of p47^{PHOX} on 7 to 8 sites in the autoinhibitory region (AIR) (8), located in its C-terminus, is of special importance, as it disrupts the autoinhibitory internal interactions

that exist within the protein (9), thus releasing the two central SH3 (Src homology 3) domains and the N-terminus PX (Phox) domain of p47^{PHOX}. This allows these p47^{PHOX} domains to interact with the proline-rich region (PRR) of p22^{PHOX} and the membrane phosphoinositides (6), respectively, thereby promoting the assembly of active NADPH oxidase.

NADPH oxidase 1 (NOX1), the first identified homologue of gp91^{PHOX} (10), is the NOX family member most closely related to NOX2 in terms of its structure and function. It interacts with p22^{PHOX} (11), and its activation also requires binding with the following regulatory partners: NOX organizer 1 (NOXO1), the homologue of p47^{PHOX}; NOX activator 1 (NOXA1), the homologue of p67^{PHOX} (12); and Rac1 GTPase (13). NOX1, NOXO1 and NOXA1 are abundantly expressed in colon epithelial cells, where they could be involved in mucosal innate immunity in physiological conditions (12, 14). However, the mechanisms regulating NOX1 activation remain obscure, and have mainly been inferred from structural homologies or differences between NOX1 and NOX2. In various cell lines transfected with human NOX1, NOXO1 and NOXA1 cDNA, superoxide is constitutively produced at a low level (12). This has been attributed to permanent association of NOXO1 with P22^{PHOX} and membrane phosphoinositides, due to the lack of the AIR domain in NOXO1 (15, 16). It is currently accepted that NOXO1 is not regulated by phosphorylation, and that NOX1 activation occurs without NOXO1 phosphorylation.

However, we demonstrate here that the mechanisms controlling NOX1 activation are far more complex than previously believed: NOXO1 phosphorylation on serine 154 by protein kinase C (PKC) is a prerequisite for its optimal NOXO1 interaction with NOXA1 and p22^{PHOX}, and thus for full activation of NOX1.

Results

NOXO1 is phosphorylated on serine 154 in PMA-activated HEK-293 cells

A functional NOX1 system was reconstituted in HEK-293 cells by transfection with NOX1, NOXA1 and NOXO1 β plasmids (NOXO1 β is the most abundant and active isoform; ref 17). Labeling of transfected HEK-293 cells with [32 P]-orthophosphate, followed by immunoprecipitation of NOXO1 β with a specific antibody that we have developed, showed that NOXO1 β was strongly phosphorylated in PMA-stimulated cells, whereas it was only weakly phosphorylated in resting cells (Fig. 1A). Phosphorylation of NOXO1 β in PMA-stimulated cells occurred exclusively on serine residues (Fig. 1B) located in several peptides (designated a, b, c, d, e and f) (Fig. 1C), as demonstrated by phosphoamino acid analysis and phosphopeptide mapping, respectively. As PMA may activate PKC directly and MAPK kinases indirectly (18), we synthesized recombinant NOXO1 β (Fig S1 A) and analyzed its phosphorylation by these kinases *in vitro*. As shown in Figure S1 B, NOXO1 β was phosphorylated by PKC but not by the MAP kinases p38MAPK and ERK2. The K_m value of PKC for NOXO1 β , calculated from a lineweaver-Burk representation of the phosphorylation of NOXO1 β at various concentrations (Fig S1 C), was 2 μ M, indicating that NOXO1 β is a good substrate for PKC. NOXO1 β phosphorylation by PKC *in vitro* occurred on serine residues (Fig S1 D) and on the same peptides (Fig S1 E) as in intact cells. Therefore, PMA-induced phosphorylation of NOXO1 β probably involves PKC but not MAPK. Sequence analysis of NOXO1 β indicated the presence of more than ten serine residues with a high probability score for being targeted by PKC. We replaced these serines (Ser-27, Ser-31, Ser-41, Ser-66, Ser-86, Ser-112, Ser-154, Ser-157, Ser-162, Ser-229, Ser-245, Ser-246, Ser-331) by alanine, a nonphosphorylatable amino acid, then cotransfected each NOXO1 β mutant into HEK293 cells along with NOX1 and NOXA1, and analyzed their phosphorylation by

phosphopeptide mapping after cell stimulation with PMA. As shown in Figure 2, only mutation of Ser-154 led to the loss of several peptides (b, d and f) as compared to wild-type NOXO1 β (NOXO1 β *wt*). The phosphopeptide maps of the other mutants were not modified (Fig. 2). All the NOXO1 β mutants were expressed at levels equivalent to that of the wild-type protein, except for mutants S31A and S41A (Fig. S2) which were more weakly expressed. Together, these data demonstrated that Ser-154 was the major phosphorylated site on NOXO1 β in PMA-stimulated cells, and that its phosphorylation involved PKC.

NOXO1 β phosphorylation increases its interaction with NOXA1 and p22^{PHOX}.

As NOXO1 β interaction with the cytosolic subunit NOXA1 and the membrane component p22^{PHOX} is crucial for NOX1 activation (15), we investigated the impact of PKC-mediated NOXO1 β phosphorylation on these interactions. Interaction with NOXA1 was examined first, in pull-down experiments with GST-NOXA1 and recombinant NOXO1 β , phosphorylated or not with PKC. As shown in Figure 3 A, phosphorylated NOXO1 β ([P] NOXO1 β) exhibited a massive increase in its NOXA1 binding capacity. The same phenomenon was observed whether NOXA1 was phosphorylated (GST-[P] NOXA1) or not (Fig. 3 A) (19). Interaction with p22^{PHOX} was then analyzed. Pull-down experiments were performed with GST-p22^{PHOX} (132-195), that contains the proline-rich region (PRR) domain involved in interaction with NOXO1 β . Phosphorylated and nonphosphorylated NOXO1 β bound similarly and weakly to GST-p22^{PHOX}, while no interaction was seen with GST control (Fig. 3 B). Interestingly, however, phosphorylated NOXO1 β ([P] NOXO1 β) binding to p22^{PHOX} increased markedly in the presence of NOXA1, while no such effect was seen with nonphosphorylated NOXO1 β (Fig. 3 B). It is unlikely that the NOXA1 effect was mediated by direct interaction of NOXA1 with p22^{PHOX}, as pull-down experiments with recombinant GST-p22^{PHOX} (132-195) and NOXA1 showed no interaction between these two proteins (Fig. 3 C). Together, these data

show that optimal binding of NOXO1 β to p22^{PHOX} requires not only phosphorylation of NOXO1 β but also the simultaneous presence of NOXA1, indicating a synergistic effect between these two events. In contrast, phosphorylation of NOXO1 alone is sufficient to directly increase its NOXA1 binding capacity.

Phosphorylation of Ser-154 on NOXO1 β is required for optimal binding of NOXO1 β to NOXA1 and to p22^{PHOX} in PMA-stimulated cells, and thus for NOX1 hyperactivation.

As Ser-154 was the major phosphorylated site on NOXO1 β in intact cells, we examined whether its phosphorylation was required for full binding to NOXA1 and to p22^{PHOX} in PMA-stimulated cells. HEK293 cells were co-transfected with NOXO1 β _{wt} or the NOXO1 β -S154A mutant, along with NOX1 and NOXA1. First, interaction with NOXA1 was analyzed in resting and PMA-stimulated cells in co-immunoprecipitation experiments with a NOXO1 β -specific antibody, followed by NOXA1 detection in the co-immunoprecipitate. As the heavy chain of the NOXO1 β antibody used for co-immunoprecipitation might interfere with the NOXA1 signal, we used a peroxidase-conjugated secondary antibody that was light-chain-specific (Fig. S3 A, *right*). As shown in figure 4 A and figures S3 A and B, interaction between NOXO1 β _{wt} and NOXA1 was observed at a basal level in resting cells, and increased in PMA-stimulated cells. Interestingly, replacement of NOXO1 β Ser-154 by alanine prevented this increase (Fig. 4 A), indicating that PMA-induced phosphorylation of Ser-154 on NOXO1 β is required for full interaction between NOXO1 β and NOXA1 in intact cells. We then examined interaction with p22^{PHOX}. HEK293 transfected cells were stimulated or not with PMA, then cell lysates were prepared and incubated with GST-p22^{PHOX} (132-195). As shown in figures 4 B, S3 C and S3 D, NOXO1 β _{wt} from PMA-treated cells bound to GST-p22^{PHOX} (132-195), whereas NOXO1 β _{wt} from resting cells did not. Interestingly, neither NOXO1 β -S154A from PMA-treated cells nor

NOXO1 β -S154A from resting cells bound GST-p22^{PHOX} (132-195) (Fig. 4 B). This indicated that PMA-induced phosphorylation of NOXO1 β Ser-154 was required for NOXO1 β binding to p22^{PHOX} in intact cells. Confocal microscopy showed more distinct plasma membrane localization of NOXO1 β _{wt} in PMA-stimulated cells than in resting cells (Fig. 4C). This was not the case of NOXO1 β -S154A, which tended to localize in intracellular structures (Fig. 4C) of PMA-stimulated cells. Together, these data demonstrate that PMA-induced phosphorylation of Ser-154 on NOXO1 β in intact cells is required for optimal binding of NOXO1 β to NOXA1 and to p22^{PHOX}, and that phosphorylation at this site increases the membrane localization of NOXO1 β . Finally, we examined the consequences of NOXO1 β -Ser-154 phosphorylation on NOX1-mediated ROS production. As previously described (19), NOX1 activity was constitutive but was increased by cell stimulation with PMA (Fig. 4 D). Replacement of NOXO1 β Ser-154 by alanine not only inhibited ROS production by NOX1 in resting cells but also prevented the PMA-induced increase in ROS production by NOX1 (Fig. 4 D). Indeed, PMA stimulation did not significantly increase NOX1 activity in cells transfected with NOXO1 β -S154A. Therefore, in addition to being necessary for NOXO1 β binding to NOXA1 and to p22^{PHOX}, phosphorylation of Ser-154 on NOXO1 β is also important for NOX1 hyperactivation under PMA stimulation.

Discussion

We demonstrate that NOXO1 β phosphorylation is a previously unrecognized mechanism required to fully activate NOX1, through a process that involves increased binding to NOXA1 and to p22^{PHOX}. We show that PMA induces NOXO1 phosphorylation in HEK-293 transfected cells *via* PKC, and identify Ser-154 as the major phosphorylated site. In PMA-stimulated cells, NOXO1 phosphorylation on Ser-154 promoted NOXO1 binding to NOXA1 and to p22^{PHOX}, increased its plasma membrane localization, and induced NOX1

hyperactivation. Furthermore, we show that binding of NOXO1 β to p22^{PHOX} is a tightly regulated process that requires not only NOXO1 β phosphorylation but also the simultaneous presence of NOXA1, indicating a synergistic effect between these two events. In contrast, phosphorylation of NOXO1 alone is sufficient to directly increase its NOXA1 binding capacity.

The organizer proteins NOXO1 and p47^{PHOX} exhibit similar structural features, including a PX domain, tandem SH3 domains (SH3A and SH3B) and a PRR domain. However, a major difference between these proteins is the lack of the AIR domain in NOXO1. In p47^{PHOX}, unless phosphorylation occurs, the AIR domain is responsible for the auto-inhibited conformation, which prevents p47^{PHOX} interaction with p22^{PHOX} and membrane phosphoinositides. Because the AIR domain is absent from NOXO1, it has been suggested that NOXO1 does not possess an auto-inhibited conformation. This led to the view that NOXO1 is not regulated by phosphorylation and that NOX1 activation occurs without NOXO1 phosphorylation (12, 15). Indeed, NOXO1 constitutively associates with the plasma membrane and NOX1 is constitutively active in resting cells (12, 13, 15, 16). Here, however, we demonstrated that phosphorylation of NOXO1 β on serine 154 by PKC is a prerequisite for its optimal interaction with NOXA1 and p22^{PHOX}, and consequently for full activation of the NOX1 system. In particular, we found that NOXO1 β interaction with p22^{PHOX} is tightly regulated: it requires not only NOXO1 β phosphorylation but also the simultaneous presence of NOXA1. Indeed, neither NOXO1 β phosphorylation alone nor the presence of NOXA1 alone was sufficient to enhance NOXO1 β binding to p22^{PHOX} in pull-down experiments, whereas both events together markedly enhanced NOXO1 β interaction with p22^{PHOX} (Fig. 3 B), indicating a synergistic effect. In contrast, NOXO1 β phosphorylation was alone sufficient to directly increase NOXO1 β binding to NOXA1. Confocal microscopy indicated that although NOXO1 β localized mainly at the plasma membrane in resting cells, PMA-induced

phosphorylation of Ser-154 further increased this membrane localization (Fig. 4 C). To our surprise, however, NOXO1 β_{wt} from resting cell lysates showed no significant binding to p22^{PHOX} (Fig. 4 B and S3 C and D), despite its mainly plasma membrane localization (Fig. 4 C). This suggests that NOXO1 β is maintained on the membrane essentially through its PX domain in resting cells, in keeping with a report from Cheng *et al*, who showed that a point mutation in the PX domain of NOXO1 was sufficient to prevent its lipid binding and membrane localization (16).

Two recent studies suggest that an intramolecular interaction exists within NOXO1, and that it might involve the tandem SH3 and PRR domains (20, 21). This intramolecular interaction has been proposed to prevent binding of NOXO1 tandem SH3 and PRR domains to p22^{PHOX} (20, 21) and NOXA1 (20), respectively. This implies that a conformational change that disrupts tandem SH3-PRR interaction within NOXO1 is required to trigger full assembly and activation of the NOX1 oxidase complex. Our findings suggest that phosphorylation of Ser-154 on NOXO1 β could be the mechanism that induces this conformational change. It is interesting to note that Ser-154 lies just upstream of the tandem SH3 domain and that in mouse NOXO1 this residue is replaced by an aspartic acid, an amino acid which mimics phosphorylation. This could explain why ROS production by human NOX1, contrary to mouse NOX1, can be further enhanced by PMA. Interestingly, Dutta *et al* (21) showed that the inhibitory effect of the C-terminal tail of NOXO1 containing the PRR domain is less pronounced in the mouse protein than in the human protein, and that mouse NOXO1 binds p22^{PHOX} more strongly (Kd 0.78 μ M) than human NOXO1 (Kd 17.5 μ M).

Taking all these data into account, we propose the following model of human NOX1 activation (Fig. 5). 1) In resting cells, NOXO1 is in an auto-inhibited conformation that involves intramolecular interaction between the tandem SH3 and PRR domains; therefore NOXO1 interaction with p22^{PHOX} and NOXA1 is very weak. In this conformation, NOXO1 localizes to the plasma membrane mainly through its PX domain. This allows low-level ROS

production by NOX1, thus ensuring biological processes such as host defense of the colon. 2) When cells are stimulated by PMA (or other agonists), NOXO1 is phosphorylated on Ser-154, just upstream of the tandem SH3 domain. This triggers a conformational change in NOXO1, leading to high-affinity interaction with NOXA1. However, this phosphorylation is not sufficient by itself to induce strong binding to p22^{PHOX}. 3) It is the binding of NOXA1 to phosphorylated NOXO1 which fully opens NOXO1, thereby allowing high-affinity interaction between NOXO1 and p22^{PHOX}. As a result, NOX1 becomes fully active and produces large amounts of ROS. By this means, NOX1 could respond to danger signals such as bacterial overload in the colon, but could also contribute to inflammatory bowel diseases. In conclusion, we demonstrate that the mechanisms controlling NOX1 activation are far more complex than previously believed, and that NOXO1 phosphorylation on serine 154 by protein kinase C (PKC) is a prerequisite for its interaction with NOXA1 and p22^{PHOX} and, consequently, for full activation of NOX1.

Materials and Methods

Plasmids and reagents

PCDNA3.1 plasmids encoding human NOX1, NOXA1 and NOXO1 β were provided by Dr. Leto T. (NIH, Bethesda, MD, USA). Antibodies directed against NOXA1 and NOXO1 were produced and purified as previously described (19). Active recombinant P42MAPK was from New England Biolabs, p38MAK from Upstate, and PKC from Promega (Charbonnières-les-Bains, France). ATP γ [³²P] and ³²P-orthophosphoric acid were from PerkinElmer. All the other biochemical reagents were from Sigma unless otherwise mentioned.

Cell culture and transfection

HEK293 cells were cultured in MEM (Invitrogen) containing 10% FBS. Transient transfection with plasmids encoding NOX1, NOXA1 and NOXO1 β was carried out using FuGene HD (Roche) as previously described (19).

Site-directed mutagenesis of NOXA1

Site-directed mutagenesis of NOXO1 was performed using the QuickChange II site-directed mutagenesis kit with primers described in *SI Tab I*.

³²P labeling, stimulation, immunoprecipitation and Western blotting

Transfected HEK293 cells were labeled with 0.1 mCi/ml of [³²P] orthophosphate in serum- and phosphate-free medium for 90 min at 37°C, then stimulated or not with PMA (500 ng/ml) and lysed. NOXO1 was immunoprecipitated with an anti-NOXO1 antibody (1/200) in the presence of immobilized protein A agarose from Thermo Fisher Scientific, using previously described procedures (19). The immunoprecipitate was analyzed by electrophoresis and immunoblotting as in (19). Phosphorylated NOXO1 was detected by autoradiography.

***In vitro* phosphorylation assay**

In vitro phosphorylation assays of NOXO1 and p47^{PHOX} by ERK2, p38MAPK or PKC in the presence 100 μ M ATP and 3 μ Ci of γ [³²P]ATP were carried out as described in (19).

Phosphoamino acid analysis and two-dimensional tryptic phosphopeptide mapping

³²P-labeled NOXO1 was subjected to phosphoamino acid analysis and two-dimensional tryptic phosphopeptide mapping using standard procedures developed in our laboratory (19).

GST pull-down assay

Recombinant NOXO1 β , NOXA1, GST-NOXA1 and GST-p22^{PHOX} (132-195) were expressed in *E. coli* and purified as previously described (19). NOXO1 (244 nM, phosphorylated or not with PKC) was incubated with GST, GST-p22^{PHOX} (132-195) or GST-NOXA1 for 30 min at 4°C in interaction buffer (PBS pH 7.4, 10 mM DTT and 0.1% TX-100). Glutathione sepharose beads were then added and incubation was continued for a further 1 hour at 4 °C. After washing, the complex was eluted with 10 mM glutathione and analyzed by SDS-PAGE and western blot using protein-specific antibodies.

Confocal microscopy

Transfected HEK-293 cells were cultured on Lab-tek chamber slides, treated with PMA, then fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 10 min at 4°C and blocked with 0.1% BSA in PBS. Cells were then incubated for 1 h at RT with rabbit anti-NOXO1 antibody (1:100). After washing, cells were incubated with Alexa Fluor 488-(green)-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:200) for 1 h at room temperature in the dark. Stained cells were examined with a Zeiss LSM510 confocal microscope (63/1.4 numerical aperture objective) and the images were imported into an LSM image browser for analysis.

ROS production assays

HEK293 cells transfected with NOXO1 wt or NOXO1-S154A, along with NOX1 and NOXA1, were detached using non enzymatic cell dissociation solution from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). ROS production was measured in terms of luminol-amplified chemiluminescence in the presence of horseradish peroxidase (HRPO) in the luminometer's thermostated chamber (Berthold-Biolumat LB937) (19).

Statistical Analysis

All results are expressed as means \pm SEM. Significant differences were identified with Student's *t* test and by one-way ANOVA followed by Scheffe's post-hoc test when multiple variables were analyzed (significance threshold $p < 0.05$).

Footnotes

M.D. performed research and analyzed the data; Y.K. and O.B. performed research, M-A.G.P. helped to design research and to analyze data; J.E.B. helped to design research, to analyze data and to write the paper, P. M-C. D. Designed research, analyzed data and wrote the paper.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM and CNRS. M. Debbabi is the recipient of fellowships from The French Research Ministry.

References

- [1] Lambeth JD. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* Mar; 4(3):181-189.
- [2] Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J.Clin.Invest.* 52: 741-744.
- [3] Bedard K, Krause KH. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87: 245-313.
- [4] Quinn MT, Ammons MC, Deleo FR. (2006) The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. *Clin Sci (Lond).* 111:1-20.

- [5] Rokutan K, Kawahara T, Kuwano Y, Tominaga K, Nishida K, Teshima-Kondo S. (2008) Nox enzymes and oxidative stress in the immunopathology of the gastrointestinal tract. *Semin Immunopathol.* 30: 315-327.
- [6] Nauseef WM. (2004) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol.* 122: 277-291.
- [7] Dang PM, Cross AR, Babior BM. (2001) Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:3001-3005.
- [8] El-Benna J, Faust LP, Babior BM. (1994) The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem.* 269:23431-23436.
- [9] Ago T, Nunoi H, Ito T, Sumimoto H. (1999) Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem.* 274:33644-33653.
- [10] Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature.* 401: 79-82.
- [11] Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R, Brandes RP. (2004) Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 279:45935-45941

- [12] Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, Leto TL. (2003) Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278: 20006-20012.
- [13] Ueyama T, Geiszt M, Leto TL. (2006) Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol.* 26:2160-2174.
- [14] Rokutan K, Kawahara T, Kuwano Y, Tominaga K, Sekiyama A, Teshima-Kondo S. (2006) NADPH oxidases in the gastrointestinal tract: a potential role of Nox1 in innate immune response and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal.* 8:1573-1582.
- [15] Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nuno H, Sumimoto H. (2003) Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J. Biol. Chem.* 278:25234-25246
- [16] Cheng G, Lambeth JD. (2004) NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. *J. Biol. Chem.* 279:4737-4742.
- [17] Cheng G, Lambeth JD. (2005) Alternative mRNA splice forms of NOXO1: differential tissue expression and regulation of Nox1 and Nox3. *Gene.* 356:118-126.
- [18] Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marmé D, Rapp UR. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature.* 364:249-252.
- [19] Kroviarski Y, Debbabi M, Bachoual R, Périanin A, Gougerot-Pocidal MA, El-Benna J, Dang PM. (2010) Phosphorylation of NADPH oxidase activator 1 (NOXA1) on serine 282 by MAP kinases and on serine 172 by protein kinase C and protein kinase A prevents NOX1 hyperactivation. *FASEB J.* 24:2077-2092.

[20] Yamamoto A, Kami K, Takeya R, Sumimoto H. (2007) Interaction between the SH3 domains and C-terminal proline-rich region in NADPH oxidase organizer 1 (Noxo1). *Biochem Biophys Res Commun.* 352:560-565.

[21] Dutta S, Rittinger K. (2010) Regulation of NOXO1 activity through reversible interactions with p22 and NOXA1. *PLoS One.* 5:e10478.

Figure legends

Figure 1: NOXO1 is phosphorylated in PMA-stimulated cells. (A) NOXO1 phosphorylation in resting or PMA-stimulated HEK293 transfected cells, detected by [³²P] orthophosphate labeling. (B) Phosphoamino acid analysis of [³²P] NOXO1β (C) Phosphopeptide mapping of [³²P] NOXO1β. Phosphorylated products were detected by autoradiography.

Figure 2: NOXO1 is phosphorylated on Ser-154 in PMA-stimulated cells. HEK293 cells were co-transfected with NOX1, NOXA1, wild-type (Wt) NOXO1β or its mutants, labelled with [³²P] orthophosphate, and stimulated with PMA. [³²P] NOXO1β_{wt} and its mutants were analyzed by phosphopeptide mapping. Phosphopeptides were detected by autoradiography.

Figure 3: Phosphorylation of NOXO1β enhances its interaction with NOXA1 and p22^{PHOX}. (A) Pull-down of phosphorylated ([³²P]NOXO1β) and non-phosphorylated NOXO1β (NOXO1β) with GST or GST-NOXA1. *Upper:* Immunoblot; *Lower:* quantification (mean ± SEM, n = 3, *p<0.05 versus non phosphorylated NOXO1β). (B) Pull-down of phosphorylated ([³²P]NOXO1β) or non-phosphorylated NOXO1β (NOXO1β) with GST or GST-p22^{PHOX} (132-195) in the presence or absence of NOXA1 and GSH beads. *Upper:*

Immunoblot; *Lower*: quantification (mean \pm SEM, n = 3, * p<0.05 versus non phosphorylated NOXO1 β). (C) Pull-down of NOXA1 with GST or GST-p22^{PHOX} (132-195).

Figure 4: Phosphorylation of Ser-154 on NOXO1 β is required for optimal binding of NOXO1 β to NOXA1 and p22^{PHOX} in PMA-stimulated cells, and thus for NOX1 hyperactivation. HEK293 cells were co-transfected with NOX1, NOXA1 and NOXO1 β _{wt} or NOXO1 β -S154A. (A) NOXO1 β _{wt} (Wt) and NOXO1 β -S154A (S154A) from resting and PMA-stimulated cells were immunoprecipitated with an anti-NOXO1 antibody for 4 h. Bound NOXA1 was detected with an anti-NOXA1 antibody and a secondary, light-chain-specific, antibody from Jackson ImmunoResearch. (B) Lysates of resting and PMA-stimulated cells were incubated with GST-p22^{PHOX} (132-195) and GSH beads. Bound NOXO1 β _{wt} (Wt) and NOXO1 β -S154A (S154A) were detected by immunoblotting with a NOXO1 β -specific antibody. (C) The subcellular localization of NOXO1 β _{wt} and NOXO1 β -S154A was analyzed by confocal microscopy as described in *Materials and Methods* in resting (R) and PMA-stimulated cells. Nuclei were stained with propidium iodide. (D) ROS production by a NOX1 system reconstituted with NOXO1 β _{wt} (Wt) or NOXO1 β -S154A (S154A) in resting and PMA-stimulated cells. (mean \pm SEM, n = 3, * p<0.05 versus resting cells transfected with NOXO1 β _{wt}, # p<0.05 versus PMA-stimulated cells transfected with NOXO1 β _{wt}).

Figure 5: Proposed model of human NOX1 activation. In resting cells, NOXO1 is in an auto-inhibited conformation which involves intramolecular interaction between the tandem SH3 domains and the PRR domain. When cells are stimulated, NOXO1 is phosphorylated on Ser-154, triggering high-affinity interaction with NOXA1. This binding fully opens NOXO1, thus allowing high-affinity interaction between NOXO1 and p22^{PHOX}. This results in enhanced ROS production by NOX1.

Figure 1 :

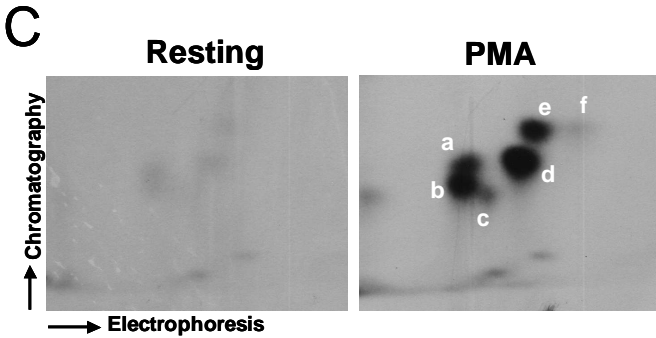
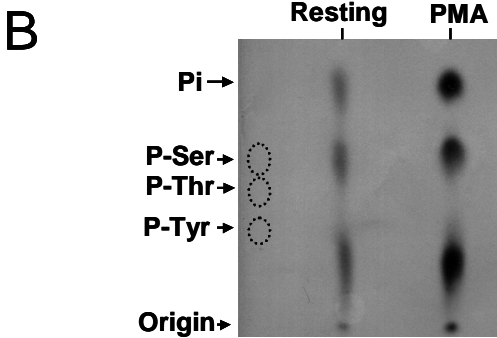
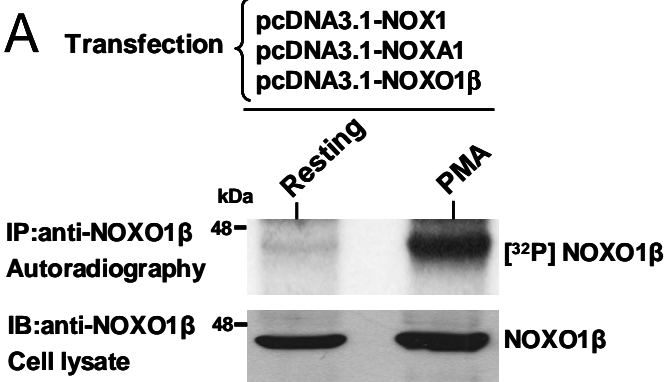


Figure 2 :

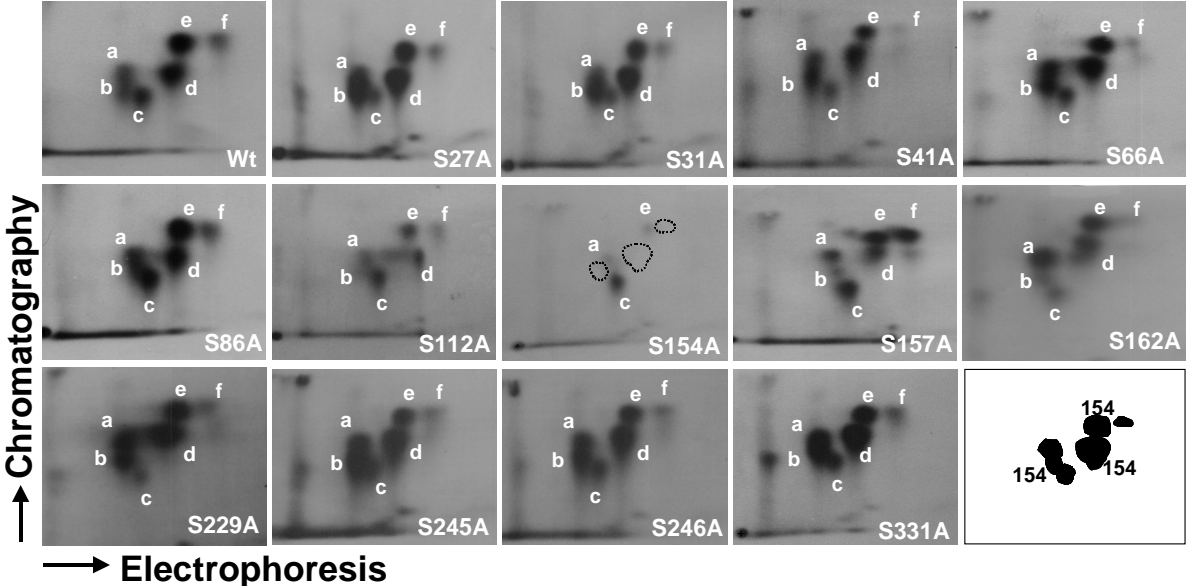
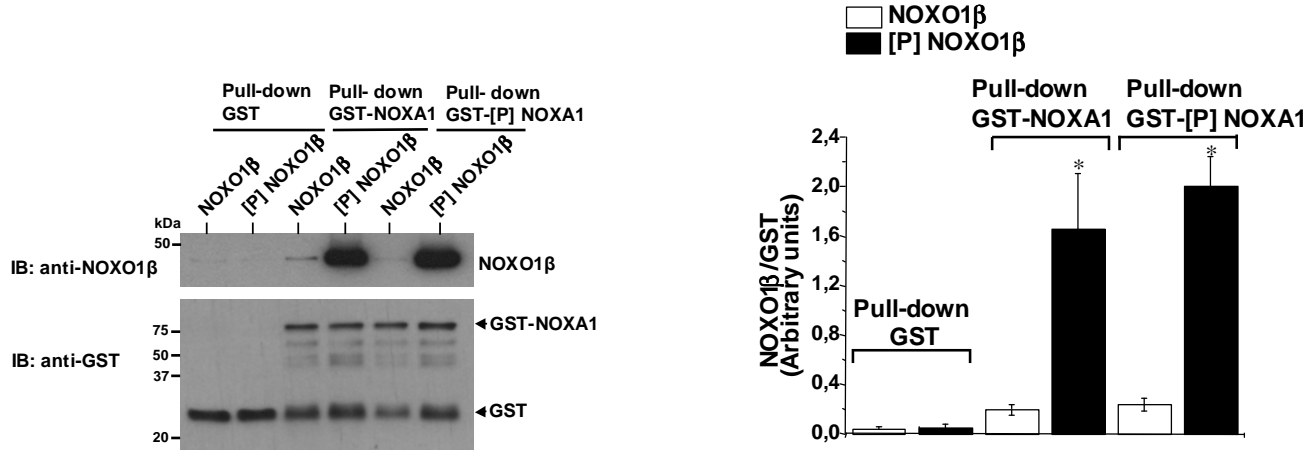
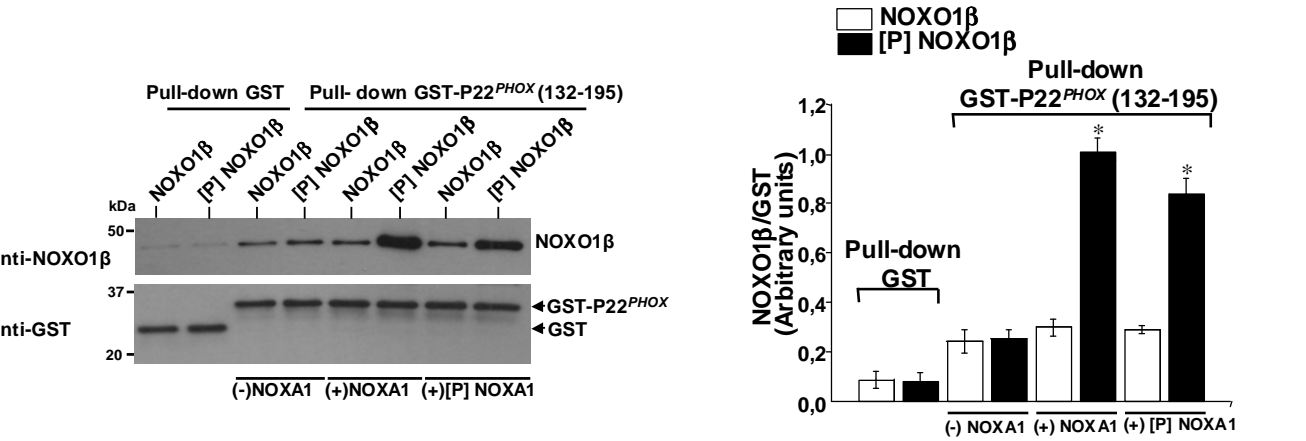


Figure 3 :

A



B



C

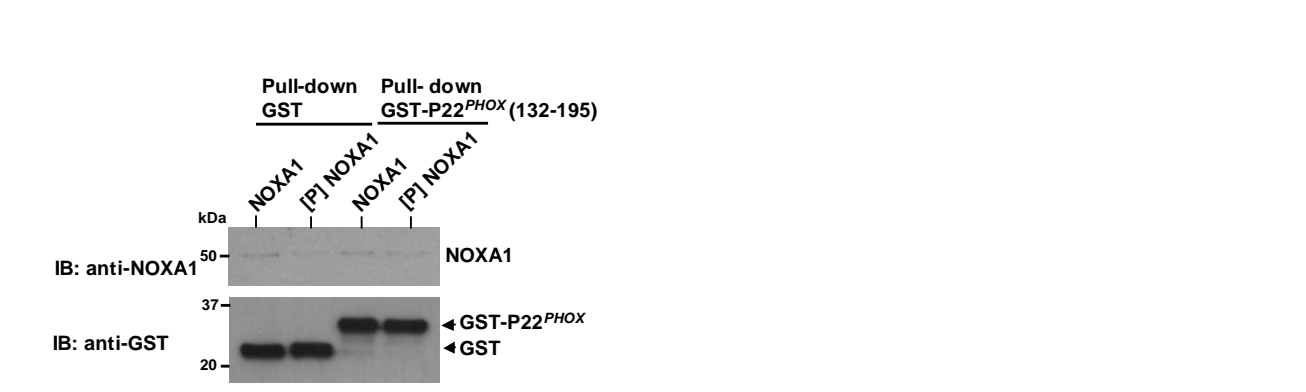


Figure 4 :

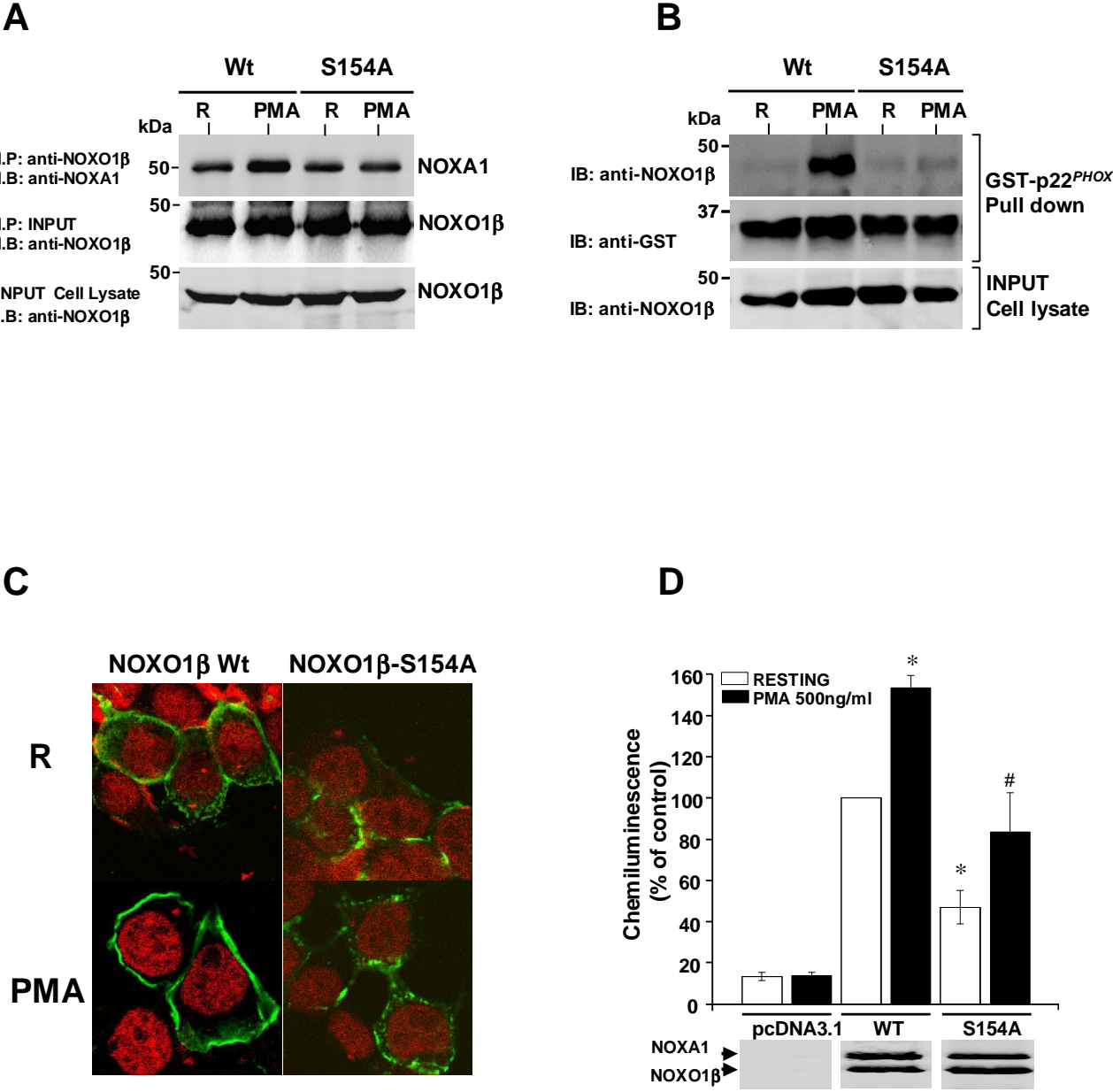
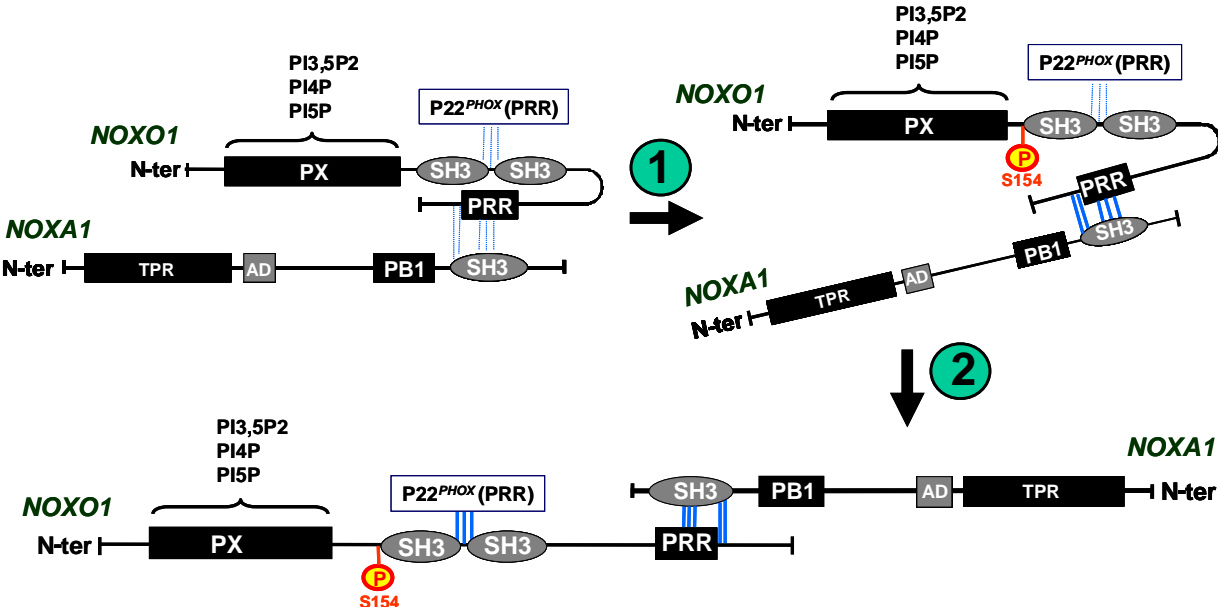


Figure 5 :



Supporting information

Debbabi *et al*

NOXO 1 β mutant	Primers
S27A	Forward : CCAAACGTTTGCCTTC G CTGTGCGCTGGTCAGAC Reverse : GTCTGACCAGCGCACAG C GAAGGCAAACGTTTGG
S31A	Forward : CTTTCTGTGCGTGG G CAGACGGCAGCGACACC Reverse : GGTGTCGCTGCCGTCT G CCACGCACAGAGAAGG
S41A	Forward : CACCTTCGTGCGCAGG G CTTGGGACGAATTCAGG Reverse : CCTGAATTCGTCCA A GCCTGCGCACGAAGGTG
S66A	Forward : GGGCCTGCTGCGGAGAG G CTGACCGCGTTCTCCC Reverse : GGGAGAACGCGGTCAG C TCTCCGCAGCAGGCC
S86A	Forward : GTGGGGCGCACG G CCCGCGGCCTGG Reverse : CCAGGCCGCG G CGTGCGCCCCAC
S112A	Forward : GAGCGCGTGGCACGG G CCCCGACGATCACTGGC Reverse : GCCAGTGATCGTCGG G CCCGTGCACGCGCTC
S154A	Forward : GCGCTGCGGGCC G CCTCGCCATCCACAGTCTGGAG Reverse : CTCCAGACTGTGGAT G CGAGGGCGCCCGCAGCGC
S157A	Forward : CCGCCTCTCCATCCAC G CTCTGGAGGCTCAGAGC Reverse : GCTCTGAGCCTCCAG A CGTGGATGGAGAGGCGG
S162A	Forward : CAGTCTGGAGGCTCAG G CCCTGCGCTGCCTGCAG Reverse : CTGCAGGCAGCGCAG G CCCTGAGCCTCCAGACTG
S229A	Forward : CCGGGAGGGAGGCCCG G CCCTAGGGAGCAGCGG Reverse : CCGCTGCTCCCTAG G CGGGCCTCCCTCCCGG
S245A	Forward : CGCGCCTACGAG G CCAGCCGCGCAG Reverse : CTGCGCGGCT G GCCTCGTAGGCGCG
S246A	Forward : GCCTACGAGAGC G CCCGCGCAGATG Reverse : CATCTGCGCG G CGTCTCGTAGGC
S331A	Forward : CCCACCCGACCT G CGCCGGGCGCCATC Reverse : GATGGCGCCCG G CGCAGGTCGGGTGGG

Table S1: Primers used for site directed mutagenesis of NOXO1 β

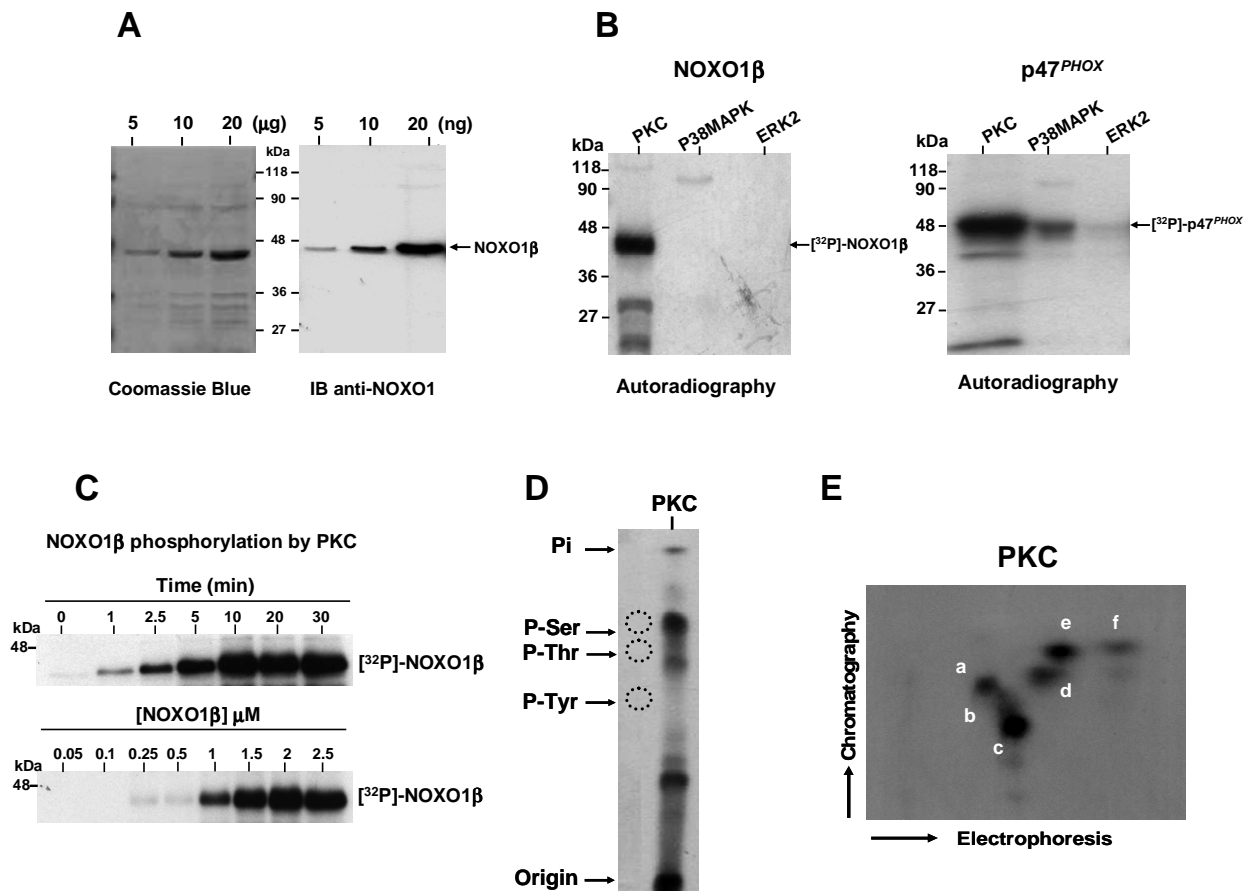


Fig. S1: NOXO1 β is phosphorylated by PKC on the same peptides *in vitro* as in intact cells. (A) SDS-PAGE (*left*) and immunoblot (*right*) analysis of full-length wild-type NOXO1 β . **(B)** *In vitro* phosphorylation of NOXO1 β (*left*) or p47^{PHOX} (*right*) by PKC, p38MAPK or ERK2 in the presence of 100 μM ATP and 3 μCi of γ [³²P]ATP, shows that NOXO1 β is phosphorylated only by PKC. **(C)** Kinetic (*upper*) and concentration-dependent (*lower*) analysis of NOXO1 β phosphorylation by PKC. **(D)** Phosphoamino acid analysis of NOXO1 β phosphorylated by PKC shows that only serine residues were targeted. **(E)** Phosphopeptide mapping analysis of NOXO1 β phosphorylated by PKC shows that same peptides were targeted *in vitro* and in intact cells.

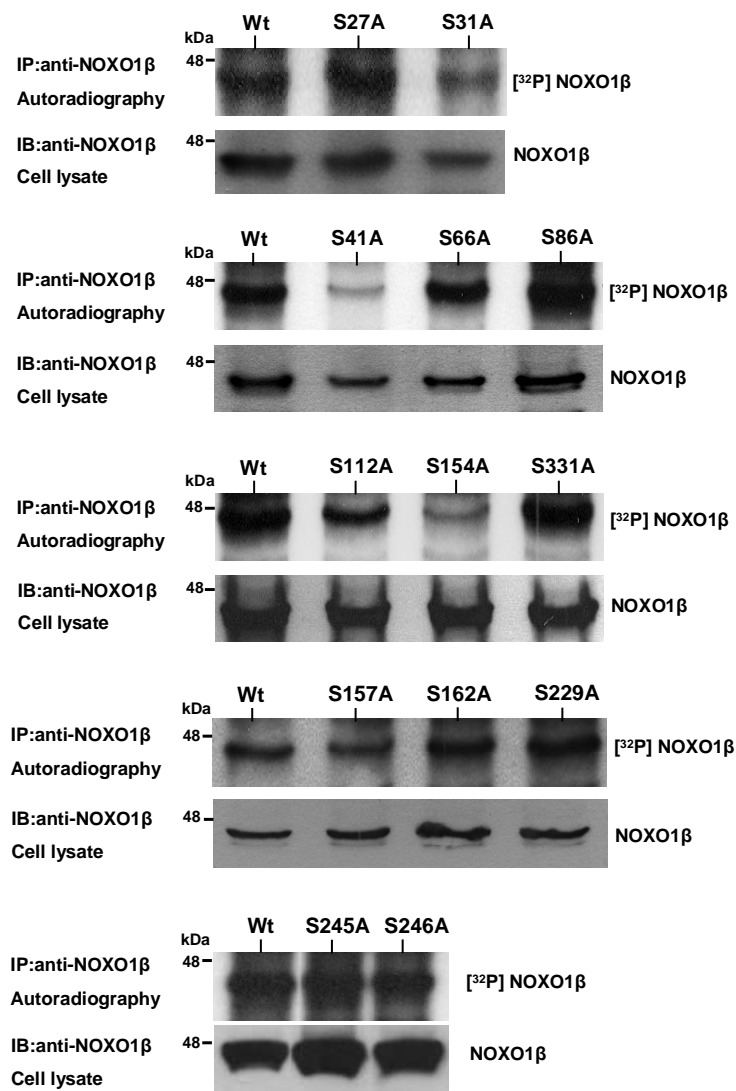


Fig. S2: SDS-PAGE analysis of $[^{32}\text{P}]$ NOXO1 β wild type and mutants. HEK293 cells were co-transfected with NOX1, NOXA1, wild type (Wt) NOXO1 β or its mutants, labelled with $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate, and stimulated with PMA. Cells were lysed and NOXO1 β was immunoprecipitated and analyzed by SDS-PAGE. $[^{32}\text{P}]$ NOXO1 β was detected by autoradiography and expression of the mutants in cell lysate were checked by immunoblot.

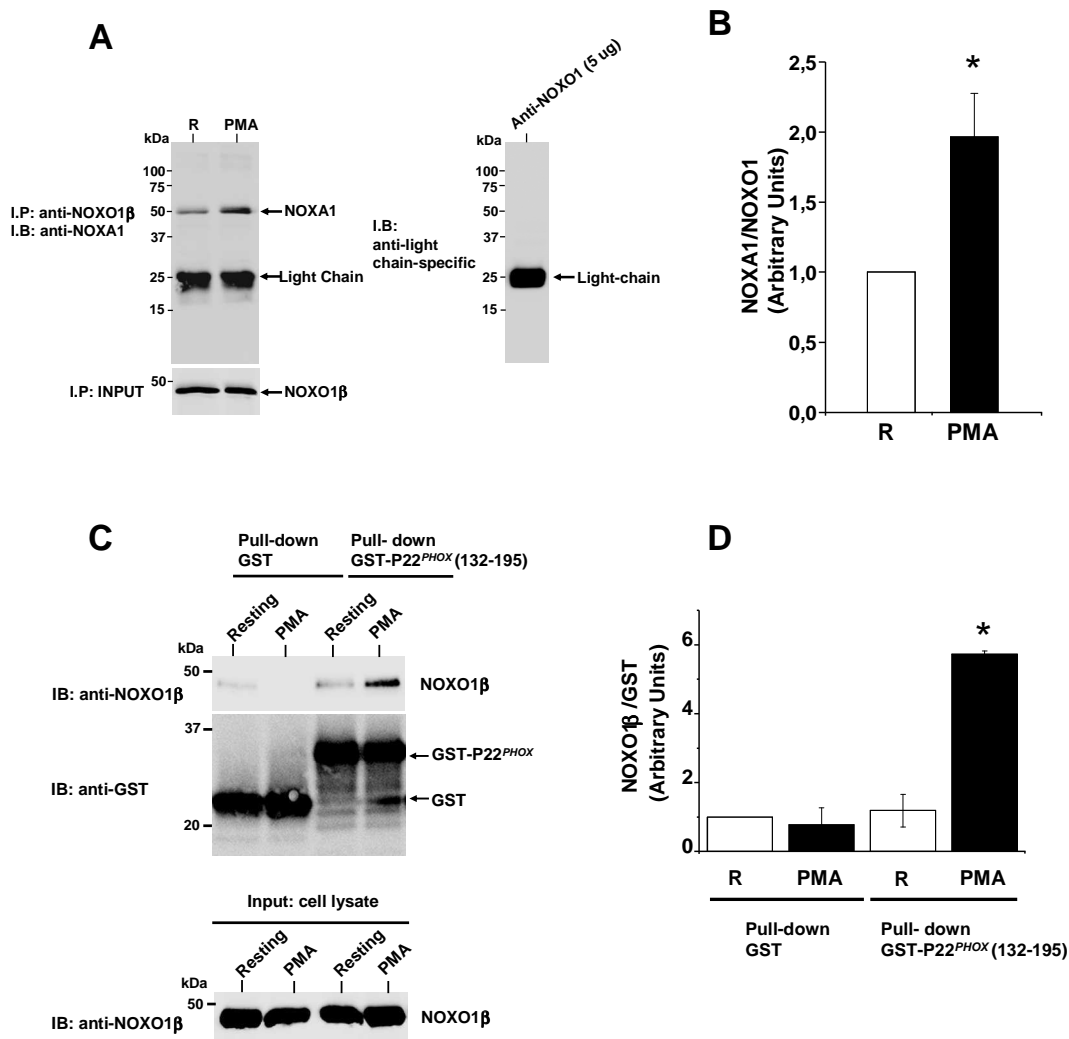


Fig. S3: PMA enhances NOXO1 β binding to NOXA1 and to p22^{PHOX}. (A) *left*: NOXO1 β was immunoprecipitated with an anti-NOXO1 antibody and protein A agarose for 4 h. Bound NOXA1 was detected with anti-NOXA1 antibody and a secondary antibody that was light chain specific from Jackson ImmunoResearch. *Right*: 5 μ g of anti-NOXO1 were separated on SDS-PAGE and immunoblot with the light chain specific antibody from Jackson ImmunoResearch to check for its specificity. (B) Ratio of co-immunoprecipitated NOXA1 to the total amount of immunoprecipitated NOXO1 β (mean \pm SEM, n = 3, *p<0.05 versus resting cells). (C) Lysate from resting or PMA-stimulated cells were incubated with GST- p22^{PHOX} (132-195) and GSH beads. Bound NOXO1 β was detected by immunoblotting with a specific antibody. (D) Ratio of precipitated NOXO1 β to the total amount of GST or GST- p22^{PHOX} (132-195) (mean \pm SEM, n = 3, *p<0.05 versus resting cells).

DISCUSSION GENERALE

La NADPH oxydase NOX1 est essentiellement exprimée dans le colon où elle jouerait un rôle dans la défense anti-infectieuse [Leto 2006] de la muqueuse. En effet, le colon qui possède une flore bactérienne importante, reste le seul tissu connu à ce jour, où sont co-exprimées à la fois et de façon abondante, NOX1, NOXO1 et NOXA1 [Takeya 2003, Geiszt 2003a, Banfi 2003]. NOX1 est structurellement proche de NOX2, la NADPH oxydase phagocytaire, mais les mécanismes moléculaires qui régulent son activation ne sont pas clairement établis. Du fait de l'expression constitutive de NOXO1 et NOXA1 à la membrane plasmique [Cheng 2004, Ueyama 2006], le complexe NOX1 produit constitutivement des FRO [Cheng 2004], ce qui n'est pas le cas de la NADPH oxydase phagocytaire où l'assemblage et l'activation sont initiés par les événements de phosphorylation, laissant ainsi suggérer que NOX1 soit moins finement régulée. L'objectif de cette thèse a été de déterminer si, malgré une activité constitutive, les phosphorylations pouvaient intervenir dans la régulation de NOX1.

Nous avons d'abord étudié la phosphorylation de NOXA1, la sous-unité activatrice du complexe, les voies qui régulent cette phosphorylation et son rôle dans l'activation de NOX1. Dans la deuxième partie du travail, nous avons analysé la phosphorylation de NOXO1, la sous-unité organisatrice du complexe, et son éventuelle implication dans l'assemblage et l'activation de NOX1.

Nos travaux révèlent que bien qu'elle possède une activité constitutive, NOX1 est régulée de façon fine et complexe et que la phosphorylation des sous-unités NOXA1 et NOXO1 dicte leurs niveaux d'interactions entre elles et avec leurs partenaires respectifs modulant ainsi l'activité de NOX1.

Concernant NOXA1, dont la phosphorylation par la PKA a récemment été démontrée [Kim 2007], nos résultats montrent qu'en plus de cette kinase, NOXA1 est également phosphorylée *in vitro*, faiblement par la PKC et la p38MAPK et de façon plus importante par ERK2. L'analyse phosphoaminoacide nous a permis de déterminer la nature du résidu phosphorylé; toutes les kinases ciblent NOXA1 exclusivement sur des résidus sérines. Par le biais du logiciel NetPhos 2.0, nous avons recherché dans la séquence de NOXA1, les sérines contenues dans les séquences consensus ciblées par ces kinases: quatre sérines ont un score de

prédiction élevé, il s'agit des sérines 172, 239, 282 et 461. Afin de déterminer si ces sérines sont phosphorylées par ces différentes kinases, nous les avons mutées en alanines et analysé leurs profils de phosphorylation par cartes phosphopeptidiques. Ainsi, les MAP Kinases, ERK2 et p38MAPK, phosphorylent NOXA1 sur la sérine 282; de plus la p38MAPK cible faiblement la sérine 239. Les PKC et PKA phosphorylent NOXA1 majoritairement sur la sérine 172; la PKA peut également phosphoryler faiblement NOXA1 sur la sérine 461. Par la suite, nous avons voulu confirmer que NOXA1 était aussi phosphorylée dans les cellules entières. Bien que deux papiers de la littérature semblent indiquer l'expression endogène et simultanée de NOX1, NOXA1 et NOXO1 dans les lignées cellulaires cancéreuses du colon HT29 et caco2 [Kim 2007, Nisimoto 2008], nous n'avons pas pu les détecter avec nos anticorps dont la spécificité et la sensibilité ont été confirmées et par conséquent nous avons choisi de reconstituer le complexe NOX1 dans les cellules épithéliales HEK293, par transfection. Bien qu'elles ne représentent pas une situation physiologique idéale, les HEK293 permettent tout de même de reconstituer un contexte cellulaire. Ainsi, dans les HEK293, NOXA1 est phosphorylée de façon basale sur deux sites qui pourraient correspondre, de par leur localisation sur la carte phosphopeptidique, aux sérines 172 et 282, cibles de PKC/PKA et de ERK2/p38MAPK respectivement. La phosphorylation de peptides qui pourraient correspondre aux sérines S239 et S461 n'est pas observée. Par ailleurs, lorsque les cellules sont stimulées par le PMA, un activateur direct des PKC mais également indirect de ERK (nous avons en effet pu observer une activation de ERK par le PMA dans les cellules HEK293), une augmentation de la phosphorylation des peptides qui contiendraient les S172 et S282 est observée. Lorsque les cellules sont stimulées par la forskoline, qui active la voie PKA, seule la phosphorylation du peptide qui contiendrait la sérine 172 est augmentée. En vue d'établir de façon certaine l'identité des sérines phosphorylées dans la cellule, nous avons co-transfecté les HEK293 avec NOX1, NOXO1 β (l'isoforme la plus abondamment exprimée dans le colon) et NOXA1 sauvage ou mutée au niveau de ces sérines (S172A ou S282A ou S172A/S282A) et étudié le profil de phosphorylation de NOXA1 par cartes phosphopeptidiques. Comme attendu, le signal de phosphorylation du peptide qui contiendrait la S172 ciblée par les PKC/PKA est perdu lorsque les cellules sont transfectées avec le mutant S172A, en revanche le signal correspondant aux peptides contenant la S282 ciblée par les MAPK est maintenu. Lorsque les cellules sont transfectées avec le mutant S282A

seul le signal de phosphorylation des peptides qui contiendraient la S282 est perdu. Le signal de tous les peptides disparaît dans le cas du double mutant.

En ce qui concerne la phosphorylation *in vitro* des S172 et S461 par la PKA, nos résultats sont en accord avec les travaux de Kim et coll. [Kim 2007]. Cependant, concernant la phosphorylation dans la cellule entière, notre approche par transfection des mutants de NOXA1, marquage des cellules HEK293 avec de l'acide orthophosphorique [³²P] puis visualisation des sites phosphorylés par cartes phosphopeptidiques montre que seule la S172 est phosphorylée par la PKA dans la cellule, contrairement à leurs résultats. Aucune phosphorylation d'un site pouvant correspondre à la S461 n'est observée. Cette discordance pourrait être due au fait que les anticorps utilisés par Kim et coll., et dirigés contre les sites consensus de phosphorylation reconnus par la PKA, donnent des résultats souvent délicats au niveau de l'interprétation en raison de leur manque de spécificité.

Par ailleurs, une étude publiée après la nôtre, montre que dans les HEK293 stimulées par l'EGF, NOXA1 est phosphorylée par ERK2 au niveau de la S282 mais pas au niveau de la S239 [Oh 2010]; ce qui est en parfaite adéquation avec nos résultats.

Nos données suggèrent donc que: i) NOXA1 est phosphorylée à l'état basal au niveau des S172 et S282 probablement en raison de l'activité constitutive des kinases, ii) le PMA entraîne une augmentation de la phosphorylation de la S172 et S282 dans la cellule *via* l'activation des PKC et ERK/p38MAPK respectivement; iii) la forskoline entraîne uniquement l'augmentation de la phosphorylation de la S172 dans la cellule *via* l'activation de la PKA.

Afin de valider l'implication des PKC/ MAPK et de la PKA dans la phosphorylation de NOXA1 sous PMA et forskoline respectivement, nous avons pré-incubé les cellules avec les différents inhibiteurs de ces kinases à savoir le GF-109203X inhibiteur des PKC, le H-89, inhibiteur de la PKA, le SB-203580 inhibiteur de la p38MAPK et U0126 inhibiteur de MEK, la kinase en amont de ERK2, puis les avons stimulé par le PMA ou la forskoline. Nos données confirment que le PMA phosphoryle NOXA1 au niveau des S172 et S282 *via* l'activation de PKC et des MAPK respectivement et que la forskoline phosphoryle la S172 par l'intermédiaire de la PKA. De même, nos résultats montrent que les PKC et ERK2 et à moindre mesure la PKA sont impliquées dans la phosphorylation basale de NOXA1. En effet, le niveau de phosphorylation basale de

NOXA1 dans les cellules incubées avec le GF-109203X, l'U0126 ou le H-89 est plus faible que son niveau de phosphorylation basale dans les cellules non traitées par ces inhibiteurs.

Dans la dernière partie de ce travail, les conséquences de la phosphorylation de NOXA1 au niveau des S172 et S282 sur l'activité du complexe NOX1 ont été déterminées. De façon intéressante, nous montrons, que la phosphorylation de NOXA1 prévient l'hyperactivation de NOX1. En effet, lorsqu'on co-transfecte le simple mutant S172A ou S282A dans les HEK293, la production des FRO, mesurée par chimioluminescence amplifiée au luminol, est significativement augmentée à l'état basal. Cette augmentation est d'autant plus importante lorsqu'on transfecte le double mutant S172A/S282A. Par contre, cette potentialisation de l'activité de NOX1 est perdue dans le cas du double mutant S172E/S282E, mutant phosphomimétique pour lequel les sérines ont été mutées en acides glutamiques (résidus qui miment la phosphorylation par apport de charge négative). Cette régulation négative de l'activité de NOX1 par la phosphorylation de NOXA1 est confirmée par l'utilisation d'un mutant constitutivement actif de MEK1, la kinase qui active ERK2. Dans les HEK293 où ce mutant a été transfecté et par conséquent où ERK2 est constitutivement active et phosphoryle continuellement NOXA1 au niveau de la S282, la production de FRO est diminuée en comparaison aux cellules n'ayant pas reçu l'ADNc de MEK1 actif. De plus, la forskoline qui augmente la phosphorylation de la S172 de NOXA1, inhibe l'activité de NOX1 ce qui est en accord avec un rôle inhibiteur de la phosphorylation. Cependant de façon paradoxale, le PMA qui augmente la phosphorylation des S172 et S282 de NOXA1, potentialise l'activité du complexe NOX1 [Cheng 2006, Ueyama 2006]. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le PMA pourrait exercer des effets sur d'autres éléments du complexe NOX1 tels que la sous-unité catalytique NOX1, NOXO1 β ou encore Rac1: l'effet du PMA sur ces éléments serait activateur alors que son effet sur NOXA1 serait inhibiteur; la résultante de ces deux effets se traduirait par un effet global activateur.

Il est cependant intéressant de noter que la stimulation des cellules par le fMLF entraîne une augmentation de l'activité de NOX1 qui est associée à une déphosphorylation de NOXA1. Le même effet de déphosphorylation de NOXA1 est observé lorsque l'on traite les cellules HEK293, où le complexe NOX1 a été reconstitué par transfection; avec l'IGF1. Les voies de signalisation et l'identité des

phosphatases impliquées dans cette déphosphorylation induite par les deux agonistes physiologiques restent à déterminer. Etant donné que NOXA1 est phosphorylée sélectivement sur des résidus sérines, on pourrait penser que les PP1A/2A (Protéines Phosphatases 1A/2A), qui sont des sérines/thréonines phosphatases activables par le fMLF, soient impliquées dans la déphosphorylation de NOXA1. Par ailleurs, la déphosphorylation de NOXA1 observée sous IGF1 pourrait aussi impliquer des sérine-thréonine phosphatases, bien qu'aucune activation directe de Ser/thréo phosphatases par l'IGF1 n'ait été clairement établie dans la littérature. Le fait que la p67^{PHOX} subit un cycle continu de phosphorylation /déphosphorylation où le rôle des PP1A/PP2A a été mis en évidence [Dang 2011] renforce l'hypothèse que NOXA1 puisse également être la cible de ces phosphatases.

Etant donné l'importance des interactions protéine-protéine dans l'activation de NOX1 et la localisation des S172 et S282 dans la séquence de NOXA1 (**Figure 23**), nous avons étudié l'effet de la phosphorylation de NOXA1 au niveau de ces sites sur ses interactions avec la sous-unité catalytique NOX1 et la petite protéine G, Rac1.

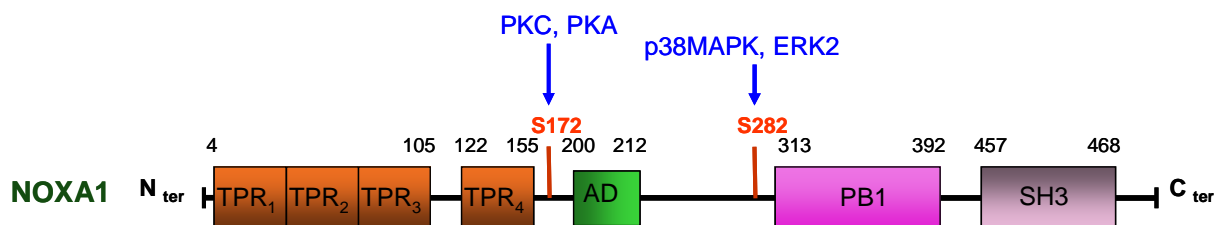


Figure 23: Localisation des S172 et S282 dans la séquence de NOXA1

Pour cela, nous avons produit dans *E.coli*, les protéines recombinantes NOXA1 et Rac1 fusionnée à la GST (NOXA1 et GST-Rac1) et le fragment C-terminal de NOX1 contenant les sites de fixation du NADPH et du FAD: GST-NOX1 (217aa-550aa) et analysé les interactions par co-précipitation (ou pull-down). Nous montrons que NOXA1 lie GST-NOX1 et GST-Rac1-GTPγS de façon significative (par rapport au contrôle GST seule). De façon intéressante cette interaction diminue significativement lorsque NOXA1 a été préalablement phosphorylée par les PKC et

ERK2, qui ciblent les S172 et S282 respectivement. La phosphorylation de NOXA1 sur les S172 et S282 diminue donc les liaisons NOXA1-NOX1 et NOXA1-Rac1.

En conclusion de cette première partie, NOXA1 est phosphorylée de façon constitutive sur les S172 et S282 respectivement par les PKC/PKA et MAPK dans les cellules au repos. Cette phosphorylation prévient l'hyperactivation de NOX1 en diminuant les interactions de NOXA1 avec ses partenaires NOX1 et Rac1. Le rôle inhibiteur de la phosphorylation de NOXA1 sur l'activité de NOX1 est en accord avec les travaux de Kim et coll., et d'Oh et coll. Les premiers ont montré que NOXA1 phosphorylée par la PKA dans la cellule interagit avec la protéine 14.3.3, ce qui empêche sa liaison au complexe NOX1 au niveau de la membrane et par conséquent fait diminuer la production de FRO par le complexe NOX1 [Kim 2007]. Quant à l'article récent d'Oh et coll., il indique que la phosphorylation de NOXA1 par ERK2 au niveau de la S282 désensibilise les HEK293 à l'action de l'EGF et par conséquent diminue l'activité de NOX1, sous EGF, dans ces cellules; cet effet négatif est médié, par la diminution de l'activation de Rac1 [Oh 2010], et probablement comme l'indique nos résultats *via* une diminution de l'interaction entre NOXA1 phosphorylée et Rac1. **La phosphorylation de NOXA1 constitue donc un nouveau mode de régulation négative de l'activité de NOX1.**

Comme il a été indiqué précédemment, le PMA pourrait avoir une autre cible que NOXA1. En raison de l'absence du domaine AIR, dans la séquence de NOXO1, cette protéine ne semble pas représenter un candidat premier auquel on pourrait penser. De plus, le concept couramment admis est que la phosphorylation de NOXO1, ne serait pas nécessaire pour l'activation du complexe NOX1. Pour impliquer ou au contraire écarter de façon définitive un éventuel rôle de la phosphorylation de NOXO1 dans la régulation de NOX1, nous avons entrepris d'étudier la phosphorylation de NOXO1. Et de façon surprenante, nous avons observé une phosphorylation de NOXO1 β dans les cellules stimulées par le PMA.

Ainsi, dans les cellules HEK293 où le complexe NOX1 actif a été reconstitué, NOXO1 β est faiblement phosphorylée au repos et cette phosphorylation est fortement augmentée après stimulation des cellules par le PMA. Par analyse phosphoaminoacide et cartes phosphopeptidiques, il a été montré que ces phosphorylations portent toutes sur des résidus sérines contenues dans plusieurs

peptides. Sachant que le PMA active les PKC et indirectement ERK, nous avons synthétisé la protéine NOXO1 β recombinante dans *E.coli* et étudié sa phosphorylation *in vitro* par les PKC, ERK2 et la p38MAPK en vue de déterminer quelles sont les kinases impliquées dans sa phosphorylation sous PMA. Seules les PKC phosphorylent, fortement, NOXO1 β ; aucune bande de NOXO1 β phosphorylée n'est détectée dans les pistes correspondant à un traitement par les MAPK. Tout comme dans les cellules stimulées par le PMA, les PKC phosphorylent NOXO1 β sur des sérines et la carte phosphopeptidique obtenue *in vitro* est similaire à celle obtenue sous PMA. Ces données indiquent que le PMA entraîne la phosphorylation de NOXO1 β uniquement par l'intermédiaire des PKC. Nous avons alors recherché, dans la séquence de NOXO1 β , les sérines potentiellement ciblées par les PKC; il en existe environ vingt dont une dizaine avec un score de prédiction élevé. Par mutagenèse dirigée, nous avons muté en alanines ces sérines, transfecté les différents mutants dans les HEK293 et analysé leurs profils de phosphorylation par cartes phosphopeptidiques après stimulation des cellules par le PMA suivie de l'immunoprécipitation de la protéine au moyen de l'anticorps anti-NOXO1 β (développé au laboratoire et dont la spécificité a été validée). Ainsi, nous avons identifié la S154 de NOXO1 β comme étant le site majeur de phosphorylation en réponse au PMA; en effet, parmi les mutants testés, seule la mutation S154A induit une diminution du signal de phosphorylation de NOXO1 β avec la perte du signal de plusieurs peptides par rapport à NOXO1 β sauvage.

Etant donné la proximité de la S154 du tandem SH3 (**Figure 24**) et l'importance des interactions protéine-protéine au cours de l'activation de NOX1, nous avons par la suite entrepris de déterminer les effets de la phosphorylation de cette sérine sur les interactions de NOXO1 β avec ses partenaires membranaire, la p22^{PHOX}, et cytosolique, NOXA1.

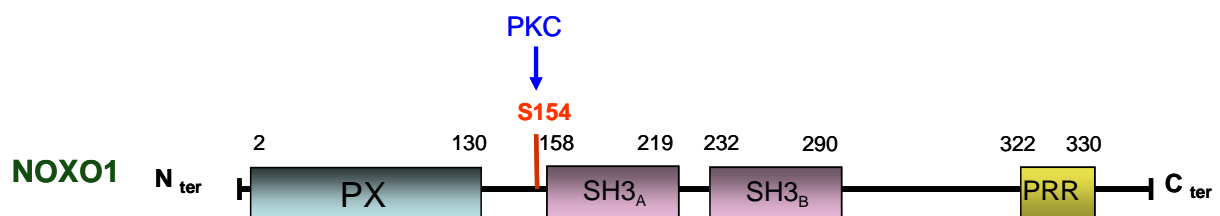


Figure 24: Localisation de la S154 dans la séquence de NOXO1 β

Tout d'abord, en ce qui concerne NOXA1, par les approches de co-précipitation (ou pull-down), nous démontrons que NOXO1 β lie faiblement NOXA1 et que cette interaction est fortement augmentée par la phosphorylation préalable de NOXO1 β par les PKC. La phosphorylation de NOXA1 n'a pas d'effets significatifs sur ces interactions. L'interaction de NOXO1 β avec la p22^{PHOX} est très finement régulée : en effet, elle nécessite deux événements, d'une part la phosphorylation de NOXO1 β et d'autre part la présence de NOXA1. Ni la phosphorylation de NOXO1 β seule ni la présence de NOXA1 seule ne sont suffisantes pour initier l'interaction avec la p22^{PHOX}. Cependant l'interaction de NOXO1 β avec la p22^{PHOX} est fortement augmentée lorsque NOXO1 β est phosphorylée et NOXA1 est présente. Il est peu probable que le phénomène observé soit médié par l'interaction directe entre NOXA1 et la p22^{PHOX} étant donné qu'aucune liaison entre ces deux protéines n'est observée dans des expériences de pull-down. Ces mêmes observations sont retrouvées dans le cas où la phosphorylation de NOXO1 β est induite par le PMA dans les cellules HEK293. Ainsi l'interaction de NOXO1 β avec NOXA1 et avec la p22^{PHOX} est augmentée dans les cellules HEK293 stimulées par le PMA en comparaison aux cellules non stimulées. Par ailleurs la phosphorylation de la S154 de NOXO1 β induite par le PMA est cruciale pour permettre la potentialisation de ces interactions puisque la mutation de cette sérine est suffisante pour prévenir l'augmentation de l'interaction de NOXO1 β avec ces partenaires. De même que l'interaction entre NOXO1 β et la p22^{PHOX} est diminuée avec le mutant S154A de NOXO1 β , la localisation à la membrane, observée par microscopie confocale, du mutant S154A sous PMA est altérée; ce mutant S154A semble être localisé dans des structures intracellulaires en réponse au PMA. Bien que nos résultats indiquent que NOXO1 β ne lie pas de manière significative la p22^{PHOX} dans les cellules HEK293 au repos, il est étonnant de constater que sa localisation est essentiellement membranaire, comme le montre la microscopie confocale. Cela laisse suggérer que NOXO1 β est maintenue à la membrane plasmique principalement par l'intermédiaire de son domaine PX dans les cellules au repos. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'une mutation ponctuelle dans le domaine PX est suffisante pour empêcher la localisation membranaire de NOXO1 β [Cheng 2005].

Finalement, l'augmentation de l'activité de NOX1 induite par le PMA est prévenue dans les cellules HEK293 transfectées avec le mutant S154A de NOXO1 β , indiquant

ainsi que la phosphorylation de la S154 joue un rôle primordial dans l'hyperactivation du complexe NOX1 sous PMA.

Deux études récentes utilisant différentes constructions de NOXO1, ont montré qu'il existerait une interaction intramoléculaire au sein de NOXO1 impliquant son tandem SH3 et son domaine PRR. En effet, le tandem SH3 isolé lie avec une forte affinité la p22^{PHOX} (constante de dissociation Kd de 0.15 μ M) alors que la construction constituée du tandem SH3 et de toute la partie C-terminale de NOXO1 (contenant le domaine PRR) diminue cette affinité de cent fois (Kd de 17.5 μ M). Cependant des mutations dans la région PRR permettent de rétablir une interaction de forte affinité (kd de 0.5 μ M) [Dutta 2010]. Il a été démontré également, que le tandem SH3 isolé de NOXO1 peut établir une interaction avec la partie C-terminale de NOXO1 isolée contenant le domaine PRR (aa 293-371) [Yamamoto 2007]. Il a été proposé que cette interaction intramoléculaire au sein de NOXO1 pourrait empêcher la liaison de son tandem SH3 et de son domaine PRR avec la p22^{PHOX} et NOXA1 respectivement. Ceci implique donc qu'un changement conformationnel est nécessaire pour rompre l'interaction intramoléculaire au sein de NOXO1 afin de permettre l'interaction de NOXO1 avec la p22^{PHOX} et NOXA1. Nos résultats suggèrent que la phosphorylation de NOXO1 sur la sérine 154 pourrait être le mécanisme par lequel ce changement conformationnel est initié.

Ainsi, dans ce deuxième article, nous démontrons, pour la première fois, que **NOXO1 β est phosphorylée au cours de l'activation du complexe NOX1 par le PMA et que cette phosphorylation constitue un nouveau mode de régulation, positive, de l'activité du complexe.** Compte tenu des résultats de ce travail, nous proposons le modèle suivant pour l'activation de NOX1: 1) dans les cellules au repos, NOXO1 β , existe sous une conformation auto-inhibée qui implique une interaction intramoléculaire engageant son tandem SH3 avec son domaine PRR. Par conséquent, elle n'interagit que faiblement avec NOXA1 et la p22^{PHOX}. 2) Lorsque les cellules sont stimulées par le PMA, la S154 localisée juste en amont du tandem SH3 est phosphorylée. Cette phosphorylation initierait un changement conformationnel dans NOXO1 et permettrait une interaction de forte affinité avec NOXA1. Cependant cette phosphorylation n'est pas suffisante par elle-même pour induire une interaction de forte affinité avec la p22^{PHOX}. 3) C'est la liaison de NOXA1

à NOXO1 phosphorylée qui permettrait un dépliement total de NOXO1 β pour permettre une interaction de haute affinité entre NOXO1 et la p22^{PHOX}. Par conséquent, la localisation membranaire de NOXO1 est consolidée ce qui permet une hyperactivation du complexe NOX1.

Si l'on tient compte des données de ces deux articles, il est possible de considérer que l'activation de NOX1 est un mécanisme finement régulé et contrôlé par la phosphorylation des sous-unités cytosoliques NOXA1 et NOXO1 β . Lorsque les cellules sont au repos, la phosphorylation basale de NOXA1, par les PKC, la PKA et ERK2, permettrait de prévenir l'hyperactivation de NOX1 en maintenant cependant une activité constitutive de production des FRO nécessaire au contrôle de la flore bactérienne dont le colon est riche. Dans le cas d'une invasion bactérienne, c'est la phosphorylation de NOXO1 β qui interviendrait pour optimiser les interactions protéine-protéine et stimuler la production de FRO en vue de lutter efficacement contre les microorganismes invasifs. Ainsi un flux constant mais non excessif de FRO serait nécessaire pour assurer la défense anti-infectieuse du colon, mais ce flux doit pouvoir être augmenté en cas d'invasion bactérienne. Cette régulation est contrôlée par la phosphorylation de NOXA1 et de NOXO1.

Ces travaux de thèse permettent donc de mieux comprendre le mécanisme par lequel l'activité de NOX1 est régulée. Il est important de noter que bien que NOX1 requiert les mêmes éléments protéiques que NOX2; à savoir une sous-unité activatrice et une sous-unité organisatrice et que ces dernières, tout comme leurs homologues phagocytaires, sont régulées par des événements de phosphorylation, cette oxydase n'est pas régulée de la même façon que NOX2. Alors que NOX2 ne peut produire des FRO qu'une fois le phagocyte stimulé, NOX1 possède déjà une activité constitutive dans les HEK293.

En effet, dans les cellules au repos, une certaine proportion de NOXA1, NOXO1 et Rac1 est localisée à la membrane plasmique où, par un jeu d'interactions protéine-protéine et protéine-lipides (impliquant le domaine PX de NOXO1), le complexe NOX1 est déjà capable de générer des FRO qui joueraient, au niveau de la muqueuse intestinale, un rôle important dans la signalisation cellulaire mais aussi dans le contrôle de la flore bactérienne. Par contre, dans les PNs au repos, la

p40^{PHOX}, la p47^{PHOX}, la p67^{PHOX} et Rac2 sont uniquement localisées dans le cytosol où il est aussi connu que les trois premières sont dans des conformations auto-inhibées qui les empêchent de s'associer entre elles pour former un complexe NOX2 actif.

La stimulation du PN par des agonistes physiologiques (fMLF, zymosan) ou pharmacologiques (PMA) va induire la phosphorylation de la p47^{PHOX} et de la p67^{PHOX} ce qui va permettre de déplier ces protéines rendant ainsi leurs domaines structuraux accessibles. Elles sont alors capables d'interagir entre elles mais aussi avec leurs partenaires membranaires et d'induire l'explosion oxydative. La phosphorylation de la p47^{PHOX} représente l'événement déclencheur de l'activité de NOX2 : une fois phosphorylée, la p47^{PHOX} sera capable de lier ses partenaires cytosoliques et d'initier la translocation de l'ensemble du trimère (p47^{PHOX}-p67^{PHOX}-p40^{PHOX}) vers la membrane plasmique.

Contrairement à NOX2, nos données montrent qu'il n'en est pas de même des phosphorylations de NOXA1 et NOXO1. La phosphorylation de NOXA1 a pour conséquence de diminuer ses interactions avec Rac1 et NOX1 et donc de prévenir l'hyperactivation du complexe. Quant à la phosphorylation de NOXO1, elle constitue, tout comme celle de la p47^{PHOX}, un mécanisme de régulation positive de l'activité du complexe. La différence entre les deux sous-unités organisatrices réside dans la capacité de NOXO1 à lier, certes faiblement, ses partenaires NOXA1 et la p22^{PHOX} dès l'état de repos des cellules et ce malgré qu'elle soit, tout comme la p47^{PHOX}, dans une conformation repliée, ce qui explique l'activité constitutive qu'on observe pour NOX1 et pas pour NOX2. Contrairement à la phosphorylation de la p47^{PHOX}, celle de NOXO1 ne fait qu'amplifier l'activité de NOX1.

La régulation de l'activité des NOX par les phosphorylations ne semble donc pas être un processus restreint à NOX2. Parmi les autres membres de la famille des NOX/DUOX, il a été montré que NOX5 et DUOX1/2 sont également régulées par des processus de phosphorylations. L'équipe de Fulton a ainsi mis en évidence que la phosphorylation des T494 et de la S498 induite par le PMA régule positivement l'activité de NOX5. Cette phosphorylation augmente la sensibilité des domaines EF hands au Ca²⁺ intracellulaire [Jagnandan 2007]. La même équipe a montré que la

voie MAPK kinase est également capable de réguler l'activité de NOX5 en modulant la phosphorylation de la S498 [Pandey 2011]. D'autre part dans les thyrocytes, il a été montré que DUOX1 était phosphorylée par la PKA sous l'action de la forskoline et que DUOX2 était phosphorylée par les PKC sous l'action des esters de phorbol [Rigutto 2009]. La phosphorylation de DUOX1 a lieu sur les sérines 955 et 1217. Mais, alors que la phosphorylation de la S955 intervient dans la régulation positive de DUOX1, la phosphorylation de la S1217 semble au contraire inhiber son activation [Rigutto 2009]. Ainsi, l'activité de DUOX1 pourrait aussi être la résultante de l'équilibre qui existe entre l'état de phosphorylation de la S955 et de la S1217.

Dans la continuité de notre travail, nous étudierons la phosphorylation de la sous-unité catalytique NOX1 et déterminerons les conséquences de sa phosphorylation sur l'activité du complexe. Le travail de notre équipe, paru en 2009, a ainsi montré que la gp91^{PHOX}/NOX2 était phosphorylée par les PKC au cours de la stimulation par le PMA [Raad 2009] et il est intéressant de constater que les sites potentiels de cette phosphorylation sont conservés dans la séquence de la sous-unité catalytique NOX1.

A moyen terme, les résultats de cette thèse contribueront au développement d'outils diagnostic à savoir des anticorps anti S172 et anti S282 de NOXA1 et anti S154 de NOXO1 β qui permettront d'étudier l'état de phosphorylation de ces deux protéines dans différentes maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), telles que la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique. A plus long terme, ces résultats pourraient permettre la synthèse de peptides inhibiteurs qui permettraient de limiter la production excessive de FRO par NOX1 dans différentes situations inflammatoires où NOX1 est impliquée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG and Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature*. **1991** Oct 17; 353(6345):668-670.

Abo A, Webb MR, Grogan A and Segal AW. Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem J*. **1994** Mar 15; 298 Pt 3:585-591.

Ago T, Nunoi H, Ito T and Sumimoto H. Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47 (phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47 (phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem*. **1999** Nov 19; 274 (47):33644-33653.

Ago T, Takeya R, Hiroaki H, Kuribayashi F, Ito T, Kohda D and Sumimoto H. The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module. *Biochem Biophys Res Commun*. **2001** Sep 28; 287(3):733-738.

Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D and Sumimoto H. Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2003** Apr 15; 100 (8):4474-4479. Epub 2003 Apr 2.

Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H and Iida M. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation*. **2004** Jan 20; 109(2):227-233. Epub 2004 Jan 12.

Ago T, Kitazono T, Kuroda J, Kumai Y, Kamouchi M, Ooboshi H, Wakisaka M, Kawahara T, Rokutan K, Ibayashi S and Iida M. NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells. *Stroke*. **2005** May; 36(5):1040-1046. Epub 2005 Apr 21.

Allaoui A, Botteaux A, Dumont JE, Hoste C and De Deken X. Dual oxidases and hydrogen peroxide in a complex dialogue between host mucosae and bacteria. *Trends Mol Med*. **2009** Dec; 15(12):571-579. Epub 2009 Nov 11.

Alloul N, Gorzalczany Y, Itan M, Sigal N and Pick E. Activation of the superoxide-generating NADPH oxidase by chimeric proteins consisting of segments of the cytosolic component p67(phox) and the small GTPase Rac1. *Biochemistry*. **2001** Dec 4; 40(48):14557-14566.

Amara N, Goven D, Prost F, Muloway R, Crestani B and Boczowski J. NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGFbeta1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. *Thorax*. **2010** Aug; 65(8):733-738.

Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R and Brandes RP. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation

of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem*. **2004** Oct 29; 279(44):45935-45941. Epub 2004 Aug 18.

Ambasta RK, Schreiber JG, Janiszewski M, Busse R, Brandes RP. Noxa1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice. *Free Radic Biol Med*. **2006** Jul 15; 41(2):193-201. Epub 2006 Jan 30.

Ambruso DR, Knall C, Abell AN, Panepinto J, Kurkchubasche A, Thurman G, Gonzalez-Aller C, Hiester A, deBoer M, Harbeck RJ, Oyer R, Johnson GL and Roos D. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2000** Apr 25; 97(9):4654-4659.

Ameziane El-Hassani R, Morand S, Boucher JL, Frapart YM, Apostolou D, Agnandji D, Gnidehou S, Ohayon R, Noel-Hudson MS, Francon J, Lalaoui K, Virion A and Dupuy C. Dual-oxidase-2 has an intrinsic ca²⁺ dependent H₂O₂-generating activity. *J Biol Chem*. **2005** Aug 26 ; 280 (34):30046-30054. Epub 2005 Jun 22.

Arakawa N, Katsuyama M, Matsuno K, Urao N, Tabuchi Y, Okigaki M, Matsubara H and Yabe-Nishimura C. Novel transcripts of Nox1 are regulated by alternative promoters and expressed under phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells. *Biochem J*. **2006** Sep 1; 398 (2):303-310.

Arnold RS, Shi J, Murad E, Whalen AM, Sun CQ, Polavarapu R, Parthasarathy S, Petros JA and Lambeth JD. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001** May 8; 98(10):5550-5555. Epub 2001 May 1.

B

Babbitt BA, Jesaitis AJ, Ivanov AI, Kelly D, Laukoetter M, Nava P, Parkos CA, Nusrat A. Formyl peptide receptor-1 activation enhances intestinal epithelial cell restitution through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of Rac1 and Cdc42. *J Immunol*. **2007** Dec 15; 179(12):8112-8121.

Babior BM, Kipnes RS and Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*. **1973** Mar; 52 (3):741-744.

Babior BM and Kipnes RS. Superoxide-forming enzyme from human neutrophils: evidence for a flavin requirement. *Blood*. **1977** Sep; 50 (3): 517-524.

Babior BM. Protein phosphorylation and the respiratory burst. *Arch Biochem Biophys*. **1988** Aug 1; 264(2):361-367.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. **1999** Mar 1; 93(5):1464-1476.

Babior BM. The activity of leukocyte NADPH oxidase: regulation by p47^{PHOX} cysteine and serine residues. *Antioxid Redox Signal*. **2002** Feb; 4(1):35-38.

- Bae YS**, Choi MK and Lee WJ. Dual oxidase in mucosal immunity and host-microbe homeostasis. *Trends Immunol.* **2010** Jul; 31(7):278-287. Epub 2010 Jun 25.
- Baker MA** and Aitken RJ. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol.* **2004** Mar 15; 216 (1-2):47–54.
- Baldrige CW** and Gerard RW. The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol.* **1933**; 103: 235–236.
- Banfi B**, Maturana A, Jaconi S, Arnaudeau S, Laforge T, Sinha B, Ligeti E, Demaurex N and Krause KH. A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science.***2000** Jan 7; 287 (5450):138-142.
- Bánfi B**, Molnár G, Maturana A, Steger K, Hegedûs B, Demaurex N and Krause KH. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem.* **2001** Oct 5; 276(40):37594-37601. Epub 2001 Aug 1.
- Bánfi B**, Clark RA, Steger K and Krause KH. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem.* **2003** Feb 7; 278(6):3510-3513. Epub 2002 Dec 6.
- Bánfi B**, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnár GZ, Krause KH and Cox JA. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem.* **2004** Apr 30; 279(18):18583-18591. Epub 2004 Feb 24. **(a)**
- Banfi B**, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M and Krause KH. NOX3: a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem.* **2004** Oct 29; 279 (44): 46065–46072. Epub 2004 Aug 23. **(b)**
- Barry-Lane PA**, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET and Runge MS. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE^{-/-} mice. *J Clin Invest.***2001** Nov; 108 (10): 1513–1522.
- Basset O**, Deffert C, Foti M, Bedard K, Jaquet V, Ogier-Denis E and Krause KH. NADPH oxidase 1 deficiency alters caveolin phosphorylation and angiotensin II-receptor localization in vascular smooth muscle. *Antioxid Redox Signal.* **2009** Oct; 11(10):2371-2384.
- Bedard K** and Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.***2007** Jan; 87:245-313.
- BelAiba RS**, Djordjevic T, Petry A, Diemer K, Bonello S, Banfi B, Hess J, Pogrebniak A, Bickel C and Görlach A. NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* **2007** Feb 15; 42(4):446-459. Epub 2006 Nov 3.
- Benedyk M**, Sopalla C, Nacken W, Bode G, Melkonyan H, Banfi B and Kerkhoff C. HaCaT keratinocytes overexpressing the S100 proteins S100A8 and S100A9 show increased NADPH oxidase and NF-kappaB activities. *J Invest Dermatol.* **2007** Aug; 127(8):2001-2011. Epub 2007 Apr 12.

Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM and Dinauer MC. Heme-ligating histidines in flavocytochrome b558: identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem*. **2001** Aug 17; 276 (33):31105-31112. Epub 2001 Jun 18.

Blouw B, Seals DF, Pass I, Diaz B and Courtneidge SA. A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth in vivo. *Eur J Cell Biol*. **2008** Sep; 87(8-9):555-67. Epub 2008 Apr 15.

Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*. **1995** Sep 1; 86(5):1649-1660.

Bokoch GM and Zhao T. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxid Redox Signal*. **2006** Sep-Oct; 8(9-10):1533-1548.

Borregaard N, Cross AR, Herlin T, Jones OT, Segal AW and Valerius NH. A variant form of X-linked chronic granulomatous disease with normal nitroblue tetrazolium slide test and cytochrome b. *Eur J Clin Invest*. **1983** Jun; 13(3):243-248.

Bouin AP, Grandvaux N, Vignais PV and Fuchs A. p40^{phox} Is Phosphorylated on Threonine 154 and Serine 315 during Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase. Implication of a protein kinase c-type in the phosphorylation process. *J Biol Chem*. **1998** Nov 13; 273 (46): 30097-30103.

Bouma G and Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. **2003**; 3:521–533.

Boussetta T, Gougerot-Pocidallo MA, Hayem G, Ciappelloni S, Raad H, Arabi Derkawi R, Bournier O, Kroviarski Y, Zhou XZ, Malter JS, Lu PK, Bartegi A, Dang PM and El-Benna J. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood*. **2010** Dec 23; 116(26):5795-5802. Epub 2010 Oct 18.

Brandes RP, Miller FJ, Beer S, Haendeler J, Hoffmann J, Ha T, Holland SM, Gorch A and Busse R. The vascular NADPH oxidase subunit p47phox is involved in redox-mediated gene expression. *Free Radic Biol Med*. **2002** Jun 1; 32 (11): 1116–1122.

Brar SS, Corbin Z, Kennedy TP, Hemendinger R, Thornton L, Bommarius B, Arnold RS, Whorton AR, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Krenitsky K, Ardie KG, Lambeth JD and Hoidal JR. NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. **2003** Aug; 285(2):C353-369. Epub 2003 Apr 9.

Brewer AC, Sparks EC and Shah AM. Transcriptional regulation of the NADPH oxidase isoform, Nox1, in colon epithelial cells: role of GATA-binding factor(s). *Free Radic Biol Med*. **2006** Jan 15; 40(2):260-274. Epub 2005 Oct 10.

Bromberg Y and Pick E. Activation of NADPH-dependent superoxide production in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate. *J Biol Chem*. **1985** Nov 5; 260(25):13539-13545.

Brown DI and Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med.* **2009** Nov 1; 47(9):1239-1253. Epub 2009 Jul 21.

Buschman MD, Bromann PA, Cejudo-Martin P, Wen F, Pass I and Courtneidge SA. The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation. *Mol Biol Cell.* **2009** Mar; 20(5):1302-11. Epub 2009

C

Campion Y, Jesaitis AJ, Nguyen MV, Grichine A, Herenger Y, Baillet A, Berthier S, Morel F and Paclet MH. New p22-phox monoclonal antibodies: identification of a conformational probe for cytochrome b 558. *J Innate Immun.* **2009** Oct; 1(6):556-69. Epub 2009 Jul 29.

Cao X, Dai X, Parker LM and Kreulen DL. Differential regulation of NADPH oxidase in sympathetic and sensory Ganglia in deoxycorticosterone acetate salt hypertension. *Hypertension.* **2007** Oct; 50(4):663-671. Epub 2007 Aug 13.

Carmona-Cuenca I, Herrera B, Ventura JJ, Roncero C, Fernández M and Fabregat I. EGF blocks NADPH oxidase activation by TGF-beta in fetal rat hepatocytes, impairing oxidative stress, and cell death. *J Cell Physiol.* **2006** May; 207(2):322-330.

Carneseccchi S, Deffert C, Pagano A, Garrido-Urbani S, Métrailler-Ruchonnet I, Schäppi M, Donati Y, Matthay MA, Krause KH and Barazzone Argiroffo C. NADPH oxidase-1 plays a crucial role in hyperoxia-induced acute lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* **2009** Nov 15; 180(10):972-981. Epub 2009 Aug 6.

Carneseccchi S, Deffert C, Donati Y, Basset O, Hinz B, Preynat-Seauve O, Guichard C, Arbiser JL, Banfi B, Pache JC, Barazzone-Argiroffo C and Krause KH. A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis. *Antioxid Redox Signal.* **2011** Aug 1; 15(3):607-619. Epub 2011 May 25.

Cassatella MA, Bazzoni F, Flynn RM, Dusi S, Trinchieri G and Rossi F. Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *J Biol Chem.* **1990** Nov 25; 265(33):20241-20246.

Cassimeris L, Safer D, Nachmias VT and, Zigmond SH. Thymosin beta 4 sequesters the majority of G-actin in resting human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol.* **1992** Dec; 119(5):1261-1270.

Chamulitrat W, Schmidt R, Tomakidi P, Stremmel W, Chunglok W, Kawahara T and Rokutan K. Association of gp91phox homolog Nox1 with anchorage-independent growth and MAP kinase-activation of transformed human keratinocytes. *Oncogene.* **2003** Sep 4; 22(38):6045-6053.

Chamulitrat W, Stremmel W, Kawahara T, Rokutan K, Fujii H, Wingler K, Schmidt HH and Schmidt R. A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* **2004** Apr; 122(4):1000-1009.

- Chanock SJ**, El-Benna J, Smith RM and Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem.* **1994** Oct 7; 269(40):24519-24522.
- Chen J**, He R, Minshall RD, Dinauer MC and Ye RD. Characterization of a mutation in the Phox homology domain of the NADPH oxidase component p40phox identifies a mechanism for negative regulation of superoxide production. *J Biol Chem.* **2007** Oct 12; 282 (41):30273-30284. Epub 2007 Aug 13.
- Cheng G**, Cao Z, Xu X, Van Meir EG and Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene.* **2001** May 16; 269 (1-2):131-140.
- Cheng G** and Lambeth JD. NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. *J Biol Chem.* **2004** Feb 6; 279(6):4737-4742. Epub 2003 Nov 14. **(a)**
- Cheng G**, Ritsick D and Lambeth JD. NOX3 regulation by NOXO1, p47phox and p67phox. *J Biol Chem.* **2004** Aug 13; 279 (33):34250-34255. Epub 2004 Jun 4. **(b)**
- Cheng G** and Lambeth JD. Alternative mRNA splice forms of NOXO1: differential tissue expression and regulation of NOX1 and NOX3. *Gene.* **2005** Aug 15; 356: 118-126.
- Cheng G**, Diebold BA, Hughes Y and Lambeth JD. Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J Biol Chem.* **2006** Jun 30; 281(26):17718-17726. Epub 2006 Apr 24.
- Chéret C**, Gervais A, Lelli A, Colin C, Amar L, Ravassard P, Mallet J, Cumano A, Krause KH and Mallat M. Neurotoxic activation of microglia is promoted by a nox1-dependent NADPH oxidase. *J Neurosci.* **2008** Nov 12; 28(46):12039-12051.
- Chessa TA**, Anderson KE, Hu Y, Xu Q, Rausch O, Stephens LR and Hawkins PT. Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Blood.* **2010** Dec 23; 116(26):6027-6036. Epub 2010 Sep 22.
- Choi H**, Leto TL, Hunyady L, Catt KJ, Bae YS, Rhee SG. Mechanism of angiotensin II-induced superoxide production in cells reconstituted with angiotensin type 1 receptor and the components of NADPH oxidase. *J Biol Chem.* **2008** Jan 4; 283(1):255-267. Epub 2007 Nov 2.
- Chose O**, Sansilvestri-Morel P, Badier-Commander C, Bernhardt F, Fabiani JN, Rupin A and Verbeuren TJ. Distinct role of nox1, nox2, and p47phox in unstimulated versus angiotensin II-induced NADPH oxidase activity in human venous smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* **2008** Feb; 51(2):131-9.
- Clark RA**, Volpp BD, Leidal KG and Nauseef WM. Two Cytosolic Components of the Human Neutrophil Respiratory Burst Oxidase Translocate to the Plasma Membrane during Cell Activation. *J Clin Invest.* **1990** Mar; 85 (3):714-721.

Clark RA, Epperson TK and Valente AJ. Mechanisms of activation of NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis*. **2004** Oct; 57(5):S22-S23.

Clempus RE, Sorescu D, Dikalova AE, Pounkova L, Jo P, Sorescu GP, Schmidt HH, Lassègue B and Griendling KK. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2007** Jan; 27(1):42-48. Epub 2006 Nov 2.

Cohen HJ, Newburger PE, Chovaniec ME, Whitin JC and Simons ER. Opsonized zymosan-stimulated granulocytes-activation and activity of the superoxide-generating system and membrane potential changes. *Blood*. **1981** Nov; 58(5):975-982.

Cross AR, Parkinson JF and Jones OT. The superoxide-generating oxidase of leucocytes. NADPH-dependent reduction of flavin and cytochrome b in solubilized preparations. *Biochem J*. **1984** Oct 15; 223 (2):337-344.

Cross AR, Heyworth PG, Rae J and Curnutte JT. A variant X-linked chronic granulomatous disease patient (X91+) with partially functional cytochrome b. *J Biol Chem*. **1995** Apr 7; 270 (14):8194-8200. **(a)**

Cross AR, Rae J and Curnutte JT. Cytochrome b-245 of the neutrophil superoxide-generating system contains two nonidentical hemes. Potentiometric studies of a mutant form of gp91phox. *J Biol Chem*. **1995** Jul 21; 270 (29):17075-17077. **(b)**

Cross A.R. p40(phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558). *Biochem J*. **2000** Jul 1; 349 (Pt 1):113-117.

Cross AR and Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta*. **2004** Jun 28; 1657(1):1-22.

Csillag C, Nielsen OH, Vainer B, Olsen J, Dieckgraefe BK, Hendel J, Vind I, Dupuy C, Nielsen FC and Borup R. Expression of the genes dual oxidase 2, lipocalin 2 and regenerating-islet derived 1alpha in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterology*. **2007**; 42: 454-463.

Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan PJ, Ariyan S, Dikalov S and Sorescu D. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res*. **2005** Oct 28; 97(9):900-907. Epub 2005 Sep 22.

Cui XL, Brockman D, Campos B and Myatt L. Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia. *Placenta*. **2006** Apr-May; 27(4-5):422-431. Epub 2005 Jul 1.

Cui XL, Chang B and Myatt L. Expression and distribution of NADPH oxidase isoforms in human myometrium--role in angiotensin II-induced hypertrophy. *Biol Reprod*. **2010** Feb; 82(2):305-12. Epub 2009 Oct 7.

D

Dai X, Cao X and Kreulen DL. Superoxide anion is elevated in sympathetic neurons in DOCA-salt hypertension via activation of NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2006** Mar; 290(3):H1019-H1026. Epub 2005 Oct 7.

Dang PM, Dewas C, Gaudry M, Fay M, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidallo MA and El Benna J. Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47(phox). *J Biol Chem*. **1999** Jul 16; 274(29):20704-20708.

Dang PM, Cross AR and Babior BM. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67^{PHOX} and cytochrome b558. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001** Mar 13; 98(6):3001-3005. (a)

Dang PM, Fontayne A, Hakim J, El Benna J and Périainin A. Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol*. **2001** Jan 15; 166(2):1206-1213. (b)

Dang PM, Cross AR, Quinn MT and Babior BM. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67^{PHOX} and cytochrome b558 II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002** Apr 2; 99(7):4262-4265. Epub 2002 Mar 26.

Dang PM, Morel F, Gougerot-Pocidallo MA and El Benna J. Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67 (PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry*. **2003** Apr 22; 42 (15): 4520–4526.

Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidallo MA and El Benna J. A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest*. **2006** Jul; 116(7):2033-2043. Epub 2006 Jun 15.

Dang PM, Raad H, Derkawi RA, Boussetta T, Paclet MH, Belambri SA, Makni-Maalej K, Kroviarski Y, Morel F, Gougerot-Pocidallo MA and El-Benna J. The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochem Pharmacol*. **2011** Nov 1; 82(9):1145-1152. Epub 2011 Jul 20.

de Carvalho DD, Sadok A, Bourgarel-Rey V, Gattacceca F, Penel C, Lehmann M and Kovacic H. Nox1 downstream of 12-lipoxygenase controls cell proliferation but not cell spreading of colon cancer cells. *Int J Cancer*. **2008** Apr 15; 122(8):1757-1764.

De Deken X, Wang D, Many MC, Castagliola S, Libert F, Vassart G, Dumond JE and Miot F. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem*. **2000** Jul 28; 275(30):23227-23233.

De Deken X, Wang D, Dumont JE and Miot F. Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system. *Exp Cell Res*. **2002** Feb 15; 273(2):187-196.

de Lamirande E and O'Flaherty C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta*. **2008** Jan; 1784(1):106-115. Epub 2007 Sep 5.

de Mendez I, Homayounpour N and Leto TL. Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol Cell Biol*. **1997** Apr; 17(4):2177-2185.

DeLeo FR, Yu L, Burritt JB, Loetterle LR, Bond CW, Jesaitis AJ and Quinn MT. Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1995** Jul 18; 92(15):7110-7114.

DeLeo FR and Quinn MT. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol*. **1996** Dec; 60(6):677-691.

DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP and Nauseef WM. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest*. **1998** Jan 15; 101(2):455-463.

DeLeo FR, Burritt JB, Yu L, Jesaitis AJ, Dinauer MC and Nauseef WM. Processing and maturation of flavocytochrome b include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem*. **2000**, May 5; 275 (18): 13986-13993.

Dewas C, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA and El-Benna J. TNF-alpha induces phosphorylation of p47 (phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*. **2003** Oct 15; 171(8):4392-4398.

Diaz B, Shani G, Pass I, Anderson D, Quintavalle M, Courtneidge SA. Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Sci Signal*. **2009** Sep 15; 2(88):ra53.

Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T and Snyderman R. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem*. **1989** Oct 5; 264(28):16378-16382.

Diebold BA and Bokoch GM. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol*. **2001** Mar; 2(3):211-215.

Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW and Hall A. Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science*. **1994** Jul 22; 265(5171):531-533.

Dikalova A, Clempus R, Lassègue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San Martin A, Lyle A, Weber DS, Weiss D, Taylor WR, Schmidt HH, Owens GK, Lambeth JD and Griendling KK. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension

and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Circulation*. **2005** Oct 25; 112(17):2668-2676. Epub 2005 Oct 17.

Dinauer MC, Orki SH, Brown R, Jesaitis AJ and Parkos CA. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome *b* complex. *Nature*. **1987** Jun 25-Jul 1; 327(6124):717-720.

Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT and Orkin SH. Human neutrophil cytochrome *b* light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*. **1990** Nov; 86 (5):1729-1737.

Dinauer MC, Pierce EA, Erickson RW, Muhlebach, TJ, Messner H, Orkin SH, Seger RA and Curnutte JT. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1991** Dec 15; 88 (24): 11231-11235.

Donkó A, Ruisanchez E, Orient A, Enyedi B, Kapui R, Péterfi Z, de Deken X, Benyó Z and Geiszt M. Urothelial cells produce hydrogen peroxide through the activation of Duox1. *Free Radic Biol Med*. **2010** Dec 15; 49(12):2040-2048.

Doussiere J, Brandolin G, Derrien V and Vignais PV. Critical assessment of the presence of an NADPH binding site on neutrophil cytochrome *b*558 by photoaffinity and immunochemical labelling. *Biochemistry*. **1993** Aug 31; 32 (34), 8880-8887.

Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, Deme D and Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs. *J Biol Chem*. **1999** Dec 24; 274(52):37265-37269.

Durand D, Cannella D, Dubosclard V, Pebay-Peyroula E, Vachette P and Fieschi F. Small-angle X-ray scattering reveals an extended organization for the autoinhibitory resting state of the p47 (phox) modular protein. *Biochemistry*. **2006** Jun 13; 45(23):7185-7193.

Durand D, Vivès C, Cannella D, Pérez J, Pebay-Peyroula E, Vachette P and Fieschi F. NADPH oxidase activator p67 (phox) behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers. *J Struct Biol*. **2010** Jan; 169(1):45-53. Epub 2009 Aug 31.

Dusi S, Della Bianca V, Grzeskowiak M and Rossi F. Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47phox and p67phox and activation of the NADPH oxidase in normal and Ca²⁺-depleted human neutrophils. *Biochem J*. **1993** Feb 15; 290 (Pt 1): 173-178. **(a)**

Dusi S and Rossi F. Activation of NADPH oxidase of human neutrophils involves the phosphorylation and the translocation of cytosolic p67phox. *Biochem J*. **1993** Dec 1; 296 (Pt 2):367-371. **(b)**

Dusi S, Donini M and Rossi F. Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in

human neutrophils lacking p47phox or p67phox. *Biochem J*. **1996** Mar 1; 314 (Pt 2):409-412.

Dutta S and Rittinger K. Regulation of NOXO1 activity through reversible interactions with p22 and NOXA1. *PLoS One*. **2010** May 4; 5(5):e10478.

E

Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB, Benian GM and Lambeth JD. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol*. **2001** Aug 20; 154(4):879-891.

El Benna J, Faust LP and Babior BM. The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem*. **1994** Sep 23; 269 (38):23431-23436.

El Benna J, Han J, Park JW, Schmid E, Ulevitch RJ and Babior BM. Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch Biochem Biophys*. **1996** Oct 15; 334(2):395-400.

El Benna J, Dang PM, Gaudry M, Fay M, Morel F, Hakim J and Pocardalo-Gougerot MA. Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Subunit p67^{phox} during Human Neutrophil Activation. *J Bio Chem*. **1997** Jul 4; 272 (27): 17204-17208.

El Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA and Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. **2005** May-Jun; 53(3):199-206.

El Benna J, Dang PM and Gougerot-Pocidalo MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol*. **2008** Jul; 30(3):279-289. Epub 2008 Jun 7.

El Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC and Braut-Boucher F. P47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med*. **2009**; 41:217-225.

El Benna J, Dang PM and Perianin A. Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochem Pharmacol*. **2010** Sep 15; 80 (6):778-785.

El Hassani RA, Benfares N, Caillou B, Talbot M, Sabourin JC, Belotte V, Morand S, Gnidehou S, Agnandji D, Ohayon R, Kaniewski J, Noël-Hudson MS, Bidart JM, Schlumberger M, Virion A and Dupuy C. Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **2005** May; 288(5):G933-942. Epub 2004 Dec 9.

El Jamali A, Valente AJ, Lechleiter JD, Gamez MJ, Pearson DW, Nauseef WM and Clark RA. Novel redox-dependent regulation of NOX5 by the tyrosine kinase c-Abl. *Free Radic Biol Med*. **2008** Mar 1; 44(5):868-881. Epub 2007 Dec 8.

Ellson CD, Gobert-Gosse S, Anderson KE, Davidson K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Thuring JW, Cooper MA, Lim ZY, Holmes AB, Gaffney PR, Coadwell J, Chilvers ER, Hawkins PT and Stephens LR. PtdIns (3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nat Cell Biol*. **2001** Jul; 3(7):679-682.

Emmendorffer A, Roesler J, Elsner J, Raeder E, Lohmann-Matthes ML and Meier B. Production of oxygen radicals by fibroblasts and neutrophils from a patient with x-linked chronic granulomatous disease. *Eur J Haematol*. **1993** Oct;51(4):223-227.

F

Fan C, Katsuyama M, Nishinaka T and Yabe-Nishimura C. Transactivation of the EGF receptor and a PI3 kinase-ATF-1 pathway is involved in the upregulation of NOX1, a catalytic subunit of NADPH oxidase. *FEBS Lett*. **2005** Feb 14; 579(5):1301-1305. Epub 2005 Jan 26.

Faust LR, el Benna J, Babior BM and Chanock SJ. The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest*. **1995** Sep; 96(3):1499-1505.

Finan P, Shimizu Y, Gout I, Hsuan J, Truong O, Butcher C, Bennett P, Waterfield MD and Kellie S. An SH3 domain and proline-rich sequence mediate an interaction between two components of the phagocyte NADPH oxidase complex. *J Biol Chem*. **1994** May 13; 269(19):13752-13755.

Flaherty JP, Spruce CA, Fairfield HE and Bergstrom DE. Generation of a conditional null allele of NADPH oxidase activator 1 (NOXA1). *Genesis*. **2010** Sep; 48(9):568-575.

Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA and El-Benna J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry*. **2002** Jun 18; 41(24):7743-7750.

Forbes LV, Truong O, Wientjes FB, Moss SJ and Segal AW. The major phosphorylation site of the NADPH oxidase component p67^{phox} is Thr²³³. *Biochem J*. **1999** Feb 15; 338 (Pt 1):99-105.

Ford WC. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*. **2004**; 10:387-399.

Forehand JR, Pabst MJ, Phillips WA and Johnston RB Jr. Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium. *J Clin Invest*. **1989** Jan; 83(1):74-83.

Fortemaison N, Miot F, Dumont JE and Dremier S. Regulation of H₂O₂ generation in thyroid cells does not involve Rac1 activation. *Eur J Endocrinol*. **2005** Jan; 152(1):127-133.

Forteza R, Salathe M, Miot F, Forteza R and Conner GE. Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **2005** May; 32(5):462-469. Epub 2005 Jan 27.

Francke U, Hsieh CL, Foellmer BE, Lomax KJ, Malech HL and Leto TL. Genes for two autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease assigned to 1q25 (NCF2) and 7q11.23 (NCF1). *Am J Hum Genet*. **1990** Sep; 47(3):483-492.

Freeman JL, Kreck ML, Uhlinger DJ and Lambeth JD. Ras effector homologue region on Rac regulates protein associations in the neutrophil respiratory burst oxidase complex. *Biochemistry*. **1994**; 33:13431–13435.

Freeman JL, Abo A and Lambeth JD. Rac “insert region” is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J Biol Chem*. **1996**; 271:19794 –19801.

Fuchs A, Dagher MC and Vignais PV. Mapping the domains of interaction of p40phox with both p47phox and p67phox of the neutrophil oxidase complex using the two-hybrid system. *J Biol Chem*. **1995** Mar 17; 270 (11):11216-11221.

Fuchs A, Dagher MC, Fauré J and Vignais PV. Topological organization of the cytosolic activating complex of the superoxide-generating NADPH oxidase. Pimpointing the sites of interaction between p47phox, p67phox and p40phox using the two –hybrid system. *Biochim Biophys Acta*. **1996** Jun 5; 1312 (1):39-47.

Fuchs A, Bouin AP, Rabilloud T and Vignais PV. The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells. *Eur J Biochem*. **1997** Oct 15; 249(2):531-539.

Fukuyama M, Rokutan K, Sano T, Miyake H, Shimada M and Tashiro S. Overexpression of a novel superoxide-producing enzyme, NADPH oxidase 1, in adenoma and well differentiated adenocarcinoma of the human colon. *Cancer Lett*. **2005** Apr 18; 221(1):97-104.

Fulton DJ. Nox5 and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal*. **2009** Oct; 11(10):2443-2452.

G

Gabig TG, Crean CD, Mantel PL and Rosli R. Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation. *Blood*. **1995** Feb 1; 85 (3):804-811.

Garcia RC and Segal AW. Phosphorylation of the subunits of cytochrome b-245 upon triggering of the respiratory burst of human neutrophils and macrophages. *Biochem J*. **1988** Jun 15; 252(3):901-904.

Gavazzi G, Banfi B, Deffert C, Fiette L, Schappi M, Herrmann F and Krause KH. Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett*. **2006** Jan 23; 580(2):497-504. Epub 2005 Dec 22.

Geiszt M, Kopp JB, Várnai P and Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2000** Jul 5; 97(14):8010-8014.

Geiszt M, Lekstrom K, Witta J and Leto TL. Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem*. **2003** May 30; 278 (22):20006-20012. Epub 2003 Mar 25. **(a)**

Geiszt M, Lekstrom K, Brenner S, Hewitt SM, Dana R, Malech HL and Leto TL. 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. *J Immunol*. **2003** Jul 1; 171(1):299-306. **(b)**

Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K and Leto TL. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J*. **2003** Aug; 17(11):1502-1504. Epub 2003 Jun 3. **(c)**

Geiszt M, Lekstrom K and Leto TL. Analysis of mRNA transcripts from the NAD(P)H oxidase 1 (NOX1) gene. Evidence against production of the NADPH oxidase homolog -1 short (NOH-1S) transcript variant. *J Biol Chem*. **2004** Dec 3; 279 (49):51661-51668. Epub 2004 Sep 16.

Geiszt M. NADPH Oxidases: New kids on the block. *Cardiovasc Res*. **2006** Jul 15; 71(2):289-299.

Gianni D, Diaz B, Taulet N, Fowler B, Courtneidge SA and Bokoch GM. Novel p47(phox)-related organizers regulate localized NADPH oxidase 1 (Nox1) activity. *Sci Signal*. **2009** Sep 15; 2(88):ra54.

Gianni D, Taulet N, DerMardirossian C and Bokoch GM. c-Src-mediated phosphorylation of NoxA1 and Tks4 induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *Mol Biol Cell*. **2010** Dec; 21(23):4287-4298. Epub 2010 Oct 13.

Gianni D, DerMardirossian C and Bokoch GM. Direct interaction between Tks proteins and the N-terminal proline-rich region (PRR) of NOXA1 mediates NOX1-dependent ROS generation. *Eur J Cell Biol*. **2011** Feb-Mar; 90 (2-3):164-171. Epub 2010 Jul 6.

Ginsel LA, Onderwater JJ, Fransen JA, Verhoeven AJ and Roos D. Localization of the low-Mr subunit of cytochrome b558 in human blood phagocytes by immunoelectron microscopy. *Blood*. **1990** Nov 15; 76(10):2105-2116.

Glebov OK, Rodriguez LM, Nakahara K, Jenkins J, Cliatt J, Humbyrd CJ, DeNobile J, Soballe P, Simon R, Wright G, Lynch P, Patterson S, Lynch H, Gallinger S, Buchbinder A, Gordon G, Hawk E and Kirsch IR. Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2003** Aug; 12(8):755-762.

Gorzalczany Y, Sigal N, Itan M, Lotan O, Pick E. Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly. *J Biol Chem.* **2000** Dec 22; 275(51):40073-40081.

Gorzalczany Y, Alloul N, Sigal N, Weinbaum C and Pick E. A prenylated p67phox-Rac1 chimera elicits NADPH-dependent superoxide production by phagocyte membranes in the absence of an activator and of p47phox: conversion of a pagan NADPH oxidase to monotheism. *J Biol Chem.* **2002** May 24; 277(21):18605-18610. Epub 2002 Mar 14.

Goyal P, Weissmann N, Grimminger F, Hegel C, Bader L, Rose F, Fink L, Ghofrani HA, Schermuly RT, Schmidt HH, Seeger W and Hänze J. Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* **2004** May 15; 36 (10):1279–1288.

Goyal P, Weissmann N, Rose F, Grimminger F, Schäfers HJ, Seeger W and Hänze J. Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **2005** Apr 1; 329(1):32-39.

Grasberger H and Refetoff S. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J Biol Chem.* **2006** Jul 7; 281(27):18269-18272. Epub 2006 May 1.

Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart.* **2004** May; 90(5):491-493.

Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ and Rittinger K. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell.* **2003** May 2; 113 (3):343-355.

Groemping Y and Rittinger Y. "Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective." *Biochem J.* **2005** Mar 15, 386(Pt3):401-416.

Grogan A, Reeves E, Keep N, Wientjes F, Totty NF, Burlingame AL, Hsuan JJ and Segal AW. Cytosolic phox proteins interact with and regulate the assembly of coronin in neutrophils. *J Cell Sci.* **1997** Dec; 110 (Pt 24):3071-3081.

H

Ha EM, Oh CT, Bae YS and Lee WJ. A direct role for dual oxidase in drosophila gut immunity. *Science.* **2005** Nov 4; 310 (5749):847-850.

Haataja L, Groffen J and Heisterkamp N. Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem.* **1997** Aug 15; 272(33):20384-20388.

Han CH, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA and Lambeth JD. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem*. **1998** Jul 3; 273 (27):16663-16668.

Harper AM, Chaplin MF and Segal AW. Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. *Biochem J*. **1985** May 1; 227 (3), 783-788.

Harper RW, Wu C, Soucek K, Setiadi H and Heiserich JP. A reappraisal of the genomic organization of human NOX1 and its splice variants. *Arch Biochem Biophys*. **2005** Mar 15; 435 (2):323-330. **(a)**

Harper RW, Xu C, Eiserich JP, Chen Y, Kao CY, Thai P, Setiadi H and Wu R. Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium. *FEBS Lett*. **2005** Aug 29; 579(21):4911-4917. **(b)**

Hata K, Ito T, Takeshige K and Sumimoto H. Anionic amphiphile-independent activation of the phagocyte NADPH oxidase in a cell-free system by p47phox and p67phox, both in C terminally truncated forms. Implication for regulatory Src homology 3 domain-mediated interactions. *J Biol Chem*. 1998 Feb 13; 273(7):4232-4236.

Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ and Thannickal VJ. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med*. **2009** Sep; 15(9):1077-1081. Epub 2009 Aug 23.

Helmcke I, Heumüller S, Tikkanen R, Schröder K and Brandes RP. Identification of structural elements in Nox1 and Nox4 controlling localization and activity. *Antioxid Redox Signal*. **2009** Jun; 11(6):1279-1287.

Heyworth PG, Curnutte JT, Nauseef WM, Volpp BD, Pearson DW, Rosen H and Clark RA. Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *J Clin Invest*. **1991** Jan; 87(1): 352–356.

Heyworth PG, Knaus UG, Settleman J, Curnutte JT, Bokoch GM. Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Mol Biol Cell*. **1993** Nov; 4(11):1217-1223.

Heyworth PG, Bohl BP, Bokoch GM and Curnutte JT. Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *J Biol Chem*. **1994** Dec 9; 269 (49):30749-30752.

Heyworth PG, Cross AR and Curnutte JT. Chronic Granulomatose disease. *Curr Opin Immunol*. **2003** Oct; 15 (5):578-584.

Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD and Griendling KK. Distinct subcellular localisations of NOX1 and NOX4 in vascular smooth muscle cells. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. **2004** Apr; 24 (4):677-683. Epub 2003 Dec 11.

Hiroaki H, Ago T, Ito T, Sumimoto H and Kohda D. Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nat Struct Biol*. **2001** Jun; 8(6):526-530.

Honbou K, Minakami R, Yuzawa S, Takeya R, Suzuki NN, Kamakura S, Sumimoto H and Inagaki F. Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. *EMBO J*. **2007** Feb 21; 26(4):1176-1186. Epub 2007 Feb 8.

Honjo T, Otsui K, Shiraki R, Kawashima S, Sawamura T, Yokoyama M and Inoue N. Essential role of NOXA1 in generation of reactive oxygen species induced by oxidized low-density lipoprotein in human vascular endothelial cells. *Endothelium*. **2008** May-Jun; 15 (3):137-141.

Huang J, Hitt ND and Kleinberg ME. Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558. *Biochemistry*. **1995** Dec 26, 34 (51): 16753–16757.

Huang J and Kleinberg ME. Activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Phosphorylation controls SH3 domain-dependent binding to p22(phox). *J Biol Chem*. **1999** Jul 9; 274 (28):19731-19737.

I

Ibi M, Katsuyama M, Fan C, Iwata K, Nishinaka T, Yokoyama T and Yabe-Nishimura C. NOX1/NADPH oxidase negatively regulates nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *Free Radic Biol Med*. **2006** May 15; 40(10):1785-1795. Epub 2006 Jan 31.

Ito T, Nakamura R, Sumimoto H, Takeshige K and Sakaki Y. An SH3 domain-mediated interaction between the phagocyte NADPH oxidase factors p40phox and p47phox. *FEBS Lett*. **1996** May 6; 385 (3):229-232.

J

Jaffe AB and Hall A. Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res*. **2002**; 84:57-80.

Jagnandan D, Church JE, Banfi B, Stuehr DJ, Marrero MB and Fulton DJ. Novel mechanism of activation of NADPH oxidase 5. calcium sensitization via phosphorylation. *J Biol Chem*. **2007** Mar 2;282(9):6494-6507. Epub 2006 Dec 12.

Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX and Laurindo FR. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. **2005** Dec 9;280(49):40813-40819. Epub 2005 Sep 8.

Jay DB, Papaharalambus CA, Seidel-Rogol B, Dikalova AE, Lassègue B and Griendling KK. Nox5 mediates PDGF-induced proliferation in human aortic smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* **2008** Aug 1; 45(3):329-335. Epub 2008 Apr 26.

Jiang F, Zhang Y and Dusting GJ. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev.* **2011** Mar; 63(1):218-242. Epub 2011 Jan 12.

Johnson JL, Park JW, Benna JE, Faust LP, Inanami O and Babior BM. Activation of p47 (phox), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. *J Biol Chem.* **1998** Dec 25; 273(52):35147-35152.

Juhász A, Ge Y, Markel S, Chiu A, Matsumoto L, van Balgooy J, Roy K and Doroshov JH. Expression of NADPH oxidase homologues and accessory genes in human cancer cell lines, tumours and adjacent normal tissues. *Free Radic Res.* **2009** Jun; 43(6):523-532.

Jurkowska M, Bernatowska E and Bal J. Genetic and biochemical background of chronic granulomatous disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* **2004** Mar-Apr; 52(2):113-20.

K

Kamiguti AS, Serrander L, Lin K, Harris RJ, Cawley JC, Allsup DJ, Slupsky JR, Krause KH and Zuzel M. Expression and activity of NOX5 in the circulating malignant B cells of hairy cell leukemia. *J Immunol.* **2005** Dec 15;175(12):8424-8430.

Kamizato M, Nishida K, Masuda K, Takeo K, Yamamoto Y, Kawai T, Teshima-Kondo S, Tanahashi T and Rokutan K. Interleukin 10 inhibits interferon gamma- and tumor necrosis factor alpha-stimulated activation of NADPH oxidase 1 in human colonic epithelial cells and the mouse colon. *J Gastroenterol.* **2009**; 44(12):1172-84. Epub 2009 Aug 28.

Kanai F, Liu H, Field SJ, Akbary H, Matsuo T, Brown GE, Cantley LC AND Yaffe MB. The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol.* **2001** Jul;3(7):675-678.

Kao YY, Gianni D, Bohl B, Taylor RM and Bokoch GM. Identification of a conserved Rac-binding site on NADPH oxidases supports a direct GTPase regulatory mechanism. *J Biol Chem.* **2008** May 9; 283 (19):12736-12746. Epub 2008 Mar 17.

Karathanassis D, Stahelin RV, Bravo J, Perisic O, Pacold CM, Cho W and Williams RL. Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO J.* **2002** Oct 1; 21(19):5057-5068.

Katsuyama M, Fan C and Yabe-Nishimura C. NADPH oxidase is involved in prostaglandin F₂α-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells:

induction of NOX1 by PGF2alpha. *J Biol Chem.* **2002** Apr 19; 277(16):13438-13442. Epub 2002 Feb 6.

Katsuyama M. NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: its transcriptional regulation and physiological roles. *J Pharmacol Sci.* **2010**; 114(2):134-146. Epub 2010 Sep 11.

Kawahara T, Teshima S, Oka A, Sugiyama T, Kishi K and Rokutan K. Type I Helicobacter pylori lipopolysaccharide stimulates toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells. *Infect Immun.* **2001** Jul; 69(7):4382-4389. **(a)**

Kawahara T, Kuwano Y, Teshima-Kondo S, Kawai T, Nikawa T, Kishi K and Rokutan K. Toll-like receptor 4 regulates gastric pit cell responses to Helicobacter pylori infection. *J Med Invest.* **2001** Aug; 48(3-4):190-197. **(b)**

Kawahara T, Kuwano Y, Teshima-Kondo S, Takeya R, Sumimoto H, Kishi K, Tsunawaki S, Hirayama T and Rokutan K. Role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1 in oxidative burst response to toll-like receptor 5 signaling in large intestinal epithelial cells. *J Immunol.* **2004** Mar 1; 172 (5): 3051–3058.

Kawahara T, Kohjima M, Kuwano Y, Mino H, Teshima-Kondo S, Takeya R, Tsunawaki S, Wada A, Sumimoto H and Rokutan K. Helicobacter pylori lipopolysaccharide activates Rac1 and transcription of NADPH oxidase Nox1 and its organizer NOXO1 in guinea pig gastric mucosal cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2005** Feb; 288(2):C450-457. Epub 2004 Oct 6. **(a)**

Kawahara T, Ritsick D, Cheng G and Lambeth JD. Point Mutations in the Proline-rich Region of p22phox are Dominant Inhibitors of Nox1- and NOX2-dependent Reactive Oxygen Generation. *J Biol Chem.* **2005** Sep 9; 280 (36):31859-31869. Epub 2005 Jun 30. **(b)**

Kawahara T, Quinn MT and Lambeth JD. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evol Biol.* **2007** Jul 6; 7:109.

Kawahara T and Lambeth JD. Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate modulates Nox5 localization via an N-terminal polybasic region. *Mol Biol Cell.* **2008** Oct; 19(10):4020-4031. Epub 2008 Jul 9.

Kawahara T, Jackson HM, Smith SM, Simpson PD and Lambeth JD. Nox5 forms a functional oligomer mediated by self-association of its dehydrogenase domain. *Biochemistry.* **2011** Mar 29;50(12):2013-2025. Epub 2011 Mar 4.

Khwaja A, Carver JE and Linch DC. Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor alpha in the priming of the neutrophil respiratory burst. *Blood.* **1992** Feb 1; 79 (3):745-753.

Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H and Fukumoto M. NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene.* **2000** Aug 22; 254(1-2):237-243.

Kim C, Marchal CC, Penninger J and Dinauer MC. The hemopoietic Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions. *J Immunol*. **2003** Oct 15;171(8):4425-4430.

Kim JS, Diebold BA, Babior BM, Knaus UG and Bokoch GM. Regulation of NOX1 activity via protein kinase A-mediated phosphorylation of NOXA1 and 14-3-3 binding. *J Biol Chem*. **2007** Nov 30; 282(48):34787-34800.

Kim JS and Bokoch GM. Anthrax edema toxin inhibits Nox1-mediated formation of reactive oxygen species by colon epithelial cells. *J Innate Immun*. **2009** Jan;1(2):145-152. Epub 2008 Aug 18.

Kiss PJ, Knisz J, Zhang Y, Baltrusaitis J, Sigmund CD, Thalmann R, Smith RJ, Verpy E and Banfi B. Inactivation of NADPH oxidase organizer 1 results in severe imbalance. *Curr Biol*. **2006** Jan 24; 16 (2):208-213.

Kleinberg ME, Rotrosen D and Malech HL. Asparagine-linked glycosylation of cytochrome b558 large subunit varies in human phagocytic cells. *J Immunol*. **1989** Dec 15; 143 (12):4152-4157.

Kleinberg ME, Malech HL and Rotrosen D. The phagocyte 47-kilodalton cytosolic oxidase protein is an early reactant in activation of the respiratory burst. *J Biol Chem*. **1990** Sep 15; 265 (26):15577-15583.

Kleinschnitz C, Grund H, Wingler K, Armitage ME, Jones E, Mittal M, Barit D, Schwarz T, Geis C, Kraft P, Barthel K, Schuhmann MK, Herrmann AM, Meuth SG, Stoll G, Meurer S, Schrewe A, Becker L, Gailus-Durner V, Fuchs H, Klopstock T, de Angelis MH, Jandeleit-Dahm K, Shah AM, Weissmann N and Schmidt HH. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol*. **2010** Sep 21; 8(9). pii: e1000479.

Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT and Bokoch GM. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science*. **1991** Dec 6; 254(5037):1512-1515.

Kodama T, Hazeki K, Hazeki O, Okada T and Ui M. Enhancement of chemotactic peptide-induced activation of phosphoinositide 3-kinase by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its relation to the cytokine-mediated priming of neutrophil superoxide-anion production. *Biochem J*. **1999** Jan 15; 337 (Pt 2):201-209.

Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F and Sumimoto H. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*. **1999** Aug 27; 274(35):25051-25060.

Komatsu D, Kato M, Nakayama J, Miyagawa S, Kamata T. NADPH oxidase 1 plays a critical mediating role in oncogenic Ras-induced vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene*. **2008** Aug 7; 27(34):4724-4732. Epub 2008 May 5.

Kramer IM, Verhoeven AJ, Van der Bend RL, Weening RS and Roos D. Purified protein kinase C Phosphorylates a 47-kDa Protein in Control Neutrophil Cytoplasts but Not in Neutrophil Cytoplasts from Patients with the Autosomal Form of Chronic Granulomatous Disease. *J Biol Chem*. **1988** Feb 15; 263(5):2352-2357.

Krause KH. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Japanese journal of infectious diseases*. **2004** Oct; 57 (5):S28–29.

Kreck ML, Freeman JL, Abo A and Lambeth JD. Membrane association of Rac is required for high activity of the respiratory burst oxidase. *Biochemistry*. **1996**; 35:15683–15692.

Kuribayashi, F, Nunoi, H, Wakamatsu, K, Tsunawaki, S, Sato, K, Ito, T and Sumimoto H. The adaptor protein p40 (phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *Embo J*. **2002** Dec 2; 21(23): 6312-6320.

Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD and Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2010** Aug 31; 107(35):15565-15570. Epub 2010 Aug 16.

Kuwano Y, Kawahara T, Yamamoto H, Teshima-Kondo S, Tominaga K, Masuda K, Kishi K, Morita K and Rokutan K. Interferon-g activates transcription of NADPH oxidase 1 gene and up-regulates production of superoxide anion by human large intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. **2006** Feb; 290 (2): C433–C443. Epub 2005 Sep 14.

Kuwano Y, Tominaga K, Kawahara T, Sasaki H, Takeo K, Nishida K, Masuda K, Kawai T, Teshima-Kondo S and Rokutan K. Tumor necrosis factor alpha activates transcription of the NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1) gene and upregulates superoxide production in colon epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. **2008** Dec 15; 45(12):1642-52. Epub 2008 Sep 23.

Kwon J, Lee SR, Yang KS, Ahn Y, Kim YJ, Stadtman ER and Rhee SG. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2004** Nov 23; 101(47):16419-16424. Epub 2004 Nov 8.

Kwon J, Shatynski KE, Chen H, Morand S, de Deken X, Miot F, Leto TL and Williams MS. The nonphagocytic NADPH oxidase Duox1 mediates a positive feedback loop during T cell receptor signaling. *Sci Signal*. **2010** Aug 3; 3(133):ra59.

Kwong CH, Malech HL, Rotrosen D and Leto TL. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins. *Biochemistry*. 1993 Jun 1; 32(21):5711-5717.

L

Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* **2004** Mar; 4(3):181-189.

Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM and Harrison DG. Role of p47phox in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension.* **2002** Oct; 40 (4): 511–515.

Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y and Rittinger K. Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem.* **2002** Mar 22; 277 (12): 10121–10128. Epub 2002 Jan 16.

Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD and Griendling KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res.* **2001** May 11; 88(9):888-894.

Lassègue B and Griendling KK. Nox is playing with a full deck in vascular smooth muscle, a commentary on "Noxa1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice". *Free Radic Biol Med.* **2006** Jul 15;41(2):185-187. Epub 2006 May 6.

Laurent E, McCoy JW, Macina RA, Lui W, Cheng G, Robine S, Papkoff J and Lambeth JD. NOX1 is over-expressed in human colon cancers and correlates with activating mutations in K-Ras. *Int J Cancer.* **2008**; 123:100-107.

Lavigne MC, Malech HL, Holland SM, and Leto TL. Genetic demonstration of p47phox-dependent superoxide anion production in murine vascular smooth muscle cells. *Circulation.* **2001** Jul 3; 104 (1): 79–84.

Lavigne MC and Eppihimer MJ. Cigarette smoke condensate induces MMP-12 gene expression in airway-like epithelia. *Biochem Biophys Res Commun.* **2005** Apr 29; 330(1):194-203.

Lee MY, San Martin A, Mehta PK, Dikalova AE, Garrido AM, Datla SR, Lyons E, Krause KH, Banfi B, Lambeth JD, Lassègue B and Griendling KK. Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2009** Apr; 29(4):480-487. Epub 2009 Jan 15.

Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS, Kim N and Lee SY. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood.* **2005** Aug 1; 106 (3): 852-859. Epub 2005 Apr 7.

Leto TL, Adams AG and De Mendez I. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1994** Oct 25; 91 (22): 10650-10654.

Leto TL and Geiszt M. Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxid Redox Signal.* **2006** Sep-Oct; 8(9-10):1549-1561.

Leusen JH, Bolscher BG, Hilarius PM, Weening RS, Kaulfersch W, Seger RA, Roos D and Verhoeven AJ. 156Pro-->Gln substitution in the light chain of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase (p22-phox) leads to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. *J Exp Med*. **1994** Dec 1; 180 (6):2329-34.

Lewis EM, Sergeant S, Ledford B, Stull N, Dinauer MC and McPhail L. Phosphorylation of p22phox on threonine 147 enhances NADPH oxidase activity by promoting p47phox binding. *J Biol Chem*. **2010**. Jan 29; 285 (5):2959-2967. Epub 2009 Nov 30.

Li J, Mullen A, Yun S, Wientjes F, Brouns G, Thrasher A and Shah A. Essential role of the NADPH oxidase subunit p47phox in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor α . *Circ Res*. **2002** Feb 8; 90 (2): 143–150.

Li J, Stouffs M, Serrander L, Banfi B, Bettioli E, Charnay Y, Steger K, Krause KH and Jaconi ME. The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol Biol Cell*. **2006** Sep; 17(9):3978-3988. Epub 2006 Jun 14.

Li XJ, Fieschi F, Paclet MH, Grunwald D, Champion Y, Gaudin P, Morel F and Stasia MJ. Leu505 of Nox2 is crucial for optimal p67phox-dependent activation of the flavocytochrome b558 during phagocytic NADPH oxidase assembly. *J Leukoc Biol*. **2007** Jan; 81 (1):238-249. Epub 2006 Oct 23.

Lipinski S, Till A, Sina C, Arlt A, Grasberger H, Schreiber S and Rosenstiel P. DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses. *J Cell Sci*. **2009** Oct 1; 122(Pt 19):3522-3530.

Lopez LR, Dagher MC, Gutierrez A, Young B, Bouin AP, Fuchs A and Babior BM. Phosphorylated p40phox as a negative regulator of NADPH oxidase. *Biochemistry*. **2004** Mar 30; 43 (12):3723-3730.

Luxen S, Noack D, Frausto M, Davanture S, Torbett BE and Knaus UG. Heterodimerization controls localization of Duox-DuoxA NADPH oxidases in airway cells. *J Cell Sci*. **2009** Apr 15; 122(Pt 8):1238-1247.

Lyer GYN, Islam DMF and Quastel JH. Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature*. **1961**; 192: 535–542.

Lyer SS, Pearson DW, Nauseef WM and Clark RA. Evidence for a readily dissociable complex of p47phox and p67phox in cytosol of unstimulated human neutrophils. *J Biol Chem*. **1994**; 269:22405-22411.

Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, Seidel-Rogol B, Pounkova L, Du P, Papaharalambus C, Lassegue B and Griending KK. Poldip2, a novel regulator of NOX4 and Cytoskeletal integrity in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res*. **2009** Jul 31; 105(3):249-259. Epub 2009 Jul 2.

M

Maehara Y, Miyano K and Sumimoto H. Role for the first SH3 domain of p67phox in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Biochem Biophys Res Commun.* **2009** Feb 6; 379 (2):589–593. Epub 2008 Dec 29.

Maehara Y, Miyano K, Yuzawa S, Akimoto R, Takeya R and Sumimoto H. A Conserved Region between the TPR and Activation Domains of p67phox Participates in Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase. *J Biol Chem.* **2010** Oct 8; 285 (41):31435-31445. Epub 2010 Aug 2.

Maheswaranathan M, Gole H, Fernandez I, Lassegue B, Griending KK and San Martin A. PDGF regulates slingshot phosphatase activity via Nox1-dependent auto-dephosphorylation of serine 834 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **2011** Aug 20.

Mandal D, Fu P, Levine AD. REDOX regulation of IL-13 signaling in intestinal epithelial cells: usage of alternate pathways mediates distinct gene expression patterns. *Cell Signal.* **2010** Oct; 22(10):1485-1494. Epub 2010 Jun 4.

Marcoux J, Man P, Castellan M, Vivès C, Forest E and Fieschi F. Conformational changes in p47 (phox) upon activation highlighted by mass spectrometry coupled to hydrogen/deuterium exchange and limited proteolysis. *FEBS Lett.* **2009** Feb 18; 583(4):835-840. Epub 2009 Feb 2.

Marcoux J, Man P, Petit-Haertlein I, Vivès C, Forest E and Fieschi F. p47phox molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex. *J Biol Chem.* **2010** Sep 10; 285(37):28980-28990. Epub 2010 Jun 30.

Marty C, Kozasa T, Quinn MT and Ye RD. Activation state-dependent interaction between Galphai and p67phox. *Mol Cell Biol.* **2006** Jul; 26(13):5190-5200.

Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC and Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal.* **2006** Jan; 18(1):69-82. Epub 2005 May 31.

Massenet C, Chenavas S, Cohen-Addad C, Dagher MC, Brandolin G, Pebay-Peyroula E and Fieschi F. Effects of p47phox C terminus phosphorylations on binding interactions with p40phox and p67phox. Structural and functional comparison of p40phox and p67phox SH3 domains. *J Biol Chem.* **2005** Apr 8; 280(14):13752-13761. Epub 2005 Jan 18.

Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamanishi K, Miyazaki M, Matsubara H and Yabe-Nishimura C. Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation.* **2005** Oct 25; 112(17):2677-2685.

Matute JD, Arias AA, Wright NA, Wrobel I, Waterhouse CC, Li XJ, Marchal CC, Stull ND, Lewis DB, Steele M, Kellner JD, Yu W, Meroueh SO, Nauseef WM and Dinauer MC. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal

recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*. **2009** Oct 8; 114 (15):3309-3315. Epub 2009 Aug 19.

McPhail LC, DeChatelet LR and Johnston RB Jr. Generation of chemiluminescence by a particulate fraction isolated from human neutrophils. Analysis of molecular events. *J Clin Invest*. **1979** Apr; 63(4):648-655.

Meier B, Cross AR, Hancock JT, Kaup FJ and Jones OT. Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J*. **1991** Apr 1; 275 (Pt 1):241-245.

Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshtein D, Rickman BH, Rogers AB, Moroski-Erkul CA, McFaline JL, Schauer DB, Dedon PC, Fox JG and Samson LD. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest*. **2008** Jul; 118(7):2516-2525.

Meitzler JL and Ortiz de Montellano PR. Caenorhabditis elegans and human dual oxidase 1 (DUOX1) "peroxidase" domains: insights into heme binding and catalytic activity. *J Biol Chem*. **2009** Jul 10; 284(28):18634-18643. Epub 2009 May 21.

Meng D, Lv DD and Fang J. Insulin-like growth factor-I induces reactive oxygen species production and cell migration through Nox4 and Rac1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. **2008** Nov 1;80(2):299-308. Epub 2008 Jun 20.

Miller FJ Jr, Filali M, Huss GJ, Stanic B, Chamseddine A, Barna TJ and Lamb FS. Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3. *Circ Res*. **2007** Sep 28; 101(7):663-671. Epub 2007 Aug 2.

Ming W, Li S, Billadeau DD, Quilliam LA and Dinauer MC. The Rac effector p67phox regulates phagocyte NADPH oxidase by stimulating Vav1 guanine nucleotide exchange activity. *Mol Cell Biol*. **2007** Jan; 27(1):312-323. Epub 2006 Oct 23.

Mitsushita J, Lambeth JD and Kamata T. The superoxide-generating oxidase NOX1 is functionally required for Ras oncogene transformation. *Cancer Res*. **2004**; 64:3580-3585.

Mittal M, Roth M, Konig P, Hofmann S, Dony E, Goyal P, Selbitz AC, Schermuly RT, Ghofrani HA, Kwapiszewska G, Kummer W, Klepetko W, Hoda MA, Fink L, Hänze J, Seeger W, Grimminger F, Schmidt HH and Weissmann N. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circ Res*. **2007** Aug 3; 101(3):258–267. Epub 2007 Jun 21.

Miyano K, Ueno N, Takeya R, and Sumimoto H. Direct involvement of the small GTPase Rac inactivation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. *J Biol Chem*. **2006**; 281: 21857–21868.

Miyano K, Koga H, Minakami R and Sumimoto H. The insert region of the Rac GTPases is dispensable for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Biochem J*. **2009** Aug 13; 422(2):373-382.

Mizuki K, Takeya R, Kuribayashi F, Nobuhisa I, Kohda D, Nunoi H, Takeshige K and Sumimoto H. A region C-terminal to the proline-rich core of p47phox regulates activation of the phagocyte NADPH oxidase by interacting with the C-terminal SH3 domain of p67phox. *Arch Biochem Biophys*. **2005** Dec 15; 444(2):185-194. Epub 2005 Nov 2.

Mizuno T, Kaibuchi K, Ando S, Musha T, Hiraoka K, Takaishi K, Asada M, Nunoi H, Matsuda I and Takai Y. Regulation of the superoxide-generating NADPH oxidase by a small GTP-binding protein and its stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *J Biol Chem*. **1992**; 267, 10215–10218.

Moll J, Sansig G, Fattori E and van der Putten H. The murine rac1 gene: cDNA cloning, tissue distribution and regulated expression of rac1 mRNA by disassembly of actin microfilaments. *Oncogene*. **1991** May; 6(5):863-866.

Morand S, Ueyama T, Tsujibe S, Saito N, Korzeniowska A and Leto TL. Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation. *FASEB J*. **2009** Apr; 23(4):1205-1218. Epub 2008 Dec 12.

Morel F, Cohen Tanugi Cholley L, Brandolin G, Dianoux AC, Martel C, Champelovier P, Seigneurin J.M, Francois P, Bost M and Vignais PV. The O₂⁻ generating oxidase of B lymphocytes: Epstein-Barr virus-immortalized B lymphocytes as a tool for the identification of defective components of the oxidase in chronic granulomatous disease. *Biochim Biophys Acta*. **1993** Aug 4; 1182 (1): 101-109.

Morel F. [Molecular aspects of chronic granulomatous disease."The NADPH oxidase complex"]. *Bull Acad Natl Med*. **2007** Feb; 191(2):377-390, discussion 390-392.

Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, Van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T and Ris-Stalpers C. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med*. **2002** Jul 11; 347(2):95-102.

Moskwa P, Lorentzen D, Excoffon KJ, Zabner J, McCray PB Jr, Nauseef WM, Dupuy C and Bánfi B. A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. **2007** Jan 15; 175(2):174-183. Epub 2006 Nov 2.

N

Nakamura R, Sumimoto H, Mizuki K, Hata K, Ago T, Kitajima S, Takeshige K, Sakaki Y and Ito T. The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40phox and p67phox, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Biochem*. **1998** Feb 1; 251(3):583-589.

Nakano Y, Banfi B, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Allen LA and Nauseef WM. Critical roles for p22phox in the structural maturation and subcellular targeting of Nox3. *Biochem J*. **2007** Apr 1; 403(1):97-108.

Nauseef WM, Volpp BD, McCormick S, Leidal KG and Clark RA. Assembly of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J Biol Chem*. **1991** mar 25; 266 (9): 5911-5917.

Nisimoto Y, Otsuka-Murakami H and Lambeth DJ. Reconstitution of flavin-depleted neutrophil flavocytochrome b558 with 8-mercapto-FAD and characterization of the flavin-reconstituted enzyme. *J Biol Chem*. **1995** Jul 7; 270 (27):16428-16434.

Nisimoto Y, Freeman JL, Motalebi SA, Hirshberg M and Lambeth JD. Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J Biol Chem*. **1997**; 272:18834 –18841.

Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH and Lambeth JD. The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem*. **1999** Aug 13; 274 (33):22999-23005.

Nisimoto Y, Tsubouchi R, Diebold BA, Qiao S, Ogawa H, Ohara T and Tamura M. Activation of NADPH oxidase 1 in tumour colon epithelial cells. *Biochem J*. **2008** Oct 1; 415(1):57-65.

Nisimoto Y, Jackson HM, Ogawa H, Kawahara T and Lambeth JD. Constitutive NADPH-dependent electron transferase activity of the Nox4 dehydrogenase domain. *Biochemistry*. **2010** Mar 23; 49(11):2433-2442.

Niu XL, Madamanchi NR, Vendrov AE, Tchivilev I, Rojas M, Madamanchi C, Brandes RP, Krause KH, Humphries J, Smith A, Burnand KG and Runge MS. Nox activator 1: a potential target for modulation of vascular reactive oxygen species in atherosclerotic arteries. *Circulation*. **2010** Feb 2; 121(4):549-559. Epub 2010 Jan 18.

Nunoi H, Rotrosen D, Gallin JI and Malech HL. Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science*. **1988** Dec 2, 242 (4843): 1298–1301.

O

Oh H, Jung HY, Kim J and Bae YS. Phosphorylation of serine282 in NADPH oxidase activator 1 by Erk desensitizes EGF-induced ROS generation. *Biochem Biophys Res Commun*. **2010** Apr 9; 394(3):691-696. Epub 2010 Mar 15.

P

Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, Heinzmann U, Marquardt A, Bareiss A, Laufs J, Russ A, Stumm G, Schimenti JC and Bergstrom DE. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3,

encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev.* **2004** Mar 1; 18(5):486-491. Epub 2004 Mar 10.

Pandey D and Fulton DJ. Molecular regulation of NADPH oxidase 5 via the MAPK pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2011** Apr; 300(4):H1336-344. Epub 2011 Feb 4.

Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ and Bae YS. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol.* **2004** Sep 15; 173(6):3589-3593.

Park J W, Ma MC, Ruedi JM, Smith RM and Babior BM. The cytosolic components of the respiratory burst oxidase exist as a M_r approximately 240,000 complex that acquires a membrane-binding site during activation of the oxidase in a cell-free system. *J Biol Chem.* **1992**; 267:17327-17332.

Parkos CA, Allen RA, Cochrane CG and Jesaitis AJ. Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest.* **1987** Sept; 80 (3): 732-742.

Parkos CA, Dinauer MC, Jesaitis AJ, Orkin SH and Curnutte JT. Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease. *Blood.* **1989** May 1; 73(6):1416-20.

Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Brasier AR, Bode C and Runge MS. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin: evidence that p47^{phox} may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* **1999**; 274:19814–19822.

Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, O'dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gougerot-Pocidallo MA, Lizard G and Ogier-Denis E. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol.* **2004** Dec; 24(24):10703-10717.

Pendyala S, Gorshkova IA, Usatyuk PV, He D, Pennathur A, Lambeth JD, Thannickal VJ and Natarajan V. Role of Nox4 and Nox2 in hyperoxia-induced reactive oxygen species generation and migration of human lung endothelial cells. *Antioxid Redox Signal.* **2009** Apr; 11(4):747-764.

Peng G, Huang J, Boyd M and Kleinberg ME. Properties of phagocyte NADPH oxidase p47-phox mutants with unmasked SH3 (Src homology 3) domains: full reconstitution of oxidase activity in a semi-recombinant cell-free system lacking arachidonic acid. *Biochem J.* **2003** Jul 1; 373 (Pt1):221-229.

Perner A, Andresen L, Pedersen G and Rask-Madsen J. Superoxide production and expression of NAD(P)H oxidases by transformed and primary human colonic epithelial cells. *Gut.* **2003** Feb; 52(2):231-236.

Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salomoni P, Grassilli E, Romano G, Calabretta B, Baserga R. Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol*. **1999** Oct; 19(10):7203-7215.

Ponting CC and Phillips C. Rapsyn's knobs and holes: eight tetratricopeptide repeats. *Biochem J*. **1996** Mar 15; 314 (Pt3): 1053–1054.

Q

Quinn MT, Evans T, Loetterle LR, Jesaitis AJ and Bokoch GM. Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *J Biol Chem*. **1993** Oct 5; 268 (28):20983-20987.

Quinn MT and Gauss KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol*. **2004** Oct; 76(4):760-781. Epub 2004 Jul 7.

Quinn MT, Ammons MC and DeLeo FR. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. *Clin Sci (Lond)*. **2006** Jul; 111(1):1-20.

R

Raad H, Paclet MH, Boussetta T, Kroviarski Y, Morel F, Quinn MT, Gougerot-Pocidallo MA, Dang PM and El-Benna J. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J*. **2009** Apr;23(4):1011-1022. Epub 2008 Nov 21.

Ranjan P, Anathy V, Burch PM, Weirather K, Lambeth JD and Heintz NH. Redox-dependent expression of cyclin D1 and cell proliferation by Nox1 in mouse lung epithelial cells. *Antioxid Redox Signal*. **2006** Sep-Oct; 8(9-10):1447-1459.

Regier DS, Waite KA, Wallin R and McPhail LC. A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22 (phox), an NADPH oxidase component. *J Biol Chem*. **1999** Dec 17; 274(51):36601-36608.

Regier DS, Greene DG, Sergeant S, Jesaitis AJ and McPhail LC. Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation. *J Biol Chem*. **2000** Sep 15; 275 (37):28406-28412.

Rigutto S, Hoste C, Grasberger H, Milenkovic M, Communi D, Dumont JE, Corvilain B, Miot F and De Deken X. Activation of dual oxidases (Duox1 and Duox2): differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*. **2009** Mar 13; 284(11):6725-6734. Epub 2009 Jan 14.

Roos D. The genetic basis of chronic granulomatous disease. *Immunol Rev.* **1994** Apr; 138: 121-157.

Roos D, De Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, Ahlin A, Nemet K, Hossle JP, Bernatowska-Matuszkiewicz E and Middleton-Price H. "Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease." *Blood.* **1996** Mar 1; 87(5):1663-1681.

Roos D, Van Bruggen R and Meischl C. Oxydative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* **2003** Oct; 5 (14): 1307-1315.

Rossi F and Zatti M. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia.* **1964** Jan 15; 20(1):21-23.

Rotrosen D, Kleinberg ME, Nuno H, Leto T, Gallin JI and Malech HL. Evidence for a functional cytoplasmic domain of phagocyte oxidase cytochrome b558. *J Biol Chem.* **1990** May 25; 265 (15):8745-8750.

Rotrosen D, Yeung CL, Leto TL, Malech HL and Kwong CH. Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science.* **1992** Jun 5; 256(5062):1459-1462.

Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT and Orkin SH. Cloning the gene for an inherited human disorder—chronic granulomatous disease on the basis of its chromosomal location. *Nature.* **1986** Jul 3-9; 322 (6074): 32–38.

S

Sadok A, Bourgarel-Rey V, Gattacceca F, Penel C, Lehmann M and Kovacic H. Nox1-dependent superoxide production controls colon adenocarcinoma cell migration. *Biochim Biophys Acta.* **2008** Jan; 1783(1):23-33. Epub 2007 Oct 30.

Sadok A, Pierres A, Dahan L, Prévôt C, Lehmann M and Kovacic H. NADPH oxidase 1 controls the persistence of directed cell migration by a Rho-dependent switch of alpha2/alpha3 integrins. *Mol Cell Biol.* **2009** Jul; 29(14):3915-28. Epub 2009 May 18.

Sathyamoorthy M, De Mendez I, Adams AG and Leto TL. P40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem.* **1997** Apr 4; 272 (14):9141-9146.

Sato TK, Overduin M and Emr SD. Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains. *Science.* **2001** Nov 30; 294(5548):1881-1885.

Sbarra AJ and Karnovsky ML. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem.* **1959** Jun; 234(6):1355-1362.

Scheffzek K, Stephan I, Jensen ON, Illenberger D and Gierschik P. The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat Struct Biol.* **2000** Feb; 7(2):122-126.

Schilder YD, Heiss EH, Schachner D, Ziegler J, Reznicek G, Sorescu D, and Dirsch VM. NADPH oxidases 1 and 4 mediate cellular senescence induced by resveratrol in human endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* **2009** Jun 15; 46(12):1598-1606. Epub 2009 Mar 26.

Schneider C, Zanetti M and Romeo D. Surface-reactive stimuli selectively increase protein phosphorylation in human neutrophils. *FEBS Letters.* **1981** May 5; 127 (1):4-8.

Schröder K, Wandzioch K, Helmcke I and Brandes RP. Nox4 acts as a switch between differentiation and proliferation in preadipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2009** Feb;29(2):239-245. Epub 2008 Dec 4.

Seals DF, Azucena EF Jr, Pass I, Tesfay L, Gordon R, Woodrow M, Resau JH and Courtneidge SA. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell.* **2005** Feb; 7(2):155-65.

Segal AW and Jones OT. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature.* **1978** Nov 30; 276 (5687):515-517.

Segal AW, Heyworth PG, Cockcroft S and Barrowman MM. Stimulated neutrophils from patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease fail to phosphorylate a Mr-44,000 protein. *Nature.* **1985** Aug 8-14; 316 (6028):547-549.

Segal AW. Absence of both cytochrome *b*-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease. *Nature.* **1987** Mar 5-11; 326 (6108): 88–91.

Segal AW, West I, Wientjes F, Nugent JH, Chavan AJ, Haley B, Garcia RC, Rosen H and Scrace G. Cytochrome *b*-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J.* **1992** Jun 15; 284 (Pt 3):781-788.

Sekharam M, Zhao H, Sun M, Fang Q, Zhang Q, Yuan Z, Dan HC, Boulware D, Cheng JQ and Coppola D. Insulin-like growth factor 1 receptor enhances invasion and induces resistance to apoptosis of colon cancer cells through the Akt/Bcl-x(L) pathway. *Cancer Res.* **2003** Nov 15; 63(22):7708-7716.

Shao D, Segal AW and Dekker LV. Subcellular localisation of the p40phox component of NADPH oxidase involves direct interactions between the Phox homology domain and F-actin. *Int J Biochem Cell Biol.* **2010** Oct; 42(10):1736-1743. Epub 2010 Jul 15.

Sharma P, Chakraborty R, Wang L, Min B, Tremblay ML, Kawahara T, Lambeth JD and Haque SJ. Redox regulation of interleukin-4 signaling. *Immunity.* **2008** Oct 17; 29(4):551-564.

Sheehan AL, Carrel S, Johnson B, Stanic B, Banfi B and Miller FJ Jr. Role for Nox1 NADPH oxidase in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. **2011** Jun; 216(2):321-326. Epub 2011 Feb 24.

Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y and Sumimoto H. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem*. **2001** Jan 12; 276 (2):1417-1423.

Si J, Fu X, Behar J, Wands J, Beer DG, Souza RF, Spechler SJ, Lambeth D and Cao W. NADPH oxidase NOX5-S mediates acid-induced cyclooxygenase-2 expression via activation of NF-kappaB in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*. **2007**; 282:16244–16255

Si J, Behar J, Wands J, Beer DG, Lambeth D, Chin YE and Cao W. STAT5 mediates PAF-induced NADPH oxidase NOX5-S expression in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **2008**; 294:G174–183.

Someya A, Nagaoka I and Yamashita T. Purification of the 260 kDa cytosolic complex involved in the superoxide production of guinea pig neutrophils. *FEBS Lett*. **1993** Sep 13; 330(2):215-218.

Sorce S and Krause KH. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal*. **2009** Oct; 11(10):2481-2504.

Stasia MJ, Bordigoni P, Martel C and Morel F. A novel and unusual case of chronic granulomatous disease in a child with a homozygous 36-bp deletion in the CYBA gene (A22(0)) leading to the activation of a cryptic splice site in intron 4. *Hum Genet*. **2002** May; 110 (5):444-50. Epub 2002 Apr 9.

Suh YA, Arnold AS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK and Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. **1999** Sep 2; 401 (67485):79-82.

Sumimoto H, Sakamoto N, Nozaki M, Sakaki Y, Takeshige K and Minakami S. Cytochrome b558, a component of the phagocyte NADPH oxidase, is a flavoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. **1992** Aug 14. 186 (3), 1368-1375.

Sumimoto H, Kage Y, Nunoi H, Sasaki H, Nose T, Fukumaki Y, Ohno M, Minakami S and Takeshige K. Role of src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1994** Jun 7; 91 (12): 5345-5349.

Sumimoto H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, Fukumaki Y, Nakamura M and Takeshige K. Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. *J Biol Chem*. **1996** Sep 6;271(36):22152-22158.

Szanto I, Rubbia-Brandt L, Kiss P, Steger K, Banfi B, Kovari E, Hermann F, Hadengue A and Krause KH. Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH

oxidase in colon cancer and inflammatory bowel disease. *J Pathol.* **2005** Oct; 207(2):164-176.

T

Tabet F, Schiffrin EL, Callera GE, He Y, Yao G, Ostman A, Kappert K, Tonks NK and Touyz RM. Redox-sensitive signaling by angiotensin II involves oxidative inactivation and blunted phosphorylation of protein tyrosine phosphatase SHP-2 in vascular smooth muscle cells from SHR. *Circ Res.* **2008** Jul 18;103(2):149-58. Epub 2008 Jun 19.

Takac I, Schröder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD, Shah AM, Morel F and Brandes RP. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J Biol Chem.* **2011** Apr 15; 286(15):13304-13313. Epub 2011 Feb 22.

Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H and Sumimoto H. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem.* **2003** Jul 4; 278(27):25234-25246. Epub 2003 Apr 25.

Takeya R, Taura M, Yamasaki T, Naito S and Sumimoto H. Expression and function of Noxo1gamma, an alternative splicing form of the NADPH oxidase organizer 1. *FEBS J.* **2006** Aug; 273(16): 3663-3677.

Teahan C, Rowe P, Parker P, Totty N, Segal AW. The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome *b-245*. *Nature.* **1987** Jun 25-Jul 1; 327 (6124): 720–721.

Teshima S, Tsunawaki S and Rokutan K. Helicobacter pylori lipopolysaccharide enhances the expression of NADPH oxidase components in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *FEBS Lett.* **1999** Jun 11; 452(3):243-246.

Teshima S, Kutsumi H, Kawahara T, Kishi K and Rokutan K. Regulation of growth and apoptosis of cultured guinea pig gastric mucosal cells by mitogenic oxidase 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2000** Dec; 279(6):G1169-1176.

Thomas MG, Tebbutt S, Williamson RC. Vitamin D and its metabolites inhibit cell proliferation in human rectal mucosa and a colon cancer cell line. *Gut.* **1992** Dec; 33(12):1660-1663.

Tirone F and Cox JA. NADPH oxidase 5 (NOX5) interacts with and is regulated by calmodulin. *FEBS Lett.* **2007** Mar 20; 581(6):1202-1208. Epub 2007 Mar 1.

Tirone F, Radu L, Craescu CT and Cox JA. Identification of the binding site for the regulatory calcium-binding domain in the catalytic domain of NOX5. *Biochemistry.* **2010** Feb 2; 49(4):761-771.

Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ and Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H

oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res*. **2002** Jun 14; 90(11):1205-1213.

Tsunawaki S, Mizunari H, Nagata M, Tatsuzawa O and Kuratsuji T. A novel cytosolic component, p40phox, of respiratory burst oxidase associates with p67phox and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67phox. *Biochem Biophys Res Commun*. **1994** Mar 30; 199(3):1378-1387.

U

Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H and Sumimoto H. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem*. **2005** Jun 17; 280 (24): 23328–23339. Epub 2005 Apr 11.

Ueyama T, Geiszt M and Leto TL. Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol*. **2006** Mar; 26(6):2160-2174.

Ueyama T, Lekstrom K, Tsujibe S, Saito N and Leto TL. Subcellular localization and function of alternatively spliced Noxo1 isoforms. *Free Radic Biol Med*. **2007** Jan 15; 42(2):180-190. Epub 2006 Sep 12.

V

Valencia A and Kochevar IE. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. **2008** Jan; 128(1):214-222. Epub 2007 Jul 5.

Valente AJ, Zhou Q, Lu Z, He W, Qiang M, Ma W, Li G, Wang L, Banfi B, Steger K, Krause KH, Clark RA and Li S. Regulation of NOX1 expression by GATA, HNF-1alpha, and Cdx transcription factors. *Free Radic Biol Med*. **2008** Feb 1; 44(3):430-443. Epub 2007 Oct 22.

Vallet P, Charnay Y, Steger K, Ogier Denis E, Kovari E, Hermann F, Michel JP and Szanto I. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience*. **2005**; 132 (2):233-238.

Volpp BD, Nauseef WM and Clark RA. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science*. **1988** Dec 2, 242 (4843): 1295–1297.

Von Löhneysen K, Noack D, Jesaitis AJ, Dinauer MC and Knaus UG. Mutational analysis reveals distinct features of the Nox4-p22 phox complex. *J Biol Chem*. **2008** Dec 12; 283(50):35273-35282. Epub 2008 Oct 10.

W

Wallach TM and Segal AW. Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b558 of the NADPH oxidase of phagocytes. *Biochem J.* **1996** Nov 15; 320 (1):33-38.

Wallach TM and Segal AW. Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem J.* **1997** Feb 1; 321 (Pt3), 583-585.

Wang D, De Deken X, Milenkovic M, Song Y, Pirson I, Dumont JE and Miot F. Identification of a novel partner of duox: EFP1, a thioredoxin-related protein. *J Biol Chem.* **2005** Jan 28; 280(4):3096-3103. Epub 2004 Nov 22.

Welch HC, Coadwell WJ, Ellson CD, Ferguson GJ, Andrews SR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hawkins PT and Stephens LR. P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell.* **2002** Mar 22; 108 (6):809-821.

Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF and Segal AW. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J.* **1993** Dec 15; 296 (Pt 3):557-561.

Wientjes FB, Panayotou G, Reeves E and Segal AW. Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox. *Biochem J.* **1996** Aug 1; 317(Pt3):919-924.

Wientjes FB, Reeves EP, Soskic V, Furthmayr H and Segal AW. The NADPH oxidase components p47 (phox) and p40 (phox) bind to moesin through their PX domain. *Biochem Biophys Res Commun.* **2001** Nov 30; 289(2):382-388.

Wingler K, Wunsch S, Kreuz R, Rothermund L, Paul M, and Schmidt HH. Upregulation of the vascular NAD(P)H oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med.* **2001** Dec 1; 31 (11): 1456–1464.

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P and Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* **2000** May; 80(5):617-653.

Y

Yamamoto A, Kami K, Takeya R and Sumimoto H. Interaction between the SH3 domains and C-terminal proline-rich region in NADPH oxidase organizer 1 (Noxo1). *Biochem Biophys Res Commun.* **2007** Jan 12; 352(2):560-5. Epub 2006 Nov 20.

Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W and Key L. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol Chem.* **2001** Feb 23; 276(8):5452-5458. Epub 2000 Nov 29.

Yang S, Zhang Y, Ries W and Key L. Expression of Nox4 in osteoclasts. *J Cell Biochem.* **2004** May 15; 92(2):238-248.

Yogi A, Mercure C, Touyz J, Callera GE, Montezano AC, Aranha AB, Tostes RC, Reudelhuber T and Touyz RM. Renal redox-sensitive signaling, but not blood pressure, is attenuated by Nox1 knockout in angiotensin II-dependent chronic hypertension. *Hypertension.* **2008** Feb; 51(2):500-506. Epub 2008 Jan 14.

Yoshida LS, Nishida S, Shimoyama T, Kawahara T, Kondo-Teshima S, Rokutan K, Kobayashi T and Tsunawaki S. Superoxide generation by NOX1 in guinea pig gastric mucosal cells involves a component with a p67(phox)-ability. *Biol Pharm Bull.* **2004** Feb; 27(2):147-155.

Yu L, Zhen L and Dinauer MC. Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits. *J Biol Chem.* **1997** Oct 24; 272(43):27288-27294.

Yu L, Quinn MT, Cross AR and Dinauer MC. gp91 (phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998** Jul 7; 95(14):7993-7998.

Yu L, DeLeo FR, Biberstine-Kinkade KJ, Renee J, Nauseef WM and Dinauer MC. Biosynthesis of flavocytochrome b558. gp91(phox) is synthesized as a 65-kDa precursor (p65) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **1999** Feb 12; 274(7):4364-4369.

Yuzawa S, Ogura K, Horiuchi M, Suzuki NN, Fujioka Y, Kataoka M, Sumimoto H and Inagaki F. Solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox in an autoinhibited form. *J Biol Chem.* **2004** Jul 9; 279(28):29752-29760. Epub 2004 Apr 29. **(a)**

Yuzawa S, Suzuki NN, Fujioka Y, Ogura K, Sumimoto H and Inagaki F. A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes Cells.* **2004** May; 9(5):443-456. **(b)**

Z

Zhan S, Vazquez N, Zhan S, Wientjes FB, Budarf ML, Schrock E, Ried T, Green ED and Chanock SJ. Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription and tissue expression of the human p40phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *Blood.* **1996** Oct 1, 88 (7):2714-2721.

Zhang M, Brewer AC, Schröder K, Santos CX, Grieve DJ, Wang M, Anilkumar N, Yu B, Dong X, Walker SJ, Brandes RP and Shah AM. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2010** Oct 19; 107(42):18121-18126. Epub 2010 Oct 4.

Zhang X, Shan P, Jiang G, Cohn L and Lee PJ. Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. *J Clin Invest*. **2006** Nov; 116(11):3050-3059. Epub 2006 Oct 19.

Zhao X, Carnevale KA and Cathcart MK. Human monocytes use Rac1, not Rac2, in the NADPH oxidase complex. *J Biol Chem*. **2003** Oct 17; 278(42):40788-40792. Epub 2003 Aug 11.

Zhen L, King AA, Xiao Y, Chanock SJ, Orkin SH and Dinauer MC. Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1993** Nov 1; 90 (21):9832-9836.