



HAL
open science

**ANALYSE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE
DE LA NADPH OXYDASE DES NEUTROPHILES :
UTILISATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE
POUR CARACTERISER LES CHANGEMENTS
CONFORMATIONNELS DE p47phox LORS DE SON
ACTIVATION**

Julien Marcoux

► **To cite this version:**

Julien Marcoux. ANALYSE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE LA NADPH OXYDASE DES NEUTROPHILES : UTILISATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE POUR CARACTERISER LES CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS DE p47phox LORS DE SON ACTIVATION. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT: . tel-00908534

HAL Id: tel-00908534

<https://theses.hal.science/tel-00908534v1>

Submitted on 24 Nov 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.

Université de Grenoble

THESE

Soutenue publiquement le 25 mars 2010 par

Julien MARCOUX

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Grenoble
Spécialité Biologie Structurale et Nanobiologie

**ANALYSE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE
LA NADPH OXYDASE DES NEUTROPHILES :
UTILISATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE
POUR CARACTERISER LES CHANGEMENTS
CONFORMATIONNELS DE p47^{phox} LORS DE SON
ACTIVATION**

Composition du jury

Rapporteurs : Edgar PICK
Jeanine TORTAJADA
Président du jury : Serge PEREZ
Directeur de thèse : Franck FIESCHI
Co-directeur de thèse : Eric FOREST

Laboratoire des Protéines Membranaire
Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines
Institut de Biologie Structurale CEA-CNRS-UJF Grenoble

À mes parents,

*sans qui je n'en serai jamais arrivé là: merci pour votre soutien
inconditionnel et votre disponibilité*

À mon frère Nico et ma sœur Marie,

mes idoles!

Je tiens tout d'abord à remercier Franck Fieschi et Eric Forest pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe et d'avoir encadré mon travail de thèse. J'ai vraiment apprécié travailler avec vous deux dans une ambiance très amicale et cependant très constructive. J'ai beaucoup appris durant ces trois ans et demi et même si vos bureaux sont les plus éloignés de l'IBS (mes semelles usées en témoignent), je pense que cette collaboration a été une réussite. Au-delà d'une relation professionnelle efficace marquée par de riches discussions scientifiques, nous avons également beaucoup échangé d'un point de vue plus personnel et cela m'a permis d'effectuer cette thèse dans un climat très serein.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux autres membres du jury : Serge Perez pour avoir accepté de présider mon jury de thèse ; Jeanine Tortajada et Edgar Pick pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

Je voudrais ensuite remercier mes collaborateurs directs qui m'ont aidé à la paillasse. Je pense tout d'abord à Petr Man, qui m'a presque tout appris sur la spectrométrie de masse et l'échange H/D. Merci Pica ! Ce fut un plaisir de te revoir à Brême. Merci aussi à Corinne et Michel pour leur aide au LPM et pour leur amitié. J'ai beaucoup aimé travailler avec vous et bénéficier de votre expérience. Merci également à toutes les personnes qui m'ont entourées, que ce soit au LSMP (Jeremy, Eric Thierry, Shahid, Izabel, Sophie, Martial et Benjamin) ou au LPM (Isabelle, Céline, Antoine, Jacques, Aurélien et Jean).

Un remerciement tout spécial aux nombreux thésards et amis de l'IBS : la « new generation » avec Eric Chabrol, Julieta, Rominou, Lydia. Promis je reviendrai à Grenoble pour qu'on se refasse des fondues et des soirées ! Un hommage aux anciens qui sont maintenant docteurs : Beny B, Thomas, Céline, Hughes, Julien et Carmen. Et plus globalement, je voudrais remercier Jean-Michel, Nicole, Dominique, Dafna, Jean-Pierre qui m'ont gentiment accordé de

leur temps au sein de l'IBS ainsi que Patrice et Dominique pour les données SAXS.

Une pensée aux membres du CJSM et plus particulièrement à ceux du bureau ainsi qu'à l'équipe Belge avec qui nous avons passé de très bons moments.

D'un point de vue plus personnel je voudrais remercier tout mon entourage pour m'avoir soutenu, encouragé voire supporté pendant cette thèse. Merci à Mag', Raph ainsi qu'à la petite Chloé. Enfin, une pensée toute particulière à mes nombreux colocataires du 150 avec qui j'ai partagé de fabuleux moments, de gargantuesques repas et des soirées déguisées décoiffantes. Merci à Lulu, Tibo, Daphnouille, Jeny Jane, Trambert, Chris et bien sur ma chère et tendre Mamé ! Merci aux voisins Bobo, Clem et Marix, Emilie et Jojo ainsi qu'à tous mes amis de la SCI (Victor, Yanouck, Barbie, Pacouze, Zilber, Guigui, Fred, Tomy, Tibo et Captain V.).

Encore une fois merci à tous !!!

SOMMAIRE

ABRÉVIATIONS

CODE INTERNATIONAL DES ACIDES AMINÉS

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LE COMPLEXE DE LA NADPH OXYDASE	1
I. La NADPH oxydase	1
I.1 La NADPH oxydase des phagocytes (Nox2).....	1
I.1.A Rôles physiologiques.....	1
I.1.B Les différents constituants du complexe	4
I.1.B.1 Le flavocytochrome b_{558}	5
I.1.B.2 Les facteurs cytosoliques	7
I.1.B.2.a $p67^{phox}$	9
I.1.B.2.b $p40^{phox}$	12
I.1.B.2.c Rac	13
I.1.C Mécanisme général d'activation de Nox2	16
I.1.C.1 Les voies de transduction du signal	16
I.1.C.2 La translocation à la membrane	19
I.1.C.3 Transferts d'électrons à travers le flavocytochrome b_{558}	21
I.2 Les autres NADPH oxydases	24
I.2.A Topologie et régulateurs des Nox et Duox	25
I.2.B Répartition cellulaire et fonctions physiologiques.....	27
I.2.B.1 Nox1	27
I.2.B.2 Nox3	28
I.2.B.3 Nox4	29
I.2.B.4 Nox5	30
I.2.B.5 Les Duox	31
I.3 Pathologies et intérêts cliniques	32
I.3.A La Granulomatose Chronique Sceptique (CGD)	33
I.3.A.1 Historique.....	33
I.3.A.2 Génétique	33
I.3.A.3 Diagnostique et traitement	35
I.3.B Le cancer	36
I.3.C Autres	39
I.3.C.1 Les maladies cardiovasculaires	39
I.3.C.2 Le vieillissement	40
I.3.C.3 Les maladies pulmonaires	40
I.3.C.4 Les maladies du système nerveux central	41
II. $p47^{phox}$ et son rôle dans le mécanisme d'activation	42
II.1 Topologie	42
II.2 La phosphorylation de $p47^{phox}$ comme signal transducteur	43
II.3 Données structurales et fonctionnelles	45
II.3.A Le domaine PX.....	45
II.3.B Le tandem SH3s	48
II.3.C La région riche en proline (PRR) C-terminale	51
II.4 Mécanisme d'activation de $p47^{phox}$	52
II.4.A L'ancien modèle	52
II.4.B Vers un nouveau modèle	53
CHAPITRE II : LA SPECTROMETRIE DE MASSE (SM)	57
I. Brève introduction à la spectrométrie de masse	57

I.1	Le spectromètre de masse	57
I.2	Historique	57
II.	Les sources d'ionisation	58
II.1	La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI)	59
II.2	L'électrospray ou électronébulisation	62
II.2.A	La formation du « spray »	62
II.2.B	Fission des gouttelettes	63
II.2.C	Formation des ions en phase gazeuse	63
II.2.D	Caractéristiques de l'ESI	64
II.2.E	La nano-ESI	65
II.2.F	Le couplage chromatographique	65
III.	Les analyseurs	66
III.1	Temps de vol (TOF)	66
III.1.A	Historique	66
III.1.B	Fonctionnement du TOF	67
III.1.C	Amélioration de la résolution	68
III.1.C.1	L'extraction retardée	68
III.1.C.2	Le réflectron	69
III.2	Quadripôles	69
III.3	La trappe ionique linéaire	71
III.4	La trappe ionique orbitale	73
III.5	Résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier	74
IV.	Le spectre de masse	75
IV.1	Paramètres	75
IV.2	Massifs isotopiques	77
IV.4	Obtenir la masse à partir des états de charge	79
V.	La spectrométrie de masse en tandem	80
V.1	La MS/MS dans l'espace	81
V.2	La MS/MS dans le temps	82
V.3	Différents types de fragmentation des protéines	83
V.3.A	Dissociation induite par collision (CID)	83
V.3.B	Autres mécanismes de fragmentation	85
CHAPITRE III : LES APPLICATIONS DE LA SM A LA BIOLOGIE STRUCTURALE		86
I.	L'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse (DXMS)	86
I.1	Principe	86
I.2	Caractéristiques de cette méthodologie	88
I.2.A	La trempe à pH acide et basse température	88
I.2.B	Utilisation de protéases acides	89
I.2.C	Vers l'utilisation du Transfert d'Electrons par Dissociation (ETD) ?	90
II.	L'oxydation	91
III.	La protéolyse ménagée	93
IV.	Le pontage covalent chimique	94
V.	La spectrométrie de masse en conditions natives	96

MATERIEL ET METHODES 99

CHAPITRE I : BIOLOGIE MOLECULAIRE		100
I.	Les plasmides utilisés	100
II.	Mutagenèse dirigée de p47^{phox}	102
III.	Clonage de p22^{phox}-Cter	103
IV.	Transformation	105
CHAPITRE II : EXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES		106

I. NADPH oxydase	106
I.1 Formes sauvages et mutantes de p47 ^{phox} FL et ΔCter et du PX	106
I.1.A Culture et expression	106
I.1.B Lyse cellulaire	107
I.1.C Chromatographie d'affinité	107
I.1.D Chromatographie échangeuse de cations	108
I.2 Tandem SH3 + AIR	108
I.3 Etiquette GST	108
I.4 Tandem SH3	108
I.4.A Culture et expression	109
I.4.B Lyse cellulaire et purification	109
I.5 GST-p22 ^{phox} -Cter	109
II. Plasmepsines 2 et 4	111
II.1 Culture et expression	111
II.2 Extraction et purification des corps d'inclusion	111
II.3 Refolding et purification des protéases	112
CHAPITRE III : METHODES DE CARACTERISATION DES PROTEINES	112
I. Gel SDS-PAGE	112
II. Fluorescence des tryptophanes	113
III. Tests fonctionnels	114
III.1 Tests d'interaction p47 ^{phox} -phospholipides	114
III.1.A Co-précipitation avec des liposomes	114
III.1.A.1 Formation des liposomes	114
III.1.A.2 Test de co-précipitation avec les liposomes	115
III.1.B Résonance Plasmonique de Surface (Biacore TM)	115
III.1.B.1 Formation des MLV et des SUV	115
III.1.B.2 Fonctionnalisation des surfaces L1 et HAP	116
III.2 Tests d'interaction p47 ^{phox} -p22 ^{phox} Cter	117
III.2.A Co-sédimentation	117
III.2.B Gel filtration	117
III.2.C Résonance Plasmonique de Surface (Biacore TM)	117
CHAPITRE IV : SPECTROMETRIE DE MASSE	119
I. MALDI-TOF	119
II. Echange hydrogène/deutérium	119
II.1 Cartographie	119
II.1.A Digestion protéolytique acide	119
II.1.B Séparation des peptides par chromatographie liquide	120
II.1.C Identification des peptides	120
II.1.C.1 Acquisition des données sur ESI-Trap	120
II.1.C.2 Analyse des données et cartographie	121
II.2 Echange H/D	122
II.2.A Cinétiques globales	122
II.2.A.1 Tampon de deutération	122
II.2.A.2 Tampon de quenching	122
II.2.A.3 Deutération	122
II.2.A.4 Dessalage de l'échantillon par LC	123
II.2.A.5 Acquisition et traitement des données	124
II.2.B Cinétiques locales	125
II.2.B.1 Deutération, digestion et analyse LC-MS	125
II.2.B.2 Acquisition et traitement des données	125
III. Protéolyse ménagée	126

IV. Interactions non covalentes	126
V. Test de l'activité des plasmepsines	127
V.1 Test de digestion par électrophorèse sur gel SDS-PAGE	127
V.2 Tests de digestion par MALDI.....	127
V.3 Cartographie par ESI-Trap et ESI-TOF	128

BUT DU TRAVAIL ET CONTEXTE SCIENTIFIQUE129

RESULTATS 133

CHAPITRE I : MISE EN EVIDENCE DE CHANGEMENTS STRUCTURAUX LIES A L'ACTIVATION DE p47^{PHOX}	134
I. Introduction	134
II. Résultats préliminaires	135
II.1 Construction de la forme activée stable	135
II.2 Mise au point du protocole de purification pour p47 ^{phox} FL, ΔCter et PX.....	135
II.3 Purification des constructions tandem SH3s et tandem SH3s + AIR	138
II.4 Mise au point du test d'interaction avec les liposomes.....	140
II.5 Mise au point de l'analyse structurale par protéolyse ménagée.....	141
III. Publication : Changements conformationnels de p47^{phox} liés à son activation mis en évidence par échange hydrogène/deutérium et protéolyse ménagée couplés à la spectrométrie de masse	145
IV. CONCLUSION	155
CHAPITRE II : IDENTIFICATION DES SURFACES EXPOSEES AU SOLVANT LORS DE L'ACTIVATION DE p47^{PHOX}	156
I. Introduction	156
II. Résultats préliminaires	156
II.1 Cartographie par SM	157
II.2 Tests fonctionnels.....	160
II.2.A.1 Co-sédimentation	160
II.2.A.2 Chromatographie d'exclusion stérique	160
II.2.A.3 Mise au point du test par résonance plasmonique de surface.....	162
II.2.B Tests d'interaction p47 ^{phox} -liposomes par Biacore TM	163
III. Publication : Activation moléculaire de p47^{phox} pour l'assemblage du complexe de la NADPH oxydase des neutrophiles.	165
IV. Conclusion	192
I. Introduction	195
II. Résultats	196
II.1 Fluorescence des tryptophanes.....	196
II.2 Tests d'interactions non covalentes.....	199
III. Conclusion	204
CHAPITRE IV : DE NOUVELLES PROTEASES ACIDES POUR L'ECHANGE H/D	205
I. Introduction	205
II. Résultats préliminaires	207
II.1 Expression et purification.....	207
II.2 Tests préliminaires d'activité	208
II.2.A Visualisation de l'activité protéolytique sur gel SDS-PAGE.....	208
II.2.B Activation des plasmepsines	209
II.2.C Test de l'activité protéolytique en spectrométrie de masse.....	209
III. Publication : Étude de nouvelles protéases acides issues de plasmodium falciparum pour l'échange H/D couplé à la spectrométrie de masse	213
IV. Conclusion	221

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	223
REFERENCES	229
ANNEXES	265
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	279

TABLE DES FIGURES

Figure 1. La phagocytose	1
Figure 2. Schéma de la cascade oxydative au sein d'un phagosome.....	3
Figure 3. Schéma du complexe enzymatique de la NADPH oxydase avant et après activation.	5
Figure 4. Topologie des composants membranaires du flavocytochrome b ₅₅₈	6
Figure 5. Organisation modulaire des facteurs cytosoliques impliqués dans la régulation de la NADPH oxydase et réseau d'interaction.	7
Figure 6. Structure à 1.8 Å de la région N-terminale de p67 ^{phox}	9
Figure 7. p40 ^{phox}	12
Figure 8. Séquences de Rac1 et Rac2	14
Figure 9. Cycle de la petite protéine G Rac	15
Figure 10. Les voies de transduction du signal d'activation de Nox2	18
Figure 11. Schéma de la NADPH oxydase à l'état activé	19
Figure 12. Les transporteurs redox de la NADPH oxydase.	22
Figure 13. Modèle structural 3D de la région cytosolique de gp91 ^{phox}	22
Figure 14. Localisation des deux hèmes non identiques chez gp91 ^{phox}	23
Figure 15. Les différents homologues de gp91 ^{phox}	25
Figure 16. Comparaison topologique des facteurs cytosoliques de Nox 1, 2 et 3	26
Figure 17. Rôle de Nox3 dans la morphogénèse de l'otolithe.....	28
Figure 18. Rôle des ROS générés par les Nox dans l'angiogénèse	37
Figure 19. Autophagie et homéostasie cellulaire.	38
Figure 20. Localisation et fonctions des Nox dans la paroi vasculaire	39
Figure 21. Rôle de Nox2 dans la maladie d'Alzheimer.....	41
Figure 22. Organisation modulaire de p47 ^{phox}	42
Figure 23. Sites de phosphorylations de p47 ^{phox}	43
Figure 24. Structure auto-inhibée du tandem SH3s de p47 ^{phox}	44
Figure 25. Le domaine PX	46
Figure 26. Modélisation de l'ancrage membranaire des domaines PX de p47 ^{phox} et p40 ^{phox} ...	47
Figure 27. Interaction entre la région Cter de p22 ^{phox} et le tandem SH3s de p47 ^{phox}	49
Figure 28. Le tandem SH3s autoinhibé.....	50
Figure 29. La région riche en proline C-terminale de p47 ^{phox}	51
Figure 30. Divers modèles de p47 ^{phox}	53
Figure 31. Incompatibilité des deux interactions intramoléculaires	54
Figure 32. Un nouveau modèle d'autoinhibition de p47 ^{phox}	55
Figure 33. Structure de l'acide sinapinique	59
Figure 34. Le MALDI	60
Figure 35. Schéma du processus d'ionisation par désorption/ionisation (MALDI)	61
Figure 36. Source électrospray	62
Figure 37. Formation d'ions dans une source électrospray	64
Figure 38. Schéma d'un analyseur à temps de vol (TOF)	67
Figure 39. Schéma d'une source ESI orthogonale et d'un TOF orthogonal	68
Figure 40. Schéma d'un analyseur quadripolaire	70
Figure 41. Diagrammes de stabilité de deux ions dans un quadripôle.....	71
Figure 42. Schéma d'une trappe ionique	72
Figure 43. Trajectoire d'un ion (m/z 105) piégé dans une trappe ionique.....	72
Figure 44. La trappe ionique orbitale ou Orbitrap	73
Figure 45. Schéma d'une cellule d'ICR	74
Figure 46. Spectre MALDI-TOF de la protéine p47 ^{phox} digérée à la pepsine.....	76

Figure 47. Spectre TIC de la protéine p47 ^{phox} digérée à la pepsine	76
Figure 48. Massifs isotopiques.....	77
Figure 49. Enveloppe d'états de charges de p47 ^{phox} obtenue par ESI-TOF.....	78
Figure 50. a) Spectre obtenu après digestion de p47 ^{phox} à la pepsine. Zooms sur les massifs isotopiques d'un même peptide b) di-chargé et c) mono-chargé	79
Figure 51. Schéma d'un triple quadripôle.....	81
Figure 52. Schéma d'un Qq-TOF	82
Figure 53. Spectrométrie de masse en tandem dans une trappe linéaire.....	82
Figure 54. Nomenclature des ions fils obtenus lors de la fragmentation d'une protéine.....	84
Figure 55. Structure primaire d'une chaîne polypeptidique	86
Figure 56. Principe de l'échange hydrogène/deutérium	87
Figure 57. Influence du pH sur la constante d'échange hydrogène deutérium pour une chaîne polyalanine	88
Figure 58. Phénomène de migration intramoléculaire des hydrogènes (scrambling).....	90
Figure 59. Principe de l'empreinte moléculaire oxydative.....	92
Figure 60. Spectres MS/MS d'ions fragmentés par CID	93
Figure 61. Principe du pontage covalent moléculaire	94
Figure 62. Modèle du complexe cofiline-G-actine déterminé par pontage covalent.....	96
Figure 63. Effet de la dénaturation sur la répartition des états de charge	97
Figure 64. Différents sous-complexes du facteur d'initiation eukaryote eIF3 observés en SM native.....	98
Figure 65. Cartes des plasmides utilisés.....	101
Figure 66. Représentation des protéines recombinantes purifiées lors de la these	106
Figure 67. Schéma du système de LC couplé à l'ESI-Trap.....	120
Figure 68. Schéma du système de LC couplé à l'ESI-TOF.....	124
Figure 69. Schéma représentant les résidus mutés lors de l'optimisation du plasmide pour les formes autoinhibée et activée de p47 ^{phox} FL et ΔCter.....	135
Figure 70. Purification par chromatographie d'affinité de p47 ^{phox} TM-FL.....	135
Figure 71. Purification par chromatographie échangeuse d'anions de p47 ^{phox} TM-FL.....	136
Figure 72. Purification par chromatographie d'affinité de p47 ^{phox} ΔCter.....	137
Figure 73. Purification par chromatographie échangeuse d'anions de p47 ^{phox} ΔCter.....	137
Figure 74. Purification du domaine PX de p47 ^{phox}	138
Figure 75. Purification du tandem SH3s + AIR.....	139
Figure 76. Gel SDS-PAGE de différentes constructions de p47 ^{phox}	139
Figure 77. Mise au point du test de co-sédimentation avec les liposomes.....	140
Figure 78. Protéolyse ménagée de p47 ^{phox} ΔCter par plusieurs protéases	142
Figure 79. Motifs de digestions de p47 ^{phox} ΔCter et p47 ^{phox} TM-ΔCter par trois protéases	143
Figure 80. Données brutes d'ESI-Trap obtenues après digestion de p47 ^{phox} ΔCter à la pepsine	158
Figure 81. Recherche Mascot après digestion de p47 ^{phox} ΔCter à la pepsine	159
Figure 82. Test d'interaction p47 ^{phox} /GST-p22 ^{phox} Cter par co-sédimentation.....	160
Figure 83. Etude de l'interaction p47 ^{phox} ΔCter – GST-p22 ^{phox} par chromatographie d'exclusion stérique.....	161
Figure 84. Etude de l'interaction p47 ^{phox} – GST-p22 ^{phox} Cter par Biacore TM	162
Figure 85. Tests d'interaction entre p47 ^{phox} et des liposomes par Biacore TM	163
Figure 86. Rôle des résidus R162 et D166 dans le mécanisme d'activation	193
Figure 87. Réseau de liaisons hydrogènes entre le SH3A et l'AIR.....	194
Figure 88. Modèle du mécanisme d'activation de p47 ^{phox} montrant le lien entre les relargages de l'AIR et du PX.....	194
Figure 89. Structure du celastrol	195

Figure 90. Spectres d'émission de fluorescence de p47 ^{phox} WT et TM avec différents ratios de celastrol ou de DMSO	197
Figure 91. Spectres d'émission de fluorescence de p47 ^{phox} WT et TM avec un ratio 1/10 de celastrol ou de DMSO	198
Figure 92. Interaction non covalentes observées par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes.....	200
Figure 93. Interactions non covalentes observées par spectrométrie de masse native sur p47 ^{phox} ΔCter	201
Figure 94. SM native sur l'apomyoglobine et le lysozyme en présence de celastrol	202
Figure 95. SM native sur des formes tronquées de p47 ^{phox} , en présence de celastrol.....	203
Figure 96. Séquence de la proplasmepsine 2 de Plasmodium falciparum	206
Figure 97. Purification des corps d'inclusion des plasmepsines 2 et 4.....	207
Figure 98. Purification de la plasmepsine 2 par chromatographie d'échange d'ions	208
Figure 99. Test d'activité des plasmepsines 2 et 4 sur gel SDS-PAGE	209
Figure 100. Cinétique de maturation des plasmepsines 2 et 4 dans 10 mM tampon citrate pH 4,5	209
Figure 101. Spectres MALDI-TOF de p47 ^{phox} ΔCter digérée par différents « pools » de plasmepsine 2	210
Figure 102. Représentation schématique de l'état conformationnel de p47 ^{phox} et des mutants R162A/D166A et S303E/S304E/S318E	226
Figure 103. Interaction entre le tandem SH3s et l'AIR	227

ABRÉVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIR	Auto Inhibitory Region (région auto-inhibitrice)
ACN	ACétoNitrile
CGD	Chronic Granulomatous Disease (granulomatose septique chronique)
CFS	Cell Free System (système acellulaire)
DO	Densité Optique
DTT	1-4, DiThioThréitol
DXMS	Deuterium eXchange coupled to Mass Spectrometry (échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse)
EDTA	acide Ethylène Diamine TétraAcétique
ESI	ElectroSpray Ionisation (ionisation par électrospray)
GST	Glutathione S-Transferase
Hepes	acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(éthanesulfonique)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (chromatographie liquide sous haute pression)
IPTG	Iso-Propyl- β -D-ThioGalactopyranoside
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Broth
LC	Liquid Chromatography (chromatographie liquide)
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (ionisation par désorption laser assistée par matrice)
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
Nox	NADPH Oxydase
PB1	Phox/Bem1p
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction en chaîne par polymérase)
p47 ^{phox} TM	p47 ^{phox} Triple Mutant (S303,304,328E)

phox	phagocyte oxydase
PI-3 kinase	phosphoinositol-3 kinase
PKC	Protéine Kinase C
PLA2	PhosphoLipase A2
PMN	PolyMorphoNuclear (polymorphonucléaires)
PRR	Prolin Riche Region (région riche en proline)
PX	PhoX homologie
PtdIns(3)P	PhosphoInositol-3-phosphate
PtdIns(3,4)P ₂	PhosphoInositol-3,4-biphosphate
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
rpm	rotation par minute
SAXS	Small-Angle X-ray Scattering (diffusion de rayons X aux petits angles)
SANS	Small-Angle Neutrons Scattering (diffusion de neutrons aux petits angles)
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (électrophorèse sur gel de polyacrylamide)
SH ₃	Src Homologie de type 3
SM	Spectrométrie de Masse
SPR	Surface Plasmon Resonance (résonance plasmonique de surface)
TOF	Time Of Flight (temps de vol)
TPR	Tetratrico Peptide Repeat (domaine tetratricopeptide)

CODE INTERNATIONAL DES ACIDES AMINÉS

G	Glycine	Gly
P	Proline	Pro
A	Alanine	Ala
V	Valine	Val
L	Leucine	Leu
I	Isoleucine	Ileu
M	Méthionine	Met
C	Cystéine	Cys
F	Phénylalanine	Phe
Y	Tyrosine	Tyr
W	Tryptophane	Trp
H	Histidine	His
K	Lysine	Lys
R	Arginine	Arg
Q	Glutamine	Glu
N	Asparagine	Asn
E	Glutamate	Glu
D	Aspartate	Asp
S	Sérine	Ser
T	Thréonine	Thr

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Le complexe de la NADPH oxydase

I. La NADPH oxydase

I.1 La NADPH oxydase des phagocytes (Nox2)

I.1.A Rôles physiologiques

La NADPH oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase) des phagocytes est un complexe multienzymatique impliqué dans la réponse immunitaire innée. Suite à une agression pathogénique, l'organisme va réagir en envoyant sur le lieu de l'infection des cellules immunitaires circulantes telles que les granulocytes neutrophiles et les monocytes. Ces sentinelles vont ainsi remonter les gradients de chimioattractants (chimiokines et cytokines) sécrétés par les macrophages résidant dans les tissus puis traverser les parois endothéliales par diapédèse pour enfin s'accumuler sur le lieu de l'agression exogène. Contrairement au complexe d'attaque membranaire du complément qui est localisé dans le sang, la NADPH oxydase est effectivement capable de détruire les pathogènes au niveau de leur intrusion dans l'organisme, avant toute infection systémique.

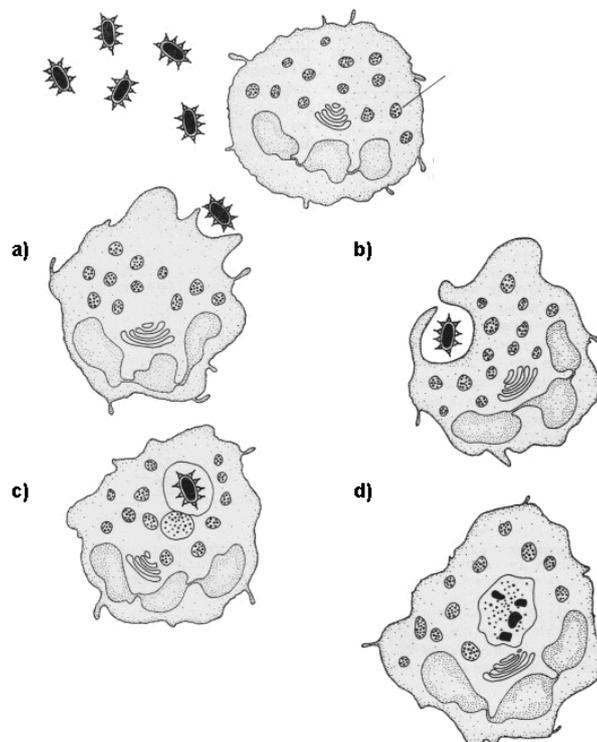
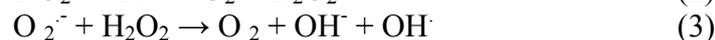
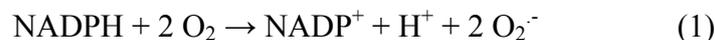


Figure 1. La phagocytose

a) Les pathogènes sont reconnus par le phagocyte, **b)** entourés par des pseudopodes **c)** ingérés puis **d)** dégradés sous l'action commune des ROS et d'enzymes lytiques.

Les neutrophiles et monocytes vont ainsi adhérer, ingérer puis digérer les microorganismes pathogènes par phagocytose (Witko-Sarsat et al. 2000) (Figure 1). Différents récepteurs tels que les Toll-Like-Receptors (TLR), des lectines de type C, des intégrines, reconnaissent de manière spécifique des motifs moléculaires pathogéniques (PAMPs) présents chez de nombreux pathogènes. L'organisme est toutefois capable de distinguer des antigènes issus de pathogènes de ceux issus de cellules apoptotiques qui seront également phagocytés mais induiront des voies de transduction du signal différentes (Blander 2007). La phagocytose peut être facilitée par l'opsonisation des pathogènes. Des pseudopodes vont ensuite englober la particule reconnue pour finalement l'ingérer complètement au sein de vacuoles digestives appelées phagosomes.

C'est au sein de ces phagosomes que les pathogènes phagocytés vont être détruits sous l'action de protéases et de ROS produits par la NADPH oxydase. Ce complexe multi-enzymatique est localisé au niveau de la membrane cytoplasmique du phagosome (cf. I.1.B). La reconnaissance du pathogène par le phagocyte déclenche la transduction d'un signal qui va finalement activer la NADPH oxydase (cf. II.3.A). Celle-ci va alors permettre le transfert d'électrons du cytosol vers l'intérieur du phagosome à travers la membrane. Ces électrons excédentaires vont déclencher une explosion respiratoire en initiant la réduction de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde, en utilisant le NADPH comme donneur d'électron (Equation 1).



La cascade oxydative qui en résulte sera à l'origine de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 formé par dismutation des anions superoxyde O_2^- (Equation 2). La concentration en superoxyde dans le phagosome est alors très élevée, de l'ordre du micromolaire (Reeves et al. 2002). Les radicaux hydroxyles OH^\cdot sont ensuite générés par la réaction d'Haber-Weiss (Equation 3). La myelopéroxydase catalyse ensuite la production d'acide hypochlorique HOCl , plus connue sous le nom d'eau de Javel, à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ions chlorures (Equation 4) (Vignais 2002). Ces espèces hautement réactives sont responsables de la destruction des pathogènes phagocytés (Figure 2). Elles sont capables d'oxyder les lipides membranaires, d'endommager l'ADN (mutation, cassure de chaîne, instabilité génomique) et de modifier les protéines

(oxydation, clivage de liaisons peptidiques, cross linking, modification d'activité enzymatique, de localisation, d'interaction) (Azad et al. 2008).

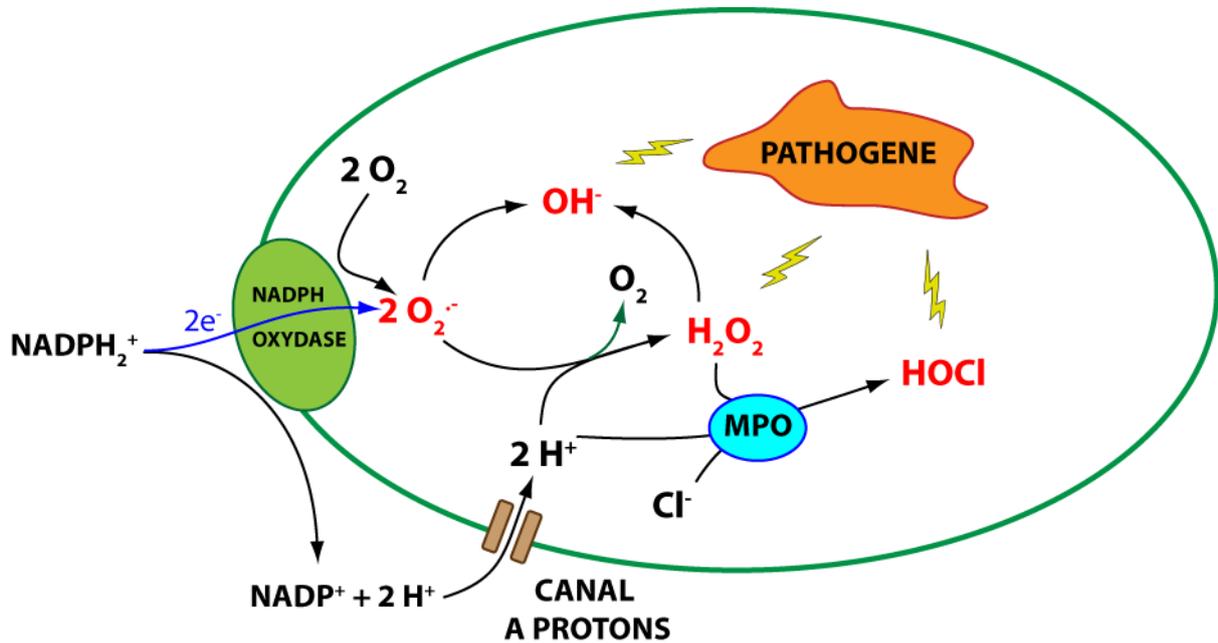


Figure 2. Schéma de la cascade oxydative au sein d'un phagosome.

MPO : myeloperoxydase. Les ROS sont représentés en rouge.

Un autre mécanisme de destruction des pathogènes existe au sein des phagocytes : la destruction enzymatique lysosomiale. L'action conjuguée de ces hydrolases, lipases, protéases, nucléases et autres carbohydrases n'est cependant pas spécifique des neutrophiles puisqu'on retrouve ces vacuoles digestives dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes animales, à l'exception des hématies. Chez les phagocytes, l'action de ces protéases peut être conjuguée à celle des ROS par maturation du phagosome en endosome (modification de la composition membranaire et baisse du pH) puis par fusion des lysosomes aux phagosomes et création d'un phagolysosome (Vieira et al. 2002). Soulignons toutefois l'importance de la NADPH oxydase comme première barrière contre les microorganismes puisque 70 % des leucocytes phagocytaires sont des granulocytes neutrophiles.

Une étude récente vient de montrer un autre mécanisme de défense immunitaire innée impliquant la NADPH oxydase. Il est connu que la production de ROS au sein du phagosome finit par induire la mort du phagocyte. Une étude de Brinkmann et *al.* (Brinkmann et al. 2004) a récemment montré que cette mort cellulaire pouvait s'accompagner de la formation de filaments appelés NET (neutrophil extracellular traps) ou encore « filets » qui se lieraient aux bactéries à Gram positif et négatif, les piègeraient et exerceraient une activité bactéricide extracellulaire à distance. La production de ROS par la NADPH oxydase active interviendrait

dans la destruction des pathogènes à la fois directement dans le phagosome, mais aussi par l'induction d'une mort cellulaire à l'origine des NET (Fuchs et al. 2007).

Les ROS dérivés de la NADPH oxydase peuvent directement réguler certaines voies de transduction du signal (Buetler et al. 2004) et ils ont également été proposés comme jouant un rôle dans l'activation des protéases granulaires (Reeves et al. 2002).

L'importance de cette machinerie enzymatique très finement régulée est illustrée par l'existence d'individus dépourvus d'activité NADPH oxydase et souffrant d'une immunodéficiences innée, la Granulomatose Sceptique Chronique ou CGD (cf. I.3.A). Cependant, bien que l'activité NADPH oxydase soit primordiale pour l'élimination des pathogènes, la génération de superoxyde doit être strictement régulée puisqu'un grand nombre d'études ont montré que des taux élevés de ROS produits par les phagocytes peuvent contribuer à des dommages tissulaires rencontrés dans de nombreuses maladies inflammatoires et neurodégénératives (Krause 2004; Bedard and Krause 2007; Lambeth 2007) (cf. I.3).

Remarquons enfin qu'à plus faibles concentrations, les ROS jouent un rôle de molécules signal qui sont impliquées dans les cascades de transduction de signal d'un grand nombre de facteurs de croissance, de cytokines et d'hormones, régulant des processus biologiques tels que l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire ou encore l'angiogénèse (Sauer and Wartenberg 2005) (cf. I.3).

I.1.B Les différents constituants du complexe

La NADPH oxydase est un complexe multienzymatique comprenant une composante membranaire, le flavocytochrome b_{558} et trois facteurs cytosoliques ainsi qu'une petite GTPase. A l'état de repos, le complexe est dissocié et inactif : le flavocytochrome b_{558} est stocké sur la membrane de granules intracellulaires (Jesaitis et al. 1990), Rac est maintenue dans une forme liée au GDP dimérisée avec l'inhibiteur de dissociation nucléotidique Rho-GDI (Abo and Pick 1991; Abo et al. 1991) et les autres facteurs cytosoliques sont associés dans un complexe ternaire (Figure 2) (Kuribayashi et al. 2002; Lapouge et al. 2002). La NADPH oxydase est constituée du flavocytochrome b_{558} comprenant les protéines membranaires $gp91^{phox}$ et $p22^{phox}$ ainsi que les facteurs cytosoliques $p67^{phox}$, $p47^{phox}$, $p40^{phox}$ et la petite protéine GDP-Rac liée à RhoGDI (Figure 3).

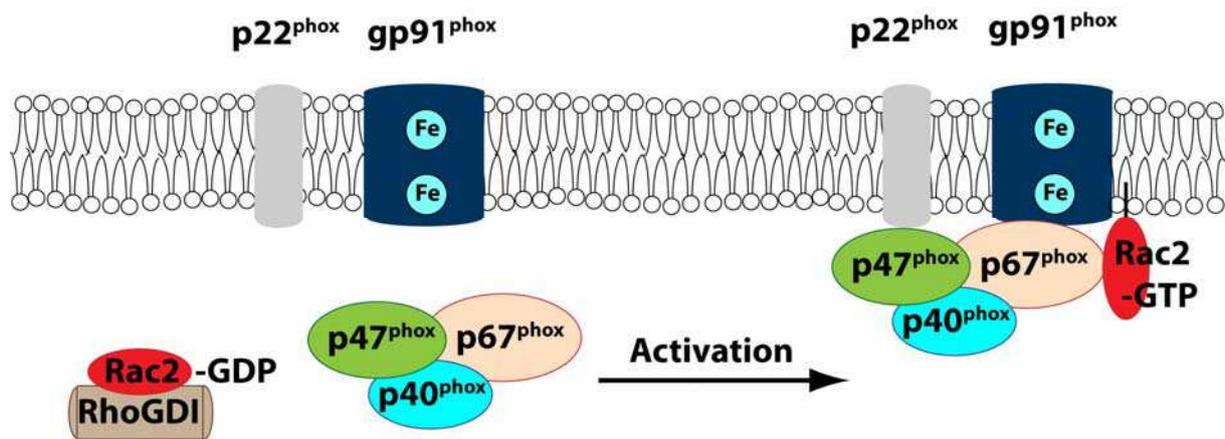


Figure 3. Schéma du complexe enzymatique de la NADPH oxydase avant et après activation.

En réponse au contact d'un phagocyte avec des microorganismes pathogènes, les facteurs cytosoliques vont être recrutés à la membrane et activer le complexe. Les granules intracellulaires vont alors fusionner avec la membrane plasmique chez le neutrophile et le macrophage ou avec la membrane endosomale chez le macrophage (Casbon et al. 2009).

I.1.B.1 Le flavocytochrome b_{558}

Cet hétérodimère constitue le site catalytique de la NADPH oxydase des phagocytes qui produit les anions superoxyde O_2^- en réponse à un stimulus inflammatoire. Il est composé des deux protéines membranaires intégrales, $gp91^{phox}$ (sous unité β aussi appelée Nox2) et de $p22^{phox}$ (sous unité α), qui sont associées de manière non covalente (Figure 4) (Segal and Jones 1978; Dinauer et al. 1987; Parkos et al. 1989). $gp91^{phox}$ est une protéine de 570 résidus fortement glycosylée sur les boucles intra-phagosomales (Wallach and Segal 1997) alors que $p22^{phox}$ n'est pas glycosylée et possède seulement 195 résidus (Taylor et al. 2004). Le flavocytochrome de la NADPH oxydase est appelé b_{558} en raison de l'absorbance de son hème à 558 nm à l'état réduit (Vignais 2002).

L'analyse de la structure primaire de $gp91^{phox}$ laisse suggérer que celle-ci possède 6 hélices transmembranaires dans sa partie N-terminale (Davis et al. 1998). Les sites de fixation du NADPH et du FAD ont été localisés dans la partie C-terminale de $gp91^{phox}$ par alignement de séquence avec d'autres réductases (Taylor et al. 1993) (Figure 4). D'autres équipes ont par ailleurs montré que les extrémités N-terminale et C-terminale de $gp91^{phox}$ étaient localisées dans le cytosol du phagocyte (Imajoh-Ohmi et al. 1992; Paclat et al. 2004). Les deux hèmes ont été localisés dans la partie N-terminale par protéolyse ménagée (Foubert et al. 2001) et les histidines très conservées qui permettent de coordonner les deux groupements prosthétiques ont été identifiées par mutagenèse dirigée (Biberstine-Kinkade et al. 2001).

L'équipe de Jesaitis a également largement contribué depuis 15 ans à l'élaboration de la topologie de gp91^{phox} et p22^{phox} en identifiant progressivement un grand nombre de sites de reconnaissance d'anticorps monoclonaux par « phage display » (Burritt et al. 1995; DeLeo et al. 1995a; DeLeo et al. 1995b; De Leo et al. 1996; Burritt et al. 2000; Burritt et al. 2001; Burritt et al. 2003; Taylor et al. 2004; Baniulis et al. 2005a; Baniulis et al. 2005b; Baniulis et al. 2005c; Taylor et al. 2006; Campion et al. 2007).

Enfin, Dang et al. (Dang et al. 2001; Dang et al. 2002) a mis en évidence une interaction directe entre p67^{phox} et le cytochrome b₅₅₈, favorisée par la présence de p47^{phox} et p40^{phox} phosphorylées.

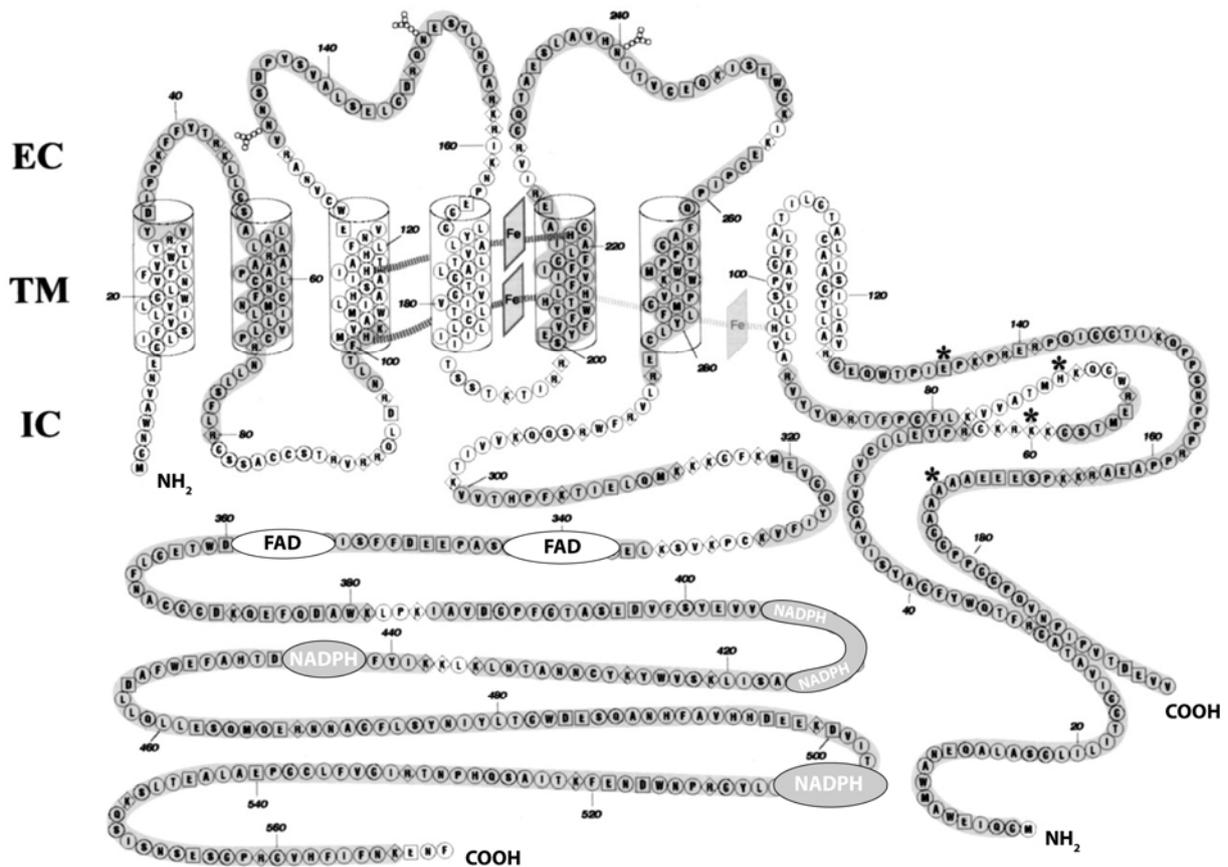


Figure 4. Topologie des composants membranaires du flavocytochrome b₅₅₈.

D'après les prédictions de structures, gp91^{phox} est composé de 6 hélices α transmembranaires et p22^{phox} de deux hélices. gp91^{phox} possède un site de liaison au NADPH, un site de liaison au FAD et deux hèmes (Fe). p22^{phox} possède dans sa région C-terminale cytosolique une séquence riche en prolines. Les astérisques correspondent à des sites de polymorphisme. EC : extracellulaire ; TM : trans-membranaire ; IC : intracellulaire. Adapté d'après (Taylor et al. 2006).

Si la topologie et la fonction biologique de gp91^{phox} sont maintenant bien connues, celles de p22^{phox} restent encore à éclaircir. Le nombre d'hélices α transmembranaires est par exemple encore un mystère et varie de 2 à 4, selon les publications (Davis et al. 1998; Dahan et al. 2002; Taylor et al. 2004). p22^{phox} est nécessaire à la biosynthèse du flavocytochrome mature (Parkos et al. 1989) et elle est phosphorylée suite à l'activation phagocytaire (Regier et

al. 2000), tout comme les facteurs cytosoliques. Il semblerait que le rôle de p22^{phox} soit de faire le lien entre le flavocytochrome b₅₅₈ et les facteurs cytosoliques et plus particulièrement en constituant un point d'ancrage moléculaire pour p47^{phox} (cf. II.2.B).

I.1.B.2 Les facteurs cytosoliques

Ces facteurs cytosoliques ont été découverts lors de recherches sur la granulomatose chronique sceptique (cf I.3.A). Les patients atteints de cette maladie génétique ne présentent pas d'activité NADPH oxydase et sont donc sujets à la formation de granulomes et à des infections récurrentes qui peuvent être mortelles (Segal 1996). Les mutations génétiques responsables de la CGD sont multiples et si 66 % sont liées au chromosome X et à la production du flavocytochrome b₅₅₈, les 33 % restants sont des mutations autosomales dans les gènes codant pour les facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase (Stasia and Li 2008). En effet, deux équipes ont découvert, il y a plus de 20 ans, que l'activité NADPH oxydase pouvait être restaurée chez des patients atteints d'une forme autosomale de la CGD, en supplémentant un milieu acellulaire (Cell Free System) avec deux fractions protéiques de 47 (p47^{phox}) et 65 kilodaltons (p67^{phox}), correspondant aux gènes NCF-1 et NCF-2, respectivement (Nunoi et al. 1988; Volpp et al. 1988).

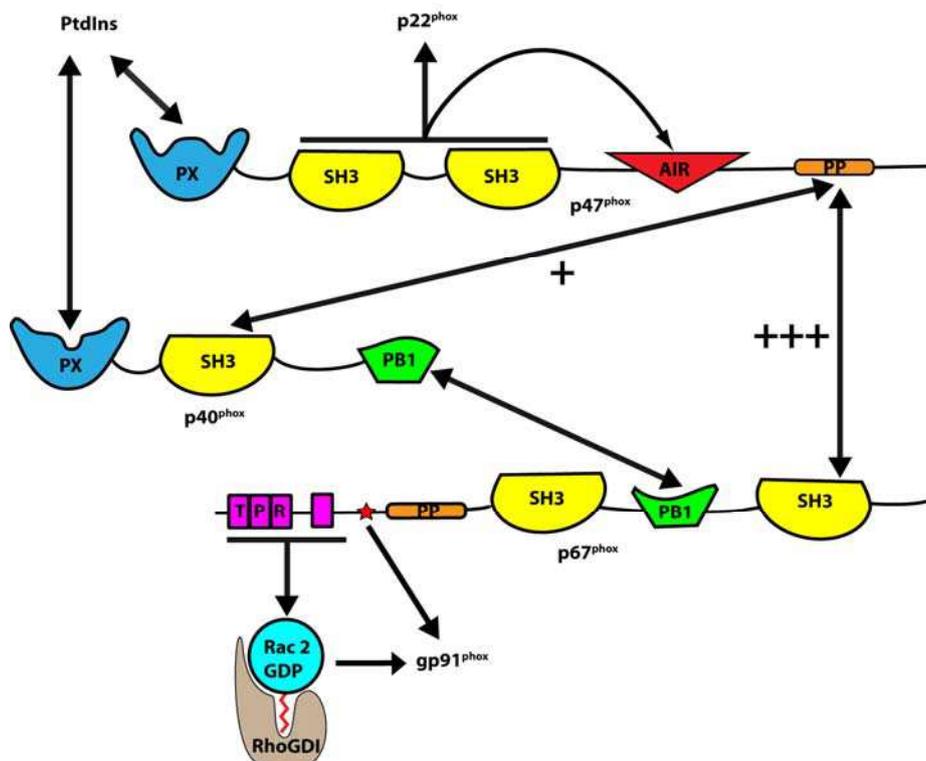


Figure 5. Organisation modulaire des facteurs cytosoliques impliqués dans la régulation de la NADPH oxydase et réseau d'interaction.

Les flèches indiquent toutes les interactions intermoléculaires qui ont été montrées expérimentalement. PX : Phox Homology ; SH3 : Src Homology ; AIR : Auto Inhibitory Region ; PP: PolyProline ; PB1 : Phox and Bem1 ; TPR : Tetratricopeptide Region.

L'utilisation du Cell Free System (CFS) a ainsi permis d'identifier les composants protéiques nécessaires à la régulation de l'activité NADPH oxydase (Curnutte 1985; McPhail et al. 1985; Clark et al. 1987; Curnutte et al. 1987; Agwu et al. 1991; Uhlinger et al. 1991). Un troisième composant du complexe a ainsi été identifié comme étant un hétérodimère associant la petite GTPase p21-Rac 1 et l'inhibiteur de dissociation de GDP rhoGDI (Abo and Pick 1991; Abo et al. 1991). Enfin, une quatrième protéine soluble, p40^{phox} codée par le gène NCF-3 a été identifiée par coimmunoprécipitation (Wientjes et al. 1993).

Depuis, un très grand nombre d'études ont tâché de déchiffrer les interactions existant entre ces différents facteurs cytosoliques d'une part et avec le site catalytique membranaire d'autre part (Figure 5). Différentes approches furent utilisées, parmi lesquelles :

- * des bibliothèques de « phage display » afin d'identifier des séquences spécifiques pouvant médier les interactions protéine-protéine (Burritt et al. 1995; DeLeo et al. 1995b; Burritt et al. 2000; Burritt et al. 2001; Burritt et al. 2003)
- * le CFS, afin de déterminer les conséquences fonctionnelles de mutagenèse dirigée ou de l'utilisation de protéines chimériques (Bromberg and Pick 1984; Heyneman and Vercauteren 1984 ; Bromberg and Pick 1985; Koshkin et al. 1996; Hata et al. 1997; Nisimoto et al. 1997; Hata et al. 1998; Toporik et al. 1998; Nisimoto et al. 1999; Shiose and Sumimoto 2000; Alloul et al. 2001; Ebisu et al. 2001; Miyano et al. 2001; Dang et al. 2003; Miyano et al. 2003; Nagasawa et al. 2003; Peng et al. 2003; Dagher and Pick 2007; Li et al. 2007)
- * des peptides synthétiques (Nauseef et al. 1993; Joseph et al. 1994; Morozov et al. 1998; Dahan et al. 2002; Massenet et al. 2005)
- * des études structurales de diffraction de rayons X, de SAXS, de SANS et de résonance magnétique nucléaire (RMN) (Grizot et al. 2001a; Grizot et al. 2001b; Grizot et al. 2001c; Hiroaki et al. 2001; Karathanassis et al. 2002; Groemping et al. 2003; Yuzawa et al. 2004a; Yuzawa et al. 2004b; Massenet et al. 2005; Durand et al. 2006; Ogura et al. 2006; Honbou et al. 2007; Taylor et al. 2007)
- * des systèmes de levures à double hybride (Sumimoto et al. 1996; Sathyamoorthy et al. 1997; Wilson et al. 1997)
- * des études de translocation subcellulaire (de Mendez et al. 1996; Renwick et al. 2007; Ueyama et al. 2007; Ueyama et al. 2008; Li et al. 2009; Taura et al. 2009)
- * la comparaison fonctionnelle de souches sauvages et mutantes par co-précipitation (Sumimoto et al. 1994; Ago et al. 1999; Shiose and Sumimoto 2000; Kuribayashi et al. 2002; Nagasawa et al. 2003; Nobuhisa et al. 2006)

* des études de phosphorylation (el Benna et al. 1994; El Benna et al. 1996; Johnson et al. 1998; El Benna et al. 1999; El Benna et al. 2002; El-Benna et al. 2005)

* des études protéine-lipides par co-précipitation avec des liposomes (Ago et al. 2001; Karathanassis et al. 2002; Ago et al. 2003; Honbou et al. 2007; Shen et al. 2008), ou par CFS (Gorzalczany et al. 2000; Sigal et al. 2003; Ugolev et al. 2006; Ugolev et al. 2008)).

Depuis, il est largement reconnu que les trois facteurs cytosoliques $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ et $p40^{\text{phox}}$ forment un complexe ternaire 1:1:1 à l'état de repos (Figure 3), même si l'organisation de cet hétérotrimère a longtemps été sujet de controverse (cf. II.2.C).

$p47^{\text{phox}}$ joue un rôle central dans le mécanisme d'activation du complexe de la NADPH oxydase et sera le centre d'intérêt de cette thèse, si bien qu'un chapitre entier lui sera consacré (c.f II.).

I.1.B.2.a $p67^{\text{phox}}$

$p67^{\text{phox}}$ est une protéine modulaire de 526 acides aminés, encodée par le gène NCF2 situé sur le chromosome 1 (locus 1q25), ayant un poids moléculaire de 59 762 Da (Vignais 2002). Elle comprend quatre domaines tetratricopeptide (TPR) suivis d'une région riche en proline (PRR) et de deux domaines SH3 séparés par un domaine PB1 (Figure 5). Tout comme $p47^{\text{phox}}$, elle est nécessaire à l'activation du site catalytique membranaire.

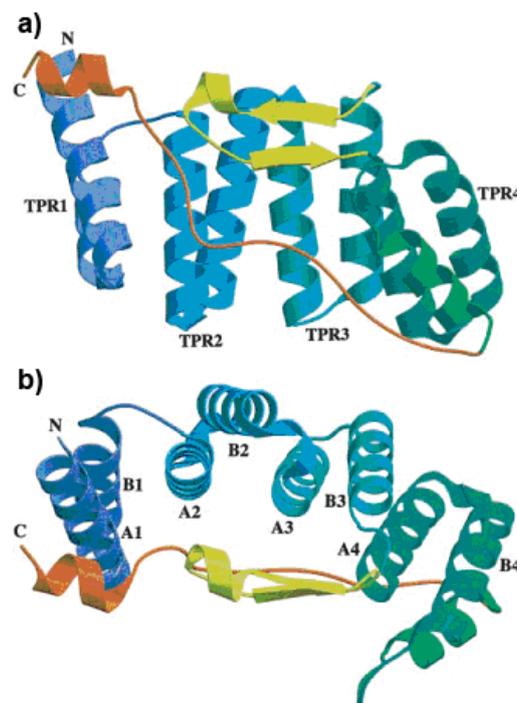


Figure 6. Structure à 1.8 Å de la région N-terminale de $p67^{\text{phox}}$.

a) et b) sont deux vues perpendiculaires de la molécule. Les quatre motifs TPRs sont colorés selon un dégradé de bleu à vert. Les hélices de type A et B sont visibles en **b)**. Les TPRs adoptent une structure globale de super hélice. La partie C-terminale en rouge est une conformation étendue bloquée dans la poche hydrophobe formée

par les TPRs et finit par une courte hélice α . Les feuillets insérés entre les TPRs 3 et 4 sont représentés en jaune. D'après (Grizot et al. 2001b). PDB access number : 1HH8

Une structure à 1.8 Å de la région N-terminale comprenant les 4 domaines TPRs a été résolue au laboratoire en 2001 (Grizot et al. 2001b) (Figure 6). Les domaines TPRs sont des séquences conservées de 34 acides aminés (organisés en deux hélices α antiparallèles) pouvant être répétées de 3 à 16 fois, que l'on retrouve chez de nombreuses espèces, de la bactérie à l'homme, et impliquées dans des interactions protéine-protéine et la formation de complexes multiprotéiques (revu dans (Nauseef 2004)). Chez p67^{phox}, le domaine TPR permet l'interaction avec le domaine « switch I » de la petite GTPase Rac, avec une stœchiométrie de 1:1 et un K_d de 120 et 60 nM pour Rac 1 et Rac 2, respectivement (Nisimoto et al. 1997; Koga et al. 1999).

En plus du domaine TPR, la région N-terminale de p67^{phox} contient un site supplémentaire lui permettant d'interagir avec Rac. Cette région comprenant les acides aminés 199-210 est un site d'activation essentiel pour l'activité de la NADPH oxydase (Han et al. 1998).

D'autre part, toutes les mutations de NCF-2 responsables de la CGD recensées à ce jour sont situées sur la partie N-terminale de p67^{phox} (Noack et al. 1999) et certains peptides de p22^{phox} tels que les résidus 84-93 inhibent la translocation de p67^{phox} en CFS (Park et al. 1994). Enfin la NADPH oxydase peut être activée en CFS sans p47^{phox} mais en présence de Rac et d'une forte concentration de p67^{phox} (Koshkin et al. 1996). Tout ceci laisse suggérer une interaction directe entre p67^{phox} et gp91^{phox}, qui a été démontrée par l'équipe de Babior (Dang et al. 2001; Dang et al. 2002) puis par Nisimoto et al. (Nisimoto et al. 2004). Cette interaction met en jeu la partie N-terminale (1-210) de p67^{phox} et bien que le site exact d'interaction ne soit toujours pas connu, on suspecte qu'il soit colocalisé avec le site d'activation 199-210 décrit par Han *et al.* (Han et al. 1998). D'après Dang et al. (Dang et al. 2001) Rac promeut cette interaction entre p67^{phox} et le cytochrome b₅₅₈.

Le domaine PB1 qui comprend environ 80 acides aminés fut identifié comme tel pour la première fois chez p67^{phox} et chez la protéine de levure Bem1 (Ito et al. 2001), ce qui explique son acronyme « Phox and Bem1 ». Les domaines PB1 contiennent deux hélices α et cinq feuillets β . On distingue trois types de domaines PB1 : le type I contient un motif acide OPCA (pour ORP/PC/AID), le type II contient une lysine conservée sur le premier feuillet β et le type trois contient à la fois le motif OPCA et la lysine conservée (Sumimoto et al. 2007). Les lysines conservées des modules PB1 de type II vont avoir tendance à former des ponts salins avec les motifs OPCA des modules PB1 de type I. C'est le cas du module PB1 de p67^{phox} (type II) qui reconnaît celui de p40^{phox} (type I) (Nakamura et al. 1998) et plus

particulièrement son motif OPCA constitué d'environ 20 acides aminés conservés relativement hydrophobes (Noda et al. 2003). Il en est de même dans l'interaction entre les domaines PB1 des protéines Bem1p et Cdc24p (Noda et al. 2003).

Le domaine SH3 situé en C-terminal (SH3_B) permet à p67^{phox} d'interagir avec la région riche en proline de p47^{phox}. En effet, bien que p40^{phox} et p67^{phox} soit capables d'établir cette interaction avec p47^{phox}, il semblerait que le complexe p47^{phox}/p67^{phox} soit favorisé (Grizot et al. 2001b; Lapouge et al. 2002; Massenet et al. 2005). La structure de ce complexe a d'ailleurs été résolue récemment par notre équipe (Massenet et al. 2005) (cf. II.2.C).

Notons que les interactions p67^{phox}/p47^{phox} et p67^{phox}/Rac sont nécessaires à l'activation de Nox2 *in vivo* (Koga et al. 1999; Mizuki et al. 2005). Enfin, l'interaction p67^{phox}/p40^{phox} n'est pas nécessaire à l'activité oxydase mais apparaît cruciale dans son assemblage à la membrane du phagosome (Bedard and Krause 2007; Dagher and Pick 2007; Lambeth 2007; Sumimoto 2008).

Contrairement à ces domaines qui commencent à être relativement bien connus, nous avons peu d'informations sur le domaine SH3_A N-terminal de p67^{phox}, à l'exception d'une étude montrant que les lymphocytes B ne produisent plus de superoxyde lorsque l'on supprime ce domaine SH3_A (de Mendez et al. 1994). Récemment, une étude vient de montrer que la délétion du SH3_A de p67^{phox}, mais pas le remplacement de son résidu conservé Trp277 par une arginine, diminuait l'activation de Nox2 (Maehara et al. 2009). Cette diminution étant compensée par une plus forte expression de p67^{phox} délétée en SH3_A, il semblerait que le rôle principal de ce module SH3 soit d'augmenter l'affinité de p67^{phox} pour gp91^{phox}.

p67^{phox} contient également une région riche en proline (PRR), située entre le domaine d'activation et le premier domaine SH3 (Figure 5). Des hypothèses ont été formulées quand à l'implication de cette région dans une interaction intramoléculaire à l'état de repos avec le domaine SH3_B de p67^{phox} (Vignais 2002) ou dans une interaction intermoléculaire avec le domaine SH3_B de p47^{phox} (Hata et al. 1997), sans qu'aucune de ces hypothèses ne soit confirmée. Notre groupe vient de publier récemment une étude par SAXS de la protéine p67^{phox} entière, montrant une enveloppe basse résolution. Il semblerait que la structure de p67^{phox} soit plutôt linéaire, sous forme d'un collier de perles dans lequel les modules structuraux sont isolés les uns des autres par des linkers flexibles. Sur la base de ces résultats, une interaction intramoléculaire entre les deux extrémités de la protéine est exclue. Cependant, les résultats obtenus suggèrent qu'une interaction intramoléculaire pourrait avoir lieu dans la région N-terminale de p67^{phox} (Durand et al. 2009).

I.1.B.2.b p40^{phox}

p40^{phox} est une protéine de 336 acides aminés encodée par le gène NFC-4 situé sur le chromosome 22. Sa masse est de 39 030 Da et elle est composée de domaines PX, SH3 et PB1 (Wientjes et al. 1993; Ito et al. 2001). p40^{phox} est le facteur cytosolique de la NADPH oxydase qui est paradoxalement à la fois le mieux connu structurellement et dont la fonction est la moins bien comprise.

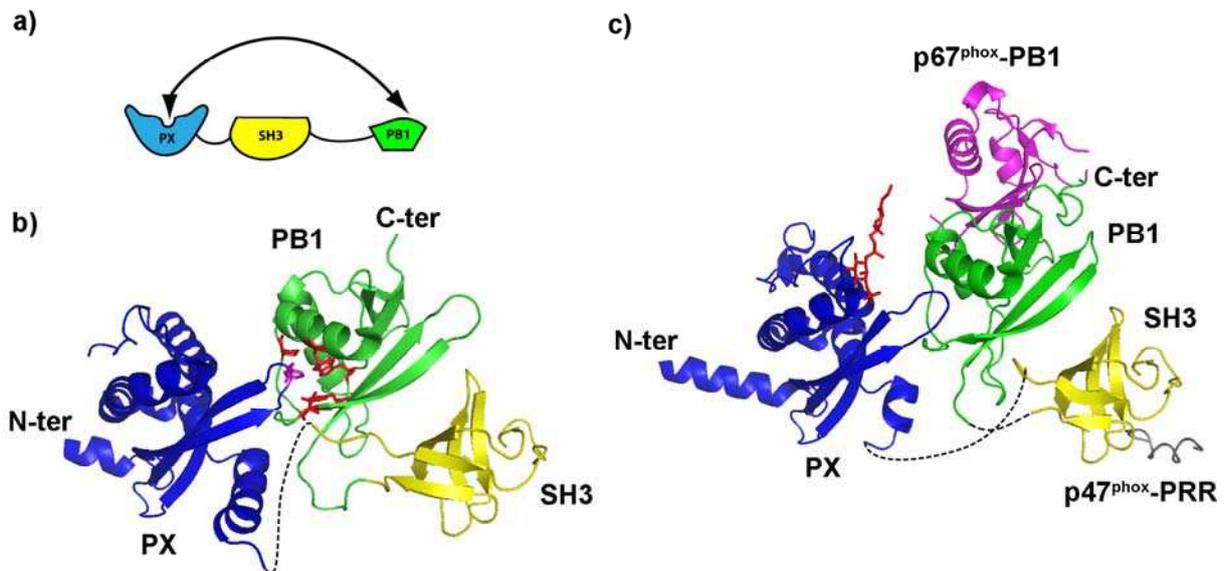


Figure 7. p40^{phox}

a) Organisation modulaire de p40^{phox}. La flèche représente l'interaction intramoléculaire responsable de l'état autoinhibé de p40^{phox}. **b)** Structure de p40^{phox}. Les domaines PX, SH3 et PB1 sont représentés en bleu, jaune et vert, respectivement. Le résidu F35 du domaine PX (magenta) est enfoui dans la poche hydrophobe constituée par les résidus V257, P265, L273, F320 et W322 (rouge) (Honbou et al. 2007). PDB access number : 2DYB. **c)** Reconstruction de p40^{phox} avec les structures des modules isolés PX, SH3 et PB1 co-cristallisés avec le PtdIns(3)P (rouge), le domaine PB1 de p67^{phox} (mauve) et la région PRR de p47^{phox} (gris), d'après (Karathanassis et al. 2002), (Wilson et al. 2003) et (Massenet et al. 2005), respectivement. PDB access numbers : 1H6H, 1OEY et 1W70.

Tout comme p67^{phox} et p47^{phox}, sa fonction modulaire lui permet d'interagir avec les autres composantes du complexe de la NADPH oxydase (Figure 7a). Son domaine PX reconnaît ainsi le phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns(3)P) (Ago et al. 2001; Bravo et al. 2001; Kanai et al. 2001), son domaine SH3 lui permet d'interagir avec la région PRR de p47^{phox} (Fuchs et al. 1996; Grizot et al. 2001b; Ito et al. 2001) et son domaine PB1 reconnaît celui de p67^{phox} (Nakamura et al. 1998). Ces trois interactions sont bien définies structurellement puisque les domaines de p40^{phox} ont été cristallisés en présence de PtdIns(3)P (Bravo et al. 2001; Karathanassis et al. 2002), du domaine PRR de p47^{phox} (Massenet et al. 2005) et du domaine PB1 de p67^{phox} (Wilson et al. 2003) (Figure 7c). Cependant, l'existence réelle d'une interaction entre p40^{phox} et p47^{phox} n'a pas été prouvée physiologiquement sur des formes entières.

La reconnaissance spécifique du phospholipide PtdIns(3)P, marqueur des endosomes précoces et des phagosomes, et dont la production augmente pendant la phagocytose (Ellson et al. 2001a) a fait de p40^{phox} une molécule désignée la plupart du temps comme adaptatrice ou régulatrice du complexe de la NADPH oxydase (Kuribayashi et al. 2002). Récemment, l'équipe japonaise de Sumimoto vient de mettre en évidence l'existence d'une interaction intramoléculaire *in vitro* et *in vivo* entre les domaines PX et PB1, responsable de l'état autoinhibé de p40^{phox} dans les phagocytes non stimulés (Honbou et al. 2007; Ueyama et al. 2007) (Figure 7b). L'interaction avec la membrane des phagosomes enrichie en PtdIns(3)P via son domaine PX nécessite la rupture de cette interaction (cf. II.3). Les résidus de p40^{phox} phosphorylés lors de l'activation (T154 et S315 (Bouin et al. 1998)) étant loin de la région d'interaction PX-PB1, il semblerait que la phosphorylation de p40^{phox} ne soit pas responsable de son ouverture (Honbou et al. 2007).

Le rôle précis de p40^{phox} est toujours soumis à controverse puisque des études ont démontré sa capacité à augmenter (Tsunawaki et al. 1996; Cross 2000; Ellson et al. 2001b; Kuribayashi et al. 2002; He et al. 2004; Bissonnette et al. 2008) ou bien à diminuer (Sathyamoorthy et al. 1997; Vergnaud et al. 2000; Lopes et al. 2004) l'activité oxydase. Contrairement à p67^{phox} et p47^{phox}, sa présence n'est pas nécessaire à l'activité NADPH oxydase, *in vitro* (CFS) ou *in vivo* (Dagher and Pick 2007), et aucune mutation dans le gène NCF-4 induisant la CGD n'a été jusqu'alors identifiée (Bissonnette et al. 2008). Des études récentes chez des souris déficientes en p40^{phox} ont montré que p40^{phox} constituait une composante essentielle du système Nox2 (Ellson et al. 2006b), le knock-out génétique induisant une baisse de 60 % de l'expression de p67^{phox}. Enfin, une équipe vient récemment de confirmer que p40^{phox} régulait positivement l'activité NADPH oxydase et que la conformation autoinhibée « fermée » (WT) produisait beaucoup moins de superoxyde que la forme mutante activée « ouverte » (E295A et F320A (Honbou et al. 2007; Ueyama et al. 2007)), suggérant une participation de p40^{phox} dans la translocation de p67^{phox} (Bissonnette et al. 2008).

I.1.B.2.c Rac

Rac est une protéine de 192 acides aminés et d'environ 21,4 kDa que l'on retrouve chez les monocytes (Zhao et al. 2003) et macrophages (Abo et al. 1994) humains (Rac 1) ainsi que chez les neutrophiles (Knaus et al. 1991; Knaus et al. 1992; Heyworth et al. 1993) (Rac 2). La forme liée au GTP de Rac est essentielle au complexe de la NADPH oxydase (Abo et al. 1994). Bien que Rac 1 et 2 ne soient pas localisées dans les mêmes lignées cellulaires ces

deux protéines présentent 92 % d'identité de séquence et diffèrent seulement de 14 résidus sur 192 (Didsbury et al. 1989). Leurs fonctions sont par ailleurs équivalentes et elles sont interchangeables en CFS (Abo and Pick 1991; Ando et al. 1992). Rac 2 fut cependant décrite comme un meilleur activateur que Rac 1 (Dorseuil et al. 1996) même si tous les résidus impliqués dans l'interaction avec p67^{phox} sont identiques chez les deux protéines (Figure 8) (Lapouge et al. 2000).

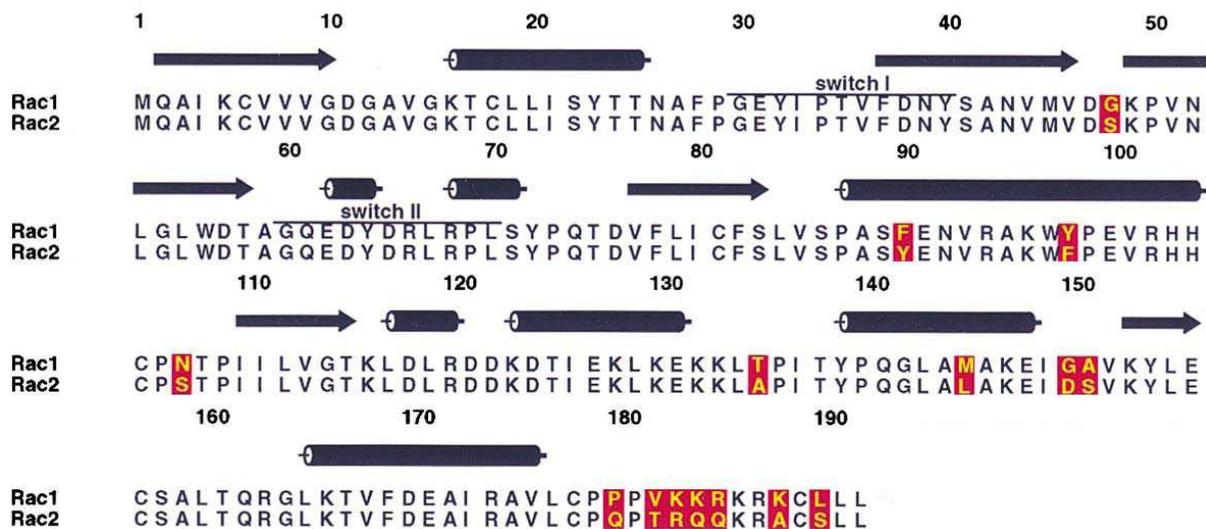


Figure 8. Séquences de Rac1 et Rac2

Les résidus différents entre Rac 1 et Rac 2 sont surlignés en rouge. D'après (Lapouge et al. 2000).

Rac est une petite protéine G, classe de protéines appartenant au groupe des GTPases capables de lier le GTP et le GDP et impliquées dans la transduction des signaux cellulaires. Elle fut découverte lors d'expériences de CFS où l'on remarqua une augmentation de l'activité oxydase en présence de GTP γ S et une baisse de cette activité suite à l'addition de GDP γ S (Gabig et al. 1987). La partie N-terminale de Rac contient le site de fixation des nucléotides ainsi que deux courtes séquences dénommées « switch » I (résidus 28-40) et II (résidus 60-75) puisqu'elles changent de conformation en fonction du nucléotide lié (GTP ou GDP) (Vignais 2002). Les protéines Rac présentent une région C-terminale basique contenant un résidu cystéine pouvant être géranyl-géranylé et assurant ainsi l'ancrage à la membrane (Kreck et al. 1996). Comme les autres protéines G, Rac alterne entre une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. Ce cycle est régulé par les facteurs d'échange GDP/GTP (facteurs GEF) qui catalysent le remplacement du GDP par le GTP, ainsi que par les protéines activatrices de GTPase (GAPs) qui augmentent l'activité GTPase endogène des protéines G et peuvent ainsi mettre un terme à la cascade oxydative (Szaszi et al. 1999) (Figure 9a).

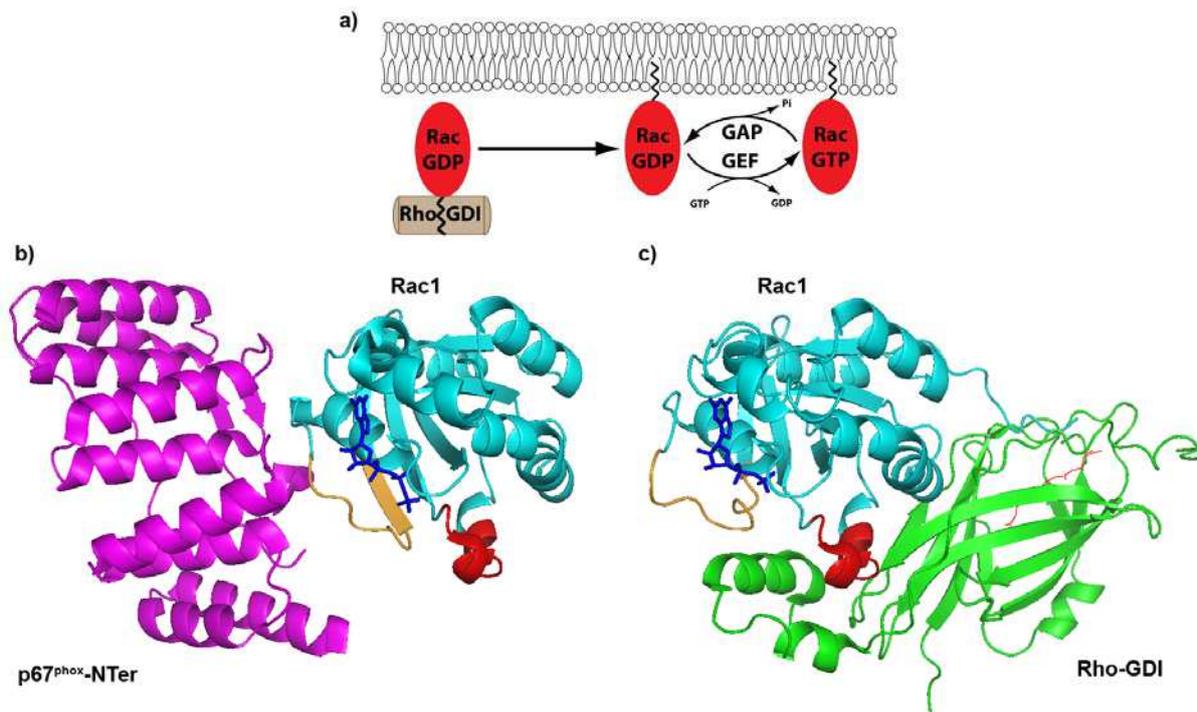


Figure 9. Cycle de la petite protéine G Rac

a) Cycle des petites protéines G. Au repos, la queue géranyl-géranyl de Rac est inhibée par la protéine Rho-GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor). GAP : GTPase Activating Protein ; GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor ; Pi : Phosphate inorganique. **b)** Structure de la petite protéine G Rac 1 (cyan) liée au domaine TPR de p67^{phox} (mauve). D'après (Lapouge et al. 2000). **c)** Structure de la petite protéine G Rac 1 (cyan) liée à RhoGDI (vert). D'après (Grizot et al. 2001a). La queue géranyl-géranyl de Rac 1 est représentée en rouge et les nucléotides ATP et ADP en bleu. Les régions switch 1 et switch 2 sont représentées en orange et rouge, respectivement. PDB access numbers : 1E96 et 1HH4.

Dans les cellules au repos, Rac est essentiellement localisée dans le cytosol, associée à une protéine inhibitrice de la dissociation du GDP (RhoGDI) qui, comme son nom l'indique, empêche l'échange du GDP contre le GTP (Figure 9c). Après activation, RacGDP se dissocie de RhoGDI et peut ainsi échanger son GDP contre de le GTP et rejoindre le complexe de la NADPH oxydase à la membrane (Bokoch et al. 1994; Kreck et al. 1996). Les analyses structurales de Rac2-RhoGDI (Scheffzek et al. 2000) et Rac1-RhoGDI (Grizot et al. 2001a) ont fourni un certain nombre d'informations sur les sites d'interactions des partenaires de ces hétérodimères. La queue géranyl-géranyl de Rac plonge dans une poche hydrophobe de RhoGDI (Figure 9c). En plus de cette interaction lipide-protéine, des interactions protéine-protéine entre Rac 1 et RhoGDI ont été mises en évidence, impliquant les résidus Tyr64, Arg66, Leu67, His103 et His104 ainsi que la région C-terminale polybasique de Rac 1 (Di-Poi et al. 2001; Grizot et al. 2001a).

La fonction essentielle de Rac est toutefois d'interagir avec p67^{phox} et notamment avec le domaine TPR de sa partie N-terminale (résidus 1-199) (Diekmann et al. 1994; Nisimoto et al. 1997), afin de promouvoir l'interaction entre p67^{phox} et le cytochrome b₅₅₈ (Dang et al.

2001). Des études de mutagenèse dirigée sur Rac ont permis de mettre en évidence par CFS des résidus essentiels pour la génération de O_2^- tels que Asn26, Ile33, Thr35, Asp38, Tyr40 et Met45 (Diekmann et al. 1994; Freeman et al. 1994), tous localisés dans la région « switch » I (Figure 9a). Un autre site de Rac 1, comprenant les résidus 143-175, a ensuite été décrit comme important pour l'interaction avec $p67^{phox}$ (Diekmann et al. 1995). D'autre part, la séquence spécifique 124-135, également appelée région d'insert, est impliquée dans l'activation de la NADPH oxydase, à travers la stabilisation du complexe $p67^{phox}/gp91^{phox}$ (Freeman et al. 1996; Nisimoto et al. 2004) ou via une interaction directe avec le flavocytochrome b_{558} (Nisimoto et al. 1997; Diebold and Bokoch 2001). En effet, l'équipe de Curnutte avait noté dès 1994 que la translocation de Rac pouvait être indépendante de $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$ et qu'elle était plus faible dans des PMNs déficients en flavocytochrome b_{558} , suggérant déjà l'existence d'une interaction directe avec le flavocytochrome b_{558} (Heyworth et al. 1994). Cependant, une étude récente vient de démontrer que la région d'insert de Rac 1 n'était pas indispensable à l'activation de Nox2 ni à sa translocation à la membrane phagosomale (Miyano et al. 2009).

Des études de « peptide walking » ont ensuite permis d'identifier au total quatre sites sur Rac nécessaires à l'activation de la NADPH oxydase (résidus 73-81, 103-107, 123-133, 163-169) (Joseph and Pick 1995). Ces interactions ont pu être rationalisées depuis par des études cristallographiques (Lapouge et al. 2000) (Figure 9b). L'Arg102 de $p67^{phox}$ est ainsi capable de réaliser des liaisons hydrogènes avec au moins quatre résidus de Rac (Ser22, Asn26, Ala159 et Leu160). De la même sorte, les résidus Gln162 et Asn26 de Rac forment des liaisons hydrogènes avec la chaîne latérale de l'Asn104 de $p67^{phox}$. Il existe également des interactions entre Asp108 de $p67^{phox}$ et Thr25 de Rac ainsi qu'entre Gly30 et Glu31 de Rac et Asp67 et Ser37 de $p67^{phox}$.

I.1.C Mécanisme général d'activation de Nox2

I.1.C.1 Les voies de transduction du signal

Suite à la détection d'une agression pathogénique par notre organisme, de nombreuses voies de transduction du signal sont employées afin de transmettre l'information jusqu'au centre catalytique de la NADPH oxydase des neutrophiles. Celles-ci mettent en jeu des molécules activatrices, chimioattractantes, produites sur le lieu de l'infection qui vont se lier à des récepteurs à 7 hélices transmembranaires présents à la surface des neutrophiles. Il en

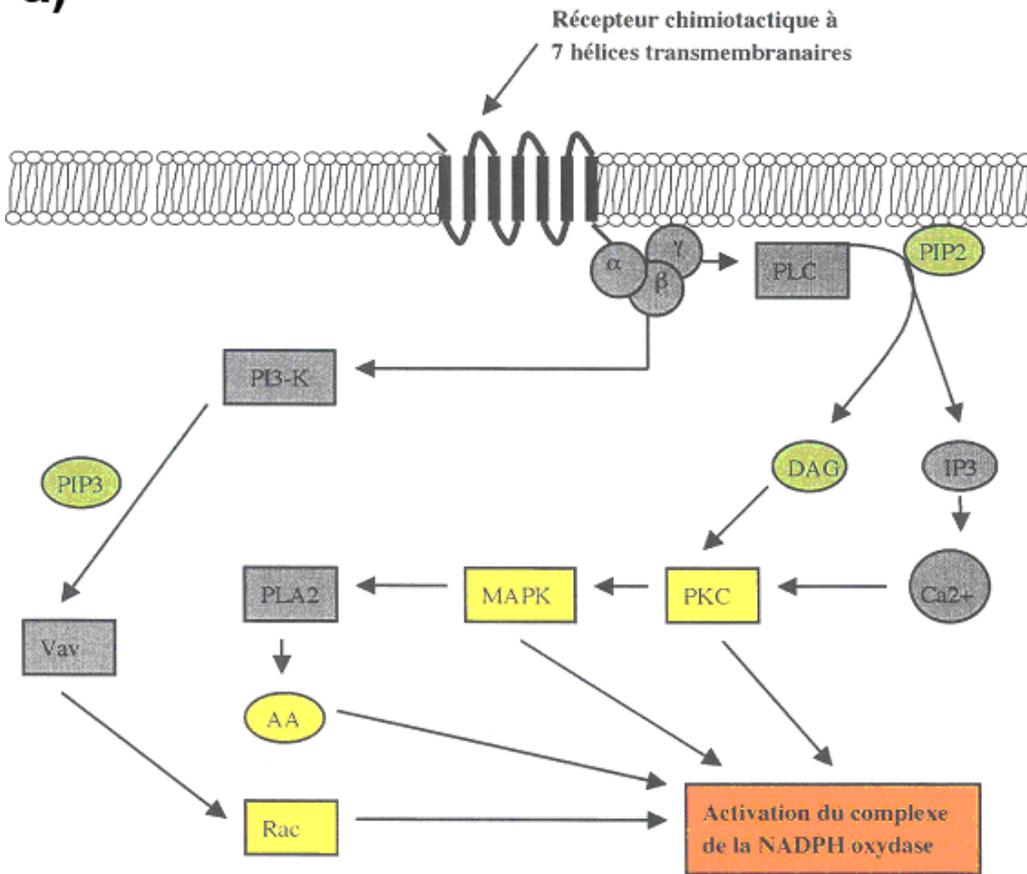
résulte une cascade informative qui peut parcourir divers chemins métaboliques (Figure 10) afin de déclencher la phagocytose, la dégranulation et l'activation de la NADPH oxydase.

Trois voies de transduction du signal ont été particulièrement étudiées dans le cas de la NADPH oxydase des neutrophiles :

- la phosphorylation des facteurs cytosoliques par différentes protéines kinases telles que :
 - * la PKC (protéine kinase C) (Nauseef et al. 1993; el Benna et al. 1994; Benna et al. 1997; Park and Babior 1997; Bouin et al. 1998; Shiose and Sumimoto 2000; Fontayne et al. 2002; He et al. 2004; Frey et al. 2006)
 - * la PKA (El Benna et al. 1996), Akt (Chen et al. 2003; Hoyal et al. 2003),
 - * ERK2 et p38 MAPK (Dang et al. 2003; Hazan-Halevy et al. 2005)
 - * PAK (p21-activated kinase) (Martyn et al. 2005)
- la modification lipidique des membranes du neutrophile par la phosphatidyl-inositol-3 kinase (PI3 kinase) (Gillooly et al. 2000; Ellson et al. 2001a; Kanai et al. 2001; Ellson et al. 2006a)
- la production d'acide arachidonique par la phospholipase A2 (PLA2) (Dana et al. 1998; Daniels et al. 1998; Sauer et al. 2000; Zhao et al. 2002; Hazan-Halevy et al. 2005; Rubin et al. 2005; Chenevier-Gobeaux et al. 2007).

Des études récentes ont par ailleurs montré la phosphorylation de p22^{phox} par la phospholipase D (Regier et al. 2000) et de la partie C-terminale de gp91^{phox} par la PKC (Raad et al. 2009). Enfin, une voie d'activation de la NADPH oxydase dépendante du calcium mettant en jeu le complexe protéique S100A8/A9 (MRP8/14) a été découverte récemment (Doussiere et al. 2002; Berthier et al. 2003; Bouzidi and Doussiere 2004). Suite à la vague calcique extracellulaire (ouverture des canaux SOCs) ou intracellulaire (stocks du réticulum endoplasmique), la fixation d'acide arachidonique et de Ca²⁺ permet au complexe MRP8/14 d'augmenter l'activité NADPH oxydase, via des interactions avec p67^{phox} et Rac 2 (Kerkhoff et al. 2005) et via l'activation de PKCs et de MPRs (Brechard et al. 2008; Brechard and Tschirhart 2008; Brechard et al. 2009).

a)



b)

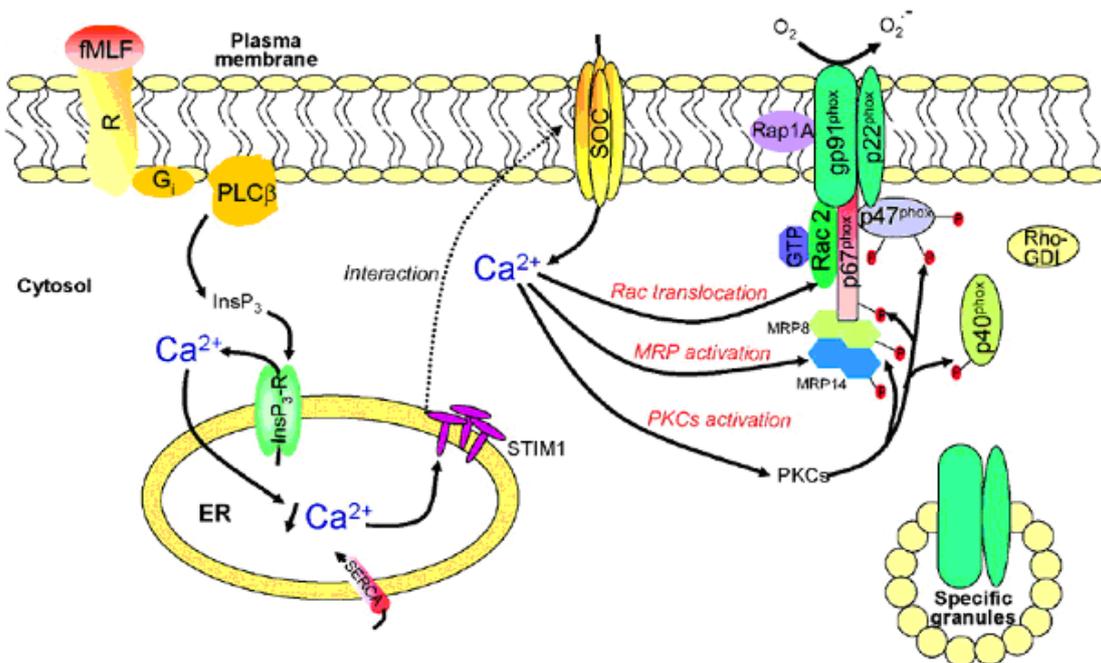


Figure 10. Les voies de transduction du signal d'activation de Nox2

a) Différentes voies de transduction liées à l'activation des récepteurs 7TMR. b) Rôle de l'influx calcique dans la régulation de la production de superoxyde chez le neutrophile. D'après (Brechard and Tschirhart 2008).

I.1.C.2 La translocation à la membrane

Si les voies de transduction du signal d'activation citées ci-dessus sont diverses et variées, toutes convergent vers un même but :

- rompre l'équilibre qui règne au sein du complexe hétérotrimérique,
- rendre accessibles les surfaces d'interactions qui étaient masquées au sein du complexe,
- faire transloquer à la membrane les facteurs cytosoliques (Figure 11) afin de mettre en marche le processus catalytique de transfert d'électrons.

Pour ce faire, une première approche consiste à rompre certaines interactions intra/intermoléculaires responsables de l'état auto-inhibé pour créer de nouvelles interactions intermoléculaires. La phosphorylation de $p47^{\text{phox}}$ par différentes kinases (el Benna et al. 1994; El Benna et al. 1996; Park and Babior 1997; Shiose and Sumimoto 2000; Fontayne et al. 2002; Ago et al. 2003; Chen et al. 2003; Hoyal et al. 2003; Massenet et al. 2005) est ainsi responsable de changements conformationnels qui seront développés plus en détail par la suite (cf. II.).

$p40^{\text{phox}}$ est également phosphorylée par la PKC sur plusieurs résidus (T154 and S315) lors de l'activation (Bouin et al. 1998). Il semblerait cependant que ces phosphorylations ne soient pas responsables de la rupture de la liaison intramoléculaire entre les domaines PX et PB1 de $p40^{\text{phox}}$ (Honbou et al. 2007).

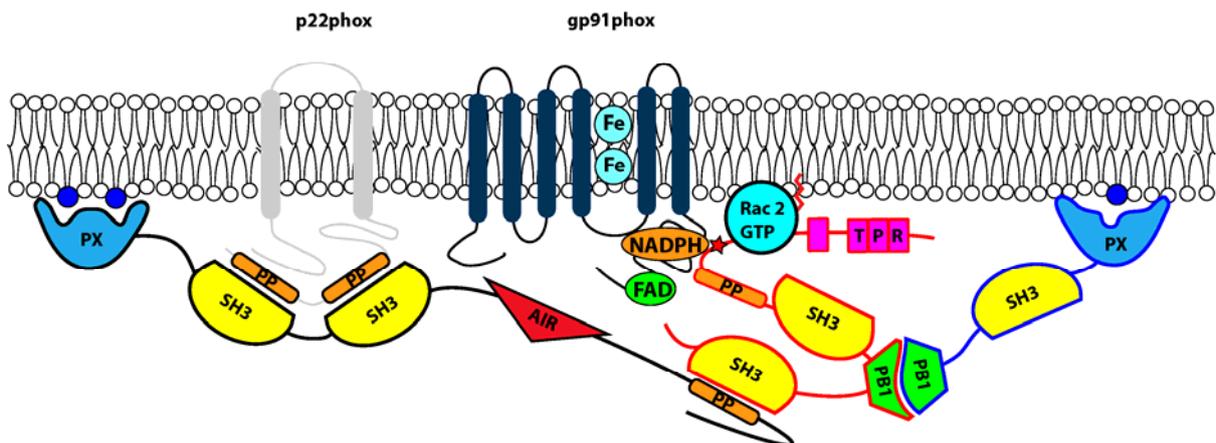


Figure 11. Schéma de la NADPH oxydase à l'état activé

Un second mécanisme consiste à modifier la composition lipidique des bicouches lipidiques afin de permettre le recrutement par affinité des facteurs cytosoliques. Ainsi, $p40^{\text{phox}}$ reconnaît le phosphatidylinositol(3)phosphate (Ago et al. 2001; Bravo et al. 2001; Kanai et al. 2001) (Figure 7). $p47^{\text{phox}}$ va également être recrutée par certains phospholipides spécifiques de la membrane phagosomale : le phosphatidylinositol(3,4)bisphosphate et l'acide

phosphatidique (Kanai et al. 2001; Karathanassis et al. 2002; Ago et al. 2003). Il est à noter que cette modification de la composition lipidique de la membrane, semble permettre une certaine chronologie aux différentes phases de l'activation. En effet, l'équipe de Sumimoto vient de montrer que la translocation de p47^{phox} est antérieure à celle de p40^{phox}: p47^{phox} interviendrait dans les premières phases de la phagocytose (avant la fermeture du phagosome), alors que p40^{phox} serait transloquée quelques minutes après, sous le contrôle de la génération de PI(3)P qui est un marqueur des endosomes précoces généré par la PI-3 kinase (Ueyama et al. 2008).

Dans le cas de la translocation de Rac, le changement de partenaire est directement lié à la modification de l'environnement lipidique (Ugolev et al. 2006). Rac est activée par la protéine P-Rex1 (Welch et al. 2002), elle-même activée par les sous unités $\beta\gamma$ de la protéine G hétérotrimérique ainsi que par le PI(3,4,5)P₃ via la PI3-kinase (Figure 10a) (Hill and Welch 2006). P-Rex1 appartient à la famille des Guanine nucleotide exchanging factors (GEFs) et une fois activée, elle permet l'échange du GDP lié à Rac contre du GTP. Ce changement nucléotidique va entraîner la dissociation de Rac-RhoGDI. Rac va ainsi pouvoir s'associer aux domaines TPRs de gp91^{phox} et ancrer sa queue prénylée dans la membrane (Figure 9a). Récemment, l'équipe d'Edgar Pick vient de démontrer la dissociation du complexe Rac1-RhoGDI par des liposomes enrichis en phospholipides anioniques (Ugolev et al. 2006) ou en GTP, GEFs et PtdIns(3,4,5)P₃ (Ugolev et al. 2008).

Bien qu'une interaction directe entre p67^{phox} et la partie C-terminale de gp91^{phox} ait été mise en évidence (Dang et al. 2001), il semblerait que la translocation de p67^{phox} nécessite la présence de p47^{phox} (Kleinberg et al. 1990). En effet, p67^{phox} est incapable de transloquer dans des cellules de patients atteints de CGD et déficients en p47^{phox} alors que dans le cas inverse (patients déficients en p67^{phox}), la translocation de p47^{phox} a bien lieu (Heyworth et al. 1991). D'autre part, le flavocytochrome b₅₅₈ peut être activé par p67^{phox} en l'absence de p47^{phox}, à condition d'utiliser p67^{phox} et Rac en excès dans un système dépendant des amphiphiles (Freeman et al. 1996; Koshkin et al. 1996) ou d'utiliser un système indépendant des amphiphiles (Gorzalczany et al. 2000; Gorzalczany et al. 2002; Mizrahi et al. 2005), ce qui semble indiquer qu'un des rôles de p47^{phox} soit de faciliter l'accès de p67^{phox} à la membrane (pour revue, voir (Molshanski-Mor et al. 2007)). L'interaction de p67^{phox} avec le flavocytochrome b₅₅₈ est d'ailleurs renforcée en présence de p47^{phox} phosphorylée ou de p40^{phox} phosphorylée (Dang et al. 2002). Il semblerait ainsi que la translocation de p67^{phox}, activateur du complexe enzymatique, soit supportée par le motif polyproline de p47^{phox} et par le domaine PB1 de p40^{phox} (Figure 11). A noter que Rac transloque séparément des facteurs

cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox} (Heyworth et al. 1994) et qu'il peut même transloquer en leur absence comme l'ont montré des expériences sur des neutrophiles CGG déficients en p47^{phox} ou p67^{phox} (Dusi et al. 1996).

La fonction principale de p22^{phox} est de servir d'ancrage moléculaire pour p47^{phox} (Vignais 2002), cependant p22^{phox} n'est pas suffisant pour permettre la translocation des facteurs cytosoliques. En effet, la translocation n'a pas lieu dans des neutrophiles CGD déficients en gp91^{phox} mais exprimant p22^{phox} normalement (Dusi et al. 1998).

D'autre part, le peptide synthétique 550-569, correspondant à l'extrémité C-ter de gp91^{phox}, inhibe l'activation de la NADPH oxydase en CFS (Nakanishi et al. 1992). Cette étude montre par pontage moléculaire que ce peptide interagit avec p47^{phox}. Ces résultats ont ensuite été confirmés et complétés par l'équipe de Jesaitis qui identifia par phage display trois sites d'interaction putatifs de p47^{phox} sur gp91^{phox}, à savoir les peptides 85-93, 450-457 et 554-564 (DeLeo et al. 1995b). p47^{phox} interagirait avec le flavocytochrome b558 via une région située en aval de l'AIR (323-342) (DeLeo et al. 1995a). Cependant, des mutations dans le site d'interaction putatif de gp91^{phox} n'ont pas eu d'effets notoires sur l'activité NADPH oxydase (Zhen et al. 1998).

Le processus de translocation est donc encore loin d'être entièrement compris. Il est de plus en plus clair par ailleurs que la vision simpliste selon laquelle il n'existe que deux états conformationnels (auto-inhibé dans le cytosol et activé à la membrane) est purement illusoire. Des études récentes de biologie cellulaire utilisant différents marqueurs fluorescents ont ainsi démontré que la translocation de p47^{phox} précédait celle de p67^{phox} (Ueyama et al. 2008) et que l'interaction entre p47^{phox} et p67^{phox} via leur C-termini disparaissait après fixation à la membrane (Li et al. 2009), permettant ainsi probablement de nouveaux réarrangements au sein du complexe. Toutes ces approches originales confirment la nécessité d'une vision séquentielle (multi-étapes) du processus de translocation des facteurs cytosoliques à la membrane et, par extension, le besoin d'aller vers des études d'assemblage *in vivo*.

I.1.C.3 Transferts d'électrons à travers le flavocytochrome b₅₅₈

Si les 4 facteurs cytosoliques sont nécessaires au bon fonctionnement et à la régulation de l'activité NADPH oxydase, des tests *in-vitro* de CFS utilisant diverses constructions chimériques ont montré que l'activation de la Nox nécessitait uniquement le binôme p67^{phox}-Rac (Alloul et al. 2001; Miyano et al. 2001; Gorzalczany et al. 2002; Miyano et al. 2003). Plus précisément, les deux motifs indispensables sont la région C-terminale de Rac nécessaire à l'ancrage à la membrane ainsi qu'un site d'interaction entre Rac et p67^{phox} responsable de

changements conformationnels sur le domaine d'activation de $p67^{\text{phox}}$. C'est ce site d'activation de $p67^{\text{phox}}$ (199-210) qui va déclencher le transfert d'électrons à travers le flavocytochrome b_{558} (Han et al. 1998).

Le transfert d'électrons, de part et d'autre de la membrane phagosomale, s'effectue en deux étapes qui se déroulent au sein de $gp91^{\text{phox}}$. Dans une première étape, le NADPH transfère un électron à l'hème proximal via le centre flavinique (Cross et al. 1994; Li and Guillory 1997; Han et al. 2001; Nisimoto et al. 2004). L'hème Fe^{II} est ainsi oxydé en hème Fe^{III} entraînant à son tour la réduction de l'oxygène moléculaire O_2 en anion superoxyde O_2^- (Figure 12).

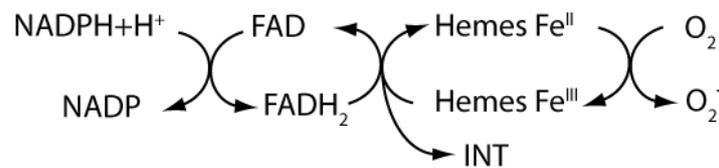


Figure 12. Les transporteurs redox de la NADPH oxydase.

Adapté d'après (Vignais 2002).

L'activité diaphorase correspond au transfert d'électrons jusqu'au centre redox du FAD. Il est possible de détourner les électrons du FAD avec un accepteur final de potentiel redox compatible tel que l'iodonitrotetrazolium (INT). On peut ainsi distinguer l'activité diaphorase, correspondant au premier transfert d'électrons, de l'activité NADPH oxydase.

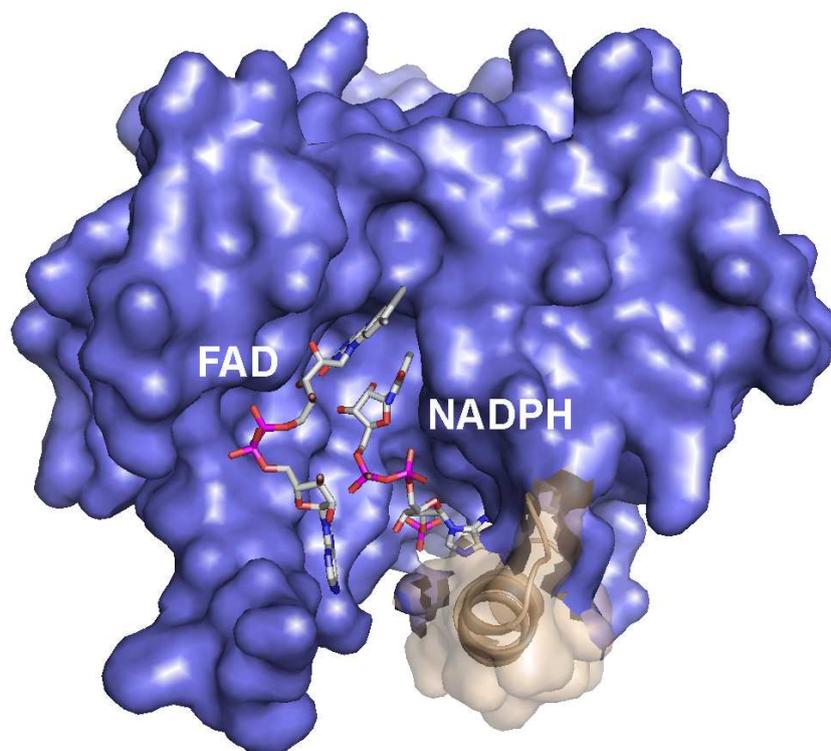


Figure 13. Modèle structural 3D de la région cytosolique de $gp91^{\text{phox}}$.

Le FAD et le NADPH sont représentés en bâtonnets selon le code couleur CPK. L'hélice α fermant l'accès au site de fixation du NADPH est représentée en marron. D'après (Li et al. 2007).

L'activité diaphorase est localisée au niveau de la région C-terminale de gp91^{phox} (282-570) qui est homologue avec la ferrédoxine-NADP⁺ réductase (FNR) (Vignais 2002). Selon le modèle structural de Taylor (Taylor et al. 1993), basé sur cette homologie, l'accès du site de liaison au NADPH serait masqué à l'état de repos par une hélice α de la partie C-terminale de gp91^{phox} (résidus 484-504). Le phénotype CGD observé chez les patients possédant la mutation L505R serait ainsi expliqué par un mauvais contrôle du déplacement de cette hélice α , empêchant ainsi l'accès du NADPH à site de fixation (Figure 13) (Li et al. 2007).

Les deux hèmes non identiques sont localisés entre les hélices α III et V de gp91^{phox} où ils sont hexa-coordinés par les histidines 101 et 209 d'une part et par les histidines 115 et 222 d'autre part (Figure 14) (Yu et al. 1998; Biberstine-Kinkade et al. 2001). Leur potentiel redox est de -225 et -265 mV, respectivement (Cross et al. 1995). L'incorporation des hèmes au sein de gp91^{phox} s'avère être une condition *sine qua non* à la stabilisation du flavocytochrome b₅₅₈ (Yu et al. 1997; Yu et al. 1998; DeLeo et al. 2000). Des études suggèrent que l'acide arachidonique délivré par l'action de la cPLA2 serait responsable du changement d'état de coordination de l'hème qui deviendrait alors penta-coordiné (Doussiere et al. 1996) pouvant ainsi réagir avec l'oxygène moléculaire O₂ et finaliser le transfert d'électrons.

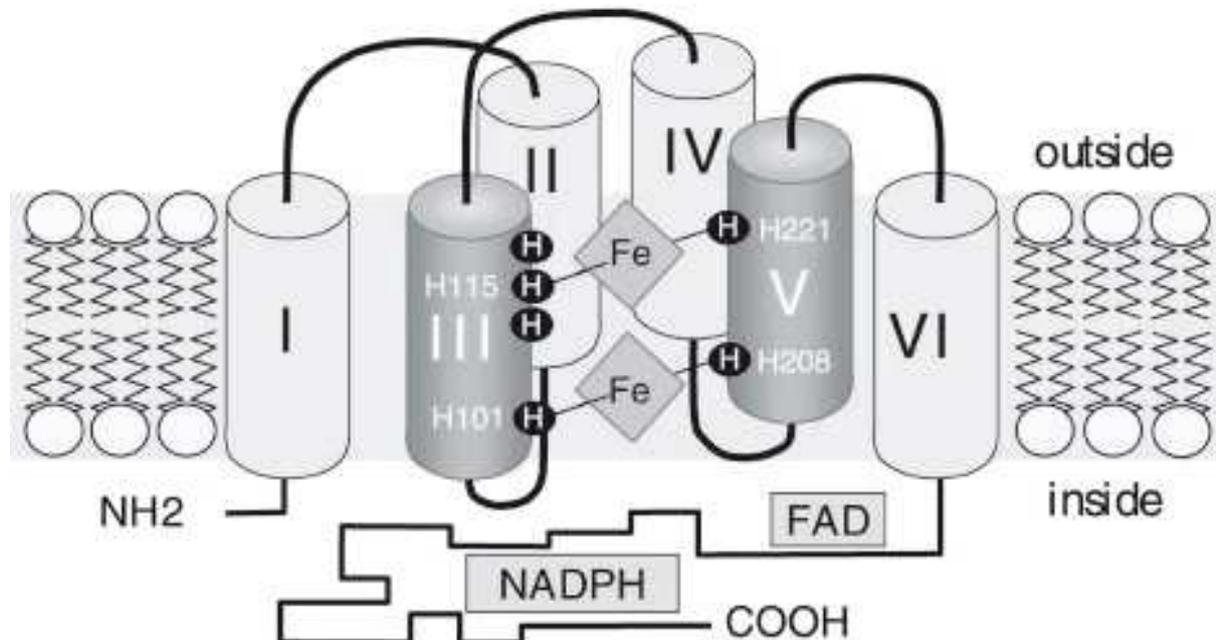


Figure 14. Localisation des deux hèmes non identiques chez gp91^{phox}.

D'après (Maturana et al. 2001).

Remarquons enfin qu'un tel transfert d'électrons induit une dépolarisation de la membrane pouvant aller jusqu'à +100 mV (Jankowski and Grinstein 1999) et nécessitant une compensation par un système de pompe à protons. gp91^{phox} a été naturellement proposée

comme jouant ce rôle de canal à proton (Henderson et al. 1987; Henderson and Chappel 1996). Cependant, des études de patch-clamp ont amené des arguments à la fois pour (Maturana et al. 2001) et contre (DeCoursey et al. 2001; DeCoursey et al. 2002) cette hypothèse. Il est depuis accepté que la repolarisation de la membrane est possible grâce à l'action d'un canal à proton voltage indépendant (DeCoursey 2003; DeCoursey et al. 2003; Femling et al. 2006; Musset et al. 2008; Musset et al. 2009) (Figure 2).

I.2 Les autres NADPH oxydases

La NADPH oxydase des phagocytes fut la première à être découverte (Babior 1978a; Babior 1978b; Segal and Jones 1978) à la fin des années 70 et elle était alors décrite comme « un nouveau système de cytochrome b ». En effet, une des caractéristiques des NADPH oxydases est la présence d'une composante transmembranaire à 6 hélices α comportant deux hèmes permettant le transfert d'électrons, tout comme le cytochrome b. La présence de sites de fixation du NADPH et du FAD permettant d'initier ce transfert constitue l'autre caractéristique de gp91^{phox} que l'on retrouve chez les ferredoxine-NADP⁺ reductases (FNR). D'un point de vue évolutif, il semblerait que les FNR et le cytochrome b bactérien di-hémique soient les ancêtres communs des différentes Nox et Duox que l'on retrouve chez la plupart des eucaryotes (Sumimoto 2008).

A la fin des années 90, des homologues du flavocytochrome gp91^{phox} furent ainsi découvertes chez les plantes terrestres et désignées Rboh pour « respiratory burst oxidase homolog » (Keller et al. 1998). Des recherches dans les bases de données génomiques ont depuis permis l'identification d'homologues de gp91^{phox} chez les animaux dénommées Nox (NADPH oxydase) et Duox (dual oxydase). Le génome humain contient sept gènes codant pour des homologues de gp91^{phox} : les Nox 1 à 5 (gp91^{phox} étant renommée depuis Nox 2) ainsi que les Duox 1 et 2 (Figure 15). Ces différentes isoformes ont depuis été l'objet d'un grand nombre d'études qui ont permis d'affiner notre compréhension de ces enzymes impliquées non seulement dans la défense immunitaire mais aussi dans la transduction du signal, le développement et la bio-synthèse hormonale (Zekry et al. 2003; Krause 2004; Lambeth 2004; Sumimoto et al. 2005; Petry et al. 2006; Bedard and Krause 2007; Lambeth 2007; Nauseef 2008; Sumimoto 2008; Ushio-Fukai and Nakamura 2008). Si toutes ces isoformes partagent pour point commun le transfert d'électron et la génération de ROS, elles

diffèrent par la nature de leurs facteurs cytosoliques régulateurs, par leur répartition cellulaire ainsi que par la fonction physiologique qu'elles exercent.

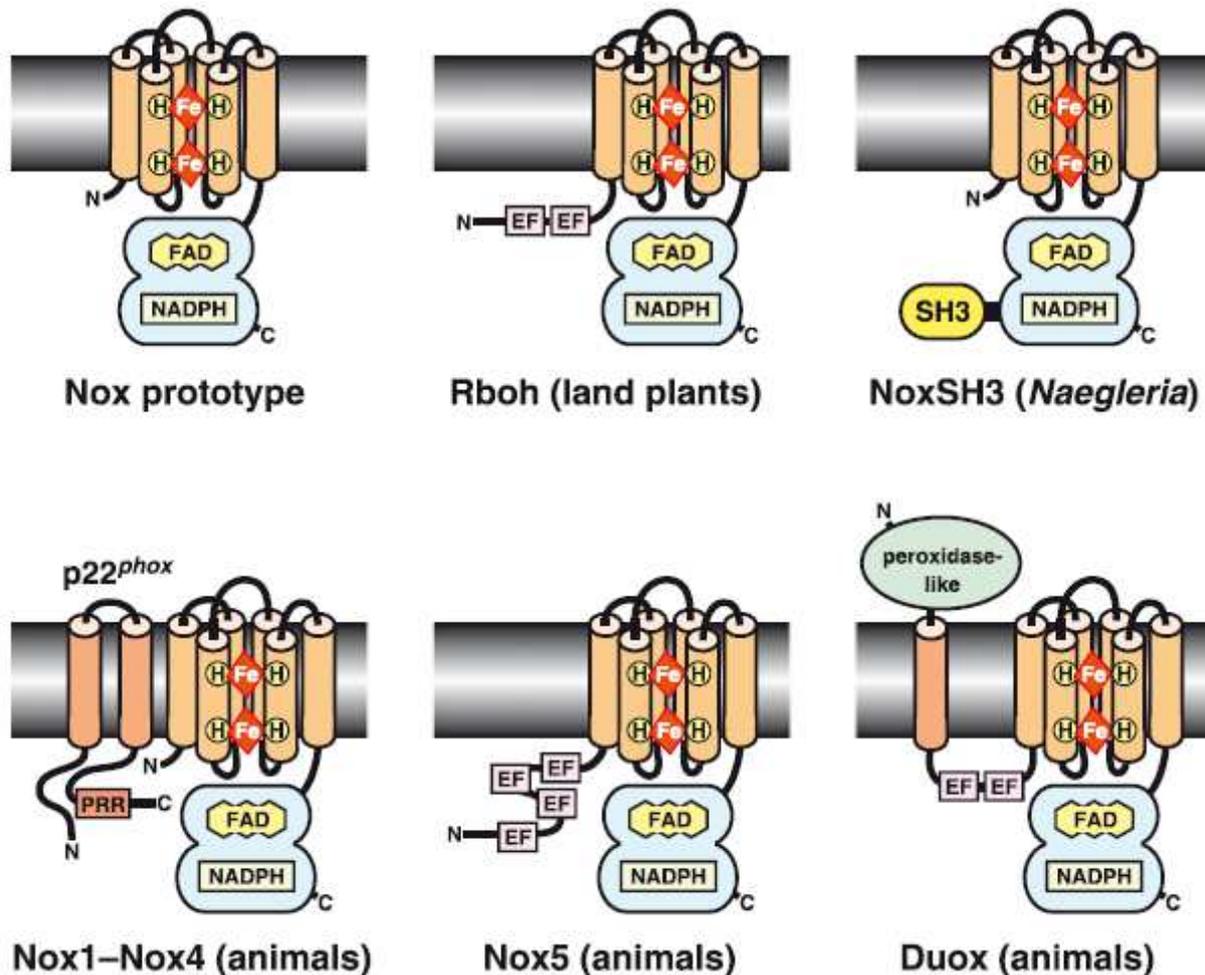


Figure 15. Les différents homologues de gp91^{phox}.

D'après (Sumimoto 2008).

I.2.A Topologie et régulateurs des Nox et Duox

Les Nox1 à 4 ont la particularité d'être présentes à la membrane sous la forme d'un hétérodimère comprenant un homologue de gp91^{phox} stabilisé par p22^{phox}. C'est par la région PRR de p22^{phox} que les Nox pourront, le cas échéant, interagir avec certains de leurs différents régulateurs et activateurs.

Nox5 se démarque des autres Nox par une topologie particulière : elle ne possède pas de sous-unité p22^{phox} mais est prolongée à son extrémité C-terminale par quatre domaines EF-hands connus pour fixer les ions Ca²⁺ (Banfi et al. 2001; Banfi et al. 2004b) (Figure 15). Les 4 isoformes de Nox5 décrites par Banfi *et al.* (- α , - β , - γ et - δ) se distinguent de l'isoforme - ϵ (ou Nox5-S) décrite par Cheng *et al.* (Cheng et al. 2001) qui ne possède pas de régions EF-hands et dont la topologie se rapproche donc des Nox1-4.

Le même type de domaine EF-hand est également présent au niveau de la première boucle des Duox. Cependant, contrairement aux domaines EF-hands de Nox5 qui constituent un domaine d'activation (Banfi et al. 2004b), ceux des Duox servent de domaine d'autoinhibition par le Ca^{2+} (Dupuy et al. 1992). Enfin, l'extrémité N-terminale de ces Duox est reliée à un ectodomaine peroxydase-like via un 7^{ème} segment transmembranaire (Figure 15).

Les Nox 1 et 3 possèdent des facteurs cytosoliques homologues de ceux de Nox2, à savoir un homologue de $p47^{phox}$ dénommé NoxO1 (pour Nox Organizer 1) et un homologue de $p67^{phox}$ dénommé NoxA1 (pour Nox Activator 1) (Tableau 1 et Figure 16). Ces protéines, qui furent d'abord identifiées avec Nox1, sont interchangeables *in vitro* avec leurs homologues, suggérant qu'elles ne sont pas spécifiques d'un type donné de Nox (Banfi et al. 2003). Remarquons que Nox1 est associée à Rac 1 (Takeya et al. 2003; Park et al. 2004b; Kawahara et al. 2005a; Sumimoto et al. 2005; Ueyama et al. 2006) et qu'aucun équivalent de $p40^{phox}$ n'ait été identifié chez les autres Nox à ce jour. On ne connaît toujours pas non plus de facteur cytosolique régulateur chez Nox4 et les isoformes Nox5 et Duox sont régulées par des voies Ca^{2+} dépendantes.

Tableau 1. Composantes régulatrices des Nox et Duox
d'après la revue (Nauseef 2008)

<u>Protéine Nox</u>	<u>$p22^{phox}$</u>	<u>Organiseur</u>	<u>Activateur</u>	<u>Cofacteur</u>	<u>Other</u>
Nox 2	+	$p47^{phox}$	$p67^{phox}$	Rac 1 ou 2	$p40^{phox}$ MRP8/14
Nox 1	+	NoxO1	NoxA1	Rac 1	
Nox 3	+	NoxO1	- / NoxA1*	Rac 1	
Nox 4	+	-	-	-	
Nox 5	-	-	Ca^{2+}	-	-
Duox 1,2	-	-	Ca^{2+}	-	-

*La Nox 3 humaine dépend uniquement de NoxO1, alors que la Nox 3 murine requiert à la fois NoxO1 et NoxA1.

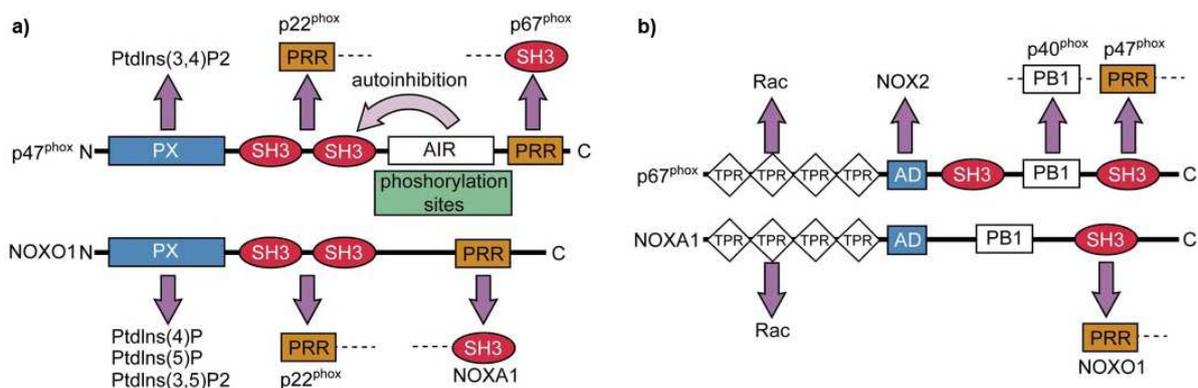


Figure 16. Comparaison topologique des facteurs cytosoliques de Nox 1, 2 et 3
D'après (Bedard and Krause 2007).

I.2.B Répartition cellulaire et fonctions physiologiques

Bien que la répartition des différentes Nox et Duox soit relativement variée (Tableau 2), chacune d'entre elles est caractéristique d'un ou plusieurs organes ou types cellulaires dans lesquelles elles jouent un rôle bien particulier. Certains types cellulaires présentent plusieurs types d'isoformes, chacune répondant à un besoin physiologique particulier. Ainsi par exemple, une isoforme constitutive exprimée à la membrane plasmique peut fournir un apport constant de ROS à la surface cellulaire dans un but purement extracellulaire, alors qu'une autre isoforme inductible sera présente à la membrane d'endosomes et produira occasionnellement une faible quantité de ROS qui jouera le rôle de messager secondaire. Presque tous les tissus et organes examinés chez l'homme ont montré la présence de Nox et/ou Duox, sur la base de la détection d'ARN messenger ou à l'aide des quelques anticorps qui existent (revu dans (Nauseef 2008)). Ce chapitre ne constitue donc en aucun cas une revue exhaustive des diverses fonctions occupées par les différents homologues de Nox2 mais nous tâcherons de citer ici les rôles majeurs de chacune de ces enzymes.

Nous ne reviendrons pas sur la prépondérance de Nox2 dans les cellules phagocytaires ainsi que son rôle indispensable comme sentinelle de l'immunité non spécifique. Des récentes études viennent d'ouvrir de nouvelles perspectives en détectant Nox2 dans les lymphocytes B où elle participerait à la cross-présentation des antigènes, par alcalinisation du pH phagosomal (Savina et al. 2006; Jancic et al. 2007; Mantegazza et al. 2008; Savina et al. 2009). Ces résultats vont ainsi à l'encontre du dogme selon lequel l'extraordinaire explosion oxydative générée par Nox2 est dédiée uniquement à la réponse immunitaire non spécifique.

I.2.B.1 Nox1

Nox1, autrefois appelée MOX1, est la NADPH oxydase spécifique de l'épithélium du colon, bien qu'une expression, certes plus faible, ait été détectée dans l'utérus et la prostate (Suh et al. 1999; Banfi et al. 2000; Banfi et al. 2003). Au sein du colon, il existe un gradient d'expression de Nox1, avec des niveaux d'expression plus élevés dans le colon distal que dans le colon proximal (Glebov et al. 2003; Szanto et al. 2005). Le rôle de Nox1 dans l'épithélium colique est cependant toujours mal défini. En raison de la forte présence de bactéries dans le colon, l'hypothèse d'une activité microbicide est fortement probable et permettrait d'expliquer le gradient d'expression de Nox1 (Krause 2004).

D'autre part, la surexpression inductible de Nox1 au niveau du tissu vasculaire (Suh et al. 1999) provoque une augmentation de la pression sanguine dépendante de l'angiotensine II (Matsuno et al. 2005) (cf. I.3.C.1) et stimule l'angiogénèse (Arbiser et al. 2002) (cf. I.3.B).

Tableau 2. Distribution tissulaire des Nox et Duox
d'après la revue (Nauseef 2008)

<u>protéine Nox</u>	<u>Distribution tissulaire</u>
Nox 1	Colon ; muscle vasculaire lisse, endothélium, prostate, utérus, placenta, ostéoclastes, péricyte rétinien
Nox 2	Cellules myéloïdes ; lymphocytes B, neurones, cardiomyocytes, muscle squelettique, hépatocytes, endothélium, cellules hépatiques, muscle vasculaire lisse
Nox 3	Oreille interne ; rein fœtal, rate fœtale, os crânien, cerveau
Nox 4	Reins ; endothélium, ostéoclastes, muscle lisse, cellules hépatiques, fibroblastes, kératinocytes, neurones, îlots cellulaires pancréatiques, cellules souches embryonnaires, adipocytes
Nox 5	Ganglions lymphatiques, rate, testicules ; endothélium, muscle lisse, pancréas, placenta, ovaires, utérus, estomac
Duox 1	Thyroïde, épithélium des voies aériennes ; pancréas, placenta, prostate, testicules, cervelet
Duox 2	Thyroïde, épithélium des voies aériennes ; glandes salivaires, estomac, duodénum, colon, rectum

I.2.B.2 Nox3

Nox3 est certainement l'isoforme la plus spécifique au niveau de sa répartition tissulaire puisqu'on la trouve presque exclusivement dans l'oreille interne (Banfi et al. 2004a). Exprimée de manière ubiquitaire dans le vestibule et la cochlée (Figure 17a), elle participe à la morphogénèse de l'otolithe (Figure 17b et c) qui assure le maintien de l'équilibre et de la perception de la gravité (Paffenholz et al. 2004).

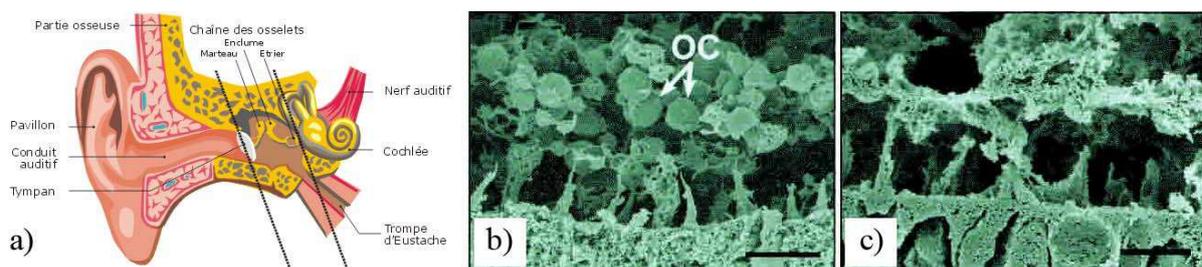


Figure 17. Rôle de Nox3 dans la morphogénèse de l'otolithe

a) Schéma de l'oreille interne. L'otolithe ou otoconie (OC), indiquée par des flèches blanches est visible uniquement chez les souris **b)** WT et non chez les souris **c)** Nox3^{-/-}. Adapté d'après (Paffenholz et al. 2004).

De faibles niveaux d'expression de Nox3 peuvent également être détectés dans d'autres tissus tels que la rate fœtale (Kikuchi et al. 2000), le rein fœtal (Cheng et al. 2001), l'os crânien et le cerveau (Banfi et al. 2004a).

Le mécanisme d'activation de Nox3 est toujours mal défini. D'un point de vue biochimique, NoxO1 semble activer Nox3 de manière constitutive (Ueno et al. 2005) mais d'un point de vue physiologique, la raison d'une telle production constitutive de ROS dans l'oreille interne reste un mystère (Bedard and Krause 2007).

I.2.B.3 Nox4

Lors de sa découverte en 2000, Nox4 fut d'abord appelée RENox, en raison de son abondante expression dans le cortex rénal (Geiszt et al. 2000; Shiose et al. 2001). Depuis, Nox4 est probablement la NADPH oxydase rencontrée dans le plus grand nombre de types cellulaires tels que :

- les ostéoclastes (Yang et al. 2001; Yang et al. 2004),
- les cellules endothéliales (Ago et al. 2005; Hu et al. 2005b; Van Buul et al. 2005),
- les cellules musculaires lisses (Lassegue et al. 2001; Hoidal et al. 2003; Pedruzzi et al. 2004; Ellmark et al. 2005; Janiszewski et al. 2005; Sturrock et al. 2006),
- les cellules souches hématopoïétiques (Piccoli et al. 2005),
- les fibroblastes (Dhaunsi et al. 2004; Colston et al. 2005; Cucoranu et al. 2005),
- les kératinocytes (Chamulitrat et al. 2004),
- les cellules du mélanome (Brar et al. 2002),
- les hépatocytes (Carmona-Cuenca et al. 2006; Carmona-Cuenca et al. 2008; Sancho et al. 2009),
- les adipocytes (Mahadev et al. 2004; Mouche et al. 2007),
- les neurones (Vallet et al. 2005).

L'expression de l'ARN messager de Nox4 est induite dans les conditions suivantes : stress du réticulum endoplasmique (Pedruzzi et al. 2004), contraintes de cisaillement (Hwang et al. 2003), lésion de la carotide (Szocs et al. 2002), hypoxie et ischémie (Suliman et al. 2004; Vallet et al. 2005), stimulation du muscle lisse par le TGF- β 1 et TNF- α . (Moe et al. 2006; Sturrock et al. 2006). Nox4 peut être surexprimée en réponse à l'angiotensine II (Wingler et al. 2001; Higashi et al. 2003; Yamagishi et al. 2005) et sous exprimée en réponse au ligand PPAR- γ (Hwang et al. 2005).

La fonction de Nox4 est encore mal connue. L'hypothèse de travail la plus populaire serait un rôle de senseur d'oxygène dans le cortex rénal (Geiszt et al. 2000). Nox4 pourrait également jouer un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire des hépatocytes fœtaux de rats (Carmona-Cuenca et al. 2006) et dans la différenciation des adipocytes (Mouche et al.

2007). Dernièrement, un groupe vient de mettre en évidence l'implication de Nox4 dans la réparation tissulaire de myofibroblastes ainsi que dans la fibrogénèse (Hecker et al. 2009). Une autre équipe a par ailleurs récemment montré que Nox4 était exprimée à l'intérieur des mitochondries des cellules mésangiales et du cortex rénal et pourrait jouer un rôle dans le diabète (Block et al. 2009).

Une des particularités de Nox4 est que pour l'instant, aucun mécanisme d'activation n'ait été trouvé. Rappelons en effet que Nox4 ne requiert pas la présence de sous unités cytosoliques et que dans les systèmes hétérologues, Rac n'est pas nécessaire à son activité. Il semblerait donc que Nox4 soit une enzyme active constitutivement et que son activité soit régulée uniquement au niveau transcriptionnel et traductionnel (Martyn et al. 2006). Cependant la présence de Rac a été démontrée dans certains systèmes endogènes où elle serait recrutée après stimulation par l'angiotensine II et le glucose dans les cellules mésangiales (Inoguchi et al. 2003; Gorin et al. 2005). Certaines études ont par ailleurs montré l'activation de Nox4 sur différentes cellules après stimulation avec des lipopolysaccharides (LPS) (Park et al. 2004a), de l'insuline (Mahadev et al. 2004), du TGF- β (Carmona-Cuenca et al. 2008) et du PMA (Kuroda et al. 2005) Certains mécanismes d'activation de Nox4 mettraient en jeu une interaction direct entre les récepteurs TLR4 et Nox4 (Park et al. 2004a).

I.2.B.4 Nox5

On retrouve Nox5 tout particulièrement dans les tissus lymphatiques, la rate et les testicules (Tableau 2) mais également dans le muscle vasculaire lisse, la moelle osseuse, le pancréas, le placenta, les ovaires, l'utérus, l'estomac et différents tissus fœtaux (Banfi et al. 2001; Cheng et al. 2001; Salles et al. 2005).

Dans les testicules, Nox5 est localisée essentiellement au niveau des spermatocytes suggérant un rôle dans la spermatogénèse (Banfi et al. 2001) vraisemblablement dans la régulation de facteurs transcriptionnels (Krause 2004).

Au niveau des tissus lymphatiques et de la rate, on retrouve Nox5 dans les régions riches en lymphocytes B autour des centres germinaux et dans les régions riches en lymphocytes T. De manière étonnante, les lymphocytes circulants semblent être dépourvus de Nox5. Nox5 pourrait participer à la différenciation lymphocytaire via une activation par le NFkappaB (Krause 2004).

Le mécanisme d'activation de l'isoforme Nox5- ϵ déficiente en région EF-hand n'est pas encore connu. Pour les autres isoformes $-\alpha$ à $-\delta$, il a été montré que Nox5 ne requiert pas la présence de p22^{phox} (Kawahara et al. 2005b) ni de facteurs cytosoliques activateurs ou

organismes (Banfi et al. 2001; Banfi et al. 2004b). L'activation de Nox5 est médiée par une augmentation intracellulaire d'ions Ca^{2+} (Banfi et al. 2004b). Les régions EF-hands de Nox5 se comportent comme une unité structurellement indépendante qui subit des changements conformationnels en réponse à la vague calcique (Banfi et al. 2004b). Il semblerait que l'activation de l'enzyme passe par une interaction intramoléculaire entre la région de liaison du Ca^{2+} et la partie catalytique C-terminale (Banfi et al. 2001; Banfi et al. 2004b).

I.2.B.5 Les Duox

Les Dual Oxydases (Duox) sont des membres de la famille des NADPH: O_2 oxydoréductases qui produisent de grandes quantités de peroxyde d'hydrogène à la membrane plasmique (Donko et al. 2005). Les deux isoformes Duox 1 et Duox 2 sont très fortement exprimées dans la thyroïde (Dupuy et al. 1999; De Deken et al. 2000) d'où leur première appellation de thyroïde oxydase (THOX). Elles sont également exprimées, à moindre échelle, dans l'épithélium des voies respiratoires (Geiszt et al. 2003; Schwarzer et al. 2004; Forteza et al. 2005) et dans la prostate (Wang et al. 2005). Par ailleurs, on retrouve Duox2 dans les conduits des glandes salivaires (Geiszt et al. 2003), dans la muqueuse rectale (Geiszt et al. 2003) et tout au long du tractus gastro-intestinal incluant le duodénum, le colon et le caecum (Dupuy et al. 2000; El Hassani et al. 2005).

Dans des systèmes d'expression hétérologue, les Duox ont tendance à être retenues dans le réticulum endoplasmique (Ameziane-El-Hassani et al. 2005). Cette observation a permis la découverte des facteurs de maturation des enzymes Duox, appelés DuoxA1 et DuoxA2 (Grasberger and Refetoff 2006). En plus de promouvoir la maturation des Duox, ces facteurs de maturation conditionnent leur sortie du réticulum endoplasmique puis ils sont co-transportés via l'appareil de Golgi à la membrane plasmique où ils participent à la stabilisation du complexe générateur de peroxyde d'hydrogène (Morand et al. 2009).

Dans les thyrocytes, les enzymes Duox sont localisées à la membrane apicale (Dupuy et al. 1999; De Deken et al. 2000) et, en plus faible quantité, dans le milieu intracellulaire, vraisemblablement dans le réticulum endoplasmique (De Deken et al. 2002). Cette localisation au niveau de la membrane apicale ne fut pas une surprise puisque depuis 15 ans, les spécialistes de la thyroïde cherchaient à identifier une oxydase participant à la synthèse de l'hormone thyroïdienne en produisant du peroxyde d'hydrogène dans le plasma, d'une manière calcium et NADPH dépendante (Bjorkman and Ekholm 1984).

Le fonctionnement des Duox n'est toujours pas bien compris et fait toujours débat. En effet, le domaine N-terminal homologue des peroxydases (Figure 15) semble indiquer que les

Duox ont bien une activité peroxydase (Edens et al. 2001). Cependant, une étude récente vient de démontrer l'absence d'activité peroxydase de l'ectodomaine peroxidase like humain recombinant (Meitzler and Ortiz de Montellano 2009). D'autre part, étant donnée l'homologie de séquence des Duox pour les Nox, et sachant que les enzymes héminiques ne peuvent transférer qu'un seul électron à la fois, les Duox devraient générer des anions superoxyde (Bedard and Krause 2007). Enfin, l'analyse de la séquence protéique de ce domaine montre qu'il manque chez les Duox des résidus essentiels à la fonction peroxydase (Daiyasu and Toh 2000; Nauseef 2001). Des peroxydases sont habituellement co-exprimées dans les cellules exprimant les Duox comme par exemple la thyroïde peroxydase dans la glande thyroïdienne et la lactoperoxydase dans les glandes salivaires (Bedard and Krause 2007). Dans la thyroïde, l'absence de la thyroïde peroxydase entraîne une hypothyroïdie, due à baisse de la synthèse d'hormone thyroïdienne dépendante du peroxyde d'hydrogène (Park and Chatterjee 2005); ce qui laisse suggérer que les Duox ne sont pas capables de compenser ces peroxydases associées. Cependant, le domaine homologue de la peroxydase de Duox2 semble toutefois fonctionnel puisque des mutations dans ce domaine peuvent également entraîner une hypothyroïdie (Vigone et al. 2005). Récemment, une équipe vient de proposer une voie Ca^{2+} dépendante mettant en jeu un mécanisme réactionnel faisant intervenir un intermédiaire superoxyde qui serait ensuite rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène (Ameziane-El-Hassani et al. 2005).

La fonction des Duox dans les cellules épithéliales des voies aériennes et du tractus gastro-intestinal est encore mal définie, mais cette localisation suggère un rôle potentiel de défense immunitaire innée (Geiszt et al. 2003). Il semblerait cependant que dans des conditions non pathologiques, le rôle des Duox ne soit pas de tuer les bactéries de la flore intestinale mais plutôt de les contenir, en produisant de l' H_2O_2 (Botteaux et al. 2009). Ce mécanisme permettrait d'expliquer comment notre corps supporte la présence des quelques 10^{14} bactéries de notre flore intestinale. Cette idée de commensalisme permet de dépasser l'idée reçue selon laquelle notre corps cherche systématiquement à tuer les cellules exogènes qu'il héberge et dont il bénéficie parfois en retour.

I.3 Pathologies et intérêts cliniques

Les pathologies liées à l'activité enzymatique des Nox et Duox sont innombrables. Une revue récente a cependant réussi à dresser une liste non exhaustive des principales

maladies dépendantes de Nox répertoriées à ce jour (Lambeth et al. 2008). Nous aborderons ici les principales pathologies qui sont les mieux décrites.

I.3.A La Granulomatose Chronique Sceptique (CGD)

La Granulomatose Chronique Sceptique est une maladie génétique rare, touchant 1 personne sur 200 000 à 250 000, caractérisée par des infections sévères et récurrentes, essentiellement par des bactéries et champignons catalase-positifs (Stasia and Li 2008). Ce défaut du système immunitaire est lié à des mutations génétiques touchant 4 des membres de la NADPH oxydase : gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox} et p47^{phox}. C'est l'étude de ce syndrome d'immunodéficience inné qui a permis l'identification des différentes sous-unités du complexe Nox2.

I.3.A.1 Historique

La première description de patients atteints de CGD date de 1954 (Janeway et al. 1954) puis d'autres cas furent répertoriés sans que les bases moléculaires responsables de ce trouble immunitaire ne soient identifiées (Landing and Shirkey 1957). La totalité des cas étant identifiés jusqu'alors chez des garçons, on pensait que cette maladie était uniquement portée par le chromosome X. La présence de granulomes fut décrite dès 1957 (Berendes et al. 1957) et la maladie fut baptisée CGD en 1967 par une équipe démontrant l'incapacité de ces malades à tuer *Staphylococcus aureus* in vitro (Quie et al. 1967). Finalement, il fallut attendre 11 ans pour que Segal et Jones identifient le cytochrome b₅₅₈ comme étant le transporteur d'électron de la NADPH oxydase des neutrophiles impliquée dans la CGD (Segal and Jones 1978). Dès 1983, une étude mit en évidence l'existence d'une forme autosomale récessive de la CGD affectant également les femmes (Segal et al. 1983). La collecte de neutrophiles de patients CGD permit ainsi d'identifier les facteurs cytosoliques de ce complexe multi-enzymatique au cours des années 80 (Segal et al. 1985; Curnutte et al. 1987; Umei et al. 1987). Le rôle de Rac 1-2 fut décrit au début des années 90 (Abo and Pick 1991; Knaus et al. 1991) et une nouvelle forme de CGD liée à Rac 2 a été décrite en 2000 chez un enfant de 5 semaines (Ambruso et al. 2000; Williams et al. 2000).

I.3.A.2 Génétique

Génétiquement, la CGD est une maladie hétérogène puisqu'elle peut toucher plusieurs gènes. On la retrouve de manière équivalente chez tous les groupes ethniques (Stasia and Li

2008). La forme récessive liée au chromosome X, caractérisée par des mutations dans le gène CYBB codant pour gp91^{phox} est la forme la plus fréquente, avec 60% des cas (Tableau 3). En 2003, l'Institut de Génétique Médicale de Cardiff (Pays de Galles) et l'Institut de Technologie et de Bioinformatique Médicale de Tampere (Finlande) ont répertorié 282 (Stenson et al. 2003) et 244 (Piiirila et al. 2006) mutations dans le gène CYBB, respectivement. La plupart de ces mutations sont des simples substitutions (58%) et les autres correspondent à des petites (26%) ou larges (14%) délétions et/ou insertions (Stasia and Li 2008). La plupart du temps, les mutations du gène CYBB entraînent une absence d'expression de gp91^{phox} et donc d'activité NADPH oxydase. Ce phénotype est appelé X91⁰ CGD (Tableau 3). Les deux autres phénotypes liés aux mutations du gène CYBB correspondent à une expression peu ou pas fonctionnelle de gp91^{phox} (X91⁻ CGD) et à une expression fonctionnelle de gp91^{phox} (X91⁺ CGD) (Stasia and Li 2008). Ces deux derniers phénotypes ont été mis en évidence dans 26 mutations pour X91⁻ CGD (Heyworth et al. 2001) et 19 mutations pour X91⁺ CGD (Stasia et al. 2005; Stasia 2007). Ils ont été l'objet d'un grand nombre d'études qui ont permis de mieux comprendre la topologie et le fonctionnement de gp91^{phox} (Stasia and Li 2008).

Tableau 3. Caractérisation des composants de la NADPH oxydase impliqués dans la CGD
Adapté de (Stasia and Li 2008)

		NOX2 ou gp91 ^{phox}	p22 ^{phox}	p47 ^{phox}	p67 ^{phox}
Maladie	Transmission	Liée au chrom. X	Autosomale récessive	Autosomale récessive	Autosomale récessive
	Désignation	X91 CGD	A22 CGD	A47 CGD	A67 CGD
	Sous-type et fréquence	X91 ⁰ CGD (55%) X91 ⁻ CGD (<5%) X91 ⁺ CGD (<5%)	A22 ⁰ CGD (5%) Un cas d'A22 ⁺ CGD	A47 ⁰ CGD (30%)	A67 ⁰ CGD (5%) Un cas d'A67 ⁻ CGD
Gène	OMIM	306400	233690	233700	233710
	Nom	CYBB	CYBA	NCF1	NCF2
	Localisation	Xp21.1	16q24	7q11.23	1q25
	Taille	30 kb	8,5 kb	15,2 kb	37 kb
	Nombre d'exons	13	6	11	16

La forme autosomale récessive la plus fréquente de CGD est due à des mutations dans le gène NCF1 (Tableau 3). Contrairement à la grande hétérogénéité des génotypes pour les CGD liées au chromosome X, 95 % des A47 CGD sont dues à une délétion GT dans le tandem GTGT correspondant aux 4 premières bases de l'exon 2 (Casimir et al. 1991). Cette délétion provoque le déplacement du cadre de lecture et l'apparition d'un codon STOP en

position 51 qui résulte en une absence complète de p47^{phox} (A47⁰ CGD). Les quelques autres mutations autres que cette délétion GT sont de petites mutations qui entraînent toutes le phénotype A47⁰ CGD (Stasia and Li 2008).

Les mutations dans le gène CYBA codant pour p22^{phox} sont très rares (<5%) et on en recensait 26 différentes en 2000 (Cross et al. 2000). La plupart d'entre elles (15/28) sont faux sens ou non sens (Stasia and Li 2008). La seule mutation faux sens Pro156Gln entraînant le seul phénotype A22⁺ est située dans la région C-terminale de p22^{phox} qui est connue pour interagir avec le tandem SH3s de p47^{phox} (Sumimoto et al. 1996). Cette mutation entraîne un défaut de translocation de p47^{phox} et p67^{phox} à la membrane (Stasia and Li 2008).

Les dernières mutations autosomales récessives sont portées par le gène NCF2 codant pour p67^{phox}. Le dernier état des lieux révélait 18 mutations différentes (Stasia and Li 2008), qui représentaient moins de 5% des cas de CGD (Tableau 3). Toutes les mutations faux sens sont situées dans le domaine TPR et donnent un phénotype A67⁰, preuve de l'importance structurale de ce domaine. Un seul cas de phénotype A67⁻ CGD a été rapporté. Il concerne un patient exprimant la moitié du taux normal de p67^{phox}, avec la Lys58 délétée, entraînant une moins bonne interaction avec Rac et empêchant la translocation de p67^{phox} à la membrane (Leusen et al. 1996).

Enfin, il est important de remarquer que l'absence d'expression de p67^{phox} entraîne une réduction voire même une absence de l'expression de p40^{phox} (Bakri et al. 2009), confirmant le fait que la stabilité de ces deux protéines est bien reliée (Tsunawaki et al. 1996; Vergnaud et al. 2000).

I.3.A.3 Diagnostique et traitement

Il existe différents tests permettant de diagnostiquer la CGD, en mesurant la production de ROS intracellulaires (réduction du NBT, chimiluminescence du luminol ou de la lucigénine, cytométrie de flux) ou extracellulaires (fluorescence de la résorufine, réduction du cytochrome *c*). Les tests de production de ROS intracellulaires doivent être précédés d'une stimulation des neutrophiles avec des stimuli solubles tels que le phorbol acétate de miristate (PMA), le peptide formyle (fMLF) ou avec des stimuli particuliers tels que des billes de latex opsonisées, des bactéries ou du zymosan. Remarquons que pour diagnostiquer un patient porteur sain de CGD autosomale récessive, ce genre de test d'activité est inutile ; il faut dans ce cas déterminer le gène muté par Western blot puis par séquençage de l'ADN.

La CGD est en général détectée dès le plus jeune âge en raison des infections récurrentes et sévères qu'elle provoque. Le taux de mortalité est de 2 à 5% par an. Les

complications les plus courantes sont la pneumonie, les abcès sous-cutanés, les abcès du foie, l'ostéomyélite et la septicémie. Les principaux micro-organismes responsables sont *S. aureus* ainsi que des espèces de *Salmonella*, *Burkholderia* et d'*Aspergillus*. Les principaux traitements cliniques proposés sont la prophylaxie antimicrobienne, l'interféron γ , la transplantation de cellules souches ainsi que la thérapie génique (Stasia and Li 2008). En effet, des patientes porteuses (hétérologues) de mutations liées au chromosome X ayant au moins 10 à 20 % de neutrophiles normaux ne présentent aucun syndrome clinique, ce qui laisse suggérer que la thérapie génique puisse fonctionner dans le cas de la CGD (Dinauer et al. 2000). En effet, cette méthode a été utilisée sur des modèles cellulaires, murins et lors de tests cliniques (Dinauer et al. 2000; Segal et al. 2000; Stein et al. 2006) avec des résultats aléatoires. La majorité des vecteurs utilisés sont des rétrovirus comprenant l'ARN codant pour gp91^{phox} ou p47^{phox}, selon le phénotype du patient (Stasia and Li 2008). Des résultats mitigés ont été récemment publiés sur deux patients X91⁰ CGD dont le nombre de cellules exprimant gp91^{phox} est monté à 40-60 % du sang total périphérique, 10 mois après la transplantation ce qui a permis l'éradication d'infections bactériennes et de mycoses dont les patients souffraient depuis de nombreuses années. Un des patients est cependant mort de septicémie, 27 mois après la thérapie génique (Grez et al. 2005; Siler et al. 2005; Stein et al. 2006). Remarquons enfin, que parallèlement aux infections à répétition dont souffrent les patients atteints de CGD, des inflammations donnant lieu à des granulomes sont aussi symptomatiques de cette maladie. Une équipe a d'ailleurs récemment suggéré que Nox2 pouvait jouer dans certaines conditions un rôle anti-inflammatoire (Schappi et al. 2008), mettant ainsi un terme au dogme selon lequel Nox2 avait un rôle purement pro-inflammatoire.

I.3.B Le cancer

En dehors de leurs fonctions antimicrobiennes, les ROS générés à de plus faibles concentrations exercent un rôle de molécule signal impliquée dans la régulation d'un grand nombre de processus physiologiques tels que l'apoptose, la prolifération cellulaire et la différenciation (Sauer et al. 2000; Poli et al. 2004). Une dérégulation de l'équilibre redox pourrait ainsi provoquer une modification de ces phénomènes impliqués dans le cancer (Sauer and Wartenberg 2005).

De nombreux groupes ont d'ailleurs mis en évidence par le passé le rôle des ROS dans la carcinogénèse de différentes lignées cellulaires (Matsubara and Ziff 1986; Meier et al. 1989). Plus particulièrement, les NADPH oxydases semblent être une source de ROS

impliqués dans de tels processus pathologiques (Griendling et al. 1994; Jones et al. 1995; Jones et al. 1996; Pagano et al. 1997; Suh et al. 1999). Les liens entre Nox et cancers sont cependant complexes et nombreux, étant donné la diversité des Nox et Duox (cf. I.2) ainsi que les innombrables processus pathologiques participant à la carcinogénèse.

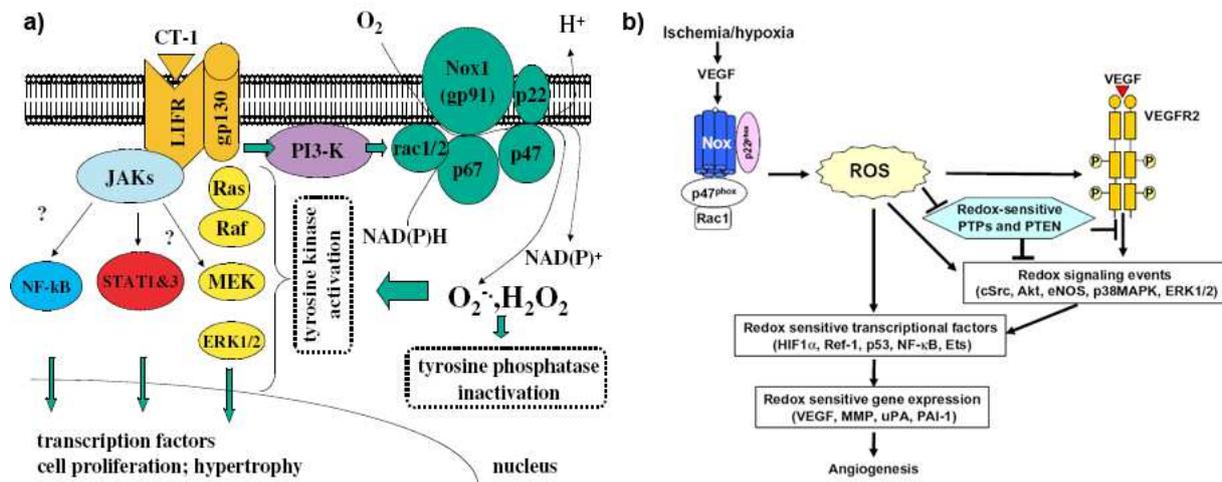


Figure 18. Rôle des ROS générés par les Nox dans l'angiogénèse

a) D'après (Ushio-Fukai and Nakamura 2008) et b) (Sauer and Wartenberg 2005).

L'équipe d'Ushio-Fukai a tout particulièrement étudié l'implication des Nox dans l'angiogénèse, phénomène physiologique de néo-vascularisation détourné par la tumeur afin d'assurer sa croissance et la formation de métastases (Ushio-Fukai et al. 2002; Ushio-Fukai and Alexander 2004; Ushio-Fukai 2007; Ushio-Fukai and Nakamura 2008). Les Nox mises en jeu sont celles que l'on retrouve dans les cellules endothéliales, à savoir Nox1, Nox2, Nox4 et Nox5 (Petry et al. 2006; Ushio-Fukai and Nakamura 2008). Il semblerait que les Nox 2 et 4 soient particulièrement exprimées dans les cellules endothéliales en prolifération, alors que Nox 1 y est moins exprimée (Petry et al. 2006). Les ROS générés joueraient ici un rôle dans la signalisation moléculaire. Les Nox sont d'abord activées par différents facteurs de croissance tels que le VEGF, l'angiopoïétine-1 ainsi que par hypoxie ou ischémie (Figure 18a). Les ROS ainsi produits sont impliqués dans l'autophosphorylation du récepteur au VEGF (VEGFR2), et dans diverses voies de signalisation redox induisant l'induction de facteurs de transcription et de gènes impliqués dans l'angiogénèse. Des thérapies anti-angiogéniques ciblent ainsi le VEGF ainsi que son récepteur, avec des anticorps spécifiques (Ushio-Fukai and Nakamura 2008). D'autre part, Sauer et Wartenberg (Sauer and Wartenberg 2005) ont montré l'implication des ROS issus de Nox dans l'activation de tyrosines kinases et l'inactivation de tyrosines phosphatases induisant la prolifération de cellules souches embryonnaires (Figure

18b). Celles-ci ont la capacité de se différencier en cellules cardiovasculaires et leur prolifération excessive induite par les ROS participe au phénomène d'angiogénèse.

L'autophagie ou autophagocytose est un autre mécanisme physiologique régulé par l'action des Nox qui peut devenir carcinogénique suite à un déséquilibre redox (Azad et al. 2008). Dans les conditions physiologiques, l'autophagie assure la survie cellulaire en recyclant les acides aminés et les acides gras de la cellule, permettant ainsi l'homéostasie cellulaire et la destruction de molécules potentiellement dangereuses (Figure 19). D'autre part, l'autophagie peut entraîner la mort cellulaire afin de recycler les cellules nécrosées, par exemple. Le rôle de l'autophagie dans le cancer n'est pas clair, certaines équipes la dotant d'un rôle pro-cancérigène (survie des cellules tumorales) (Boya et al. 2005; Lum et al. 2005; Degenhardt et al. 2006) ou anti-cancérigène (Liang et al. 1999; Yue et al. 2003).

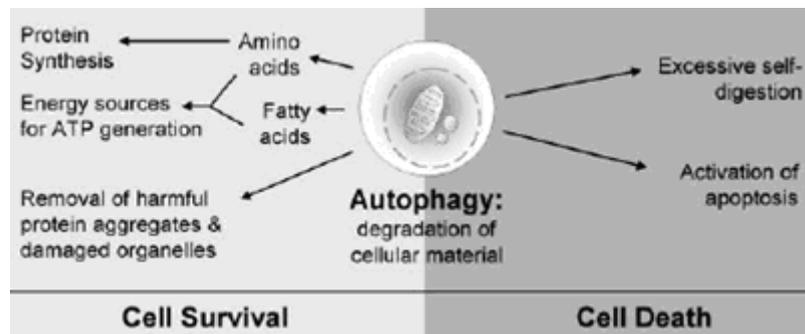


Figure 19. Autophagie et homéostasie cellulaire.

D'après (Azad et al. 2008).

Plusieurs groupes ont étudié le rôle de Nox1 dans l'initiation et le développement d'adénomes et d'adénocarcinomes. Des études sur des modèles murins ont montré que l'injection de fibroblastes surexprimant Nox1 stimulait la génération de ROS qui augmentaient les capacités mitogénique et carcinogénique (Suh et al. 1999; Arnold et al. 2001; Arbiser et al. 2002). Il semblerait ainsi que Nox1 soit impliquée dans le développement du cancer du colon (Fukuyama et al. 2005; Rokutan et al. 2006) et de la prostate (Suh et al. 1999; Kikuchi et al. 2000; Arbiser et al. 2002) bien que la surexpression de Nox 1 dans l'adénocarcinome de colon soit controversée (Szanto et al. 2005). D'autre part, une équipe a montré qu'il existait une sorte de dialogue entre la mitochondrie et Nox1 et que la perte de ce « cross-talk » provoquait l'apparition de cancers des ovaires et du sein (Desouki et al. 2005).

Enfin, une étude très récente a montré l'implication de Nox4 dans le développement de mélanomes et plus particulièrement dans la régulation de la phase G(2) M du cycle cellulaire (Yamaura et al. 2009).

Au final, le rôle des ROS dans l'initiation et le développement des tumeurs est très compliqué. On voit ainsi certaines thérapies anticancéreuses utilisant des antioxydants afin

d'augmenter le pouvoir cytotoxique d'agents chimiothérapeutiques (Chinery et al. 1997) alors que d'autres stratégies visent à augmenter la production de ROS pour induire la mort des cellules tumorales (Agostinelli and Seiler 2006). Depuis quelques années, le celastrol, un triterpène issu de la plante médicinale chinoise *Tripterygium wilfordii*, est étudié pour ses propriétés antiangiogéniques (He et al. 2009), proapoptotiques, anti-invasives (Sethi et al. 2007) et inhibitrices du protéasome (Yang et al. 2006), qui en font un bon candidat comme drogue anticancérogène.

I.3.C Autres

I.3.C.1 Les maladies cardiovasculaires

L'implication des Nox dans le système cardiovasculaire a été très largement étudiée, en raison des nombreux rôles physiologiques et altérations pathologiques existantes. Des revues très spécialisées et approfondies sur le sujet ont été publiées récemment (Bengtsson et al. 2003; Griendling 2004; Brandes and Kreuzer 2005; Bedard and Krause 2007).

Les Nox sont présentes à tous les niveaux de la paroi vasculaire. Cependant, les cellules endothéliales de l'intima, les cellules musculaires lisses de la média ainsi que les macrophages et fibroblastes présents dans l'adventice expriment de manières différentes les isoformes Nox 1, 2, 4, et 5 (Figure 20).

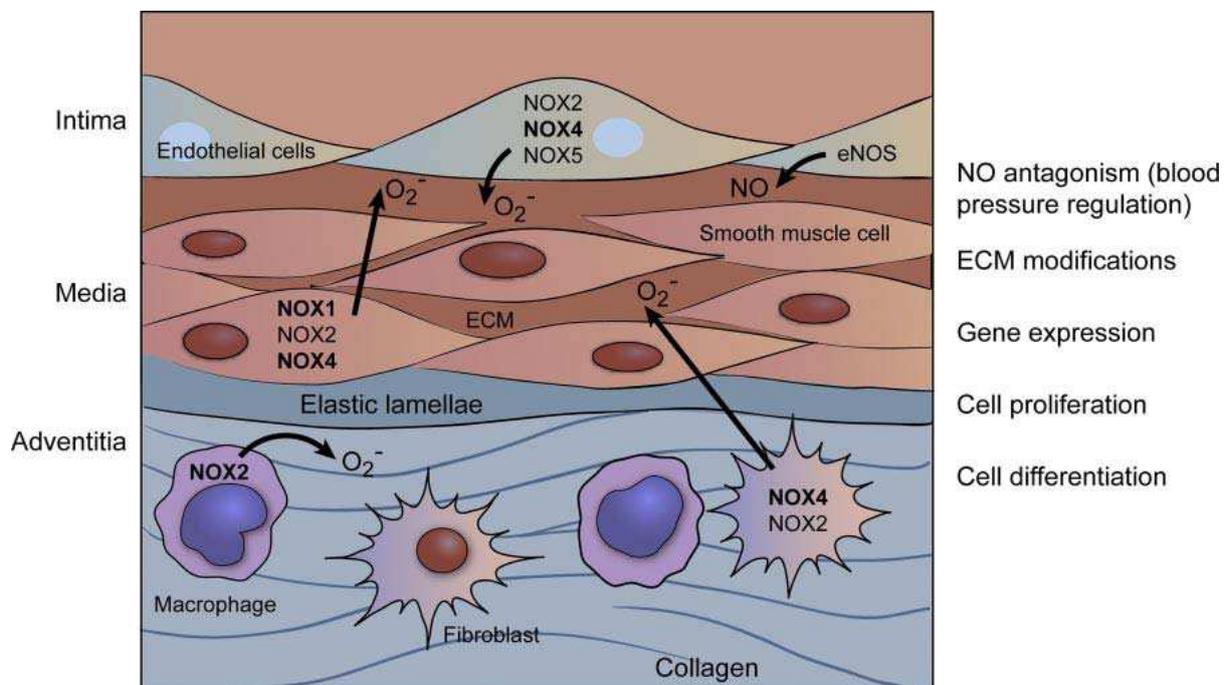


Figure 20. Localisation et fonctions des Nox dans la paroi vasculaire
Les isoformes prédominantes sont en gras. D'après (Bedard and Krause 2007).

Les principales pathologies cardiovasculaires liées aux ROS produits par les Nox sont l'hypertension, l'athérosclérose, la dissection aortique, l'anévrisme, l'hypertrophie cardiaque, la fibrose, l'arrêt cardiaque et l'infarctus du myocarde (Bedard and Krause 2007; Lambeth et al. 2008). La plupart de ces pathologies mettent en jeu Nox 1 et 2. Toutefois, une étude récente vient de montrer que Nox4 est capable de déclencher la prolifération et d'inhiber l'apoptose de fibroblastes des artères pulmonaires (Li et al. 2008).

Des inhibiteurs de Nox sont ainsi envisagés comme agents anti-hypertenseurs (Williams and Griendling 2007), ainsi que dans le traitement de ces diverses pathologies cardiovasculaires (Lambeth et al. 2008).

I.3.C.2 Le vieillissement

Les Nox ont été récemment identifiées comme jouant un rôle potentiel dans les maladies liées au vieillissement telles que les maladies neurodégénératives (cf. I.3.C.4), les accidents vasculaires cérébraux, certaines maladies cardiovasculaires (cf. I.3.C.1), la cataracte et l'ostéoporose (Krause 2007).

Parallèlement à ces pathologies, le processus lui-même de vieillissement, parfois appelé horloge biologique est également causé par des radicaux libres (Harman 1956). Cependant, les mitochondries sont souvent décrites comme la majeure voire unique source de ROS responsable de ce processus. Récemment, quelques chercheurs ont émis l'hypothèse que les Nox pouvaient également jouer un rôle dans le vieillissement (Salles et al. 2005; Krause 2007) et notamment dans la sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire (Hannken et al. 1998; Imanishi et al. 2005).

I.3.C.3 Les maladies pulmonaires

Les poumons et les voies aériennes contiennent de fortes quantités d'ARNm de Nox2 (Kikuchi et al. 2000; Cheng et al. 2001) et Duox1 (Geiszt et al. 2003) ainsi que Nox4 en plus faible quantité (Cheng et al. 2001). Plusieurs revues ont récemment détaillé le rôle des Nox dans les voies aériennes (Bedard and Krause 2007; Lambeth et al. 2008; van der Vliet 2008). Il semblerait ainsi que les ROS générés par les Nox jouent un rôle dans l'asthme et la Broncho-pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) (Hoidal et al. 2003), l'emphysème (Lambeth et al. 2008), la fibrose pulmonaire et l'hypertension pulmonaire (Bedard and Krause 2007; Lambeth et al. 2008).

Les Nox semblent avoir un rôle de défense aux infections. Dans les voies pulmonaires, leur implication relative est dépendante des pathogènes. En effet, des souris KO pour Nox2

ont montré une meilleure résistance à *Streptococcus pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans* ainsi qu'au virus influenza mais une plus forte susceptibilité aux infections par *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* et *Aspergillus fumigatus* (Bedard and Krause 2007).

I.3.C.4 Les maladies du système nerveux central

Le système nerveux consomme 20% de l'oxygène de l'organisme et il produit donc de fortes quantités de ROS. Là aussi, les Nox vont accompagner les mitochondries dans cette production de ROS. L'ARNm de cerveau total contient essentiellement le messenger de Nox2 et, en plus faibles quantités, de Nox4 et 5 (Cheng et al. 2001).

L'implication de ces Nox a récemment été suggérée ou mise en évidence dans un grand nombre de maladies du système nerveux central dont l'épilepsie (Patel et al. 2005), la schizophrénie (Behrens et al. 2007; Lambeth et al. 2008), l'infarctus cérébral (Walder et al. 1997), et des maladies neuro-dégénératives telles qu'Alzheimer (Park et al. 2008), Parkinson (Zhang et al. 2004), la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Wu et al. 2006) et la démence du SIDA (Vilhardt et al. 2002).

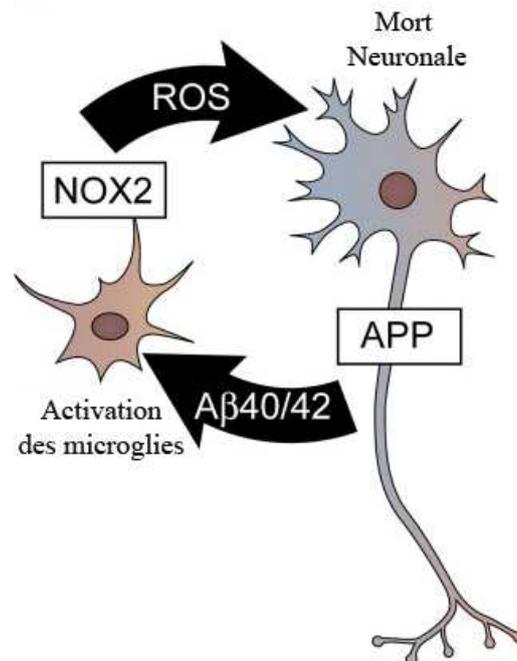


Figure 21. Rôle de Nox2 dans la maladie d'Alzheimer.

Adapté d'après (Bedard and Krause 2007).

Dans la maladie d'Alzheimer, le peptide Aβ40/42, issu de la protéine précurseur amyloïde APP, entraîne l'activation de la microglie (macrophage du système nerveux central) et de Nox2 (Zekry et al. 2003). Les ROS générés par les microglies activées vont participer à la mort cellulaire des neurones (Figure 21). L'étude de souris Nox2-déficientes a confirmé leur rôle dans le développement de cette neuropathologie (Park et al. 2008) et notamment dans la mort des neurones avoisinants (Qin et al. 2006).

II. p47^{phox} et son rôle dans le mécanisme d'activation

Dès 1985, Segal et al. découvre une protéine associée à certains cas de CGD (Segal et al. 1985). En 1988, Nunoï (Nunoï et al. 1988) puis Volpp (Volpp et al. 1988) identifient le facteur cytosolique p47^{phox}, absent dans certains cas de CGD. Depuis, p47^{phox} est désigné comme jouant un rôle central dans l'assemblage du complexe de la NADPH oxydase des neutrophiles (el Benna et al. 1994; DeLeo et al. 1995a; Sumimoto et al. 1996; Hata et al. 1997; Park and Babior 1997; Fontayne et al. 2002; Ago et al. 2003; Massenet et al. 2005; Taura et al. 2009).

II.1 Topologie

p47^{phox} est une protéine modulaire de 397 acides aminés (Figure 22), encodée par le gène NCF1 situé sur le chromosome 7 (locus 7q11.23), ayant un poids moléculaire de 44 696 Da. Son pI relativement élevé de 9,1 s'explique par une concentration de résidus chargés négativement sur son extrémité C-terminale (Vignais 2002). Les deux domaines d'homologie à src (SH3) (résidus 156-213 et 226-283) furent découverts par analyse de la séquence nucléotidique (Rodaway et al. 1990). Les domaines PX (phagocyte oxydase homologie) de p47^{phox} (résidus 4-125) et p40^{phox} furent identifiés simultanément en 1996 comme de nouveaux modules structuraux (Ponting 1996). L'utilisation de l'acronyme AIR, désignant la région polybasique auto inhibitrice, date de 2004 (Lambeth 2004) même si l'existence de celle-ci a été suggérée 10 ans auparavant par diverses équipes (Nauseef et al. 1993; Leto et al. 1994; Sumimoto et al. 1994). Enfin, la région riche en proline PRR située à l'extrémité C-terminale de p47^{phox} (résidus 361-371) est décrite dès 1994 (Leto et al. 1994). Depuis lors, la topologie de p47^{phox} est certes acceptée par tous mais l'organisation relative des différents modules structuraux fait toujours débat (cf. II.4). De nouveaux homologues de p47^{phox}, p40^{phox} et NoxO1 ont récemment été identifiés. Les protéines Tks4 et Tks5 qui possèdent toutes les deux un domaine PX N-terminal, suivi de 4 et 5 domaines SH3, respectivement ont ainsi été proposées comme de nouvelles protéines organisatrices de Nox (Gianni et al. 2009).

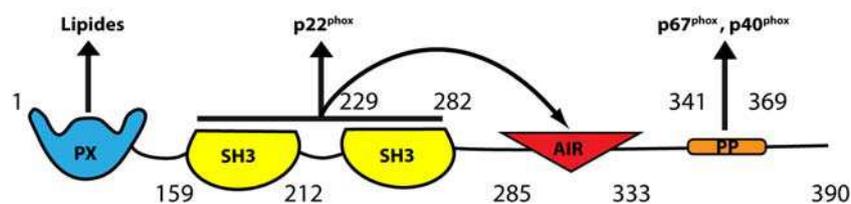


Figure 22. Organisation modulaire de p47^{phox}.

II.2 La phosphorylation de p47^{phox} comme signal transducteur

Dès le milieu des années 80, Segal et al. montre l'importance de la phosphorylation dans l'activation du complexe de la NADPH oxydase en décrivant des patients atteints de CGD possédant une protéine non phosphorylée de 44 kDa qui s'avérera être p47^{phox} (Segal et al. 1985). Parmi les 31 résidus sérine que comporte p47^{phox}, il semblerait que seules les sérines de l'extrémité C-terminale soient phosphorylées lors de l'action de la NADPH oxydase (el Benna et al. 1994). Plus particulièrement, des phosphorylations ont été observées sur les résidus Ser303,304,315,320,328,345,348,359,370 et 379 par les protéines kinases C, l'Akt ou les MAP kinases (el Benna et al. 1994; Faust et al. 1995; El Benna et al. 1996; Fontayne et al. 2002; Hoyal et al. 2003; Dang et al. 2006) (Figure 23).

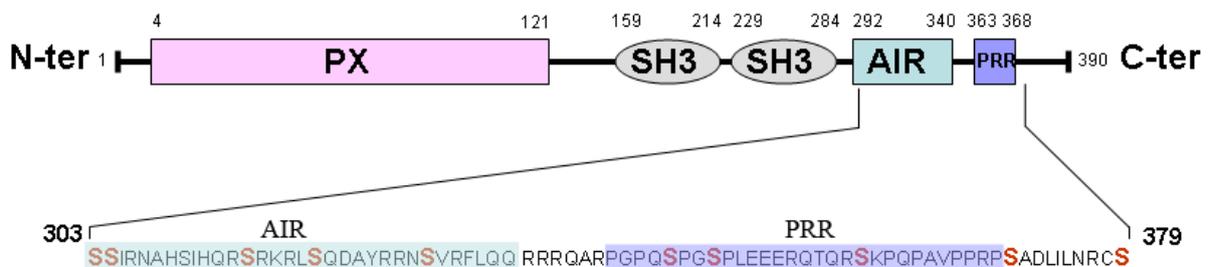


Figure 23. Sites de phosphorylations de p47^{phox}

Les sérines phosphorylées sont représentées en rouge. D'après (El-Benna et al. 2009).

Cependant, l'impact de la phosphorylation sur la structure et la fonction de p47^{phox} n'est pas le même selon la ou les sérines considérées. En effet, plusieurs groupes ont montré que la phosphorylation des Ser 303,304,328,359,370 et 379 participait à l'activation de la NADPH oxydase, alors que la phosphorylation des Ser315,320,345 et 348 semblait moins importante (El Benna et al. 1996; Inanami et al. 1998; Johnson et al. 1998; Ago et al. 1999).

Les sérines 315 et 320 sont exposées au solvant (Figure 24) ce qui semblerait expliquer pourquoi leur phosphorylation n'entraîne pas un changement drastique de l'organisation de p47^{phox}. En effet, des analyses de mutagenèse indiquent que la phosphorylation de ces résidus ne contribue que faiblement à l'activation de la NADPH oxydase (Ago et al. 1999; Groemping et al. 2003).

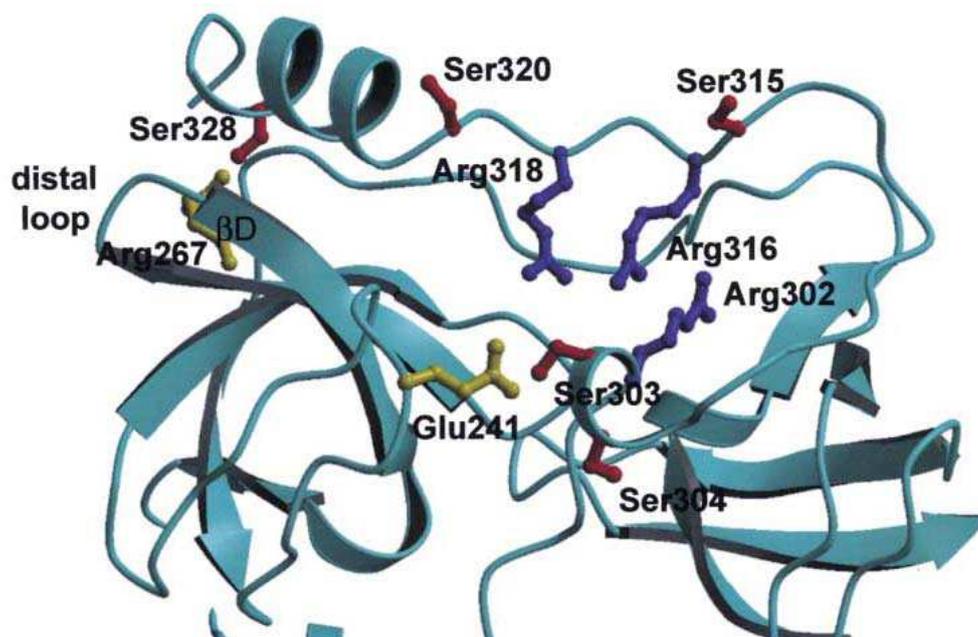


Figure 24. Structure auto-inhibée du tandem SH3s de p47^{phox}

D'après (Groemping et al. 2003).

De même, la phosphorylation des Ser345 et 348 n'est pas requise pour l'activation à proprement parler de Nox2 (Faust et al. 1995). Mais, une analyse par spectrométrie de masse a récemment suggéré que la Ser345 serait un site de phosphorylation critique dans le mécanisme de priming de la production de ROS par les neutrophiles polymorphonucléaires (Dang et al. 2006).

Enfin, la phosphorylation de chacune des Ser303,304,328,359,370 et 379 semble avoir un rôle direct dans le processus d'activation, en modifiant la structure et la fonction de p47^{phox} (Tableau 4).

Serines	Mutant	phosphorylation des autres sérines	transfert à la membrane	Activité NADPH oxydase	Ref.
	Wild Type	+	+	+	
Ser-303/304	S303A/304A	+	+	-	(El Benna et al. 1996; Inanami et al. 1998; Ago et al. 1999)
	S303E/304E	+	+	+	(Inanami et al. 1998)
	S303D/304D	+	+	-	(Inanami et al. 1998)
Ser-328	S328A	Nd ^a	Nd ^a	-	(El Benna et al. 1996; Ago et al. 1999) (El Benna et al. 1996; Johnson et al. 1998)
Ser-359/370	S359A/S370A	-	-	-	(Johnson et al. 1998)
	S359K/S370K	-	-	-	(Johnson et al. 1998)
	S359D/370D	+	+	-	(Johnson et al. 1998)
	S359E/370E	+	+	-	(Johnson et al. 1998)
Ser-379	S379A	+	+ / -	-	(Faust et al. 1995)

^aND, non déterminé

Tableau 4. Effets de mutations des sérines phosphorylables de p47^{phox}

D'après (Massenet et al. 2005).

Ainsi, la mutation des résidus Ser359 et 370 en Ala ou en Lys empêche la phosphorylation des autres sérines, ce qui semble indiquer qu'elles seraient les premières à être phosphorylées (Johnson et al. 1998). Ce phénomène n'est toujours pas expliqué mais la phosphorylation de ces sérines pourrait modifier l'affinité entre p47^{phox} et une autre kinase nécessaire pour phosphoryler les autres sérines. Remarquons que la phosphorylation des Ser359 et 370 n'a pas d'effet sur l'interaction entre l'AIR et le tandem SH3s de p47^{phox} et qu'elle n'influe pas non plus sur la préférence de la PRR de p47^{phox} pour p67^{phox} ou p40^{phox} (Massenet et al. 2005).

Les effets de la phosphorylation des trois autres sérines de l'AIR sont bien mieux compris. En effet, les Ser303,304 et 328 participent activement à l'interaction avec le tandem SH3s (Figure 24). On comprend aisément que des charges négatives de groupements phosphoryl sur ces positions puissent entraîner la destabilisation de cette conformation auto-inhibée (c.f II.4). Ainsi, la mutation de ces trois résidus en alanines empêche l'activation du complexe alors que leur mutation en acides glutamiques ou aspartiques, mimant les phosphorylations, entraîne l'activation.

La phosphorylation de la Ser379 déstabilise les interactions entre la PRR de p47^{phox} et les domaines SH3s de p40^{phox} et p67^{phox}, avec un effet plus marqué sur le SH3 de p40^{phox} (Massenet et al. 2005). Ce résultat semble contradictoire avec l'idée que p47^{phox} est responsable de la translocation des autres facteurs cytosoliques à la membrane, suite à son activation par phosphorylation. Cependant, il se pourrait que la phosphorylation de ce résidu ait lieu après la translocation afin de modifier le réseau d'interactions du complexe à la membrane. Ce site de phosphorylation est toutefois primordial puisque la mutation individuelle des différents sites de phosphorylation a montré que seule la mutation S379A inhibait complètement l'activité NADPH oxydase (Faust et al. 1995).

II.3 Données structurales et fonctionnelles

II.3.A Le domaine PX

La structure du domaine PX de p47^{phox} a été résolue en 2001 par RMN (Hiroaki et al. 2001) puis par cristallographie en 2002 (Karathanassis et al. 2002) et 2003 (PDB access number 1KQ6, non publié) (Figure 25). Le domaine PX comporte un feuillet β antiparallèle

formé de 3 brins β ainsi que 4 hélices et une région riche en prolines (résidus 70-83) susceptible d'interagir avec un domaine SH3 (Hiroaki et al. 2001; Karathanassis et al. 2002).

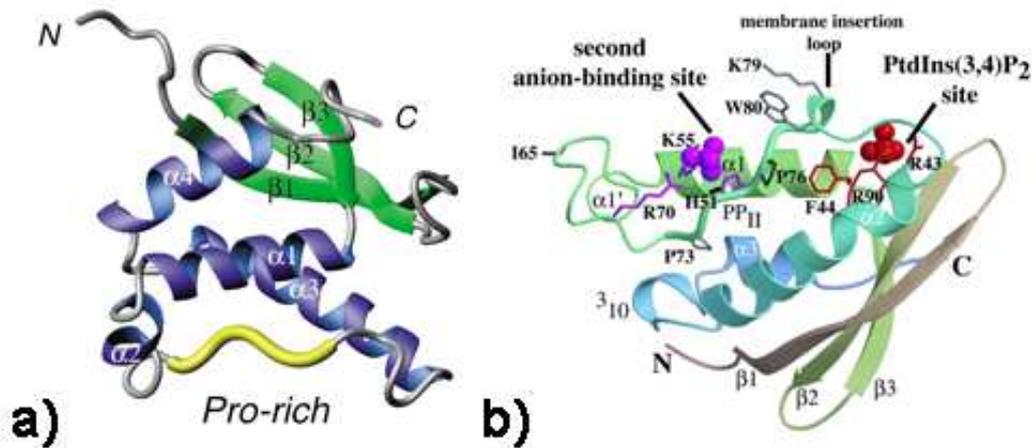


Figure 25. Le domaine PX

Structure du domaine PX résolue **a)** par RMN (Hiroaki et al. 2001) et **b)** par cristallographie (Karathanassis et al. 2002). PDB access number : 1GD5 et 1O7K.

Les domaines PX ont été caractérisés comme étant des sites de reconnaissance spécifique des phosphoinositides (Ago et al. 2001; Bravo et al. 2001). Chez $p47^{\text{phox}}$, Une première poche de 8 Å de profondeur et chargée positivement a été identifiée par RMN comme susceptible d'interagir avec des molécules chargées négativement telles que les phospholipides (Hiroaki et al. 2001). Cette poche basique est analogue de celle de $p40^{\text{phox}}$ (Karathanassis et al. 2002). Cependant, les opinions sont divergentes quant à la spécificité de la reconnaissance du domaine PX de $p47^{\text{phox}}$. Remarquons que cette question de la spécificité des domaines de reconnaissance lipidique PX de $p47^{\text{phox}}$ et $p40^{\text{phox}}$ est primordiale si l'on considère que la composition lipidique n'est pas la même dans toutes les membranes de la cellule et que celle-ci change au cours de la phagocytose, notamment grâce à l'activation de la PI(3)K (Kanai et al. 2001). Pour certains, ce sont ces sites de reconnaissance spécifiques qui vont permettre de réguler la translocation d'un point de vue tant spatial que temporel (Ueyama et al. 2008).

Trois équipes ont démontré que le site de reconnaissance lipidique de $p47^{\text{phox}}$ était spécifique du phosphatidyl-inositol 3,4-diphosphate (PtdIns(3,4)P₂) (Ago et al. 2001; Kanai et al. 2001; Karathanassis et al. 2002). Ces travaux ont par ailleurs identifié d'autres phosphoinositides reconnus par le domaine PX tels que le PtdIns(4)P (Ago et al. 2001) voire même une seconde poche de reconnaissance, moins profonde et capable de reconnaître des phospholipides anioniques tels que le phosphatate ou la phosphatidylsérine (Karathanassis et al. 2002) (Figure 25b).

L'étude des potentiels électrostatiques des domaines PX de p47^{phox} et p40^{phox}, couplée à une étude de mutagenèse dirigée, a permis de mieux comprendre le mécanisme de pénétration de ces modules dans la membrane (Figure 26) (Stahelin et al. 2003). Cependant, d'après Zhan et al., l'interaction entre p47^{phox} et les lipides est faible et non sélective (Zhan et al. 2002). Outre les études par co-précipitation avec des liposomes (Ago et al. 2001; Kanai et al. 2001; Karathanassis et al. 2002; Ago et al. 2003; Shen et al. 2008), des études par SPR avec des liposomes enrichis en PtdIns(3,4)P₂ ont permis de déterminer pour le domaine PX isolé un *K_d* variant entre 0,6 nM (Karathanassis et al. 2002) et 60 μM (Shen et al. 2008).

Cette interaction n'est pas constitutive puisque la forme entière sauvage de p47^{phox} n'interagit pas ou très peu avec ces phospholipides (Karathanassis et al. 2002). C'est une des interactions exaltées lors de l'activation de p47^{phox}. Ce processus est central dans l'assemblage du complexe de la NADPH oxydase.

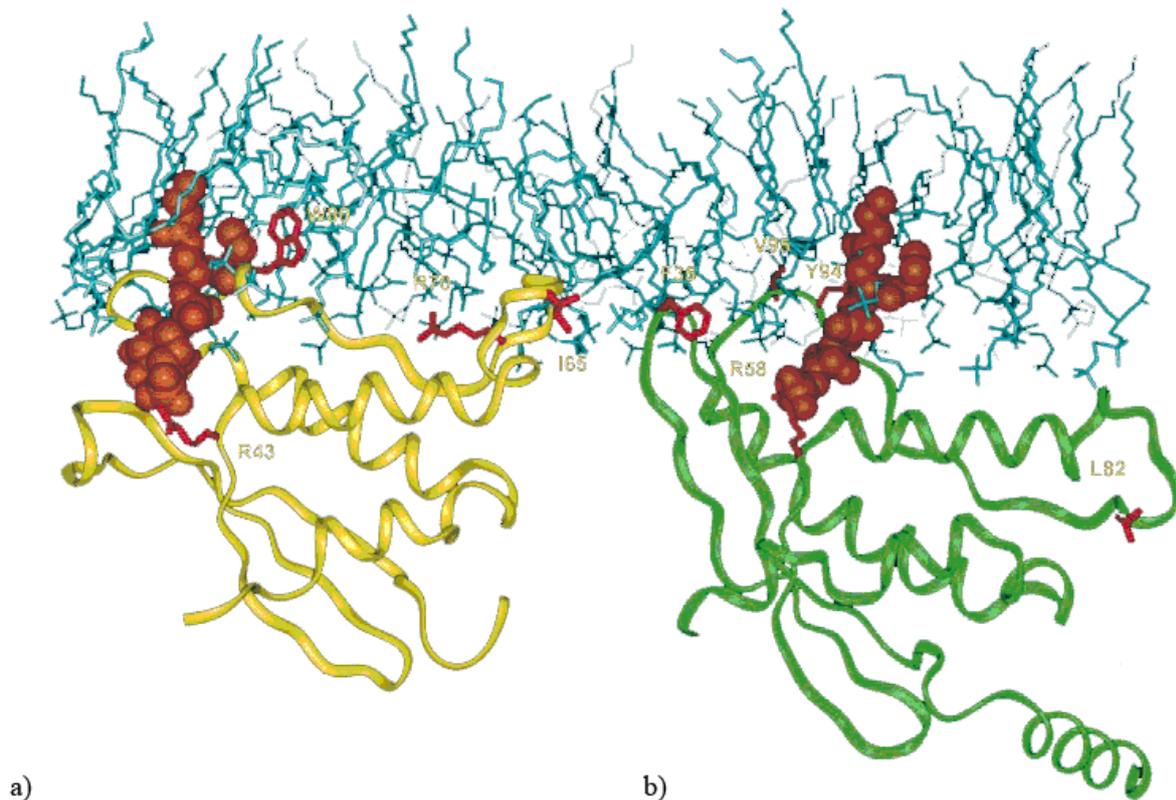


Figure 26. Modélisation de l'ancrage membranaire des domaines PX de p47^{phox} et p40^{phox}
a) p47^{phox} est représentée avec une molécule de PtdIns(3,4)P₂ et **b)** p40^{phox} est modélisée en complexe avec une molécule de PtdIns(3)P. Les résidus mutés sont indiqués en rouge. D'après (Stahelin et al. 2003).

De nombreux mutants de p47^{phox} ont été générés et les tests d'interactions avec des liposomes ou des bicouches ont permis d'étudier les effets de ces mutations sur l'interaction avec les phospholipides. Il a ainsi été montré que la mutation R42Q responsable de la CGD chez certains patients, abolissait l'interaction entre p47^{phox} et les phosphoinositides (Kanai et

al. 2001). La mutation de la seconde arginine conservée R90 chez p47^{phox} induit une altération partielle de cette interaction (Kanai et al. 2001). De manière contraire, la mutation W263R au niveau du SH3B permet de restaurer l'interaction chez la forme entière de p47^{phox} (Karathanassis et al. 2002). Ce résultat, basé sur l'étude d'interaction entre modules isolés, est à l'origine de l'ancien modèle de p47^{phox} dans lequel le site de reconnaissance des phospholipides était masqué par le second module SH3 (cf. II.4.A). Des mutations dans la région riche en proline du PX ont donné des résultats contradictoires selon la proline mutée (Nagasawa et al. 2003). Selon les auteurs, la baisse d'activité Nox du mutant P73Q s'expliquerait par une altération de l'interaction entre p47^{phox} et le cytochrome b₅₅₈.

Récemment, l'équipe de Linda Mc Phail a montré que la mutation en glycine de 8 résidus du linker entre les domaines PX et SH3A permettait également de restaurer cette interaction (Shen et al. 2008). Depuis lors, s'il est largement admis que le site de reconnaissance des lipides est démasqué lors de l'activation de p47^{phox} (Ago et al. 2003), la façon dont ce site est masqué à l'état de repos est loin d'être consensuelle (cf. II.4).

II.3.B Le tandem SH3s

Les domaines SH3 sont des séquences conservées de 60 acides aminés que l'on retrouve dans les protéines du cytosquelette et dans des voies de signalisation intracellulaires chez un grand nombre d'organismes, de la levure à l'humain (Pawson and Gish 1992). Ces domaines, qui reconnaissent des régions riches en prolines sont constitués essentiellement de feuillettes β (Koyama et al. 1993). Les modules SH3A (résidus 159-212) et SH3B (résidus 229-282) de p47^{phox} contiennent respectivement quatre et cinq brins β . Les brins A et B sont séparés par une boucle RT, les brins B et C par une boucle n-Src et les brins C et D par une boucle distale (Groemping et al. 2003).

Les études fonctionnelles concernant l'interaction entre le tandem SH3s de p47^{phox} et l'extrémité C-terminale de p22^{phox} sont nombreuses (Sumimoto et al. 1994; Ago et al. 1999; Shiose and Sumimoto 2000; Nobuhisa et al. 2006; Taylor et al. 2007). La constante de dissociation relative à cette interaction a été déterminée par une analyse d'interaction en temps réel (Sumimoto et al. 1996) et par fluorescence (Ogura et al. 2006), les deux approches montrant un résultat similaire de 0,36 μ M et 0,64 μ M, respectivement.

Plus récemment, deux modèles structuraux ont permis de déchiffrer les caractéristiques moléculaires de cette interaction (Groemping et al. 2003; Ogura et al. 2006) (Figure 27). Ces études ont montré que les boucles Src du tandem SH3s de p47^{phox} étaient

capables d'interagir avec la région riche en proline de p22^{phox}, les deux modèles structuraux étant juxtaposables (Groemping et al. 2003; Ogura et al. 2006). Cette interaction met en jeu essentiellement des liaisons de type van der Waals et des ponts salins.

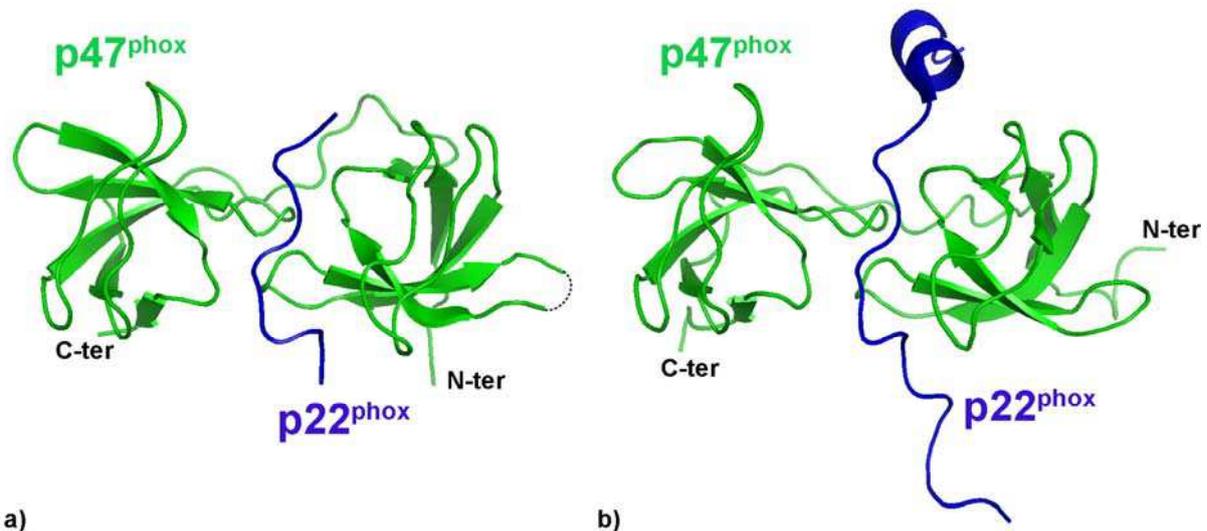


Figure 27. Interaction entre la région C-ter de p22^{phox} et le tandem SH3s de p47^{phox}. Structures du tandem SH3s de p47^{phox} (en vert) interagissant avec les résidus 149-168 de la partie C-terminale de p22^{phox} (en bleu), résolues par **a)** diffraction de rayons X (Groemping et al. 2003) et par **b)** RMN (Ogura et al. 2006). PDB access numbers : 1OV3 et 1WLP.

Dès 1992, des interactions entre p47^{phox} et le flavocytochrome *b* sont mises en évidence par pontage moléculaire (Nakanishi et al. 1992). En 1994, une étude montre que le tandem SH3s est capable d'inhiber l'activité Nox en CFS, suggérant un rôle dans le mécanisme d'activation (Sumimoto et al. 1994). Les auteurs parlent déjà d'un masquage intramoléculaire de cette région, probablement par la partie C-terminale de p47^{phox}. La même année, une autre équipe montre sur des modules isolés que le tandem SH3s peut interagir avec les régions riches en prolines de p22^{phox} (résidus 127-195) et de p47^{phox} (résidus 70-83 et 358-390) (Leto et al. 1994). D'autre part, l'interaction entre le tandem SH3s et p22^{phox} est abolie chez les patients atteints de CGD possédant la mutation P156Q au niveau de la région riche en proline de p22^{phox} (Leto et al. 1994). Une première estimation à 0,34 μ M de la constante de dissociation de cette interaction est obtenue deux ans plus tard, et le résidu W193 du SH3A de p47^{phox} est décrit comme jouant un rôle primordial dans cette interaction (Sumimoto et al. 1996). La région responsable de l'autoinhibition du tandem SH3s (résidus 286-340) est identifiée par le même groupe en 1999 (Ago et al. 1999). L'étude de mutations ponctuelles de cette région englobant les sites de phosphorylation S303,304 et 328 (el Benna et al. 1994) suggère que l'interaction intramoléculaire masquant le tandem SH3s est abolie lors de la phosphorylation de p47^{phox} (Ago et al. 1999) ou par l'ajout d'acide arachidonique (Shiose and Sumimoto 2000).

Le mécanisme moléculaire d'autoinhibition du tandem SH3s est finalement caractérisé à partir de 2003 par deux structures cristallographiques à haute résolution (Groemping et al. 2003; Yuzawa et al. 2004b). Le groupe de Katrin Rittinger est le premier à découvrir ce modèle original dans lequel les deux modules SH3 prennent en sandwich la région polybasique (Figure 28), permettant ainsi de masquer les boucles Src qui interagissent avec la région riche en proline de p22^{phox} à l'état activé (Figure 27) (Groemping et al. 2003).

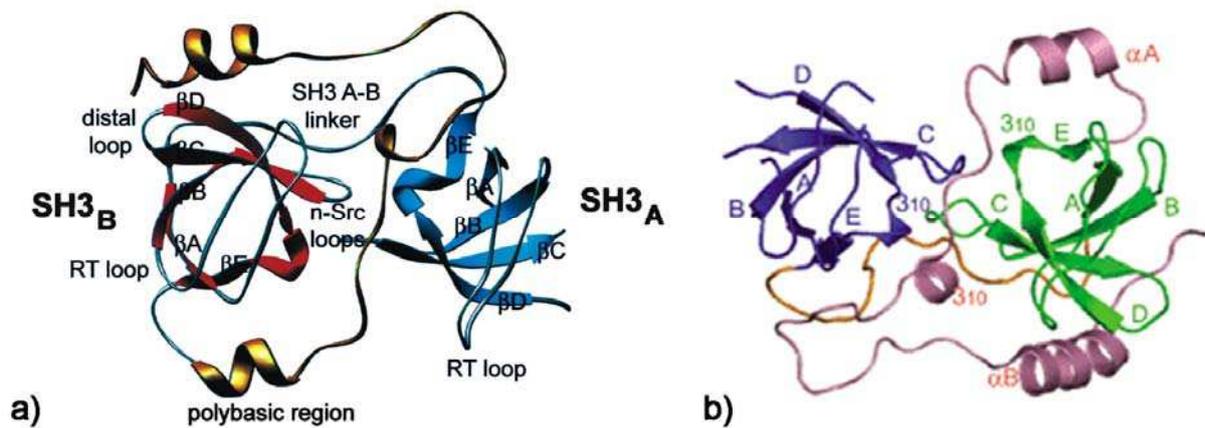


Figure 28. Le tandem SH3s autoinhibé

Structure cristallographique du tandem SH3s inhibé par la région auto-inhibitrice (AIR) résolue par **a)** (Groemping et al. 2003) et **b)** (Yuzawa et al. 2004b). Les figures sont issues des articles correspondants. PDB access number : 1NG2 et 1UEC.

Cette interaction est tout à fait différente de celles que l'on retrouve normalement avec un seul module SH3 (Dalgarno et al. 1997; Mayer 2001). D'habitude, les modules SH3 reconnaissent un motif PxxP alors qu'ici les prolines de la région polybasique de p47^{phox} (GAPPR) ou de la région riche en proline de p22^{phox} (QPPSNPPRPPA), sont adjacentes. D'autre part, l'interface entre les deux modules SH3 est possible grâce à la présence d'un motif GWW conservé dans chacune des deux boucles n-Src (Groemping et al. 2003). Enfin, l'affinité entre le tandem SH3s et l'AIR est potentialisée par la présence d'une région additionnelle en aval de la séquence GAPPR (Ago et al. 1999; Groemping et al. 2003; Yuzawa et al. 2004b). Des travaux de SAXS (Yuzawa et al. 2004a) et de RMN (Ogura et al. 2006) ont ensuite permis de confirmer ce mécanisme moléculaire d'autoinhibition avec l'AIR et d'interaction avec la région C-terminale de p22^{phox} sur la base d'un monomère en solution et non d'un dimère entrelacé tel qu'observé en cristallographie (Groemping et al. 2003; Yuzawa et al. 2004b). Des K_d pour l'interaction entre le tandem SH3s de p47^{phox} et les peptides 149-162 et 149-168 de p22^{phox} furent estimés par titration de fluorescence à 8,67 μ M et 0,64 μ M, respectivement (Ogura et al. 2006). Une étude de mutagenèse dirigée a ensuite confirmé la nécessité de la présence des deux modules SH3 pour interagir avec p22^{phox} et

conduire ainsi à l'activation de Nox2 (Nobuhisa et al. 2006). Dernièrement, des anticorps spécifiques du flavocytochrome *b* ont été utilisés afin d'identifier par spectrométrie de masse le site d'interaction du tandem SH3s de p47^{phox} (résidus 151-164 de p22^{phox}) (Taylor et al. 2007). Cette étude a en outre mis en évidence des changements conformationnels du flavocytochrome *b* liés à la fixation du tandem SH3s sur p22^{phox}.

II.3.C La région riche en proline (PRR) C-terminale

Etant donné le nombre important de domaines SH3 et de PRR du complexe de la NADPH oxydase, les interactions potentielles sont également nombreuses (Wientjes et al. 1993) et on a longtemps débattu sur le partenaire moléculaire de tel ou tel motif structural. Deux courants de pensée quant à l'organisation de l'hétérotrimère des facteurs cytosoliques se sont ainsi longuement opposés pour savoir qui, de p40^{phox} ou de p67^{phox}, interagissait avec la PRR de p47^{phox}, comme souligné dès 2004 dans une revue de Nauseef (Nauseef 2004). Il existait ainsi un modèle dans lequel p40^{phox} était la protéine faisant le lien entre p67^{phox} et p47^{phox} (Wientjes et al. 1996; Grizot et al. 2001c) et un modèle avec p67^{phox} jouant ce rôle de liant moléculaire (Kami et al. 2002; Lapouge et al. 2002) (Figure 5).

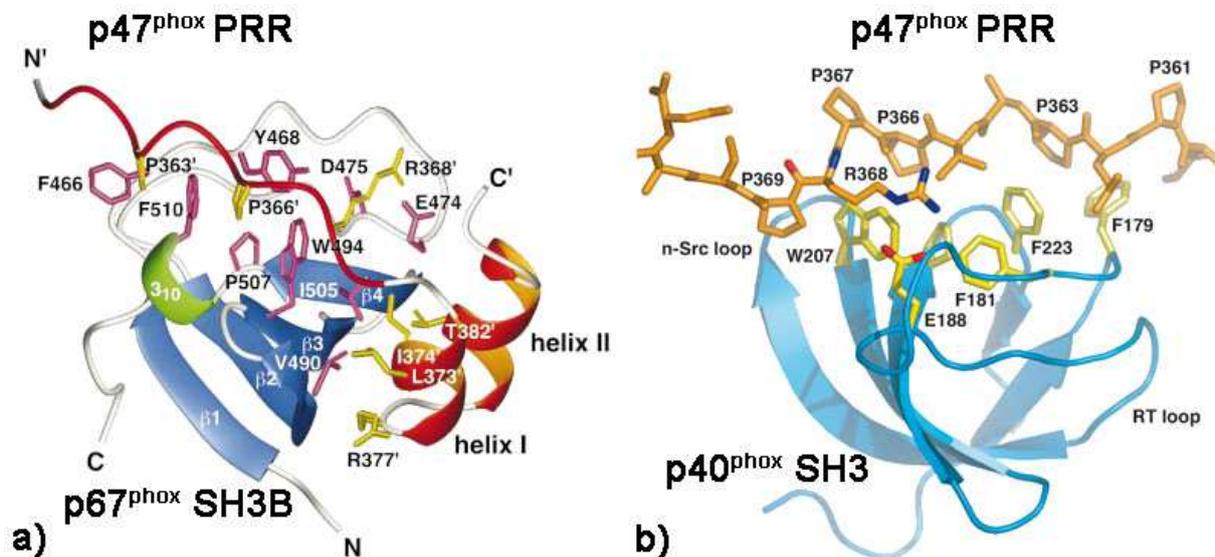


Figure 29. La région riche en proline C-terminale de p47^{phox}

a) Structure RMN de la PRR de p47^{phox} (résidus 360-390) complexée avec le module SH3B de p67^{phox} (Kami et al. 2002). **b)** Structure cristallographique de la PRR de p47^{phox} (résidus 360-372) complexée avec le domaine SH3 de p40^{phox} (Massenet et al. 2005).

La résolution des structures cristallographiques de la PRR de p47^{phox} complexée avec les modules SH3s de p67^{phox} et p40^{phox} (Figure 29), ainsi que les travaux de Massenet *et al.* (Massenet et al. 2005) réalisés dans notre laboratoire mirent fin à ce dilemme en montrant

expérimentalement que l'affinité était plus forte entre p47^{phox} et p67^{phox}. Plus précisément, ces études mêlant analyse cristallographique et caractérisation des affinités relatives ont révélé que la préférence pour l'interaction avec le SH3B de p67^{phox} était due à une surface électrostatique favorable à la stabilisation de l'arginine 368 de la PRR de p47^{phox} (Massenet et al. 2005). Depuis, il est largement admis que p67^{phox} est la protéine interagissant avec la PRR de p47^{phox}, tout du moins à l'état de repos. En effet, un groupe vient très récemment de montrer que cette interaction était abolie une fois l'hétérotrimère ancré à la membrane (Li et al. 2009), laissant la PRR de p47^{phox} disponible pour interagir éventuellement avec un autre ligand. Remarquons qu'à ce jour, le rôle du module SH3 de p40^{phox} n'est toujours pas connu.

II.4 Mécanisme d'activation de p47^{phox}

Les nombreuses études basées sur les modules isolés des facteurs cytosoliques ont permis de mettre en évidence un grand nombre d'interaction intra- et inter- moléculaires (Figure 5; Figure 7; Figure 11). Le but de ces études structurales et fonctionnelles était multiple :

- décrire les interactions intermoléculaires du complexe p40^{phox}-p47^{phox}-p67^{phox} au repos.
- identifier les interactions intra- permettant de maintenir cet hétérotrimère au repos dans le cytoplasme en masquant les régions d'interaction avec le flavocytochrome b558, et notamment les domaines PX de p40^{phox} et p47^{phox} permettant d'interagir avec les lipides, ainsi que le tandem SH3s de p47^{phox} permettant l'interaction avec p22^{phox}.
- établir le nouveau réseau d'interactions ayant lieu après activation du complexe, permettant la translocation et l'ancrage à la membrane.
- étudier l'éventuelle réorganisation des interactions intermoléculaires, une fois les facteurs ancrés à la membrane.

II.4.A L'ancien modèle

Pour que p47^{phox} existe à l'état inhibé, il faut impérativement que les surfaces d'interactions avec les lipides et avec le flavocytochrome b₅₅₈ soient masquées. Il a ainsi été très vite suggéré que p47^{phox} existait dans deux états conformationnels différents. Les différents modèles proposés depuis les 15 dernières années sont répertoriés Figure 30.

Les deux premiers modèles de p47^{phox} font état d'une protéine repliée sur elle-même, permettant ainsi l'autoinhibition du tandem SH3s avec une (Figure 30a) ou plusieurs régions (Figure 30b).

Puis, le module PX identifié par Ponting et al., apparaît dans les modèles (Figure 30c et d). Ce module possédant une région riche en prolines (résidus 70-83), l'équipe de Sumimoto a naturellement cherché à identifier une interaction avec un des deux modules SH3 de p47^{phox}. Cette étude sur des modules isolés a mis en évidence une interaction entre le PX et le second domaine SH3 de p47^{phox} (Hiroaki et al. 2001). De plus, cette interaction est abolie par la mutation du résidu conservé Trp163 du module SH3B. Ainsi l'hypothèse du masquage du site de reconnaissance des lipides du PX par le domaine SH3B a été ensuite largement acceptée et représentée (Figure 30e à h). On pensait alors que le domaine SH3B interagissait simultanément avec le PX et l'AIR, via deux surfaces d'interaction différentes.

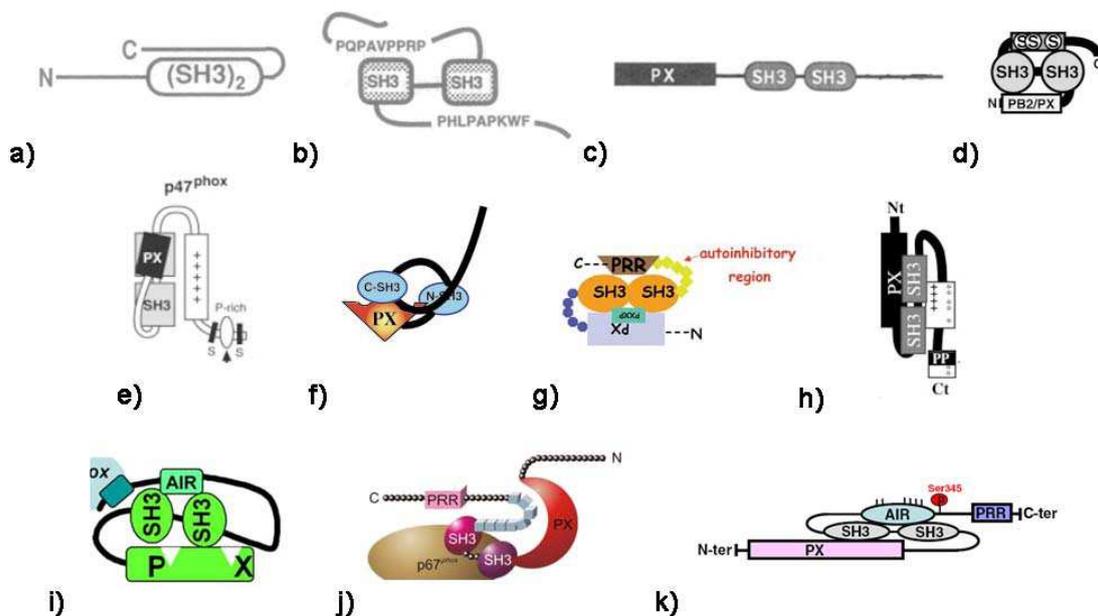


Figure 30. Divers modèles de p47^{phox}

D'après a) (Sumimoto et al. 1994), b) (Leto et al. 1994), c) (Ponting 1996), d) (Ago et al. 1999; Shiose and Sumimoto 2000), e) (Lapouge et al. 2002), f) (Karathanassis et al. 2002), g) (Nauseef 2004) (revue), h) (Massenet et al. 2005), i) (Ueyama et al. 2007), j) (Nauseef 2008) (revue), k) (El-Benna et al. 2008).

II.4.B Vers un nouveau modèle

Cependant, la résolution de la structure du tandem SH3s autoinhibé par l'AIR (Groemping et al. 2003) pose un problème évident. Les surfaces d'interaction des modules SH3 sont clairement occupées par la région polybasique (Figure 31a) et l'hypothétique région d'interaction avec la PRR du domaine PX, comprenant le résidu Trp163, n'est plus accessible (Figure 31b) (Groemping et al. 2003). Il semble donc évident que ces deux interactions ne

sont pas compatibles simultanément. D'après Groemping et al. ces observations suggèrent que ce doit être l'interaction entre le tandem SH3s et la région polybasique qui permettrait la formation d'une surface d'interaction pour le domaine PX (Groemping et al. 2003). En d'autres termes, les phosphorylations responsables de l'ouverture du tandem SH3s et du relargage de l'AIR entraîneraient également le relargage du PX. La mutation du Trp163 agirait donc de manière allostérique et indirecte sur le domaine PX.

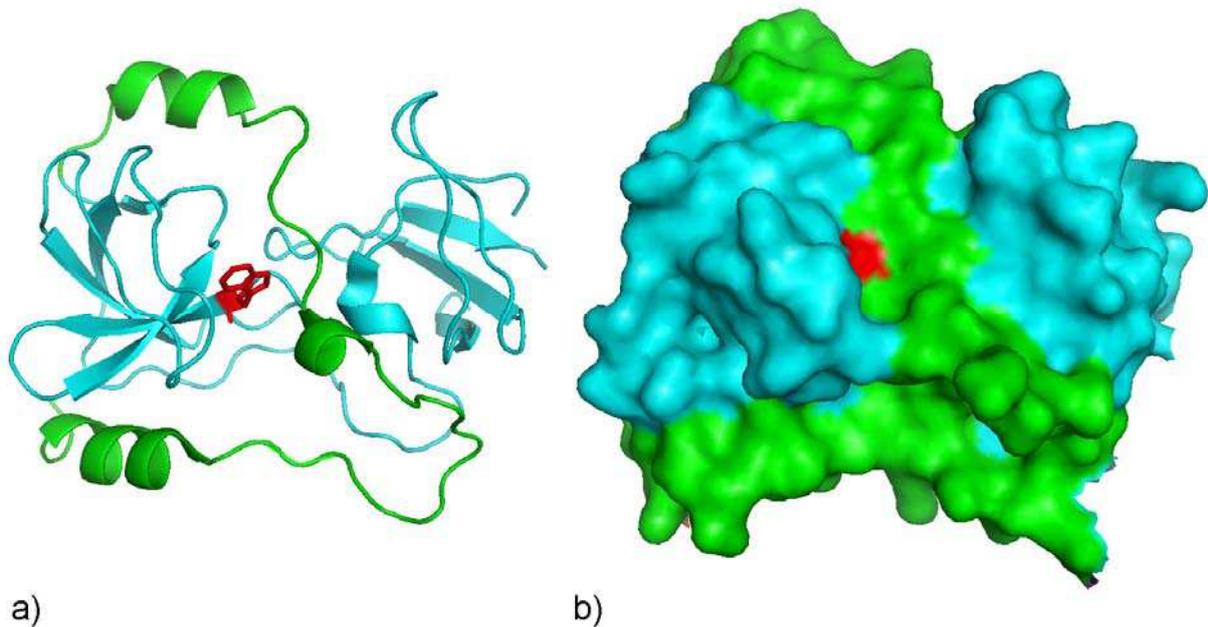


Figure 31. Incompatibilité des deux interactions intramoléculaires

a) et b) Structure cristallographique du tandem SH3s (cyan) autoinhibé par l'AIR (vert). Le Trp163 est représenté en rouge. D'après (Groemping et al. 2003). PDB access number 1NG2.

D'autres auteurs font aussi état de cette incompatibilité entre les deux interactions intramoléculaires proposées sur la base d'études utilisant des modules isolés du contexte protéique global. En effet, pour Yuzawa et al. la structure cristallographique démontre que la séquence GAPPR de l'AIR occupe les surfaces d'interactions conservées des deux modules SH3 de telle manière que le SH3B n'est pas disponible pour des interactions avec le motif PxxP du domaine PX (Yuzawa et al. 2004b). Ces auteurs ont ainsi proposé que le domaine PX puisse être inhibé par une autre surface du module SH3B. Au final, le mécanisme d'inhibition n'était pas compris en 2006 et nécessitait des travaux complémentaires, et notamment de passer de l'étude de modules isolés à la protéine entière, afin d'éviter à l'avenir ce genre d'erreurs d'interprétation.

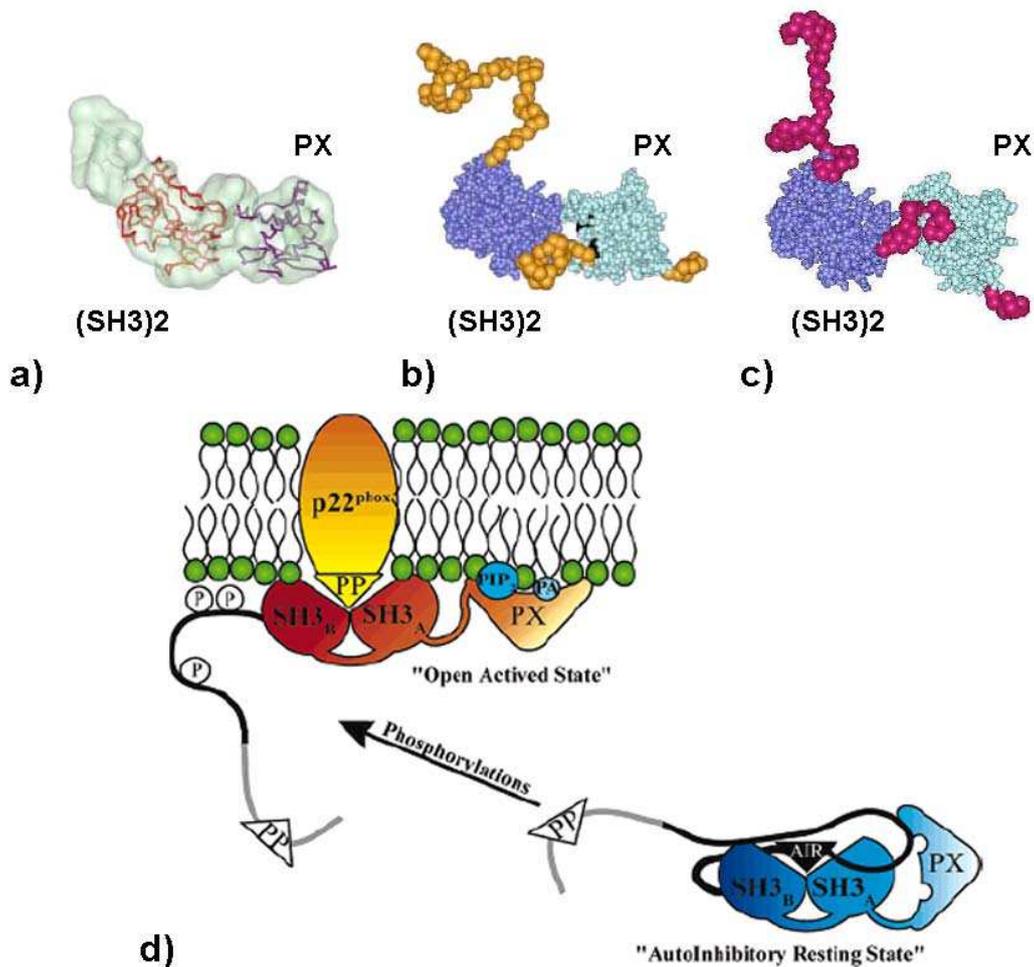


Figure 32. Un nouveau modèle d'autoinhibition de p47^{phox}

a) Structures cristallographiques du domaine PX (violet) et du tandem SH3s (rouge) insérés grâce au programme SUPCOMB dans l'enveloppe obtenue avec le logiciel GASBOR. **b)** et **c)** Exemples de conformations obtenues avec le logiciel BUNCH en utilisant les structures cristallographiques des modules isolés. **d)** Nouveau modèle d'activation de p47^{phox}. D'après (Durand et al. 2006).

Dès lors, notre équipe a déployé ses efforts sur la forme entière autoinhibée de p47^{phox}, en réalisant de la diffraction de rayons X aux petits angles (SAXS). Les résultats obtenus suggéraient une conformation étendue et relativement flexible, contrairement à celle plutôt globulaire qui était jusqu'alors proposée. D'autre part, les diverses enveloppes basse résolution obtenues ne permettaient pas d'imaginer un masquage du site de reconnaissance des lipides du PX par le domaine SH3B (Figure 32a). Pour la première fois, une organisation étendue de la protéine était mise en évidence. Ainsi, il semblait plus vraisemblable que le domaine PX soit finalement masqué via une interaction avec le module SH3A (Figure 32b) ou le linker (Figure 32c) (Durand et al. 2006). Sur cette base, nous avons proposé un nouveau modèle (Figure 32d) qui commence à être repris par certains auteurs (Figure 30j) même s'il n'est pas encore systématiquement pris en compte (Figure 30i et k). Récemment, une étude a mis en évidence une interaction directe entre le domaine PX et la région englobant le tandem

SH3s et l'AIR (SuperSH3/AIR) qui serait renforcée par les résidus 341-360 (Ueyama et al. 2008).

Ces résultats sont en accord avec notre modèle que nous allons tenter de valider et de mieux caractériser lors de cette thèse. En effet, la résolution du SAXS ne permet pas de conclure quant à la modalité du masquage du domaine PX. S'agit-il d'une réelle interaction intramoléculaire qui est abolie lors de la phosphorylation de p47^{phox} ou bien d'une simple réorientation du domaine PX, permettant une meilleure accessibilité au site de liaison des phospholipides ? Cette interaction implique-t-elle le SH3A ou le linker ? Ces questions sont au centre de ce travail de thèse. Pour y répondre nous ferons largement appel à des méthodes utilisant la spectrométrie de masse, conjointement à de l'ingénierie moléculaire sur p47^{phox}.

CHAPITRE II : La spectrométrie de masse (SM)

I. Brève introduction à la spectrométrie de masse

I.1 Le spectromètre de masse

Un spectromètre de masse permet de déterminer la masse d'une molécule en mesurant le rapport masse sur charge (m/z) de formes ionisées. Il est composé de trois parties bien distinctes :

- une source d'ion qui permet, d'ioniser les molécules que l'on analyse (c.f II). Les ions sont généralement formés en induisant soit une perte soit un gain de charge(s) à partir d'une espèce neutre.
- un analyseur, qui permet de séparer les molécules selon leur rapport m/z (c.f III).
- un détecteur qui permet de convertir l'énergie des ions en signal électrique transmis à un ordinateur.

Remarquons toutefois que dans le cas de la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) et de l'OrbitrapTM, analyseur et détecteur constituent la même entité.

I.2 Historique

Les prémisses de la spectrométrie de masse remontent au début du XX^{ème} siècle lorsque Joseph J. Thomson étudia les raies formées à partir d'un tube contenant des gaz ionisés et soumis à un champ magnétique (Thomson 1913). Francis W. Aston est à l'origine du premier « spectrographe de masse » qui lui permit en 1919 d'étudier les isotopes d'éléments stables. Il faudra attendre les années 30 pour que les analyseurs à secteurs magnétiques soient complétés par des analyseurs à champ électrostatique (Mattauch and Herzog 1934). Dans les années 40, un nouveau spectromètre magnétique à double focalisation nommé calutron est développé pour fournir l'uranium-235 nécessaire à la construction de la première bombe atomique (projet Manhattan). En même temps, le « velocitron » de Cameron et Eggers est le premier analyseur à temps de vol (c.f II.1) qui sera ensuite développé par Wiley et McLaren. Les premières études de fragmentations d'ions précurseurs datent des

années 70. Les années 80 voient l'avènement de nouvelles sources d'ionisations adaptées à l'étude des molécules du vivant de plus hauts poids moléculaires telles que les protéines (principalement MALDI et ESI, c.f II). Les développements technologiques des dernières années et notamment de l'analyseur à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) (c.f III.5) (Comisarow and Marshall 1974) ont permis d'atteindre une sensibilité de l'ordre de l'attomole, une précision en masse inférieure au ppm (partie par million) avec une résolution de 750 000 et une gamme dynamique (rapport du signal mesurable maximal sur le signal mesurable minimal) de 4000. De telles prouesses techniques ont évidemment élargi le champ d'applications de la spectrométrie de masse qui n'est plus limité à l'étude de mécanismes réactionnels de petites molécules. On citera par exemple l'essor de domaines tels que la protéomique et la métabolomique (Lafaye et al. 2005), l'imagerie par MALDI (Seeley and Caprioli 2008) ou encore l'analyse de complexes macromoléculaires non covalents (Levy et al. 2008).

Le début de ce chapitre sera consacré à la description des principales sources d'ionisation utilisées actuellement dans le domaine des biomolécules (c.f II). Nous verrons ensuite les analyseurs qui sont le plus utilisés dans ce domaine (c.f III). Puis, des informations sur les spectres de masse obtenus lors de telles acquisitions seront détaillées dans la troisième partie (c.f III). Enfin, nous étudierons le principe de la spectrométrie de masse en tandem ainsi que les principaux mécanismes de fragmentation (c.f IV).

II. Les sources d'ionisation

La source d'ionisation a pour but d'obtenir une molécule chargée en phase gazeuse, à partir d'une phase liquide ou solide. L'ionisation, qui a lieu en phase condensée ou gazeuse selon la nature de la source, peut faire intervenir divers mécanismes : éjection ou capture d'électron, protonation, déprotonation ou cationisation.

Ces techniques d'ionisations peuvent être obtenues à l'aide de différentes sources d'ionisations. L'ionisation électronique (EI) a été la première source d'ionisation. Tout comme l'ionisation chimique (CI) apparue dans les années 60, l'EI est cependant restreinte à l'étude de petites molécules volatiles, bien en deçà des composés bio-organiques. En effet, dans les deux cas, l'ionisation des composés est réalisée en phase gazeuse et est donc

difficilement applicable à des grosses molécules polaires et peu volatiles telles que les protéines.

Cette limitation a poussé des scientifiques tels que John B. Fenn, Koichi Tanaka, Franz Hillenkamp, Michael Karas, Graham Cooks et Michael Barber à développer une nouvelle génération de techniques d'ionisation incluant la désorption de champ (FD), la désorption plasma (^{252}Cf PDMS), le bombardement d'atomes lourds (FAB), l'ionisation par désorption chimique (DCI), la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) (Hillenkamp and Karas 1990) et l'ionisation par électrospray (ESI) (Fenn et al. 1989).

Une première solution pour ioniser les protéines consiste à fournir beaucoup d'énergie à l'échantillon dans un temps très bref pour que les dégradations n'aient pas le temps de se produire. Les molécules sont ainsi ionisées et vaporisées simultanément : c'est la désorption (PDMS, FAB, MALDI). Une seconde solution consiste à désolvater progressivement l'échantillon ionisé en solution : c'est l'électronébulisation ou électrospray (ESI).

Parmi ces techniques, le MALDI et l'ESI se sont clairement imposés comme étant les plus appropriés à l'analyse de biomolécules, en permettant de mesurer des masses beaucoup plus élevées avec une meilleure sensibilité. Le prix Nobel de chimie 2002 a ainsi été attribué à John B. Fenn pour l'invention de l'ESI et à Koichi Tanaka pour sa contribution initiale au développement du MALDI.

II.1 La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

La double caractéristique du MALDI réside à la fois dans l'utilisation d'une matrice solide et d'un laser comme source d'énergie. L'échantillon est en effet mélangé dans une matrice aromatique en excès telle que l'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique) (Figure 33) (Beavis and Chait 1989), l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (alpha-cyano ou alpha 4) (Beavis et al. 1992) ou l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (Strupat et al. 1991). L'acide sinapinique est utilisé principalement pour les protéines et l'alpha 4 ainsi que la DHB pour des petits peptides.

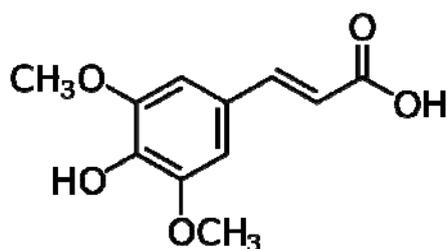


Figure 33. Structure de l'acide sinapinique

L'échantillon ainsi mélangé à la matrice en large excès (ratio matrice:échantillon 5000:1) à l'aide d'un solvant volatil acidifié, est déposé sur une plaque métallique (Figure 34a). L'évaporation du solvant va permettre la co-cristallisation de la matrice et de l'échantillon (Figure 34b).

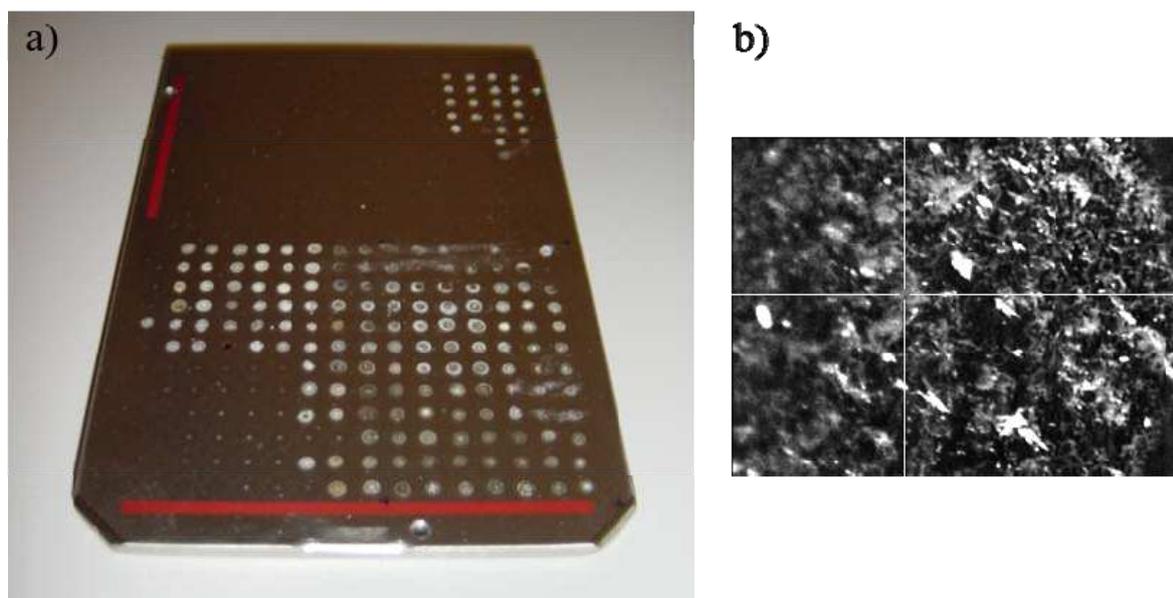


Figure 34. Le MALDI

a) Plaque MALDI de l'Autoflex (Bruker Daltonics) **b)** Cristaux de matrice et de protéine.

Ces molécules de matrice possèdent une forte absorption à la longueur d'onde du laser utilisé et vont donc pouvoir transmettre l'énergie lumineuse aux particules à ioniser (Karas and Hillenkamp 1988). L'absorption d'énergie par la matrice permet en outre de réduire la détérioration de l'analyte par l'irradiation du laser. C'est pourquoi le MALDI est considéré comme une ionisation douce provoquant peu de fragmentations. La désorption des produits est obtenue par un tir laser (généralement à azote $\lambda=337$ nm) d'une courte durée comprise entre 1 et 10 ns qui irradie une surface de l'ordre de 100 à 500 μm . Il y a alors formation d'un plasma et les molécules sont désorbées puis ionisées par transfert de protons entre la matrice photoexcitée et la substance analysée (Figure 35). Le mécanisme de transfert est mal défini mais il semblerait qu'il s'agisse de réactions acide/base entre la matrice et l'analyte (Busch 1995). Une fois créés, les ions sont accélérés et envoyés dans l'analyseur par application d'un champ électrique.

Une des principales caractéristiques de l'ionisation MALDI est de générer essentiellement des ions monochargés, ce qui facilite énormément la lecture de spectres complexes (Figure 46) et permet de balayer en une seule analyse une gamme de masse

étendue, pouvant aller jusqu'à une centaine de kDa. La sensibilité est en général de l'ordre de la femtomole à la picomole. Enfin, la préparation des échantillons est rapide.

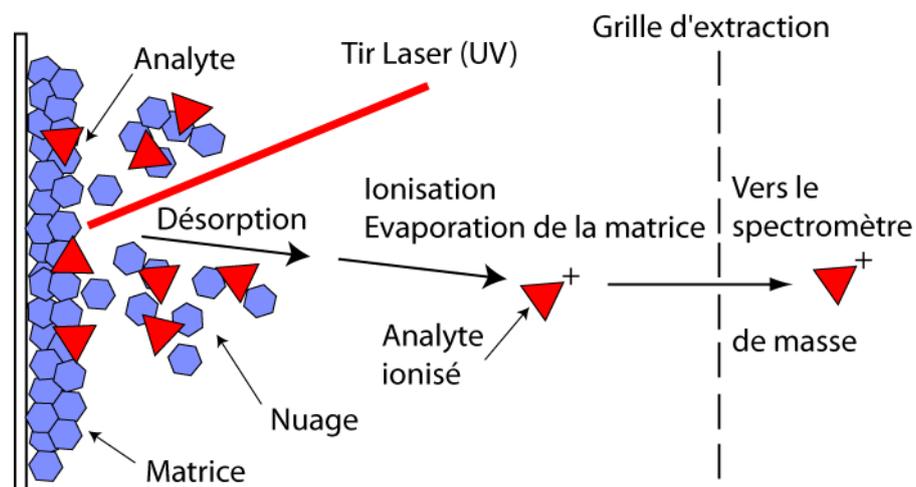


Figure 35. Schéma du processus d'ionisation par désorption/ionisation (MALDI)

L'une des principales limites du MALDI provient du fait que le couplage LC-MS est difficilement adaptable au dépôt sur la plaque. Le dessalage ainsi que la séparation des différentes molécules est difficilement réalisable en ligne. Il existe toutefois depuis quelques années des robots permettant de déposer sur une plaque MALDI les différentes fractions obtenues en sortie de chromatographie.

Même si cette technique d'ionisation tolère mieux la présence de sels, ceux-ci réduisent considérablement la sensibilité et on effectue donc préalablement des dilutions en cascades de l'échantillon dans 0,1% TFA afin d'optimiser le rapport protéine/sels. Par ailleurs, la génération de peu d'espèces chargées limite la précision en masse. Enfin, la matrice peut générer des pics parasites en dessous de 700 Da.

La technique d'ionisation MALDI est utilisée très couramment pour l'analyse de mélanges complexes de divers types de molécules : protéines, peptides, acides nucléiques, oligosaccharides, polymères. Dans la plupart des cas, elle est couplée à un analyseur de temps de vol (c.f III.1).

Tout comme l'ESI, la technique d'ionisation de type MALDI est en évolution constante. Ainsi, des développements concernant la résolution spatiale du spot laser ont permis l'énorme révolution que connaît aujourd'hui l'imagerie MALDI initiée en 1997 par l'équipe de Caprioli (Caprioli et al. 1997). Des méthodes d'ionisations dérivées du MALDI permettent de se passer de matrice dans le cas du DIOS (Desorption Ionization On Silicon) (Shen et al. 2001) ou de former les ions à pression atmosphérique (AP-MALDI) (Laiko et al. 2000), permettant ainsi de coupler cette source avec des systèmes d'analyseurs autrefois

réservés aux sources ESI. Enfin, l'essor des sources MALDI dans l'étude de biomolécules a entraîné le développement de détecteurs de haute masse permettant d'étudier des complexes de plusieurs centaines de kDa (Bich et al. 2008).

II.2 L'électrospray ou électronébulisation

Le concept d'électrospray date des années 30 et l'on doit son couplage à la spectrométrie de masse à Dole dans les années 60. C'est lui qui découvre notamment la possibilité de produire des molécules multichargées. Cependant, c'est John Fenn qui apportera les modifications nécessaires à l'étude de macromolécules biologiques dès la fin des années 80 (Fenn et al. 1989). L'électrospray a ainsi été la première source d'ionisation permettant l'analyse de molécules de masse supérieure à 100 000 Da.

L'électronébulisation produit des molécules ionisées gazeuses à partir d'une phase liquide. Le principe consiste à créer un fin « spray » de gouttelettes fortement chargées, appelé nébulisât, sous l'influence d'un fort champ électrique. Les gouttelettes éclatent progressivement en micro puis nanogouttelettes. Enfin, les ions sont obtenus en phase gazeuse à partir de la phase liquide.

II.2.A La formation du « spray »

L'échantillon solubilisé dans un solvant organique à pH acide est véhiculé au sein d'un capillaire à l'aide d'un pousse-seringue ou d'un système chromatographique, jusqu'au bout d'une aiguille (Figure 36). Un champ électrostatique intense, compris entre 700 V et 5000 V, est appliqué entre l'extrémité du capillaire et la contre-électrode.



Figure 36. Source électrospray

En mode positif, les molécules chargées positivement sont attirées à la surface de l'aiguille sous l'effet de ce champ électrique, alors que les molécules chargées négativement sont repoussées loin de la surface (Figure 37). L'accumulation des charges positives à la surface provoque une déstabilisation du ménisque et entraîne la formation de gouttelettes via un « cône de Taylor ». La création de ces gouttelettes chargées est facilitée par un gaz nébuliseur coaxial au flux de solvant, tel que l'azote.

II.2.B Fission des gouttelettes

Le solvant est évaporé en appliquant à pression atmosphérique une température de l'ordre de 200 à 300°C et un gaz séchant tel que l'azote. La réduction de volume des gouttelettes provoque une augmentation de la densité de charges en surface. La limite de Rayleigh est atteinte lorsque les forces de répulsion coulombiennes entre les charges excèdent la tension de surface, provoquant une explosion coulombienne qui provoque la fission des gouttelettes. A chaque fois que la limite de Rayleigh est atteinte, les gouttelettes éclatent perdent 2% de leur masse et 15% de leur charge (Gomez and Tang 1994).

II.2.C Formation des ions en phase gazeuse

Selon le modèle de Dole (Figure 37), les ions sont obtenus par fission successive des gouttelettes (Dole et al. 1968). On finirait ainsi par obtenir des gouttelettes contenant une seule molécule avec une ou plusieurs charges. Le passage en phase gazeuse serait provoqué par l'évaporation du solvant au sein de cette gouttelette.

Pour Iribarne et Thomson, le passage à la phase gazeuse ne résulterait pas d'une ultime fission de la gouttelette mais d'une évaporation progressive de tout le solvant suivie d'une éjection des ions de la surface de la gouttelette multichargée par désorption de champ (Iribarne and Thomson 1976) (Figure 37b).

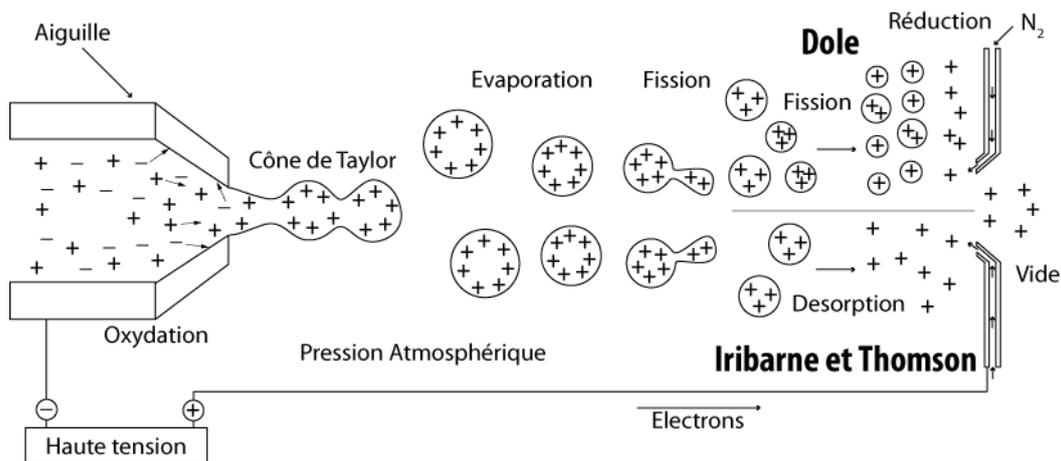


Figure 37. Formation d'ions dans une source électrospray

A l'heure actuelle aucune étude n'a pu conclure en faveur de l'une ou l'autre des deux hypothèses et il semblerait que le mécanisme d'ionisation soit une combinaison des deux.

Une fois ionisées, les molécules sont conduites par le champ électrique à l'intérieur du système d'optique qui sert d'interface entre la source d'ionisation et l'analyseur où ces ions seront séparés selon leur rapport m/z .

II.2.D Caractéristiques de l'ESI

De nombreux solvants peuvent être utilisés en ESI et ils sont d'abord choisis en fonction de la solubilité des échantillons à analyser. Le solvant idéal possède une forte propension à donner un proton, afin d'augmenter le rendement d'ionisation, ainsi qu'une forte pression de vapeur saturante qui facilite la nébulisation. Typiquement, des solvants protiques tels que le méthanol, l'eau ou des acides sont souvent mélangés avec un solvant organique volatil tel que l'acétonitrile. On évitera les tampons riches en phosphate de sodium ou d'ammonium et autres sels non volatils qui abaissent la pression de vapeur des gouttelettes et réduisent ainsi de manière significative le signal. Comme nous le verrons dans le Chapitre III-V, des tampons salins volatils tels que l'acétate d'ammonium ou le bicarbonate d'ammonium peuvent être utilisés en ESI-MS.

L'atout majeur de l'ESI est la possibilité de couplage avec la chromatographie liquide (LC-ESI-MS cf. II.2.e). Le second atout de cette technique d'ionisation est de générer plusieurs états de charge d'une même molécule (Figure 49), avec les conséquences que nous avons déjà citées plus haut : meilleure précision en masse, gamme de masse étendue pour un intervalle m/z réduit. De plus, en spectrométrie de masse en tandem (c.f IV), on observera plus de fragments ionisés à partir de précurseurs multichargés qu'à partir de précurseurs

monochargés. Cependant, ces nombreux états de charges génèrent des spectres très chargés qui sont parfois difficilement analysables. Par ailleurs, si l'ESI est utilisé en mode positif pour les protéines, qui sont en général plutôt basiques, le mode négatif permet d'améliorer le rendement d'ionisation des oligonucléotides plutôt acides. Enfin, l'ESI est la méthode d'ionisation la plus douce qui existe, et l'utilisation de solvants appropriés permet même de générer et de détecter des complexes non covalents en phase gazeuse (Robinson et al. 1994; Gordiyenko and Robinson 2008) (c.f Chapitre III-V).

Une des faiblesses de l'ESI est d'être relativement sensible à la présence de sels. Ceux-ci ont tendance à former de nombreux adduits qui multiplient le nombre d'espèces moléculaires. L'intensité du signal, et par conséquent la sensibilité, peuvent être ainsi diminuées. Les analyses ESI se font en général avec des échantillons concentrés entre 1 et 100 μM . En effet, l'ESI est en général 100 fois moins sensible que le MALDI (cet ordre de grandeur informatif varie selon les machines et selon leur ancienneté). Toutefois, l'invention du nanospray a permis d'améliorer grandement la sensibilité de l'ESI.

II.2.E La nano-ESI

L'électrospray produit dans des capillaires de quelques μm de diamètre avec des débits de l'ordre du nL/min permet d'augmenter grandement le rendement d'ionisation, en plus de consommer moins d'échantillon. Contrairement à l'électrospray classique, le nanospray ne nécessite pas de gaz nébuliseur coaxial au flux de solvant.

Le nanospray initialement introduit par Wilm et Mann en 1996 (Wilm and Mann 1996) n'était pas encore couplé à la LC et consistait en des aiguilles remplies de 1 à 4 μL de solution. Actuellement, le couplage avec la nano-LC est utilisé en routine et permet d'atteindre des seuils de sensibilité de l'ordre de l'attomole (10^{-18} mole) (Onisko et al. 2007) voire de la zeptomole (10^{-21} mole) (Belov et al. 2000). L'intensité du signal observé en ESI dépend de la concentration de l'échantillon et non du débit utilisé. En réduisant le débit de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ (LC) à 40 nL/min (nanoLC), on peut ainsi consommer beaucoup moins d'échantillon pour une intensité de signal égale.

II.2.F Le couplage chromatographique

Un des avantages considérables de l'ESI est de pouvoir injecter l'analyte en phase liquide et donc de pouvoir coupler la SM avec une interface chromatographique. Dans le cas

des protéines, on peut ainsi dessaler les échantillons et augmenter grandement la sensibilité. L'utilisation de deux pompes permet de réaliser des gradients et ainsi de séparer progressivement des peptides d'une colonne en phase inverse, selon leur polarité.

La chromatographie à ultra haute pression (UPLC) développée par Waters permet quant à elle une amélioration du pouvoir résolutif, de la sensibilité et de la vitesse d'analyse, en utilisant des pressions de 500 à 1000 bars, contre 150 à 350 bars en HPLC.

Remarquons enfin que l'ESI peut également être couplée à l'électrophorèse capillaire qui utilise la migration de molécules chargées, sous l'effet d'un champ électrique. Cette autre méthode séparative est donc appropriée à des molécules chargées et polaires telles que les protéines (Valaskovic et al. 1996).

Quelle que soit la source d'ionisation utilisée, les molécules d'intérêt peuvent être séparées en fonction de leur rapport m/z selon différentes techniques. Contrairement au MALDI qui est presque toujours couplé à un analyseur TOF ou FT-ICR (à l'exception de l'AP-MALDI), l'ESI peut être associé avec presque tous les analyseurs existants : TOF, TOF-TOF, Trappe Ionique, Q-TOF, Triple Quadripôle, FTICR.

III. Les analyseurs

III.1 Temps de vol (TOF)

III.1.A Historique

Dès 1946, Williams Stephen présente les concepts de son spectromètre de masse à temps de vol linéaire à l'American Society meeting à Cambridge (Stephen 1946). Deux ans plus tard, le premier montage expérimental de Cameron et Eggers produit les premiers spectres TOF-MS (Cameron and Eggers 1948). Ce n'est qu'à la fin des années 50 qu'est introduit le premier modèle commercial de TOF-MS linéaire Bendix. Cependant, à l'arrivée sur le marché des quadripôles (c.f III.2), les spectromètres à temps de vol ont été relégués à des applications où la rapidité de leur temps d'analyse faisait la différence. Il faudra attendre les années 70 pour que les analyseurs TOF reprennent leur essor avec diverses découvertes technologiques telles que le réflectron (c.f III.1.c) (Mamyrin et al. 1973), la focalisation temporelle par extraction retardée pour le MALDI (Wiley and McLaren 1955) et l'injection orthogonale pour les sources ESI (Figure 39). Les TOF sont également utilisés pour analyser

les fragments de molécules, soit en tandem (TOF-TOF), soit associés à des quadripôles (Q-TOF).

III.1.B Fonctionnement du TOF

L'analyseur à temps de vol linéaire est le plus simple des analyseurs. Il est constitué d'un tube de vol dans lequel règne un vide poussé (de l'ordre de 10^{-7} mbar) (Figure 38a). Une fois ionisées dans la source, les molécules sont accélérées par une tension V avant d'atteindre la zone libre de champ sous vide que constitue le tube. Ce vide permet d'éviter toute collision avec des molécules de gaz, qui empêcheraient les ions d'atteindre le détecteur. En admettant que tous les ions reçoivent la même énergie cinétique $E=zeV$, on pourra séparer les ions dans le tube de vol selon leur rapport m/z .

En effet : $E=1/2 mv^2$ et $v=d/t$ d'où $m/z=2eV(t/d)^2$

La longueur du tube ainsi que le voltage étant connus, on peut relier facilement le temps de vol t au rapport m/z . Ainsi, les molécules de rapports m/z les plus faibles voleront plus rapidement dans le tube et arriveront au détecteur avant les molécules de rapports m/z élevés.

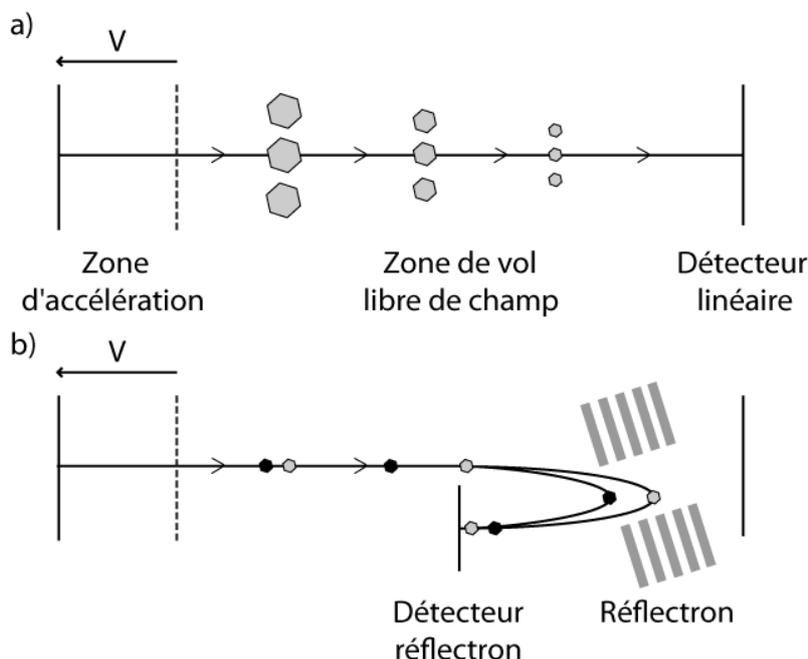


Figure 38. Schéma d'un analyseur à temps de vol (TOF)

a) TOF linéaire b) Réflectron

De par sa nature pulsée, la source MALDI est parfaitement adaptée au TOF. En effet, le laser donne des impulsions énergétiques et à chacune de ces impulsions, une séparation des ions est effectuée. Ainsi en MALDI-TOF, l'utilisateur va pouvoir balayer toute la gamme de masse choisie à chaque impulsion et moyenner automatiquement le signal au cours du temps.

L'ESI ne semble donc à priori pas fait pour le TOF puisqu'il fournit une ionisation continue des molécules. Cependant, il est maintenant possible d'injecter les ions de manière orthogonale au tube de vol (Morris et al. 1996) (Figure 39). Les ions qui arrivent de manière continue sont ainsi accélérés par paquets grâce à des impulsions de haute tension fournies par le « pusher ». Chaque impulsion constitue ainsi le temps zéro à partir duquel on calcule le temps de vol.

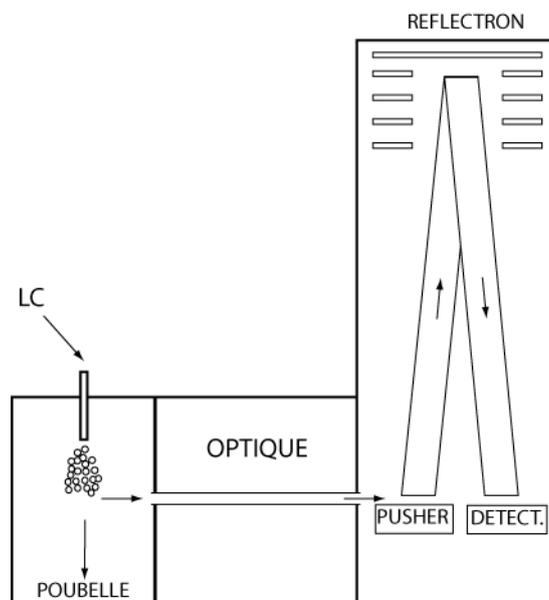


Figure 39. Schéma d'une source ESI orthogonale et d'un TOF orthogonal

Cependant, les TOF linéaires sont confrontés aux limites du postulat initial à savoir que tous les ions reçoivent la même énergie cinétique au moment de l'impulsion. En effet, la dispersion énergétique des ions à l'entrée de l'analyseur entraîne inévitablement une grande perte de résolution. Heureusement, cette dispersion peut être compensée grâce à deux systèmes qui permettent une refocalisation à la fois énergétique et temporelle des ions : l'extraction retardée (Vestal et al. 1995) (pour le MALDI uniquement) et le réflectron (Cornish and Cotter 1993).

III.1.C Amélioration de la résolution

III.1.C.1 L'extraction retardée

Lorsque le faisceau laser du MALDI vient frapper le mélange d'analytes et de matrice, ces molécules sont désorbées et il se forme une sorte de nuage à la surface de la plaque (Figure 35). Ainsi, si l'on accélérât les ions directement après leur formation, certaines

protéines ionisées pourraient être freinées par des collisions avec les ions de la matrice. En d'autres termes, tous les ions d'intérêt n'auraient pas la même énergie cinétique en arrivant dans la zone libre de champ. Afin de palier à ce problème, Vestal (Vestal et al. 1995) a remis au goût du jour l'extraction retardée dont l'idée initiale remonte au milieu des années 50 (Wiley and McLaren 1955). Dans ce mode d'extraction, les ions sont créés dans une zone libre de champs et le potentiel d'accélération (10-25 kV) n'est appliqué à la grille d'extraction que quelques centaines de nanosecondes après le tir laser. Ce délai permet ainsi de mieux focaliser temporellement les ions dans la source avant accélération et de minimiser ainsi l'effet de distribution d'énergie cinétique initiale ce qui augmente finalement la résolution.

III.1.C.2 Le réflectron

Dans le tube de vol, les très faibles différences d'énergie cinétique initiales provoquent des différences de temps de vol qui s'accroissent tout au long du parcours des ions. Le réflectron est constitué d'un empilement d'électrodes portées à des potentiels croissants induisant un champ électrique homogène qui s'oppose à la progression des ions. Il permet ainsi de ralentir les ions jusqu'à inverser leur direction dans le tube (Figure 38b). Ainsi, pour un rapport m/z identique, les ions de plus haute énergie arriveront en premier dans le réflectron et pénétreront plus profondément dans le champ électrique que les ions de plus faible énergie. La différence de distance entre les deux ions de même rapport m/z sera ainsi réduite considérablement lors de leur arrivée au détecteur réflectron qui est situé sur un plan de focalisation temporelle des ions. Ce véritable « miroir électrostatique » permet donc de refocaliser les ions spatialement et donc d'augmenter considérablement la résolution de l'analyseur. D'autre part, le réflectron permet d'augmenter la distance de vol et donc le pouvoir résolutif, sans augmenter le volume de l'instrument. Remarquons que le réflectron corrige la dispersion en énergie cinétique mais ne corrige pas la dispersion en temps.

III.2 Quadripôles

L'analyseur quadripolaire, inventé en 1953 par Paul et Steinwedel (Paul and Steinwedel 1953) est composé de quatre électrodes de section idéalement hyperbolique mais le plus souvent circulaire, soumises à un vide de l'ordre de 10^{-6} mbar. Un même potentiel Φ_0

est appliqué aux 4 électrodes, mais deux électrodes adjacentes sont de potentiel opposé (Figure 40).

Ce potentiel Φ_0 résulte de la combinaison d'une tension continue U et d'une tension alternative V de fréquence angulaire ω , de telle manière que : $\Phi_0 = U - V \cos \omega t$. Le champ électrique quadripolaire formé par ces deux tensions sera ainsi pour un ion de coordonnées x,y,z : $\Phi = \Phi_0 (x^2 - y^2/r_0^2)$. La trajectoire des ions dans le quadripôle sera donc uniforme selon l'axe z et l'équation de Mathieu résolue en 1866 permet de relier la trajectoire des ions selon les deux autres axes (x et y) à leur rapport m/z :

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cdot \cos 2\xi) \cdot u = 0 \quad \text{Avec : } u = x \text{ ou } y, \xi = \omega t/2, a_u = \frac{8zeU}{mr_0^2\omega^2} \text{ et } q_u = \frac{4zeV}{mr_0^2\omega^2}$$

Avec r_0 : le rayon du cercle inscrit entre les 4 électrodes ; ω : la fréquence angulaire telle que $\omega = 2\pi f$ où f est la fréquence rf (radio-fréquence) ; m : la masse de l'ion et ze sa charge.

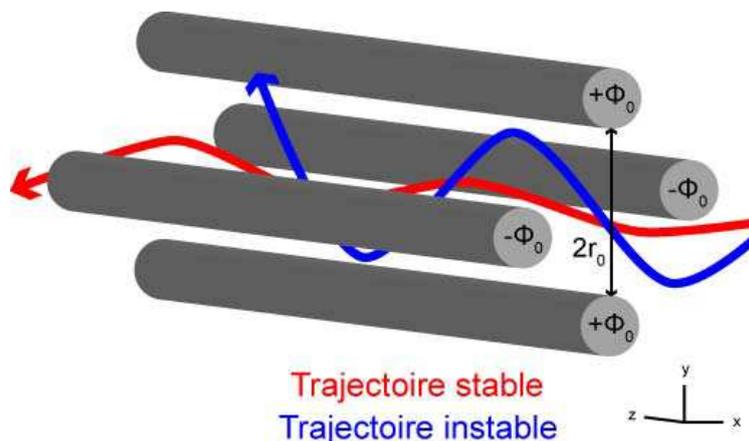


Figure 40. Schéma d'un analyseur quadripolaire

Les ions dont les coordonnées x et y sont inférieures à r_0 seront maintenus entre les électrodes et pourront parvenir au détecteur (trajectoire stable); les autres seront collectés par les barres du quadripôle (trajectoire instable) (Figure 40. Schéma d'un analyseur quadripolaire). Ainsi, en faisant varier les tensions U et V, on peut choisir d'assurer la stabilité des ions que l'on souhaite détecter en fonction de leur rapport m/z. On représente souvent les solutions de l'équation de Mathieu par un diagramme de stabilité dans lequel on porte a_u en fonction de q_u , c'est-à-dire U en fonction de V (Figure 41).

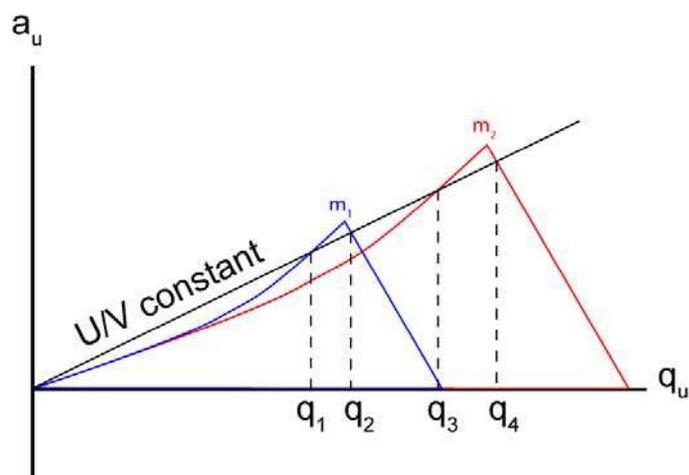


Figure 41. Diagrammes de stabilité de deux ions dans un quadripôle

Ainsi, à U/V constant, si l'on fait augmenter U progressivement, l'ion de masse m_1 sera détecté entre q_1 et q_2 et l'ion de masse m_2 entre q_3 et q_4 . La droite U/V correspond à la droite de fonctionnement de l'appareil. Plus la pente de celle-ci est élevée et plus la résolution de l'analyseur est importante mais moins on détecte les ions de faible masse (défaut de sensibilité). Pour une pente plus faible, on détectera les ions de masse m_1 et m_2 simultanément. Lorsque la pente de la droite de fonctionnement est nulle, tous les ions traversent le quadripôle : on parle alors d'analyseur transparent. Cette fonctionnalité peut être utilisée, non pas pour séparer les ions en fonction de leur rapport m/z , mais pour focaliser le faisceau d'ions. Des hexapôles ou octopôles, à six et huit électrodes respectivement, sont couramment utilisés dans ce mode RF (radiofréquence seule, $U=0$), en amont d'un analyseur quadripolaire, d'un TOF ou d'une cellule de collision quadripolaire (c.f IV.2.a).

Les principaux avantages de ces analyseurs sont leur faible coût, un contrôle des tensions V et U aisé permettant une grande vitesse de balayage comparativement aux secteurs magnétiques et un passage aisé du mode positif au mode négatif.

III.3 La trappe ionique linéaire

La trappe ionique est un développement du quadripôle datant de 1960 (Paul and Steinwedel 1960) qui a valu à Wolfgang Paul le prix Nobel de physique en 1989. La différence majeure entre ces deux types d'analyseur réside dans leur géométrie. Contrairement au quadripôle, la trappe ionique ne dispose que de 3 électrodes : une électrode annulaire (torique) et deux calottes hémisphériques appelées « end-cap » (De Hoffmann et al. 1994) (Figure 42), le tout formant une cavité maintenue sous un vide de 10^{-5} mbar environ.

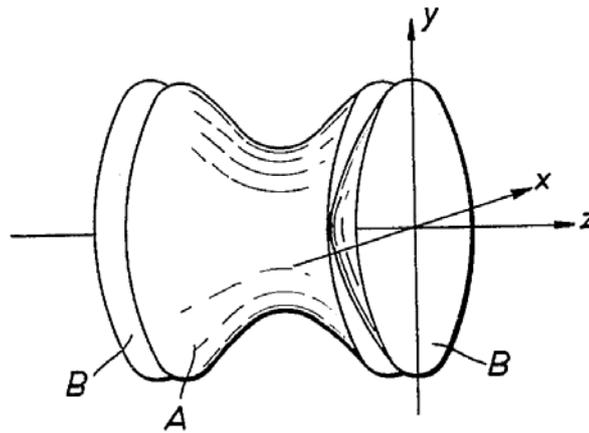


Figure 42. Schéma d'une trappe ionique

A : électrode annulaire, B : calottes hémisphériques. Brevet déposé en 1960 par Paul et Steinweld (Paul and Steinwedel 1960).

Une tension $+\Phi_0$ est appliquée aux calottes hémisphériques alors qu'une tension $-\Phi_0$ est appliquée à l'électrode annulaire, ce qui a pour effet de créer un champ quadripolaire au sein de la trappe. Les ions sont injectés dans la trappe par la calotte de gauche depuis le système d'optique succédant généralement à la source d'ions. Contrairement à l'analyseur quadripolaire, où les ions ne font que passer en étant sélectionnés, la trappe permet de piéger les ions dans un pseudo puits de potentiel, en stabilisant leur trajectoire en forme de huit (Nappi et al. 1997) (Figure 43). Cette trajectoire oscillante tridimensionnelle obéit aux équations de Mathieu (avec $u = x, y$ ou z et $r_0^2 = x^2 + y^2$), et il est donc possible, comme pour le quadripôle linéaire, d'établir des diagrammes de stabilité et de conserver les ions de rapport m/z désiré en faisant varier les valeurs de la radiofréquence. On pourra ensuite éjecter ces ions en déstabilisant leur trajectoire afin de les diriger vers le détecteur, via la calotte de droite.

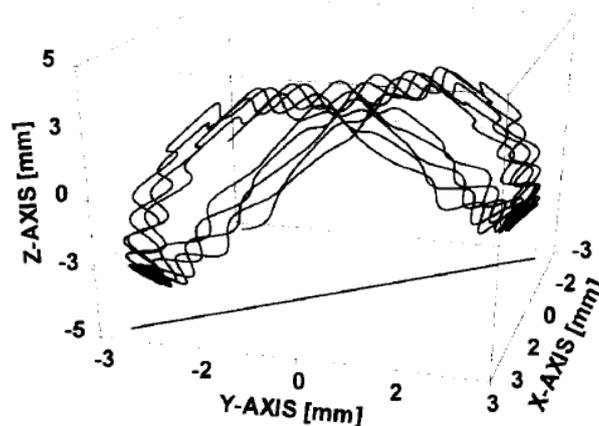


Figure 43. Trajectoire d'un ion (m/z 105) piégé dans une trappe ionique

D'après (Nappi et al. 1997).

Notons que le piégeage des ions s'effectue en appliquant uniquement un potentiel RF sur l'électrode annulaire. Afin de réduire l'énergie cinétique des ions et de concentrer leur

trajectoire vers le centre de la trappe, de l'hélium est introduit au sein de la trappe. Les collisions des ions avec les atomes de gaz neutre permettent de les refroidir énergétiquement. L'éjection des ions est le plus souvent réalisée en augmentant progressivement le potentiel RF, ce qui a pour effet de déstabiliser séquentiellement les ions selon des rapports m/z croissants (éjection axiale).

Le principal avantage de la trappe ionique par rapport au quadripôle linéaire est lié à sa géométrie tridimensionnelle qui permet de stocker les ions et d'augmenter ainsi la sensibilité de l'appareil. Par ailleurs, la capacité d'isolement d'une espèce précurseur est idéale pour réaliser des expériences de fragmentation (c.f IV.2.b).

III.4 La trappe ionique orbitale

La trappe ionique vient de connaître un renouveau avec la trappe orbitale inventée par Alexander Makarov en 2000 (Makarov 2000) et commercialisée par Thermo Fisher Scientific sous le nom d'OrbitrapTM (Hu et al. 2005a). Ce nouveau type d'analyseur, issu de la trappe ionique est caractérisé par une électrode creuse contenant une autre électrode interne autour de laquelle les ions vont être stabilisés par un champ quadro-logarithmique (Figure 44).

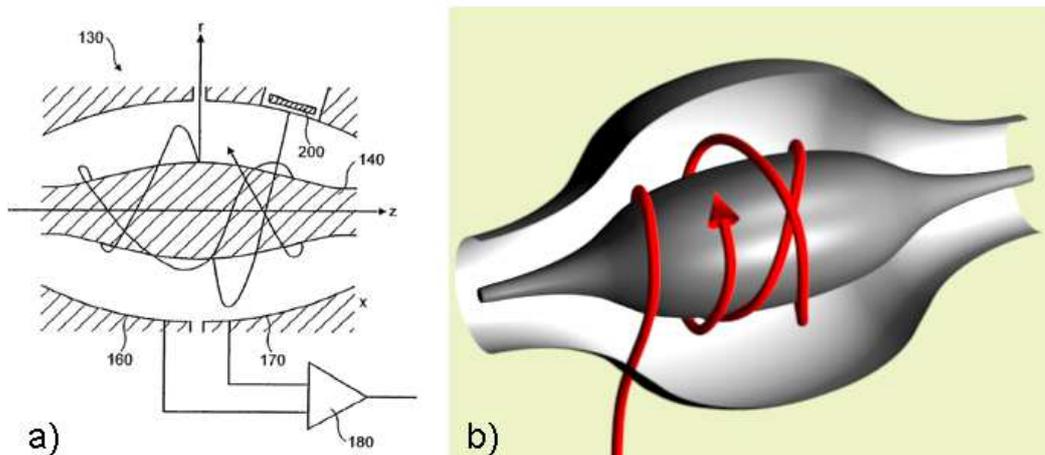


Figure 44. La trappe ionique orbitale ou Orbitrap

a) Brevet déposé en 2005 par Makarov, b) Représentation 3D de la trajectoire des ions au sein de l'Orbitrap.

Les ions sont injectés tangentiellement et leur trajectoire décrit des mouvements oscillants dont la fréquence dépend du rapport m/z . Le courant induit par ces oscillations permet d'accéder à la somme des fréquences des ions oscillants. Une transformée de Fourier permet ensuite de remonter à chacune des fréquences et donc à chacun des rapports m/z , tout comme en résonance cyclotronique à transformée de Fourier FT-ICR (c.f III.5). La précision en masse de ce type d'analyseur est particulièrement bonne (de l'ordre du ppm) ainsi que la

résolution (environ 100 000) et la gamme dynamique supérieure à 3 décades. De plus, son coût de fabrication relativement faible lui permet de rivaliser avec un analyseur de type FT-ICR.

III.5 Résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier

Le principe de l'analyseur à résonance cyclotronique ionique consiste à soumettre les ions à un champ magnétique B qui induit une force de Lorentz $\vec{F} = ez\vec{v} \wedge \vec{B}$. Les ions, étant focalisés sur un même plan par l'application d'un faible courant entre deux plaques de piégeage, parcourent alors une trajectoire circulaire dite cyclotronique (Figure 45.a) dans un vide très poussé (10^{-9} mbar).

Les ions vont ensuite être excités par un champ alternatif de fréquence correspondante à leur fréquence cyclotron et généré par deux plaques d'excitation. Ce balayage RF permet d'exciter en cohérence tous les ions présents dans la cellule.

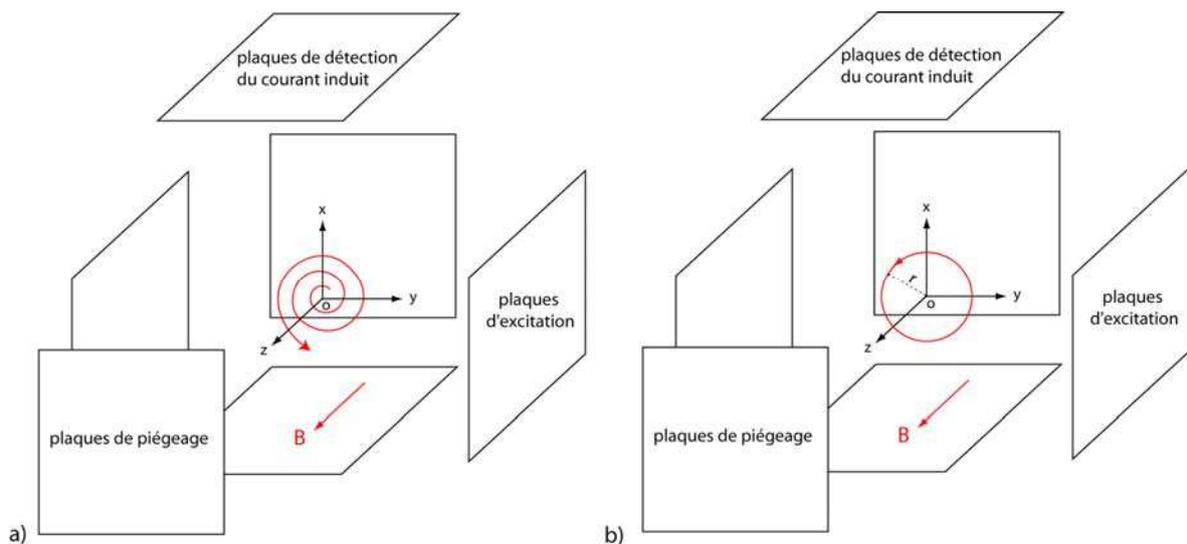


Figure 45. Schéma d'une cellule d'ICR

a) Les ions sont focalisés sur le plan Oxy par les plaques de piégeage et excités par les plaques d'excitation.
b) Les ions sont stabilisés sur une orbite de rayon dépendant de leur rapport m/z . Les plaques de détection mesurent la fréquence de rotation de chaque paquet d'ions cohérents.

Les ions vont alors décrire des orbites dont le rayon va augmenter (Figure 45a) jusqu'à ce qu'ils se stabilisent (Figure 45b). En effet, ce rayon dépend du rapport m/z de chaque

paquet d'ions cohérents car $r = \frac{m}{z} \times \frac{v}{eB}$.

Enfin, les plaques de détection vont mesurer le courant induit par le mouvement des ions dans la cellule. Ce courant correspond à la somme des courants induits par chaque paquet d'ions cohérents de même rapport m/z . Par transformée de Fourier, il est possible de remonter

à chaque sinusoïde générée par les paquets d'ions et déterminer ainsi la fréquence cyclotronique de chacun. Finalement, on peut relier la fréquence d'une particule chargée dans un champ magnétique B au rapport m/z par la relation $f = \frac{eB}{2\pi(m/z)}$.

Cet analyseur est le plus puissant sur le marché actuellement, avec une résolution pouvant atteindre les 600 000, une sensibilité atteignant l'attomole, avec une précision en masse meilleure que le ppm. Le FT-ICR est également une méthode de choix pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (c.f V), puisqu'elle permet différents modes de fragmentation moléculaire.

Les inconvénients sont l'encombrement ainsi que les coûts d'achat et de fonctionnement (hélium) non négligeables du cryo-aimant supraconducteur, indispensable pour produire le champ magnétique nécessaire. De plus, la gamme dynamique est restreinte à 2 ou 3 décades car le nombre d'ions pouvant coexister dans la cellule est limité.

IV. Le spectre de masse

Dans tous les cas, on obtient un spectre où l'intensité du signal est représentée pour chaque rapport m/z (Figure 46). Dans le cas de l'ESI, il est possible de coupler le spectromètre de masse à la chromatographie liquide (LC), on parle alors de LC-MS. Les échantillons peuvent ainsi être dessalés, ou bien fractionnés à l'aide de colonnes chromatographiques en phase inverse. On obtient ainsi des spectres différents au cours du temps. Le spectre TIC (Total Ion Current) représente l'intensité du courant obtenu en fonction du temps (Figure 47). Il s'agit d'une élution chromatographique classique, sauf qu'au lieu de suivre la densité optique, on suit le total du courant généré par les ions. Pour chaque temps, il est possible d'obtenir un spectre de masse. On obtient donc une séparation selon deux dimensions : la polarité et le rapport m/z.

IV.1 Paramètres

La gamme de masse d'un spectre correspond à l'intervalle entre les m/z max et min choisis lors de l'acquisition.

La gamme dynamique d'un spectromètre de masse correspond au rapport du signal mesurable maximal sur le signal mesurable minimal.

La justesse, souvent mesurée en partie par millions (ppm), correspond à la différence entre la valeur expérimentale et la valeur théorique. Par abus de langage, on utilise souvent le terme précision pour parler de justesse.

La sensibilité correspond à la quantité minimale détectée par l'instrument.

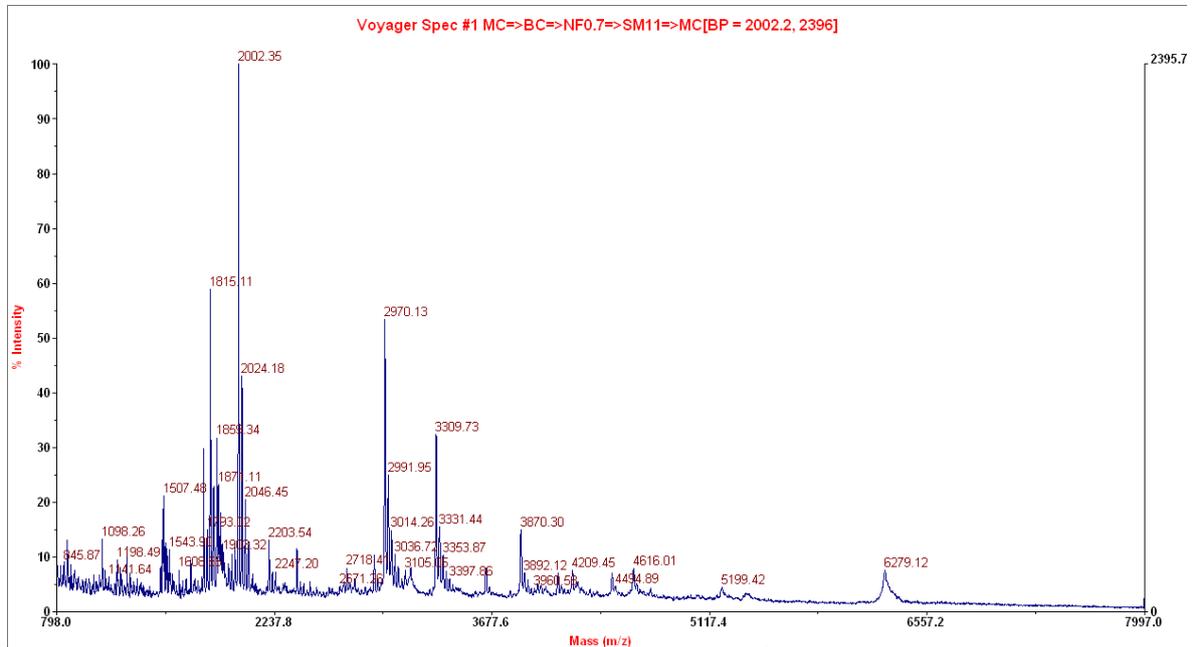


Figure 46. Spectre MALDI-TOF de la protéine p47^{phox} digérée à la pepsine

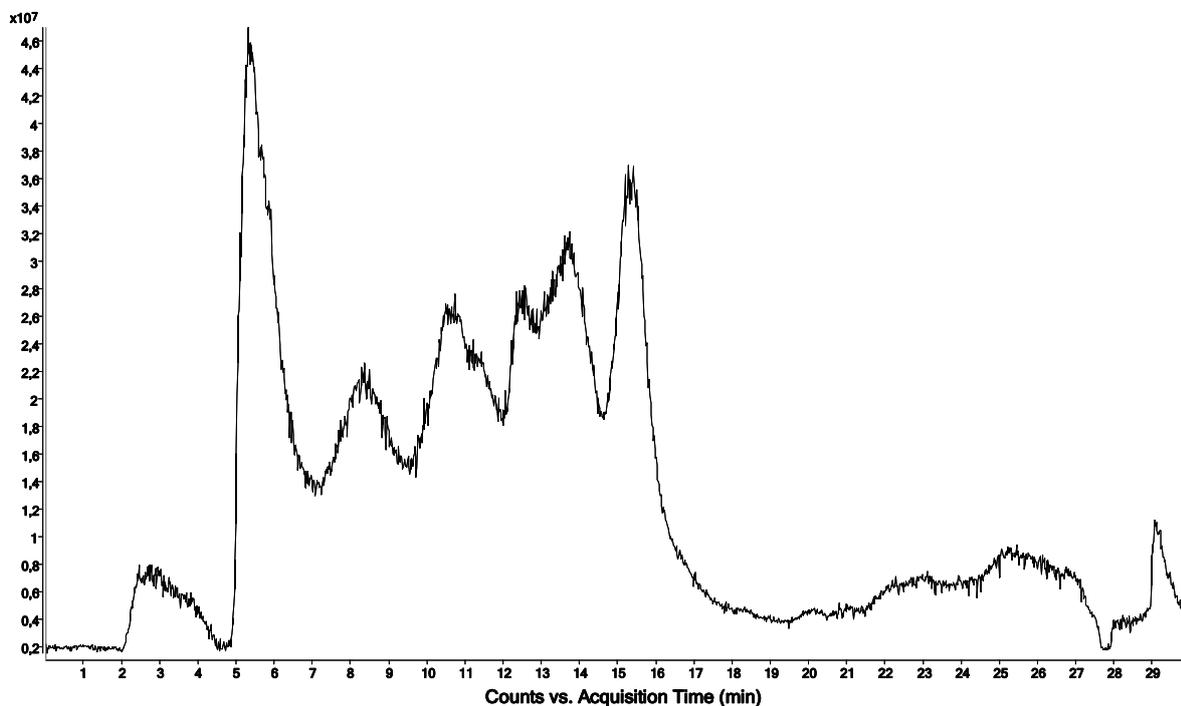


Figure 47. Spectre TIC de la protéine p47^{phox} digérée à la pepsine

La résolution correspond à la capacité de l'instrument à séparer deux pics de m/z très proches. Elle est donnée par le rapport entre la masse d'un pic et sa largeur à mi-hauteur ($R=M/\Delta M$). Plus la résolution est importante et plus les pics sont fins.

IV.2 Massifs isotopiques

Si la résolution est suffisante, on pourra observer le massif isotopique de l'ion. En effet, la répartition moyenne des isotopes au sein des principaux éléments constituant les substances naturelles est telle qu'à l'échelle d'un atome seul, on considère uniquement les isotopes majoritaires (^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{32}S). Cependant, lorsqu'on prend en compte tous les atomes d'une protéine par exemple, les pics correspondant aux autres isotopes (^{13}C , ^{18}O , ^{15}N) peuvent être visibles. Ainsi le peptide théorique de séquence THESE (figure II.3a) possède un pic monoisotopique majoritaire de masse $M=601,2$, correspondant à toutes les molécules comprenant uniquement des isotopes majoritaires ^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{32}S . Le massif contient également un pic à $M+1=602,2$ ayant 29,16% de l'intensité du pic monoisotopique et correspondant à toutes les molécules du peptide THESE comprenant par exemple un ^{13}C ou un ^{15}N . Le troisième pic à $M+2=603,2$ correspond à toutes les molécules du THESE comprenant deux ^{13}C ou un ^{18}O ou encore un ^{13}C et un ^{15}N . L'intensité de ce pic est plus faible car la probabilité d'avoir ces isotopes dans une molécule de cette taille est plus faible (6,51%).

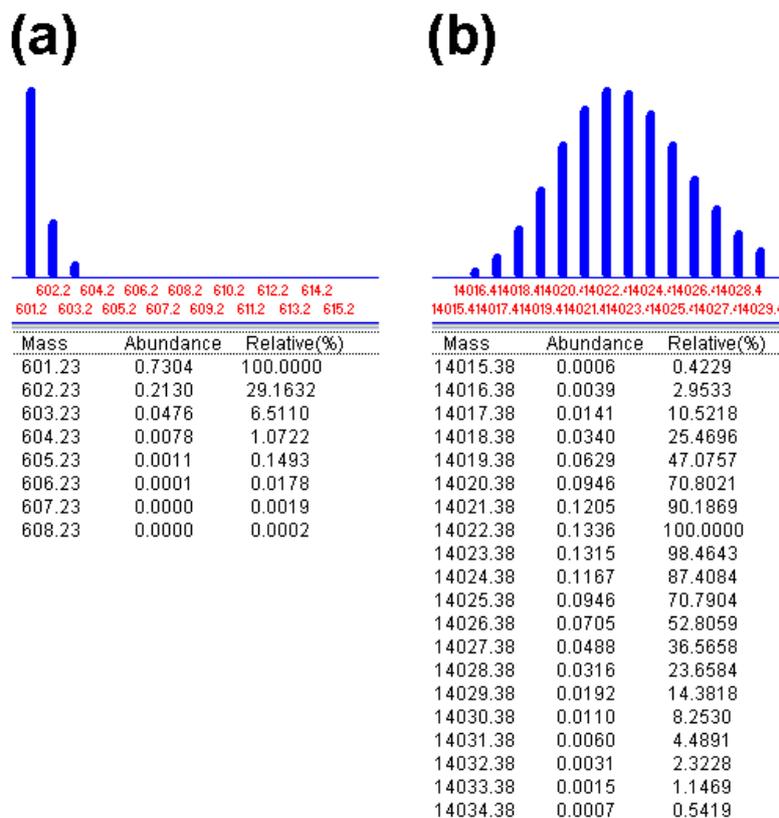


Figure 48. Massifs isotopiques

a) Spectres théoriques du peptide THESE et **b)** d'une répétition de 24 motifs THESE. Les abondances relatives de chaque pic isotopique sont indiquées en dessous des spectres. Ces spectres théoriques ont été générés par le logiciel GPMW 7.00 (<http://www.gpmaw.com/>).

Maintenant, si l'on considère la protéine théorique de séquence correspondant à une répétition de 24 motifs THESE, on obtient une masse monoisotopique de 14015,4 Da (figure II.3b). Cependant, en raison du très grand nombre d'atomes composant cette molécule, le pic monoisotopique devient très minoritaire (0,4 %). On obtient alors un massif en cloche et le pic majoritaire correspond à la masse 14022,4 Da, c'est-à-dire pesant 7 Da de plus que la molécule monoisotopique. Ainsi, dans le cas de grosses molécules telles que les protéines, on observe souvent un pic élargi si la résolution ne permet pas de séparer tous les pics du massif et l'on mesure alors une masse moyenne correspondant au centroïde de l'enveloppe (barycentre du massif isotopique). Dans notre cas, la masse moyenne de cette protéine est de 14023,3 Da.

IV.3 Etats de charge

L'électrospray permet d'observer différents états de charge pour une même molécule (Figure 49). Ceci est doublement avantageux. En effet, chaque état de charge permettant de remonter à la masse de la molécule (cf I.2.d), on peut ainsi obtenir une moyenne qui sera plus précise que si la masse était déterminée à partir d'un seul état de charge. De plus, on peut observer dans une gamme de masse (intervalle de travail m/z) relativement faible ($m/z < 3000$ Da) des molécules fortement chargées de poids moléculaires très élevés, jusqu'à une centaine de kDa.

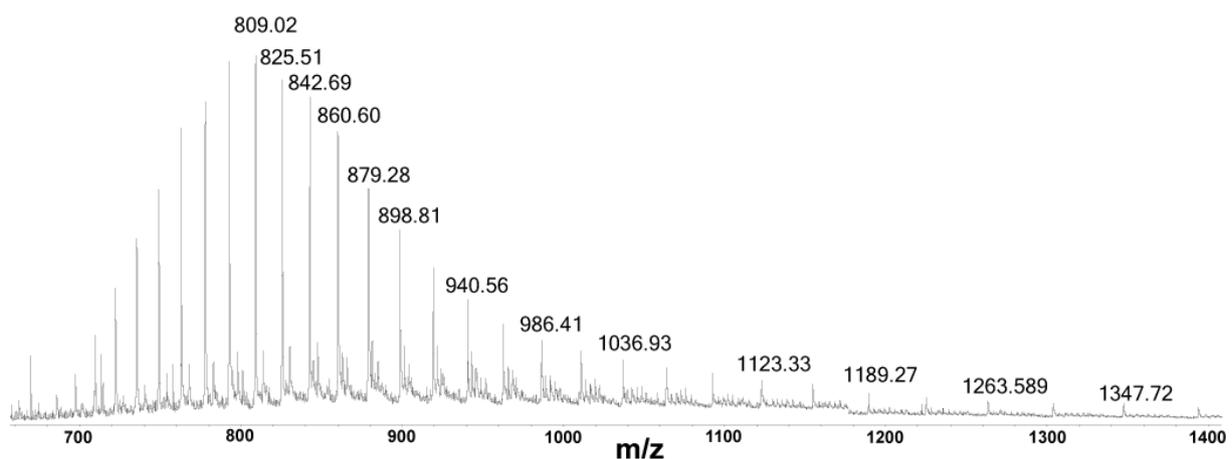


Figure 49. Enveloppe d'états de charges de p47^{phox} obtenue par ESI-TOF

Si le massif isotopique est résolu, il est aisé de remonter à l'état de charge. En effet, les différents pics isotopiques sont séparés de $1/z$ Da. Dans le cas de la Figure 50, les pics du peptide doublement chargé (Figure 50b) sont séparés de $1/2$ alors que les pics du même

peptide monochargé (Figure 50c) sont séparés de 1. Ainsi, plus la résolution de l'appareil est importante et plus on pourra observer des massifs isotopiques pour des états de charges élevés. Il est ainsi courant d'observer des massifs isotopiques résolus pour des états de charges allant jusqu'à 10.

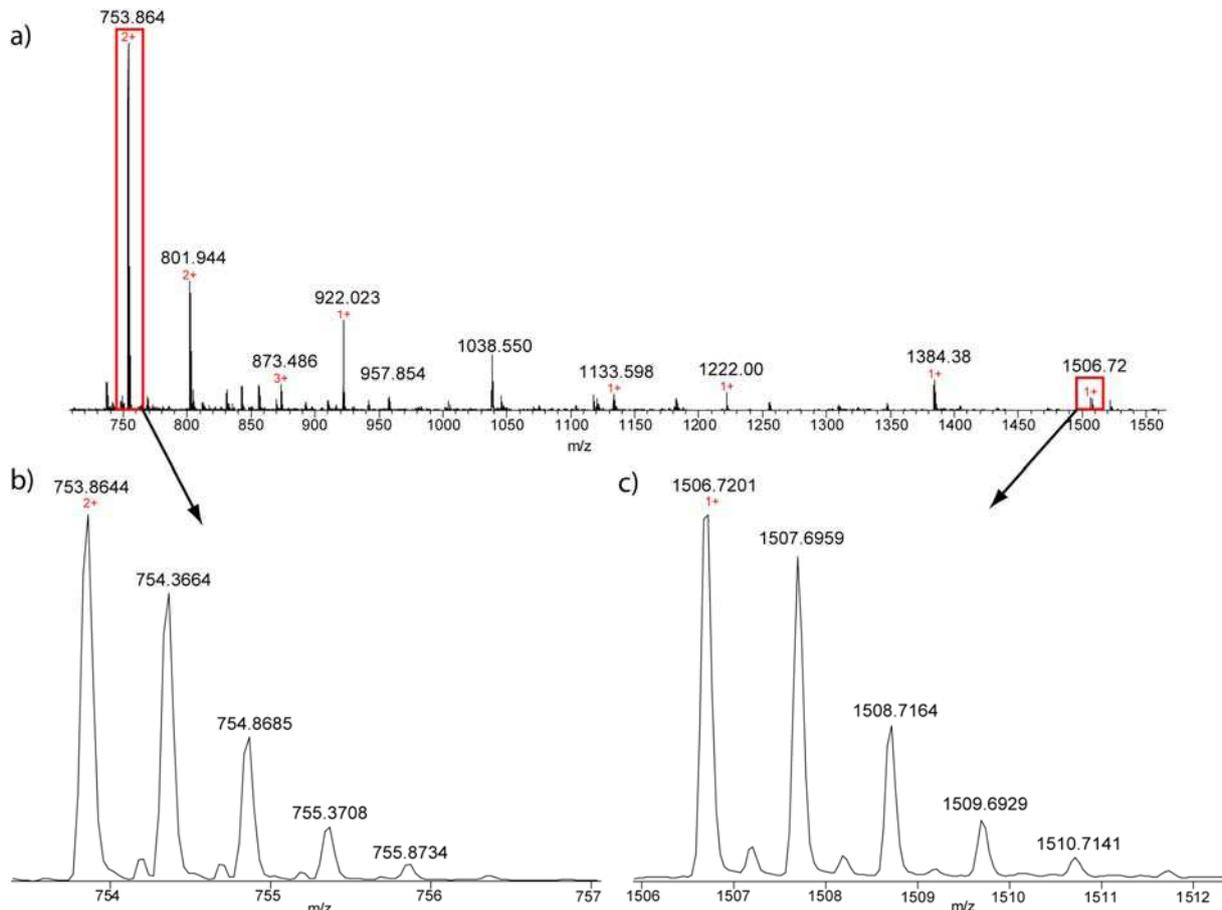


Figure 50. a) Spectre obtenu après digestion de p47^{phox} à la pepsine. Zooms sur les massifs isotopiques d'un même peptide b) di-chargé et c) mono-chargé

IV.4 Obtenir la masse à partir des états de charge

- à partir de 2 états de charges adjacents :

$$825,51 = \frac{m+z}{z} \text{ et } 809,02 = \frac{m+z+1}{z+1} \text{ par exemple (Figure 49)}$$

$$\text{D'où : } m = \frac{(809,02-1) \times (825,51-1)}{825,51-809,02} = 40401,49 \text{ et } z = 49$$

Les logiciels de déconvolution de spectres déterminent ainsi une valeur de la masse à partir de chacun des états de charges et donnent finalement une valeur moyenne.

- à partir du massif isotopique d'un état de charge connu

Prenons l'exemple du peptide doublement chargé de la Figure 50b

753,8644 correspond au pic isotopique, soit $753,8644 = \frac{m + z \times 1,0078}{z}$ avec $z = 2$

Donc $m = 753,8644 \times z - z \times 1,0078 = 1505,7132$

On peut déterminer la masse avec chaque pic et ensuite moyenner ces valeurs, En effet :

$$754,3664 = \frac{m + z \times 1,0078}{z} + \frac{1}{z} \text{ d'où } m = z \times (754,3664 - 1,0078) - 1 = 1505,7172 .$$

De même, on pourra déterminer la masse de ce peptide avec chacun des pics du massif isotopique du peptide monochargé (Figure 50a). Au final, le logiciel d'analyse de données calcule dix valeurs pour la masse de ce peptide qu'il peut ainsi moyenner.

V. La spectrométrie de masse en tandem

Les ions formés dans la source sont plus ou moins stables :

- les ions stables sont capables d'atteindre le détecteur
- les ions instables disparaissent généralement dans la source
- les ions métastables subissent une fragmentation dans la source ou juste après la source.

On peut ainsi obtenir des informations structurales sur un MALDI-TOF en réalisant des expériences d'In Source Decay (ISD) ou de Post Source Decay (PSD).

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) consiste à isoler des espèces ionisées stables appelées précurseurs (ou ions parents) et à les fragmenter en ions produits (ou ions fils) en dehors de la source. Il faut pour cela fournir de l'énergie à l'ion parent jusqu'à ce que son énergie interne dépasse l'énergie d'activation nécessaire aux fragmentations. La MS/MS doit énormément aux travaux de Beynon, Cooks et McLafferty (McLafferty 1981). Cette approche est applicable à différentes sortes de molécules et permet de remonter à leur structure. On peut ainsi identifier la nature des acides gras composant les triglycérides ou séquencer des oligonucléotides ainsi que des protéines.

Lors d'une analyse MS/MS, les ions d'intérêt sont sélectionnés dans un premier analyseur puis fragmenté dans une cellule de collision et les ions fils sont finalement séparés selon leur rapport m/z dans un deuxième analyseur.

Les deux analyseurs et la cellule de collision peuvent être séparés physiquement : on parle alors de MS/MS dans l'espace. Cependant d'autres appareils permettent de coupler ces trois éléments au même endroit : on parle alors de MS/MS dans le temps.

V.1 La MS/MS dans l'espace

Dans ce type de MS/MS, les ions parents et fils sont séparés dans deux analyseurs disposés l'un après l'autre. Dans cette configuration, une cellule de collision est disposée entre les deux analyseurs.

Les premières expériences de spectrométrie de masse en tandem furent réalisées sur un triple quadripôle (Yost 1978). En mode spectre d'ions fils, le premier quadripôle va permettre d'isoler l'ion parent. Celui-ci sera fragmenté dans la cellule de collision (deuxième quadripôle ou hexapôle) et les ions fils seront séparés dans le troisième quadripôle (Figure 51).

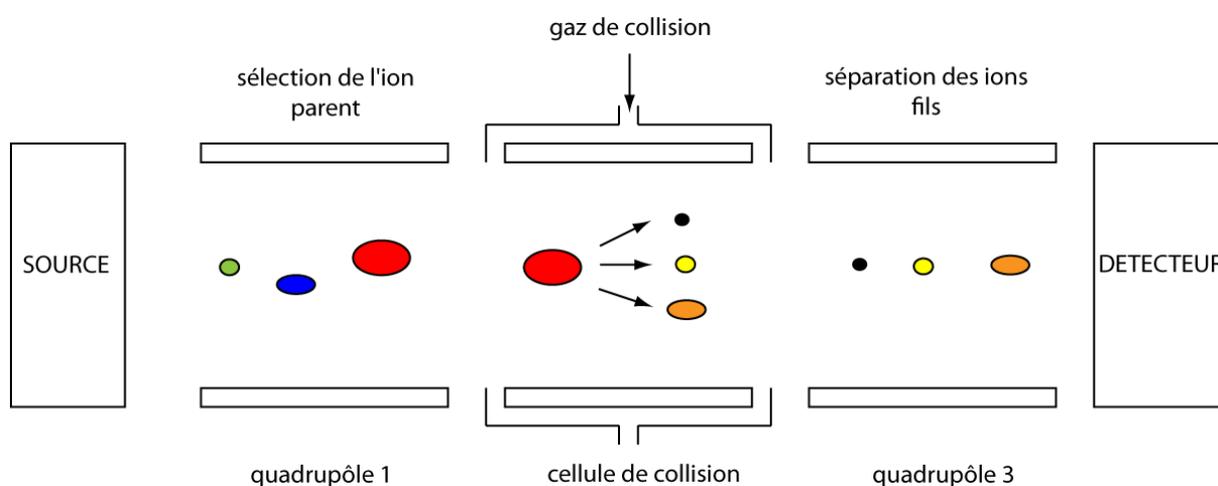


Figure 51. Schéma d'un triple quadripôle

Le qQ-TOF est un instrument hybride dans lequel un analyseur TOF remplace le troisième quadripôle (Figure 52). En SM simple, le premier quadripôle est utilisé en mode filtre « RF only » et tous les ions sont transmis au TOF. En MS/MS, le premier quadripôle sélectionne l'ion parent et le TOF sépare les ions fils selon leur rapport m/z .

Enfin, dans les TOF-TOF, la cellule de collision CID (c.f IV.3.a) est située soit entre les deux analyseurs à temps de vol (Medzihradzky et al. 2000) (Applied Biosystems 4800+), soit en amont des tubes de vol (Suckau et al. 2003) (Bruker Daltonics).

Ces instruments sont nés de l'observation de la fragmentation spontanée de certains ions métastables en sortie de source (Post Source Decay) et de la volonté d'obtenir des fragmentations de haute énergie.

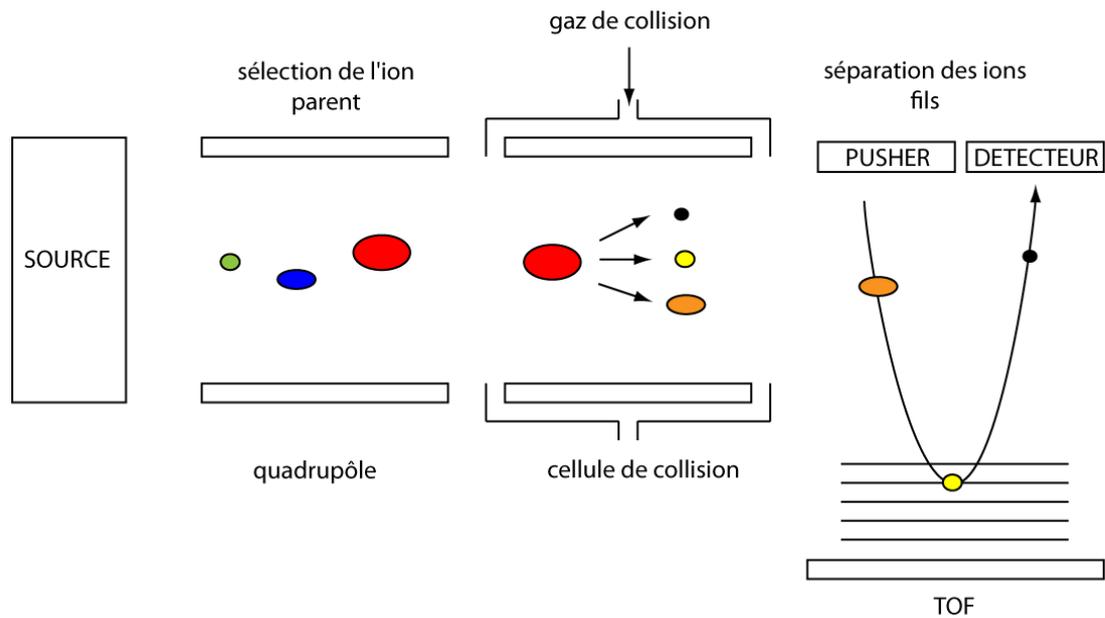


Figure 52. Schéma d'un Qq-TOF

V.2 La MS/MS dans le temps

Dans ce type de MS/MS, les ions parents et fils sont séparés dans un même analyseur, qui sert également de cellule de collision. C'est le cas des trappes ioniques linéaires, orbitales ainsi que des cellules de FT-ICR qui permettent de réaliser des fragmentations successives (MS^n).

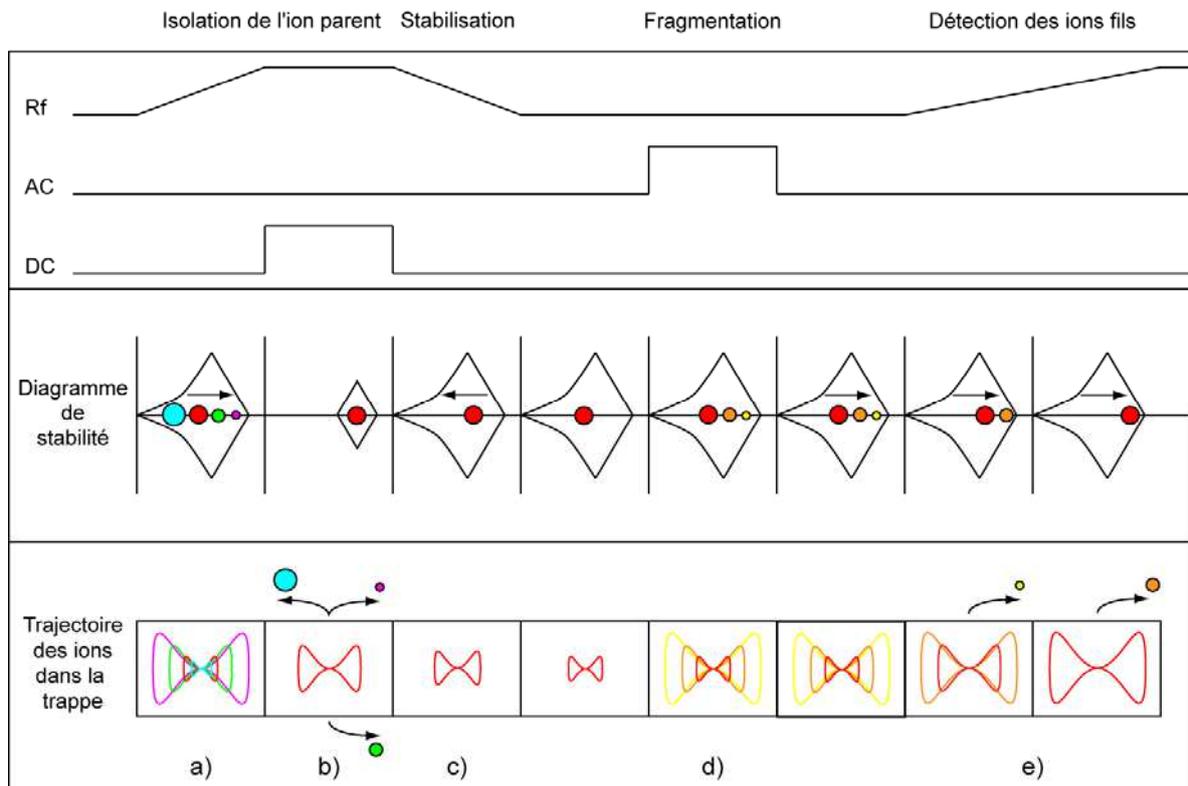


Figure 53. Spectrométrie de masse en tandem dans une trappe linéaire

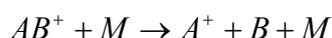
Dans une trappe linéaire, l'ion parent est tout d'abord isolé en augmentant le potentiel R_f de l'électrode annulaire. Ceci a pour effet d'augmenter l'amplitude de la trajectoire des ions et de faire ainsi sortir de leur zone de stabilité les ions dont on souhaite se débarrasser (Figure 53a) (élimination par éjection axiale). L'application d'une tension DC permet par ailleurs de réduire cette zone de stabilité et facilite ainsi l'élimination des ions de rapport m/z plus faible que celui de l'ion parent choisi (Figure 53b). Celui-ci est ensuite stabilisé en abaissant la R_f (Figure 53c) puis fragmenté en appliquant une tension continue AC (Figure 53d). Les ions fils sont ensuite détectés séquentiellement en augmentant progressivement la R_f et en les éjectant un à un de leur zone de stabilité (détection par éjection latérale) (Figure 53e). En sélectionnant un ion fils, puis en le stabilisant pour ensuite le re-fragmenter, on peut ainsi réaliser des expériences de MS^n avec ce type d'analyseur. Remarquons qu'il est nécessaire d'introduire à l'intérieure de la trappe une pression de gaz neutre (généralement de l'hélium à 10^{-6} bar) qui permet de thermalyser les ions.

V.3 Différents types de fragmentation des protéines

La fragmentation des chaînes polypeptidiques peut donner lieu à différents ions fils. Ceux-ci sont appelés a, b ou c s'ils correspondent à la partie N-terminale du précurseur et x, y ou z s'ils correspondent à la partie C-terminale. La localisation de la coupure (en amont ou en aval du carbone α ou au niveau de la liaison amide) détermine la nature des ions fils (Figure 54), selon la nomenclature de Roepstorff (Roepstorff and Fohlman 1984) (Figure 54). La nature des ions obtenus est déterminée par le mode de fragmentation.

V.3.A Dissociation induite par collision (CID)

Ce mode de dissociation, également appelé dissociation activée par collision (CAD) est le premier à avoir été utilisé. La fragmentation résulte de la collision de l'ion parent AB^+ avec un gaz rare M tel que l'argon ou l'hélium. L'énergie de collision est convertie en énergie vibrationnelle qui se répartit rapidement sur toutes les liaisons peptidiques et finit par provoquer leur coupure :



Ce type de fragmentation donne généralement des ions de série b et y. En dissociation induite par une surface (SID), la fragmentation est le résultat de la collision d'un ion sur une surface.

La dissociation multiphotonique par infrarouge (IRMPD) utilise un laser infrarouge pour fragmenter les ions parents (Little et al. 1994). Cette fragmentation est également réalisée en augmentant l'énergie vibrationnelle des molécules.

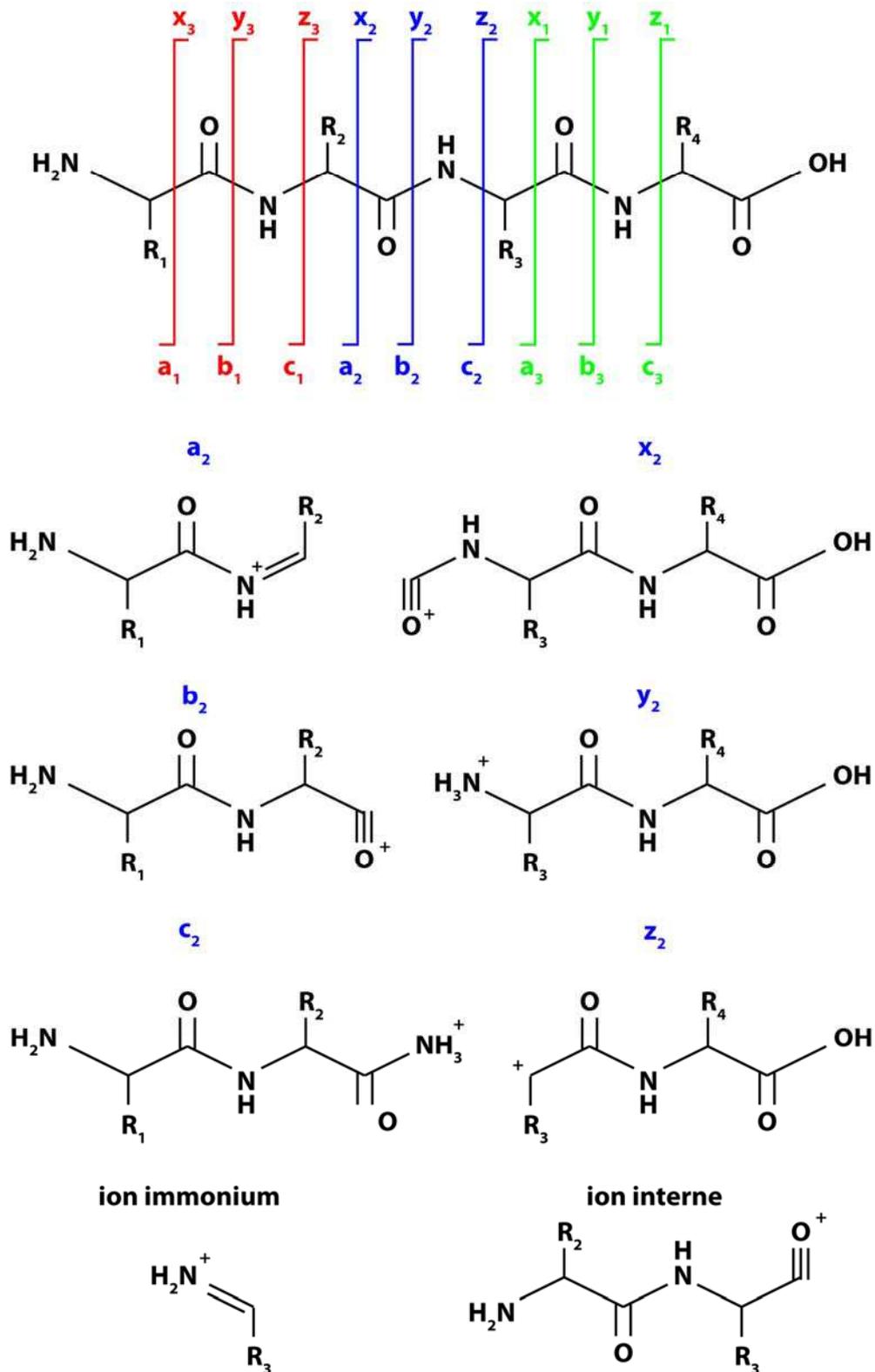
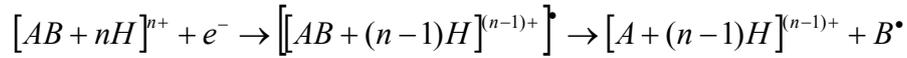


Figure 54. Nomenclature des ions fils obtenus lors de la fragmentation d'une protéine
 D'après Roepstorff et al, (Roepstorff and Fohlman 1984). Les ions immonium ne possèdent qu'un carbone alpha et sont dus à deux fragmentations a et y. Les ions internes sont dus à deux fragmentations b et y.

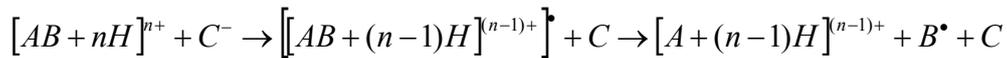
V.3.B Autres mécanismes de fragmentation

L'énergie interne peut également être augmentée par la capture d'électrons de basse énergie (ECD) par des espèces multi-protonées (Zubarev et al. 1998) :



Ce type de fragmentation donne essentiellement des ions complémentaires de séries c et z. Cependant, l'ECD n'est pas compatible avec les analyseurs utilisant une RF telle que les quadripôles et les trappes et nécessite l'utilisation d'un analyseur FT-ICR très onéreux (Syka et al. 2004).

En utilisant des anions comme donneurs d'électrons, l'équipe de Donald Hunt a initié les premières expériences de dissociation par transfert d'électron (ETD), sur une trappe linéaire (Syka et al. 2004). Le mécanisme de fragmentation est similaire à l'ECD :



Ces deux modes de fragmentation semblent particulièrement bien adaptés à l'étude des protéines puisqu'ils apportent moins d'énergie vibrationnelle à la molécule, ce qui permet de rompre les liaisons peptidiques tout en conservant les ponts disulfures et les modifications post traductionnelles (PTM) telles que les glycosylations ou phosphorylations (Zubarev 2004; Sweet and Cooper 2007).

La dissociation par détachement d'électrons (EDD) consiste à irradier des protéines déprotonées avec des électrons et donne préférentiellement des ions de séries a et x (Kjeldsen et al. 2005).

L'approche combinée de différentes méthodes de fragmentations permet d'obtenir une meilleure description de la structure primaire d'une petite protéine.

CHAPITRE III : Les applications de la SM à la biologie structurale

Depuis l'essor du MALDI et de l'ESI qui ont permis l'analyse en routine de grosses biomolécules, la spectrométrie de masse est couramment utilisée pour obtenir des informations sur la structure primaire (c.f Chapitre II-IV.), mais également la structure secondaire, tertiaire (c.f I. à IV.) voire quaternaire (c.f V.) des protéines. Pour cela, nous utilisons la capacité de la SM à détecter des changements de conformation d'échantillons protéiques préparés dans différentes conditions. Il est possible de réaliser différents marquages, covalents (c.f II.) ou non (c.f I.). Nous pouvons également étudier l'accessibilité de surface par des isotopes lourds (c.f I.), des radicaux libres (c.f II.) ou des protéases (c.f III.), afin d'obtenir des informations complémentaires. Des distances intra ou intermoléculaires peuvent être obtenues par pontage moléculaire (c.f IV.). Enfin, la spectrométrie de masse en conditions natives permet d'étudier des complexes multiprotéiques et d'obtenir des informations sur leur état oligomérique ou sur leur dynamique d'assemblage (c.f V.).

I. L'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse (DXMS)

I.1 Principe

Lorsqu'une protéine, initialement hydrogénée, est diluée dans un tampon deutéré (contenant de l'eau lourde), certains de ses hydrogènes vont naturellement s'échanger contre les atomes de deutérium. Les hydrogènes liés à des atomes de carbone (Figure 55 en bleu) ne vont pas s'échanger et les autres hydrogènes des chaînes latérales (Figure 55 en vert) vont s'échanger à une vitesse trop rapide pour être suivie par spectrométrie de masse.

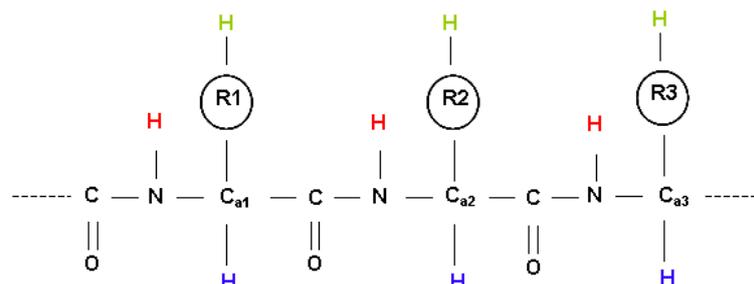


Figure 55. Structure primaire d'une chaîne polypeptidique

Finalement, seuls les atomes d'hydrogène de la liaison amide (Figure 55 en rouge) s'échangent à une vitesse qui sera observable par spectrométrie de masse. En effet, pour chaque atome de deutérium incorporé, la masse de la protéine augmente d'un Da. Ainsi, nous pouvons suivre la cinétique d'incorporation du deutérium en mesurant la masse des protéines à différents temps de deutération. La vitesse d'échange isotopique d'un atome d'hydrogène dépend de son accessibilité au solvant ainsi que de sa participation dans la stabilisation de structures secondaires. En d'autres termes, la vitesse d'échange reflète à la fois la structure et l'accessibilité au solvant de la protéine. Ainsi, les atomes de deutérium vont s'incorporer très rapidement dans les régions très accessibles et peu structurées alors que l'échange sera plus lent dans les régions structurées et/ou cachées au cœur de la protéine (Figure 56).



Figure 56. Principe de l'échange hydrogène/deutérium

Dès lors, la comparaison de la vitesse d'échange sur des échantillons préparés dans diverses conditions nous apportera des informations sur des différences éventuelles de conformation. On peut ainsi comparer l'influence de mutations sur la conformation d'une protéine (Marcoux et al. 2009a). On peut également caractériser l'interaction spécifique entre une protéine et un ligand quel qu'il soit : protéines (Lam et al. 2002; Hamuro et al. 2004; Zhou et al. 2006), petites molécules (Brier et al. 2006), acides nucléiques (Chandra et al. 2008; Poliakov et al. 2008), lipides (Man et al. 2007), sucres (Seyfried et al. 2007). En effet, la zone d'interaction entre les deux molécules sera masquée et donc plus difficilement accessible au deutérium qui s'y incorporera plus lentement, entraînant une deutération plus faible de la protéine en présence de son ligand. Des études s'intéressant aux mécanismes de dynamique moléculaire ont également été menées en suivant le dépliement progressif de protéines sous l'effet de dénaturants (Tobler et al. 2004; Mazon et al. 2005a) ou de la température (Maier et al. 1999). Pour obtenir de telles informations, la manipulation manuelle des échantillons est bien souvent insuffisante, car pour des raisons techniques, il est difficile de prélever des échantillons après moins de 10 secondes de deutération. Plusieurs groupes ont ainsi développé des systèmes de deutération en ligne (« quenched-flow » H/D) permettant, grâce à une deutération pulsée, d'étudier des événements de l'ordre de la dizaine de millisecondes tels que les repliements moléculaires (Konermann and Simmons 2003; Simmons et al. 2003).

I.2 Caractéristiques de cette méthodologie

I.2.A La trempe à pH acide et basse température

Deux autres paramètres influencent fortement la vitesse d'échange hydrogène/deutérium : le pH et la température. Des études sur des peptides synthétiques polyalanine ont montré que la vitesse d'échange était multipliée par trois à chaque augmentation de 10°C (Bai et al. 1993). Par ailleurs, en raison d'un mécanisme d'échange pouvant faire intervenir une catalyse soit acide soit basique, l'échange sera minimal pour un pH situé entre 2,5 et 3 (Figure 57). Un écart d'une unité de pH autour de ce minimum multiplie la vitesse d'échange par 10 (Bai et al. 1993) !

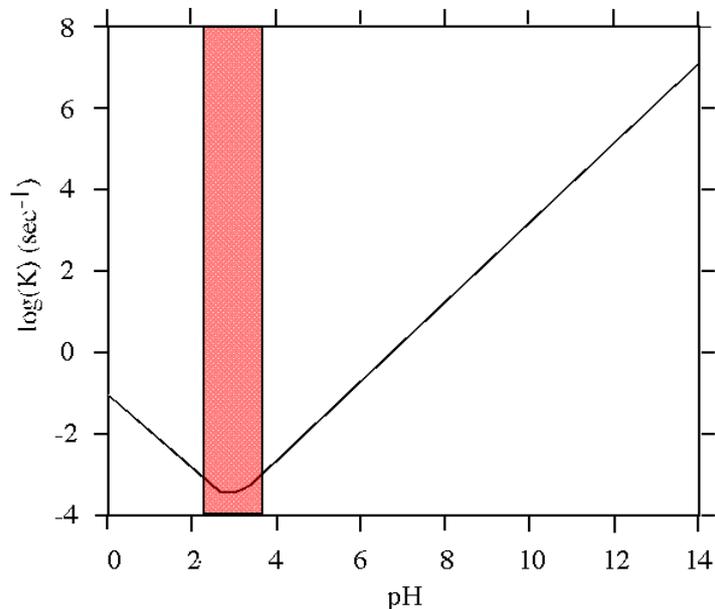


Figure 57. Influence du pH sur la constante d'échange hydrogène deutérium pour une chaîne polyalanine D'après (Bai et al. 1993).

Une fois la protéine deutérée dans des conditions physiologiques, la solution doit donc être portée à pH acide et 0°C, afin de limiter le contre-échange. Ce phénomène consiste en l'échange de deutérium contre des atomes d'hydrogène. En effet, il reste toujours des atomes d'hydrogène dans le tampon. Le contre-échange entraîne une perte de marqueur deutéré et donc d'information, et il doit donc être minimisé afin de déceler les différences conformationnelles les plus subtiles. Cette « trempe » en milieu acide et à 0°C permet de ralentir très fortement les échanges isotopiques et donc de conserver un maximum de deutérium. Les pourcentages de deutération peuvent être calculés en utilisant l'équation (1) et

le phénomène de contre-échange peut être corrigé à l'aide d'un échantillon totalement deutéré, selon l'équation (2) (Zhang and Smith 1993).

$$\%D = [(m_{x\%} - m) / N] \times 100 \quad (1)$$

$$D = \frac{m_{x\%} - m}{m_{100\%} - m} \times N \quad (2)$$

Où m , $m_{x\%}$ et $m_{100\%}$ représentent la masse moléculaire moyenne de l'échantillon non deutéré, partiellement deutéré et totalement deutéré, respectivement et N , le nombre de protons échangeables (nombre de liaisons amides auquel on soustrait le nombre de résidus proline n'ayant pas d'hydrogène amidique).

I.2.B Utilisation de protéases acides

La comparaison de vitesses de deutération sur protéines entières dans différentes conditions permet donc de déterminer d'éventuelles différences conformationnelles. Cependant, l'information obtenue, lors de ces cinétiques dites globales, reste peu précise. Afin d'obtenir plus de détails sur ces différences conformationnelles, nous pouvons réaliser après différents temps de deutération, une protéolyse à pH acide et 0°C, afin de limiter le contre-échange. L'incorporation de deutérium en fonction du temps est, cette fois-ci, analysée sur chaque peptide obtenu et non sur la protéine entière (Figure 56) : il s'agit de l'approche « bottom-up ». Si les protéines sont deutérées dans des conformations différentes, il est alors possible d'identifier avec précision les régions qui n'ont pas la même conformation puisqu'elles seront deutérées à des vitesses différentes.

Pour réaliser ces cinétiques locales, nous ne pouvons pas utiliser les protéases spécifiques telles que la trypsine ou la chymotrypsine, puisqu'elles sont totalement inactives en milieu acide et à 0°C. Nous devons donc utiliser des protéases acides telles que la pepsine (Wang et al. 1998). Le Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines de l'IBS a largement contribué à l'utilisation combinée de différentes protéases acides afin de générer un maximum de peptides différents et d'augmenter ainsi la résolution spatiale de l'étude (Cravello et al. 2003). La protéase type XIII d'*Aspergillus saitoi* et la protéase type XVIII de *Rhizopus sp.* sont aujourd'hui utilisées dans des études de DXMS (Mazon et al. 2005b; Man et al. 2007; Alverdi et al. 2008; Zhang et al. 2008). Une version recombinante de la protéase type XVIII vient également d'être purifiée au laboratoire, permettant l'utilisation d'un rapport enzyme:protéine beaucoup plus faible qu'avec la version commerciale (Rey et al. 2009). Remarquons par ailleurs que ces protéases doivent être impérativement reproductibles et

capables de digérer leurs substrats en moins de 5 minutes, afin de limiter encore une fois le phénomène de contre-échange. L'utilisation de protéases immobilisées sur des colonnes permet d'automatiser le protocole et d'améliorer dans certains cas la digestion de la protéine étudiée (Rey et al. 2009).

Etant donné le caractère non spécifique de ces protéases acides, les peptides obtenus doivent être identifiés par spectrométrie de masse en tandem (c.f Chapitre II-IV.). Les spectres de fragmentation expérimentaux sont ainsi comparés avec des spectres théoriques, sur la base de la séquence de la protéine étudiée. Des outils informatiques tels que le serveur Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) permettent toutefois d'automatiser cette analyse.

I.2.C Vers l'utilisation du Transfert d'Electrons par Dissociation (ETD) ?

Une des limites de cette méthode reste le caractère aléatoire des coupures protéolytiques générant des peptides de taille variable. Même en obtenant une bonne couverture de séquence, certaines régions de la protéine peuvent être moins bien définies que d'autres. Une alternative à l'utilisation des protéases acides serait d'utiliser la SM en tandem sur la protéine entière, directement après deutération : c'est l'approche « top-down ». Il faut cependant pour cela que le marquage des deutériums soit stable lors de la fragmentation en phase gazeuse. Un certain nombre d'études a cependant montré que la fragmentation de peptides par CID (c.f Chapitre II.IV.3.a) était accompagnée d'une importante migration intramoléculaire des hydrogènes (Demmers et al. 2002; Jorgensen et al. 2005a; Jorgensen et al. 2005b; Ferguson et al. 2007). Ce phénomène, connu sous le nom de « scrambling », et dû à l'augmentation de l'énergie vibrationnelle du précurseur, peut donner des résultats non représentatifs de la réalité (Figure 58).

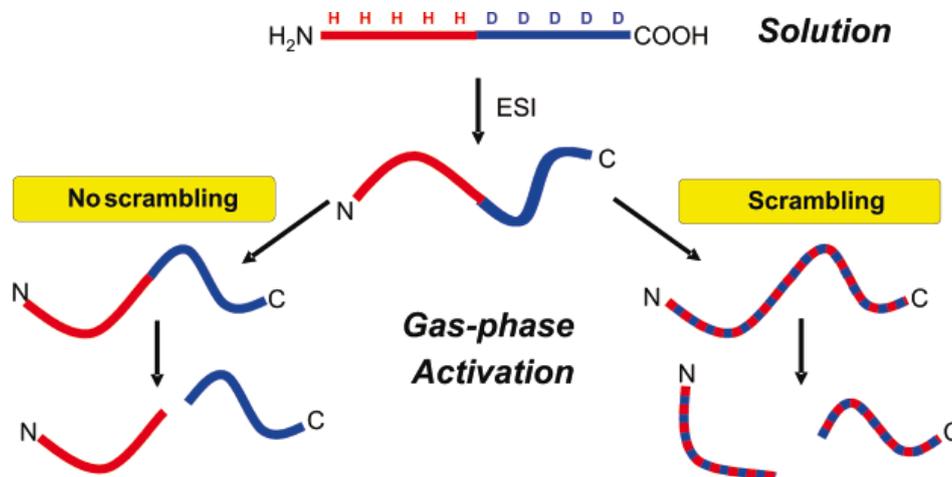


Figure 58. Phénomène de migration intramoléculaire des hydrogènes (scrambling)
D'après (Rand et al. 2008).

La mise au point de nouvelles méthodes de fragmentation qui ne sont pas basées sur une augmentation de l'énergie vibrationnelle telles que l'ECD ou l'ETD a permis d'envisager des études de DXMS sans protéases acides (Palmlblad et al. 2001; Charlebois et al. 2003; Kocher et al. 2005; Hagman et al. 2006; Kweon and Hakansson 2006; Pan et al. 2008; Rand et al. 2009; Stefanowicz et al. 2009). Une telle approche permet ainsi d'atteindre une résolution spatiale au résidu près. Cependant, la longueur des chaînes polypeptidiques à fragmenter est un obstacle de taille qui n'est pas encore résolu : la plus grosse protéine étudiée en DXMS par ECD à ce jour est la myoglobine de cheval, de poids moléculaire 17kDa (Pan et al. 2009a). En DXMS classique ou « bottom-up », des protéines de poids moléculaires compris entre 40 kDa et 80 kDa sont couramment étudiées (Cravello et al. 2003; Hamuro et al. 2004; Mazon et al. 2005b; Brier et al. 2006; Zhou et al. 2006; Guo et al. 2009). La stratégie « bottom-up » a également permis d'étudier des homodimères d'environ 150 kDa (immunoglobuline IgG1 (Houde et al. 2009), kinase PKG (Alverdi et al. 2008)) et même une capsid virale de 19,6 MDa, composée de 420 sous-unités identiques de 47 kDa (Tuma et al. 2001).

II. L'oxydation

Une autre approche, développée principalement par l'équipe de Mark Chance (Chance 2001), consiste à modifier covalamment les protéines étudiées à l'aide d'espèces réactives de l'oxygène. Plus particulièrement, des radicaux hydroxyles $\text{OH}\cdot$ vont oxyder les résidus les plus accessibles à la surface de la protéine. Tout comme en DXMS, on pourra détecter des régions plus ou moins accessibles dans certaines conditions ou des régions d'interaction avec un ligand (Figure 59). Cette technique s'apparente aux modifications chimiques telles que l'acylation ou la succinylation qui permettent d'identifier les résidus réactifs qui sont exposés à la surface des protéines (Glocker et al. 1994). Les radicaux hydroxyles peuvent être obtenus soit par la réaction chimique de Fenton (Tullius and Dombroski 1986), soit par hydrolyse de l'eau en utilisant des rayons X (Bohon et al. 2008) ou des rayons γ , ou bien encore par photolyse du peroxyde d'hydrogène (Konermann et al. 2009; Pan et al. 2009b; Stocks and Konermann 2009).

Exposition des protéines aux radicaux hydroxyles et protéolyse

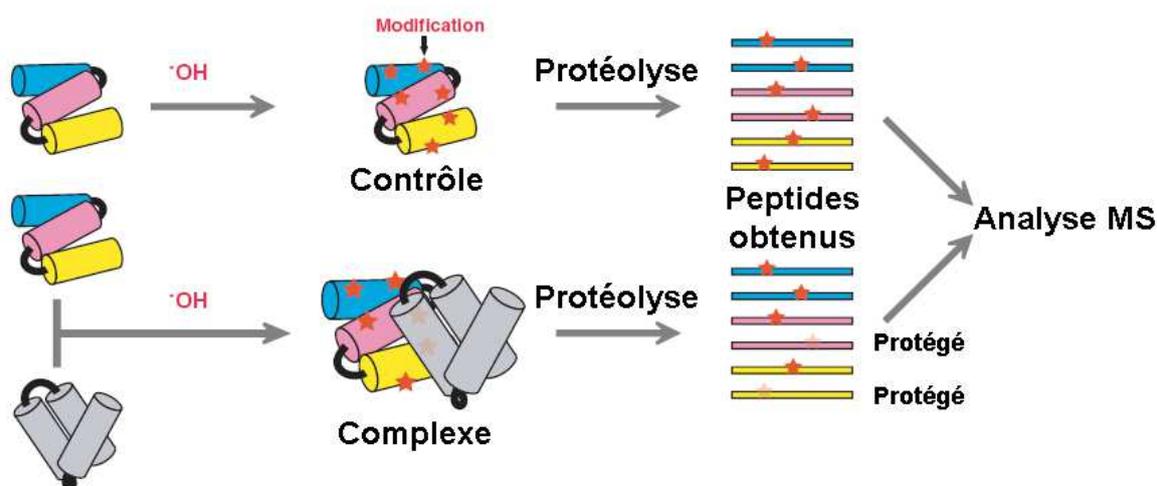


Figure 59. Principe de l'empreinte moléculaire oxydative

Adapté d'après (Takamoto and Chance 2006). Les peptides protégés (non oxydés) correspondent à la région d'interaction entre les deux protéines.

Ce marquage oxydatif est relativement comparable à l'échange H/D puisqu'il apporte le même genre d'informations, mais comme les radicaux libres $\text{OH}\cdot$ et les atomes de deutérium n'ont pas la même taille et donc pas la même accessibilité, les informations obtenues sont souvent complémentaires. Par ailleurs, les radicaux hydroxyles touchent les chaînes latérales de la protéine alors que le deutérium s'incorpore au niveau de la liaison peptidique de la chaîne carbonée. De plus, contrairement en DXMS où l'on considère que la nature de la chaîne latérale influence peu la vitesse d'échange isotopique (sauf pour les prolines qui n'ont pas d'hydrogène amidique), les radicaux hydroxyles montrent une préférence pour certains résidus. En effet la réactivité relative des chaînes latérales avec les radicaux hydroxyles est la suivante : Cys > Met > Trp > Tyr > Phe > His > Leu ~ Ile > Arg ~ Lys ~ Val > Ser ~ Thr ~ Pro > Gln ~ Glu > Asp ~ Asn > Ala > Gly. Ainsi, les résidus Gly, Ala, Asp et Asn ne sont pas utiles en raison de leur faible réactivité. Les résidus Ser et Thr ont des produits de réactions qui sont difficilement détectables. Il y a donc au final 14 résidus sur 20 qui sont utilisables pour réaliser l'empreinte oxydative de la protéine (Takamoto and Chance 2006). Certains résidus peuvent subir deux modifications consécutives tels que les Met (+16 Da et +32 Da) ou bien les Cys (+32 Da et + 48 Da), ce qui aura tendance à complexifier les spectres. Enfin, une même modification peut être attribuée à différents résidus : par exemple un gain de 16 Da peut correspondre à une chaîne aliphatique, aromatique, à une Met ou un Trp. L'étape de MS/MS par CID succédant à la protéolyse (trypsine, Asp-N, Glu-C) est donc nécessaire afin d'identifier avec précision les résidus ayant subi telle ou telle modification (Figure 60).

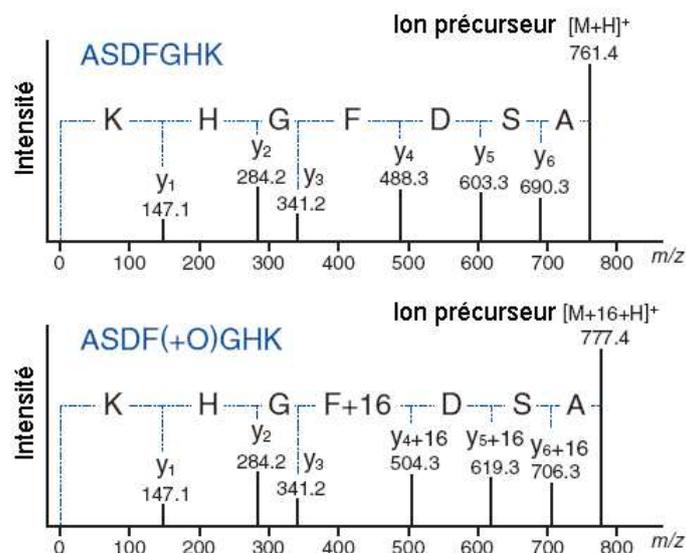


Figure 60. Spectres MS/MS d'ions fragmentés par CID

Adapté d'après (Takamoto and Chance 2006). Spectres de fragmentations du peptide ASDFGHK a) avant et b) après oxydation. Cette étape de MS/MS permet d'identifier la Phe comme étant le résidu oxydé sur ce peptide.

III. La protéolyse ménagée

Les premiers travaux rapportant l'étude d'une empreinte protéique par protéolyse ménagée datent de 1987 et sont directement inspirés des travaux de DNA footprint (Sheshberadaran and Payne 1988). Le principe consiste à tester l'accessibilité de différentes protéases spécifiques aux protéines étudiées. Un profil protéolytique différent obtenu sur gel SDS-PAGE peut être dû à des surfaces accessibles qui ne sont pas les mêmes ou au masquage par une molécule ligand. Couplée à la spectrométrie de masse, la protéolyse ménagée est ainsi devenue un outil puissant qui permet, entre autres, d'identifier avec précision les épitopes de certains anticorps (Suckau et al. 1990). Depuis, cette technique est largement utilisée pour des études de dynamique structurale (Bothner et al. 1998), d'interaction protéine-ligand (Gervasoni et al. 1998; Yi and Skalka 2000; Bogan et al. 2005; Williams et al. 2006), de différences conformationnelles liées à des mutations (Brockerhoff et al. 1992; Huang et al. 2005) ou pour l'élucidation de domaines structuraux (Bantscheff et al. 1999; Jawhari et al. 2004; Gao et al. 2005).

La trypsine, qui reconnaît les résidus basiques Arg et Lys, ainsi que la protéase V8 qui reconnaît les résidus acides Asp et Glu, sont souvent utilisées, en raison de la haute fréquence de ces résidus dans les protéines et de la complémentarité des profils protéolytiques obtenus. La protéolyse doit être la plus limitée possible, afin de ne pas déstructurer la protéine, ce qui pourrait induire d'autres sites de coupure non représentatifs de la structure tertiaire.

Là encore, cette méthode va fournir des informations bien spécifiques liées à la taille des protéases, qui n'est pas comparable aux radicaux hydroxyles ou au deutérium. La résolution de cette méthode est cependant plus modeste. C'est pourquoi la plupart des groupes couplent en général la protéolyse ménagée à l'oxydation ou à l'échange H/D afin d'obtenir des résultats complémentaires (Hager-Braun and Tomer 2005; Cheng et al. 2009).

IV. Le pontage covalent chimique

Parmi les autres méthodes qui permettent d'obtenir des informations d'ordre structural grâce à la spectrométrie de masse, le pontage moléculaire est la seule qui permette d'obtenir une estimation de distance ainsi que l'état oligomérique d'une protéine.

Cette méthode repose sur l'utilisation d'agents réticulants bi-fonctionnels. Les deux groupes fonctionnels, qui peuvent être identiques ou différents, sont séparés par un bras espaceur de longueur connue. Après incubation de la protéine avec l'agent pontant, on peut tout d'abord déterminer le ou les états oligomériques de la protéine étudiée en analysant la masse des éventuels produits de réaction (Figure 61).

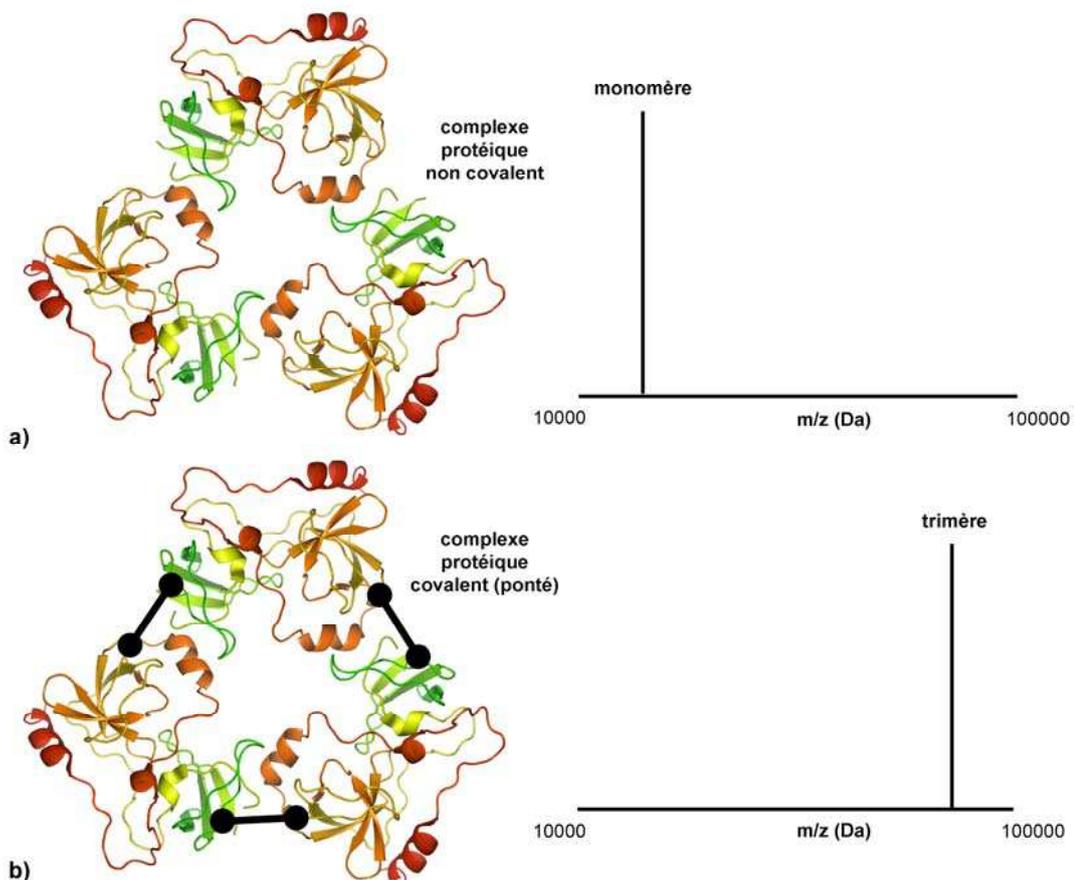


Figure 61. Principe du pontage covalent moléculaire

En faisant subir une protéolyse aux protéines pontées et en identifiant par MS/MS les peptides générés, on peut identifier les résidus ayant réagi avec l'agent pontant, d'autant que ceux-ci sont en général spécifiques de certains acides aminés. Ainsi, les esters N-hydroxysuccinimides (esters NHS), les esters imides, le glutaraldéhyde et le formaldéhyde, réagissent principalement avec les amines primaires des lysines et des extrémités N-ter (Figure 62a). Les carbodiimides, tel que l'EDC, activent les fonctions carboxyliques qui sont en contact avec des lysines (interaction ionique) et permettent ainsi la création d'une liaison amidique. Les fonctions thiols peuvent également être ciblées par des maléimides (Sinz 2003). Enfin, des agents photo-activables tel que les arylazides ou les benzophénones peuvent réaliser des réticulations non sélectives par exposition aux ultraviolets. Les agents réticulants sont dits homobifonctionnels s'ils possèdent le même groupement fonctionnel de part et d'autre du bras espaceur et hétérobifonctionnels s'ils possèdent deux groupes fonctionnels différents. De nouveaux agents dits trifonctionnels possèdent une troisième fonction, permettant par exemple de purifier les molécules pontées de manière spécifique (Trester-Zedlitz et al. 2003). Notre groupe vient de publier un article décrivant un nouvel agent réticulant permettant d'augmenter de manière spécifique le signal des peptides pontés (Paramelle et al. 2009).

L'identification des résidus pontés permet non seulement de reconstruire des assemblages multi-protéiques, mais également de donner des informations de distances inter ou intramoléculaires en utilisant des agents réticulants avec des bras de tailles variables. Le groupe de J. Loo a ainsi pu confirmer le site de liaison à la cofiline de la G-actine de levure et déterminer des distances entre les résidus impliqués dans cette interaction (Grintsevich et al. 2008) (Figure 62b).

Remarquons que pour les interactions intermoléculaires, on utilise très souvent des agents réticulants de « longueur nulle » tels que l'EDC. Des agents réticulants modifiables après réaction ont été développés dernièrement afin d'identifier rapidement les peptides ayant réagi. C'est le cas par exemple du DBB, qui devient phosphorescent après avoir réagi avec ses deux groupements fonctionnels permettant aisément de détecter par fluorescence les peptides modifiés (Sinz and Wang 2001). Enfin, des agents réticulants clivables par réduction au DTT, tels que le DTME ou le BASED, permettent d'identifier directement sur le spectre les peptides modifiés (Figure 62a).

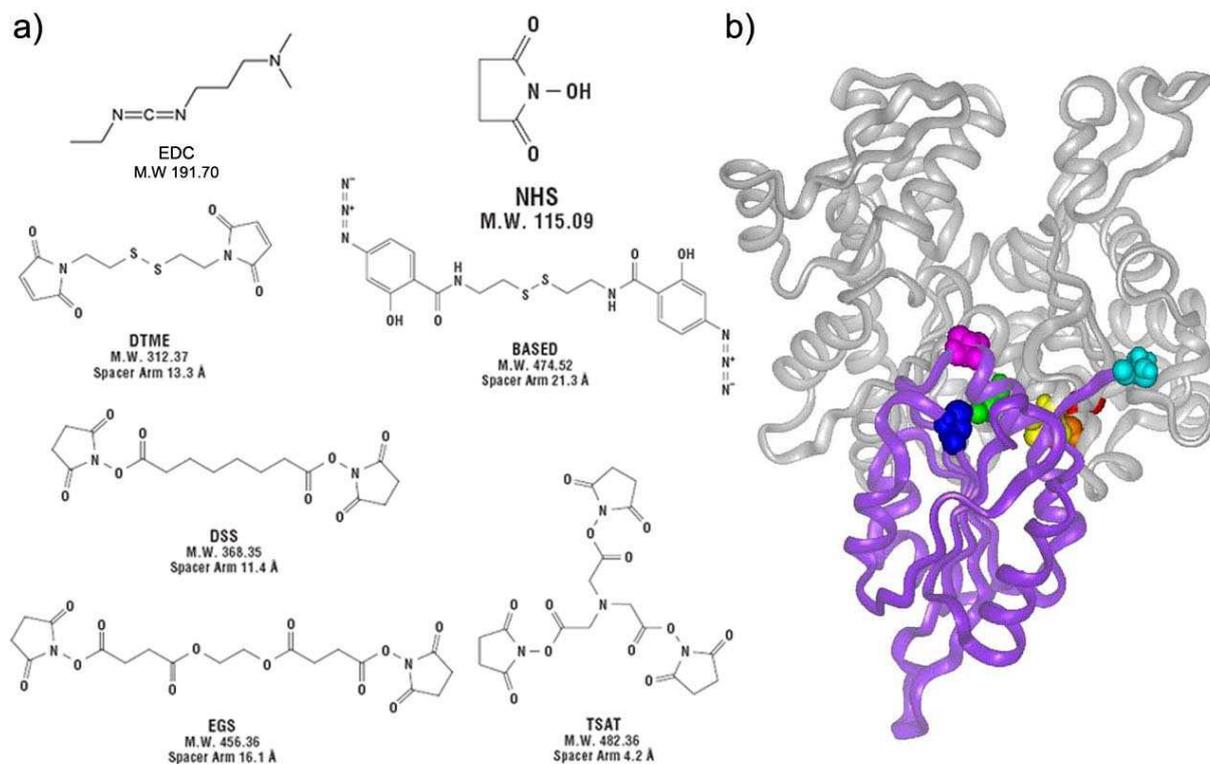


Figure 62. Modèle du complexe cofiline-G-actine déterminé par pontage covalent

a) Structures d'agents pontant mono-fonctionnels (EDC et NHS), bi-fonctionnels (DTME, BASED, DSS et EGS) et tri-fonctionnels (TSAT). Les bras espaceurs varient entre 4,2 Å (TSAT) et 21,3 Å (BASED). Le DTME et le BASED sont clivables en conditions réductrices et l'EGS est clivable à pH 8,5. L'EDC est un carbodiimide, le BASED un arylazide et les autres agents pontants représentés sont des NHS esters. **b)** La G-actine de levure et la cofiline sont représentées en grise et violette, respectivement. D'après l'étude de (Grintsevich et al. 2008), les résidus 345 (jaune) de l'actine et 62 (bleu) de la cofiline sont distants de 17 Å alors que les résidus 144 (vert) de l'actine et 95 (mauve) de la cofiline sont distants de 12 Å.

Les récentes applications du pontage moléculaire ont fait l'objet d'un grand nombre de revues recensant les différents agents réticulants utilisables ainsi que les diverses applications qu'offre cette méthode (Brymora et al. 2004; Vasilescu and Figeys 2006; Novak and Giannakopoulos 2007; Jin Lee 2008).

V. La spectrométrie de masse en conditions natives

Les fonctions cellulaires mettent très souvent en jeu des interactions non covalentes de faible énergie, par exemple entre une enzyme et un substrat, une protéine et un ligand, un récepteur et un activateur ou encore un anticorps et un antigène. Cependant, en conditions d'utilisation classique de l'électrospray, l'échantillon est ionisé à pH acide, le plus souvent après dessalage sur colonne chromatographique en phase inverse et élution avec un solvant organique tel que l'acétonitrile. Autant de conditions qui vont à l'encontre du maintien de la structure protéique tertiaire et par extension, de ces interactions non covalentes.

Les techniques conventionnelles pour détecter ce genre d'interactions, telles que la chromatographie d'exclusion stérique, le gel électrophorétique natif ou encore la centrifugation analytique sont souvent peu précises ou nécessitent une grande quantité d'échantillon.

La spectrométrie de masse dite « native » consiste à ioniser les protéines en maintenant leur structure tridimensionnelle physiologique. Pour ce faire, la force ionique doit être maintenue et le pH stabilisé entre 7 et 8. Des sels non volatils tels que l'acétate d'ammonium ou le bicarbonate d'ammonium sont utilisés, au lieu du chlorure de sodium qui perturbe la nébulisation et forme des adduits de type $M+Na^+$, $M+H+Na^{2+}$ qui compliquent le spectre et diminuent la sensibilité. Par ailleurs, les conditions de pression et de tension au niveau du cône d'extraction doivent être optimisées afin de favoriser la stabilisation des interactions non covalentes.

Une première information sur l'état structural de la protéine est donnée par les états de charges. En effet, le nombre de charge z étant dépendant de l'accessibilité au solvant, on retrouve un nombre de charges plus faible lorsque la protéine est « repliée » (Figure 63a) que lorsqu'elle est « dépliée » à pH acide (Figure 63d). En chauffant la protéine, on peut voir une transition de cet état natif à l'état dénaturé (Figure 63b et c). On peut ainsi relier le nombre de charges au nombre d'acides aminés basiques et acides en surface et donc obtenir des informations sur la stabilité de la protéine.

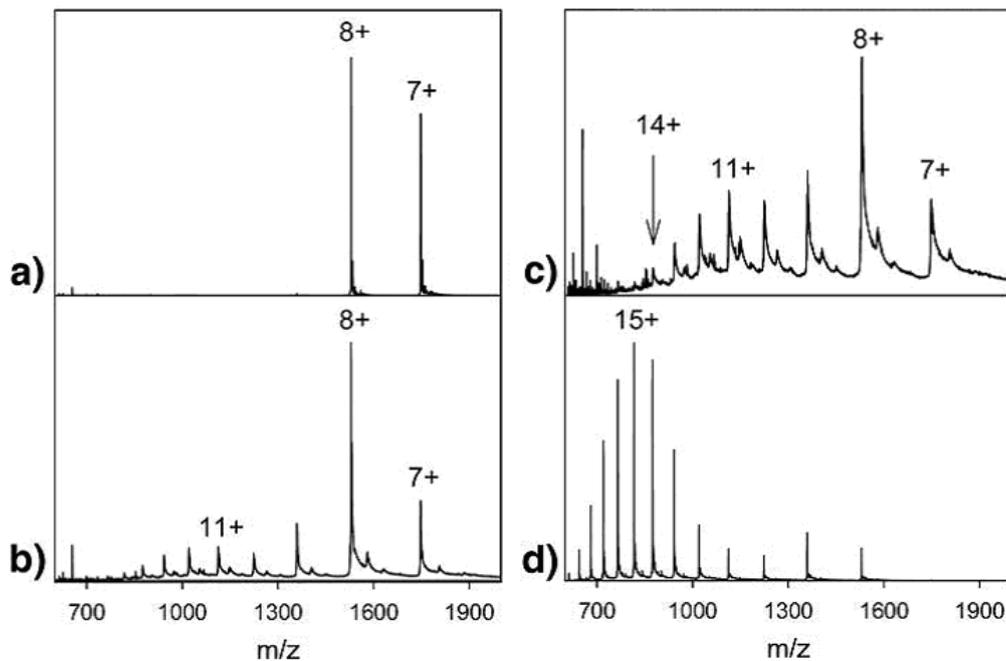


Figure 63. Effet de la dénaturation sur la répartition des états de charge

Spectres ESI du cytochrome c bovin : **a)** en conditions natives (pH 7) **b)** après une exposition à la chaleur d'une heure (pH 7) **c)** après une exposition à la chaleur de deux heures (pH 7) **d)** dénaturé à pH 2. D'après (Liu and Konermann 2009).

En plus de permettre de telles études des mécanismes de dépliement protéique (Liu and Konermann 2009), la spectrométrie de masse en conditions natives est de plus en plus utilisée pour mettre en évidence l'état oligomérique d'une protéine (Lin et al. 2009), des interactions avec toutes sortes de ligands (Rekas et al. 2004). Enfin, la spectrométrie de masse n'étant en théorie pas limitée en masse, cette méthode a ouvert l'horizon vers l'étude de complexes multienzymatiques non covalents gigantesques tels que le complexe TRAP (Ruotolo et al. 2005), le facteur d'initiation eukaryote eIF3 (Zhou et al. 2008), l'exosome (Hernandez et al. 2006), l'ATP-synthase (Esteban et al. 2008), la chaperone GroEL (Robinson 2005; van Duijn et al. 2006), les ribosomes (Benjamin et al. 1998; Videler et al. 2005) ou des assemblages de capsides virales (Morton et al. 2008) allant jusqu'à 40,5 MDa (Fuerstenau et al. 2001). Il est possible d'identifier différents sous-complexes (Figure 64) permettant de postuler sur la proximité spatiale des différentes sous-unités (Zhou et al. 2008) et, en jouant sur l'énergie d'activation, il est même possible de distinguer par exemple, si un hexamère est formé de deux trimères ou de trois dimères (Levy et al. 2008).

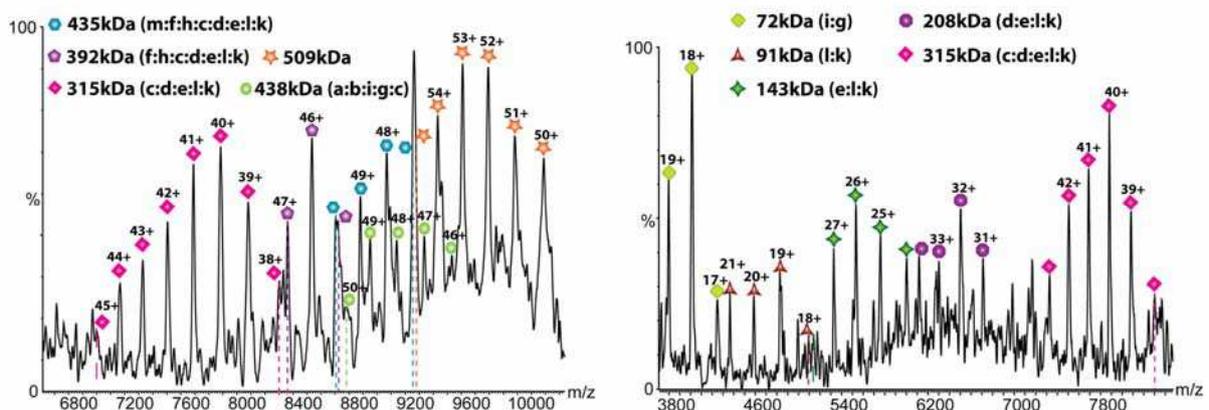


Figure 64. Différents sous-complexes du facteur d'initiation eukaryote eIF3 observés en SM native
 La stœchiométrie des 13 sous-unités (a à m) de eIF3 est indiquée ainsi que les masses des différents sous-complexes observés. D'après (Zhou et al. 2008).

Ce formidable outil permet ainsi de mieux comprendre les dynamiques d'assemblages supra moléculaires et plus largement, ce que Carol Robinson appelle la « sociologie moléculaire de la cellule » (Robinson et al. 2007).

MATERIEL ET METHODES

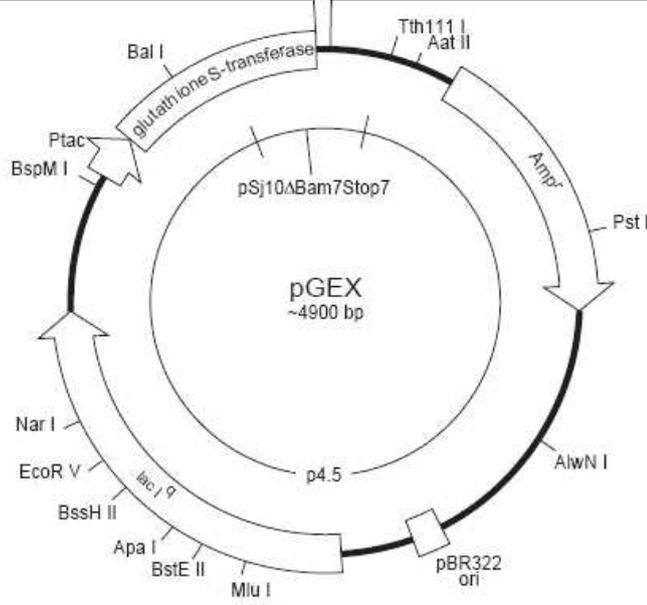
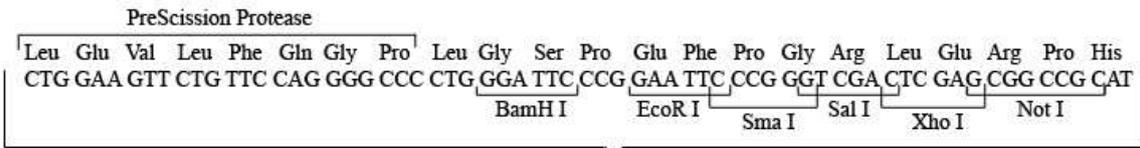
CHAPITRE I : Biologie moléculaire

I. Les plasmides utilisés

Toutes les protéines recombinantes purifiées lors de cette thèse, à l'exception des plasmepsines, ont été exprimées dans des plasmides pGEX-6P de chez GE Healthcare qui permettent la fusion Nterminale avec une étiquette glutathion-S-transferase (GST) suivie d'un site de coupure à la protéase PreScissionTM (Figure 65a). Le plasmide pGEX-6P confère la résistance à l'ampicilline. L'expression des gènes clonés dans le site de clonages multiples (PCS) est régulée par un promoteur du phage T7 dont l'inhibition par le répresseur lac est levée par ajout d'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). L'ajout d'IPTG permet ainsi d'induire l'expression de la protéine recombinante clonée au sein du PCS.

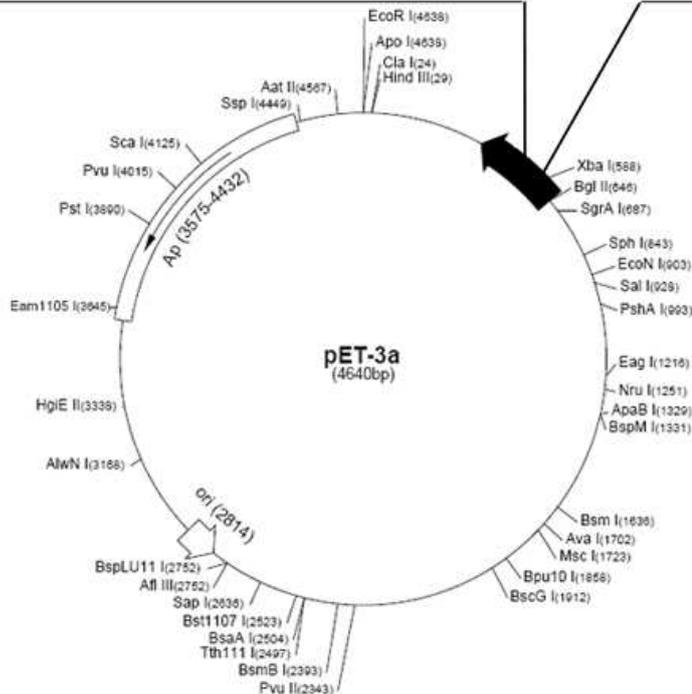
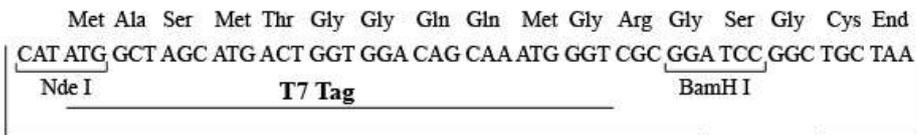
Les plasmepsines ont été surexprimées à l'aide du plasmide pET-3a de chez Novagen qui contient également un promoteur T7 inductible à l'IPTG (Figure 65b). Le polycloning site est précédé d'une étiquette T7. Contrairement aux autres protéines, toutes exprimées dans *E.coli* BL21(DE3), les plasmepsines seront exprimées dans une souche d'*E.coli* BL21(DE3) pLysS contenant un plasmide additionnel pLysS codant pour le lysozyme T7. Ce lysozyme T7 diminue l'expression basale du gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur T7 et permet ainsi de minimiser les fuites d'expression. En effet, l'expression des plasmepsines est potentiellement toxique pour la bactérie, du fait de leur activité protéolytique. Après induction à l'IPTG, la forte expression du gène d'intérêt n'est pas limitée par le lysozyme T7. Le plasmide pLysS contient un gène de résistance au chloramphénicol (marqueur de sélection).

pGEX-6P-1



a)

pET-3a



b)

Figure 65. Cartes des plasmides utilisés

a) pGEX-6P-1 b) pET-3a

II. Mutagenèse dirigée de p47^{phox}

Le plasmide original de p47^{phox} que nous avons au laboratoire possédait un double polymorphisme (C48 et E135 au lieu d'Y48 et K135). Nous avons commencé par réverter ce polymorphisme par mutagenèse dirigée avant de réaliser les autres mutations.

Les mutations D82A, K126Stop, R162A, D166A, Q197A, K199E, R202A, S303E, S304E, R314A, S328E et P343Stop ont été réalisées en utilisant le kit de mutagenèse dirigée Quick-Change Site-Directed Mutagenesis (Stratagène).

Les mutations S303E, S304E et S328E ont été réalisées successivement à partir du plasmide pGex-6P-1 contenant le gène codant pour p47^{phox}FL.

Les mutations P343Stop et K126Stop ont été réalisées à partir des plasmides pGex-6P-1 contenant les gènes codant pour p47^{phox}FL sauvage et p47^{phox}S303E/S304E/S328E-FL.

Les mutations D82A, R162A, D166A, Q197A, K199E, R202A, R314A ont été réalisées à partir des plasmides pGex-6P-1 contenant les gènes codant pour p47^{phox}ΔCter (1-342). Les doubles mutants D82A/R314A et R162A/D166A ont été obtenus par deux mutagenèses dirigées successives.

Mutation	Amorces oligonucléotidiques
D82A	5'-CCCAAGTGG TTTGCCGGGCAGCGGGC-3' 5'-GCCCGCTGCCCGCAAACCACTTGGG-3'
K126Stop	5'-GTG CGC CCT GAT GAC CTC TAA CTC CCC ACA GAC AAC CAG-3' 5'-CTG GTT GTC TGT GGG GAG TTA GAG GTC ATC AGG GCG CAC-3'
R162A	5'-CCTGCAGACGTACGCCGCCATTGCCGAC-3' 5'-GTCGGCAATGGCGGCGTACGTCTGCAGG-3'
D166A	5'-CGCGCCATTGCCGCCTACGAGAAGACC-3' 5'-GGTCTTCTCGTAGGCGGCAATGGCGCG-3'
Q197A	5'-GCGGTTGGTGGTTCTGTGCGATGAAAGCAAAGCGAG-3' 5'-CTCGCTTTGCTTTCATCGCACAGAACCACCAACCGC-3'
K199E	5'-GTGGTTCTGTCAGATGGAAGCAAAGCGAGGCTG-3' 5'-CAGCCTCGCTTTGCTTCCATCTGACAGAACCAC-3'
R202A	5'-GTCAGATGAAAGCAAAGGCAGGCTGGATCCCAGCAT-3' 5'-ATGCTGGGATCCAGCCTGCCTTTGCTTTCATCTGAC-3'
S303E	5'-CCG CCC CGC AGG GAG GAG ATC CGC AAC-3' 5'-GTT GCG GAT CTC CTC CCT GCG GGG CGG-3'
S304E	5'-CCC CGC AGG TCG GAG ATC CGC AAC GCG-3' 5'-CGC GTT GCG GAT CTC CGA CCT GCG GGG-3'
R314A	5'-CACAGCATCCATCAGGCGTCGCGGAAGCGCC-3' 5'-GGCGCTTCCGCGACGCCTGATGGATGCTGTG-3'
S328E	5'-AC GCC TAT CGC CGC AAC GAA GTC CGT TTT CTG CAG CA-3' 5'-TG CTG CAG AAA ACG GAC TTC GTT GCG GCG ATA GGC GT-3'
P343Stop	5'-CAG GCG CGG CCG GGA TAA CAG AGC CCC GGG AGC-3' 5'-GCT CCC GGG CGT CTG TTA TCC CGG CCG CGC CTG-3'

Tableau 5. Liste des oligonucléotides utilisés pour générer les mutants de p47^{phox}

L'amplification d'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR) est réalisée avec le mélange suivant :

- 1,5 µl de chaque oligonucléotide (Tableau 5) à 100 ng/µl dans tampon TE
- 1 µl de plasmide matrice à 100 ng/µl
- 1 µl de dNTP à 10 mM
- 5 µl de tampon de Pfu polymérase 10X (Stratagène)
- 1 µl de Pfu polymérase à 2,5 U/ µl (Stratagène)
- qsp 50 µl d'H₂O distillée stérile

Le protocole d'amplification de l'ADN est :

- Dénaturation : 95°C, 30 sec
- 18 cycles

{	Dénaturation : 95°C, 30 sec
	Hybridation : 55°C, 1 min
	Elongation : 68°C, 10 min
- Elongation : 68°C, 10 min

La matrice d'ADN est finalement digérée 1h à 37°C avec 1 µl de Dpn1.

III. Clonage de p22^{phox}-Cter

Afin de purifier la partie C-terminale de p22^{phox} (résidus 131-194) fusionnée à une étiquette GST, la séquence d'ADN codant pour cette région est tout d'abord amplifiée à partir d'une construction dans un vecteur pET-15b, pour être insérée dans un plasmide pGEX-6P-1 (c.f I).

Amplification du gène d'intérêt : Nous commençons le clonage par une étape d'amplification de la séquence d'intérêt avec les amorces oligonucléotidiques suivantes :

5'-GAA TTC GGA TCC ACG CCC ATC GAG CCC AAG CC-3'

BamH1

5'-GTC GAC TCG AGT CAC ACG ACC TCG TCG GTC AC-3'

Xho1 **STOP**

L'amplification d'ADN par PCR est réalisée avec le mélange suivant :

- 2,5 µl de chaque oligonucléotide à 100 ng/µl dans tampon TE
- 1 µl de plasmide matrice à 100 ng/µl
- 2 µl de dNTP à 10 mM
- 10 µl de tampon de Pfu polymérase 10X (Stratagène)

2 µl de Pfu polymérase à 2,5 U/ µl (Stratagène)

qsp 100 µl d'H₂O distillée stérile

Le protocole d'amplification de l'ADN est :

Dénaturation : 94°C, 30 sec

25 cycles {
Dénaturation : 94°C, 45 sec
Hybridation : 65°C, 1 min
Elongation : 72°C, 2 min

Elongation : 72°C, 10 min

Purification d'ADN sur gel : Les plasmides de destination et de départ ayant la même résistance à l'ampicilline, il est préférable de purifier l'ADN amplifié sur gel avec le kit « PCR purification kit » de Qiagen. 10 µl de réaction PCR sont déposés sur gel d'agarose 1%, incubé au bromure d'éthidium et soumis aux U.V afin d'être localisé. Le reste de la réaction est coupé en aveugle, solubilisé et purifié avec le kit. L'ADN purifié est finalement élué dans 30 µl d'eau distillée.

Digestion du plasmide : Le plasmide de destination (pGEX-6P-1) et le produit de la PCR sont ensuite digérés séparément avec les enzymes de restriction BamH1 et Xho1 dans les proportions suivantes :

10 µl de plasmide pGEX-6P-1 ou 30 µl de p22^{phox}Cter purifié

2 µl de chaque d'enzyme BamH1 et Xho1 à 10 U/µl (Fermentas)

12 µl de tampon de digestion tango 2X (attention à la compatibilité des tampons)

qsp 60 µl d'H₂O distillée stérile

Les deux mélanges sont incubés 3 h à 37°C puis chaque échantillon est purifié sur colonne avec le « PCR purification kit » et élué dans 30 µl d'eau distillée.

Ligation de l'ADN : Le gène d'intérêt est finalement inséré dans le plasmide d'intérêt avec le « Rapid DNA ligation kit » de Roche. Le mélange de ligation est le suivant :

1 µl de vecteur

7 µl d'insert

2 µl de dilution buffer 5X

10 µl de ligation buffer 2X

1 µl de T4 DNA ligase à 5 U/µl (Fermentas)

Le mélange est incubé 1 h à 22°C.

IV. Transformation

Que ce soit dans le cas de la mutagénèse dirigée (c.f II) ou du clonage (c.f III), les plasmides d'intérêt purifiés peuvent ensuite être introduits dans différentes souches bactériennes.

Une aliquote d'environ 200 μ l d'*E.coli* est transformée avec 1 μ l de plasmide pGEX-6P-1 contenant le gène codant pour la protéine à purifier. Le mélange est incubé pendant 1 h dans la glace puis on réalise un choc thermique pendant 1 min à 42 °C. Le tube est ensuite remis dans la glace pendant 2 min. On rajoute 200 μ l de milieu LB puis on incube 1h à 37°C. Le tube est centrifugé à 13 000 rpm pendant 1 min afin d'enlever 200 μ l de milieu LB avant d'étaler sur boîte de Pétri supplémentée en ampicilline (50 μ g/ml) et chloramphénicol (34 μ g/ml) pour la souche *E.coli* BL21(DE3)pLysS et en ampicilline (100 μ g/ml) pour les autres souches utilisées. Les bactéries sont incubées à 37°C sur la nuit.

Les souches Top10 (Invitrogen) et Neb5 α (New England Biolabs) sont utilisées pour extraire et purifier de l'ADN grâce aux kits de purification d'ADN Miniprep et Midiprep de Qiagen. Cette étape permet de faire séquencer l'ADN ou de reconstituer le stock d'ADN.

Les souches BL21(DE3) et BL21(DE3)pLysS sont utilisées pour l'expression des protéines recombinantes du complexe de la NADPH oxydase et des plasmepsines, respectivement.

Chapitre II : Expression et purification des protéines

Plusieurs constructions de p47^{phox} ont été purifiées lors de cette thèse, correspondant aux formes entière (FL) et tronquée (Δ Cter) de la protéine ainsi qu'aux modules PX, tandem SH3 ou tandem SH3 + AIR (Figure 66). D'autre part, un certain nombre de mutations ponctuelles ont été réalisées sur la forme tronquée de p47^{phox}. Enfin, d'autres protéines telles que la GST, GST-p22^{phox} ainsi que les plasmepsines 2 et 4 ont été purifiées (Figure 66). Le Tableau 6 rassemble toutes les caractéristiques biophysiques des protéines recombinantes purifiées. Certaines constructions possèdent en N-ter une dizaine de résidus supplémentaires issus des plasmides utilisés (c.f. Annexes pages 266 à 275).

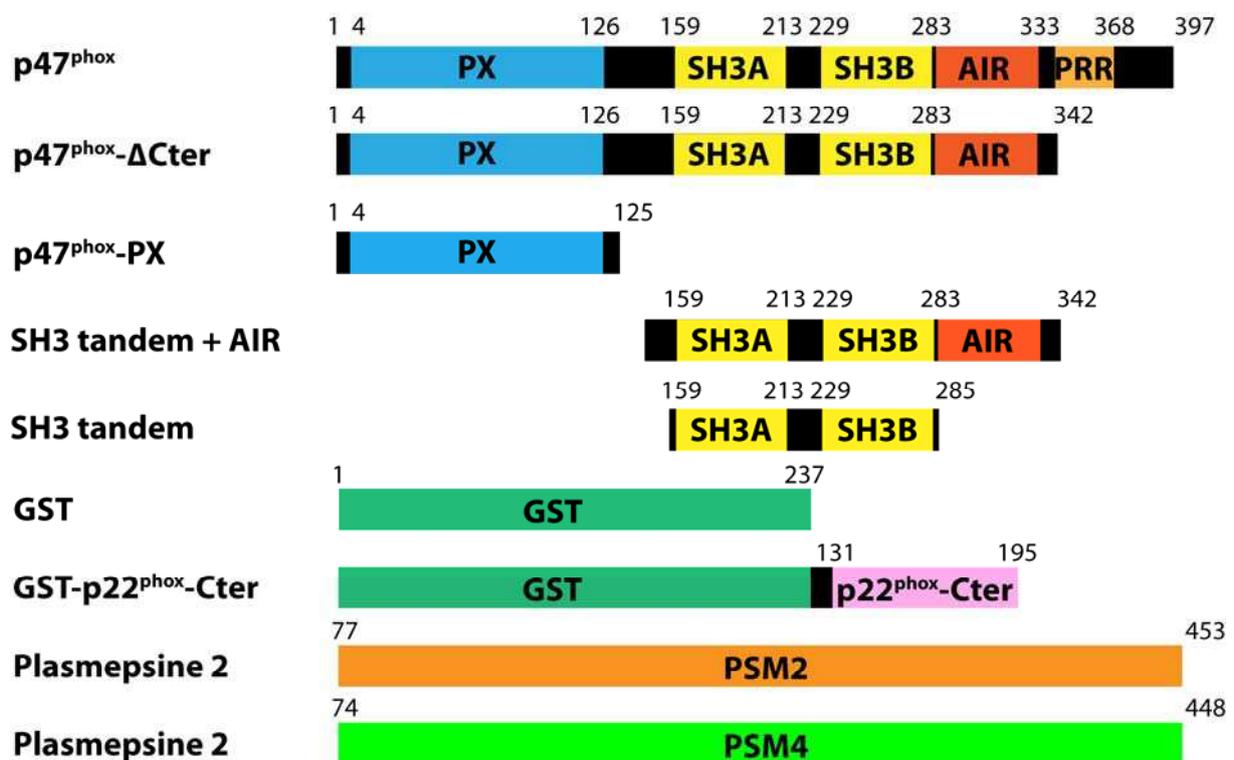


Figure 66. Représentation des protéines recombinantes purifiées lors de la thèse. Les séquences indiquées correspondent aux séquences canoniques des protéines.

I. NADPH oxydase

I.1 Formes sauvages et mutantes de p47^{phox}FL et Δ Cter et du PX

I.1.A Culture et expression

Après transformation d'une souche d'*E.coli* BL21(DE3) avec le plasmide pGEX-6P-1 contenant le gène codant pour la protéine à purifier, on réalise 100 ml de préculture en milieu

LB enrichi en ampicilline (100 µg/ml final) à partir d'une colonie prélevée sur la boîte de Pétri. On laisse les bactéries pousser à 37°C jusqu'à atteindre une densité optique (DO) proche de 0,6.

On inocule ensuite 3 litres de milieu LB enrichis en ampicilline à partir de 10 ml de la préculture. On laisse pousser à 37°C jusqu'à atteindre une DO de 0,4. Les erlens sont ensuite placés à 20°C. L'expression protéique est induite à une DO de 0,6, avec une concentration finale d'IPTG de 0,5 mM. L'expression continue toute la nuit à 20°C.

Les bactéries sont centrifugées 20 min à 4000 rpm et 4°C (dans des pots de 1 L puis dans des Falcon de 50 ml). On peut éventuellement congeler les culots à -80°C et poursuivre la purification un autre jour.

I.1.B Lyse cellulaire

Un culot correspondant à 1,5 L de culture est repris dans environ 40 ml de tampon de lyse (50 mM Tris pH=7,5 ; 300 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 2 mM DTT ; 1 tablette « complete w/o EDTA »). Il est important de bien vérifier le pH à chaque purification (risque de précipitation) et de bien conserver le tampon de lyse dans la glace. Les inhibiteurs de protéases sont à mettre juste avant utilisation et seulement pour lyser les cellules (pas pour équilibrer la colonne Glu-Seph. par ex...). La suspension bactérienne est répartie dans 2 Falcon de 50 ml et soniquée pendant 2 min efficaces (1 sec → 9 sec pause) puis passer deux fois sur presse de French.

I.1.C Chromatographie d'affinité

Après ultracentrifugation (40 min à 40 000 rpm), le surnageant est récupéré et déposé sur une colonne de chromatographie d'affinité Glu-Sepharose 4B de 30 ml, préalablement équilibrée en tampon de lyse (sans inhibiteurs de protéases). L'échantillon est passé à 1 ml/min, lavé avec au moins 50 ml de tampon de lyse puis élué avec au moins 60 ml de tampon d'éluion (50 mM Tris pH=7,5 ; 10 mM Glutathion ; 50 mM NaCl). Des fractions de 1 ml sont récupérées et une aliquote est conservée pour déposer sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 12 %. Les fractions intéressantes sont rassemblées et les protéines sont digérées sur la nuit à 4°C avec l'enzyme Prescission (70 Unités Enz pour 40 mg de protéine ; solution d'enzyme à 2 U/µl).

I.1.D Chromatographie échangeuse de cations

En raison de la précipitation liée à la digestion, la solution de protéine est filtrée (0,45 µm) puis le surnageant est déposé à 1 ml/min sur colonne échangeuse de cation SP-sepharose (25ml) préalablement équilibrée avec le tampon C (50 mM Hepes pH=7,5 ; 50 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 2 mM DTT). La colonne est lavée à 1 ml/min avec du tampon C (1 ml/min) puis les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de C vers C' (50 mM Hepes pH=7,5 ; 500 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 2 mM DTT). Nous récupérons 90 ml à 1 ml/min (fractions de 1ml). 10 µl de chaque fraction sont déposés sur gel SDS-Page à 12 %.

Les fractions intéressantes sont rassemblées et concentrées sur Amicon Ultra4 (cut-off de 10 kDa). La concentration est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Cary 50, Varian). Les échantillons sont congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

I.2 Tandem SH3 + AIR

1 ml de p47^{phox}WT ΔCter à 6,5 mg/ml est dilué 10 fois dans 50 mM Hepes pH = 7,5, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, puis digéré par protéolyse ménagée avec 0,5 ‰ de chymotrypsine pendant 1h. La réaction est stoppée par ajout de 1mM PMSF. Les résidus 140-342 sont ensuite séparés des autres peptides par chromatographie échangeuse d'anion MonoS avec un gradient linéaire de C vers C'. L'échantillon est concentré à 1,02 mg/ml et stocké à -80°C.

I.3 Etiquette GST

Lors de la purification du domaine PX, l'étiquette GST est récupérée dans le flow-through après dépôt sur SP-sepharose (après digestion à la Prescission). L'échantillon est concentré à 10 mg/ml et stocké à -80°C.

I.4 Tandem SH3

L'équipe de Vincent Jaquet à Genève nous a donné un plasmide pGEX-6P-1 codant pour les résidus 156-185 correspondant au tandem SH3 de p47^{phox}.

I.4.A Culture et expression

Une souche BL21(DE3) est transformée avec 1 µl de ce plasmide. Une colonie est prélevée sur boîte de Pétri +ampicilline et une préculture de 50 ml LB + ampicilline (10 µg/ml) est incubée à 37°C sur la nuit. Le lendemain, 3 litres de LB + ampicilline (10 µg/ml) sont incubés avec la préculture. Lorsque la DO atteint 0,6, l'expression protéique est induite pendant 3h à 27 °C, avec 1 mM IPTG. Les bactéries sont centrifugées 15 min à 4500 rpm et 4°C (dans des pots de 1 L puis dans des Falcon de 50 ml). On peut éventuellement congeler les culots à -80°C et poursuivre la purification un autre jour.

I.4.B Lyse cellulaire et purification

Les culots sont repris dans 15 ml de tampon de lyse (50 mM Tris pH=7,0 ; 300 mM NaCl ; 2 mM EDTA ; 4 mM DTT ; 1 tablette d'inhibiteur de protéases de Roche) puis soniqués une seconde pour casser l'ADN. Les cellules sont lysées par deux passages à la presse de French puis centrifugées 35 min à 13 500 rpm.

Le surnageant est déposé à 0,5 ml/min sur une colonne d'affinité GSTrap à 4°C. La colonne est ensuite lavée avec 50 ml de tampon A (50 mM Tris pH=7,0 ; 1 M NaCl ; 2 mM EDTA ; 4 mM DTT) puis 100 ml de tampon B (50 mM Tris pH=7,0 ; 50 mM NaCl ; 2 mM EDTA ; 4 mM DTT). Le tandem SH3 est élué avec 50 ml de tampon d'éluion (50mM Tris pH=7,5 ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 10mM glutathion réduit). L'étiquette GST est digérée sur la nuit à 4°C avec la protéase prescission (70 µl dans 6 ml).

La protéine est ensuite précipitée avec 60% de sulfate d'ammonium pendant 1h à 4°C et resuspendue dans 4 ml de tampon C (25mM Tris pH=7,0 ; 150mM NaCl ; 1mM DTT ; 1mM EDTA). L'étiquette GST est finalement séparée du tandem SH3 par deux passages sur colonne de gel filtration Superdex 75 (124ml) préalablement équilibrée avec 3 volumes de colonnes de tampon C. Les fractions intéressantes sont rassemblées et concentrées sur Amicon Ultra4 (cut-off de 10 kDa). Les échantillons sont congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

I.5 GST-p22^{phox}-Cter

Une souche d'*E.coli* BL21(DE3) est transformée avec 1 µl de plasmide pGEX-6P-1 contenant la séquence codant pour la partie C-terminale de p22^{phox} (résidus T131-V194).

Le protocole d'expression et d'induction est identique à celui de p47^{phox} (c.f I.1).

Les culots cellulaires sont repris dans du tampon de lyse (50 mM Tris pH=8,0 ; 300 mM NaCl ; 2 mM DTT ; 2 mM MgCl₂ ; DNase ; 1 tablette « complete EDTA free») et les cellules sont lysées par deux passages sur presse de French.

Après centrifugation (1 h à 35 000 rpm, 4°C), le surnageant est déposé à 1 ml/min sur une colonne GSTrap de 5 ml équilibrée en tampon de lyse. L'échantillon est lavé avec 100 ml de tampon de lyse et élué avec du tampon d'éluion (50 mM Tris pH=8,0 ; 10 mM glutathion ; 100 mM NaCl). Les fractions intéressantes sont rassemblées et concentrées sur Amicon Ultra4 (cut-off de 10 kDa). Les échantillons sont congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

Protéine	Fragment	MW (Da)	Nbre A.A	Pi	ϵ
GST-p47 ^{phox} FL	1-397	72718,49	633	7,72	101355
p47 ^{phox} FL	1-397	46364,8	407	9,38	59610
p47 ^{phox} S303E/S304E/S328E-FL	1-397	46490,91	407	8,98	59610
p47 ^{phox} Δ CTer	1-342	40399,02	352	9,27	59485
p47 ^{phox} S303E/S304E/S328E- Δ CTer	1-342	40525,13	352	8,67	59485
p47 ^{phox} D82A- Δ CTer	1-342	40355,01	352	9,39	59485
p47 ^{phox} R314A- Δ CTer	1-342	40313,92	352	9,11	59485
p47 ^{phox} D82A/R314A- Δ CTer	1-342	40269,91	352	9,27	59485
p47 ^{phox} R162A/D166A- Δ CTer	1-342	40269,91	352	9,27	59485
p47 ^{phox} R162A- Δ CTer	1-342	40313,92	352	9,11	59485
p47 ^{phox} D166A- Δ CTer	1-342	40355,01	352	9,39	59485
p47 ^{phox} Q197A- Δ CTer	1-342	40341,97	352	9,27	59485
p47 ^{phox} K199E- Δ CTer	1-342	40399,97	352	8,93	59485
p47 ^{phox} R202A- Δ CTer	1-342	40313,92	352	9,11	59485
p47 ^{phox} PX	1-125	15757,28	135	9,23	18450
p47 ^{phox} (SH3) ₂ + AIR	140-342	23014,92	203	9,01	39420
p47 ^{phox} (SH3) ₂	156-285	15384,25	138	4,12	37930
GST	1-226	26430,8	226	5,68	43110
Plasmepsine 2	78-453	43583,68	389	5,12	43570
Plasmepsine 4	74-448	43680,48	389	4,68	49530
GST-p22 ^{phox} -Cter	131-194	33428,69	295	5,79	42860

Tableau 6. Caractéristiques biophysiques des protéines recombinantes purifiées

La numérotation de la deuxième colonne correspond aux séquences canoniques du site <http://www.uniprot.org/>. Les points isoélectriques (Pi) et les coefficients d'extinction (ϵ en M⁻¹.cm⁻¹) sont ceux des formes réduites fournies par l'outil ProtParam du serveur Expasy (<http://expasy.org/tools/protparam.html>).

II. Plasmepsines 2 et 4

II.1 Culture et expression

Nous disposons de stocks glycérol de deux souches d'*E.coli* BL21(DE3) préalablement transformées avec les plasmides pET-3-a, contenant les gènes codant pour les plasmepsines 2 (résidus 78-453) et 4 (résidus 74-448). Le protocole de purification est identique pour ces deux isoformes. Une préculture de 100 mL de milieu LB avec de l'ampicilline (50 µg/ml) et du chloramphenicol (34 µg/ml) est inoculée avec le stock glycérol et incubée sur la nuit à 37°C. Le lendemain, 3 litres du même milieu sont inoculés avec 10 ml de la préculture et nous laissons pousser les bactéries sous agitation, à 37°C, jusqu'à une DO de 0,6. L'expression est induite par ajout de 1 mM IPTG. Les cellules sont récoltées par centrifugation (40 min à 40 000 rpm) après 3 h d'induction et les culôts sont pesés puis conservés à -20°C.

II.2 Extraction et purification des corps d'inclusion

Les culôts sont resuspendus dans le tampon 1 (10 mM Tris pH=8,0 ; 20 mM MgCl₂ ; 5 mM CaCl et 60 U/ml de DNase I), à raison de 4,2 ml par g de cellules. Les cellules sont lysées à l'aide d'une presse de French (2 passages). La suspension cellulaire est ensuite déposée sur 10 ml de sucrose à 27% et centrifugée à 12 000 x g pendant 45 min à 4°C. Une aliquote du supernageant est conservée et le culot est resuspendu dans 5 ml de tampon 2 (10 mM Tris pH=8,0 ; 1 mM EDTA ; 2 mM β-mercaptoéthanol ; 100 mM NaCl). La resuspension est déposée de nouveau sur 10 ml de sucrose à 27% et à 12 000 x g pendant 45 min à 4°C. Une aliquote du supernageant est conservée et le culot est resuspendu dans 15 ml de tampon 3 (50 mM Tris pH=8,0 ; 5 mM EDTA ; 5 mM β-mercaptoéthanol ; 0,5% Triton X-100). La resuspension est transférée dans des tubes propres et centrifugées 15 min à 12 000 x g et 4°C. Une aliquote du supernageant est conservée et le culot est resuspendu dans 40 ml de tamon 4 (50 mM Tris pH=8,0 ; 5 mM EDTA ; 5 mM β-mercaptoéthanol). La resuspension est transférée dans des Falcon de 50 ml pré-pesés et centrifugée à 12 000 x g pendant 15 min à 4°C. Une aliquote du supernageant est conservée et le culot final (corps d'inclusion purifiés) est pesé. Les corps d'inclusion sont resuspendus dans un tampon Tris-EDTA (50 mM Tris ; EDTA 5 mM) à une concentration finale de 100 mg/ml et conservés à -80°C.

II.3 Refolding et purification des protéases

Une solution d'urée 8M est préparée, à raison d'un ml par mg de corps d'inclusion à purifier. 5 à 10 g de résine Dowex échangeuse d'ions sont ajoutés à l'urée et mélangés pendant 30 min afin d'éliminer les produits d'hydrolyse de l'urée produits par chauffage lors de sa dissolution. La résine est éliminée en utilisant une colonne de gravité (Biorad). Le CAPS 50 mM, l'EDTA 5 mM et le β -mercaptoéthanol 200 mM sont rajoutés à l'urée.

Les corps d'inclusion sont repris dans cette solution pendant 2 h puis transférés dans un boudin de dialyse (Spectra-Por MWCO 6-8 kDa). Ils sont ensuite dialysés contre un volume 100 fois plus important de tampon Tris-EDTA, qui sera échangé 3 fois.

Après dialyse, la protéine est chargée sur une colonne échangeuse d'anions Hi Trap Q HP (GE Healthcare), lavée du tampon Tris-EDTA et éluée avec du Tris 20 mM pH=8,0 et du NaCl 500 mM, à 1 ml/min. On utilise un gradient linéaire de 15 min entre les tampons de lavage et d'éluion. Les fractions intéressantes sont rassemblées et concentrées sur Amicon Ultra4 (cut-off de 10 kDa). Les échantillons sont congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

Chapitre III : Méthodes de caractérisation des protéines

I. Gel SDS-PAGE

Les gels SDS-PAGE signalés à 12% d'acrylamide dans le manuscrit ont été réalisés selon le protocole de fabrication des gels Tris-glycine. Les quantités données ci-dessous sont pour 1 gel :

<u>Gel de migration :</u>		<u>Gel de concentration :</u>	
H ₂ O	1,6 ml	H ₂ O	680 μ l
Acrylamide à 30 %	2,0 ml	Acrylamide à 30 %	170 μ l
1,5 M Tris pH=8,8	1,3 ml	1,0 M Tris pH=6,8	130 μ l
10 % SDS	50 μ l	10 % SDS	10 μ l
10 % APS	50 μ l	10 % APS	10 μ l
TEMED	2 μ l	TEMED	1 μ l

Les protéines migrent dans du tampon LAEMMLI (25 mM Tris ; 0,1 % SDS p/v ; 250 mM glycine pH=8,3), à 220 V, 1100 mA, pendant 45 min. Le gel est coloré au bleu de Coomassie pendant 20 min puis décoloré pendant 20 min (30 % éthanol, 10 % acide acétique, 60 % H₂O).

II. Fluorescence des tryptophanes

L'interaction potentielle du celastrol avec p47^{phox} est étudiée en observant sa capacité à quencher la fluorescence des tryptophanes, c'est à dire en diminuant son émission entre 310 nm et 380 nm.

Les expériences sont réalisées sur un spectrofluoromètre (Photon Technology International) à une longueur d'onde d'excitation de 295 nm et l'émission est enregistrée entre 310 nm et 380 nm. La lampe est soumise à une puissance de 70 W et l'amplification du signal est fixée à 1 V. Les deux fentes entre la lampe et la cuve sont ouvertes à 2 mm (1 tour) et les deux fentes entre la cuve et le détecteur sont ouvertes à 4 mm (2 tours).

La concentration totale en tryptophane nécessaire est de l'ordre du 2 μ M. p47^{phox} possédant 7 résidus tryptophane, nous utiliserons des concentrations de l'ordre de 140 nM. Les solutions stock étant concentrées autour de 100 à 200 μ M, nous pouvons diluer la protéine environ 500 fois dans le tampon de travail (50 mM Hepes pH=7,5 ; 500 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 2 mM DTT ; 10 % glycérol).

Une fois la protéine ajoutée au tampon, la cuve est équilibrée 30 min à température ambiante. Une solution de celastrol à 10 mg/ml (22,2 mM) dans 100 % DMSO est diluée 100 fois dans H₂O avant son ajout dans la cuve. Nous étudions différents ratios stoechiométriques protéine.celastrol ainsi que l'effet du celastrol au cours du temps pour un ratio donné. Les mesures d'émission de fluorescence sont alors prises à des temps réguliers après l'ajout de celastrol. Les mesures n'excèdent pas les 20 min, pour des raisons de stabilité de la protéine dans le tampon.

Une cuve contrôle ne possède que du tampon et le signal ainsi obtenu est soustrait de chacun des spectres réalisés avec la protéine. Nous réalisons également une cuve avec 2 μ M N-acetyl-tryptophanamide (NATA, analogue du tryptophane), afin de contrôler l'éventuel effet du celastrol sur un tryptophane qui serait totalement accessible au solvant. Enfin, nous réalisons une cuve dans laquelle nous remplaçons le celastrol par du DMSO afin de nous assurer que celui ci n'influe pas sur la fluorescence de p47^{phox}.

III. Tests fonctionnels

III.1 Tests d'interaction p47^{phox}-phospholipides

III.1.A Co-précipitation avec des liposomes

III.1.A.1 Formation des liposomes

Afin de protoner le 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phosphoinositol-3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P₂; MW :1074,17), commercialisé par Avanti Polar Lipids sous forme de poudre, celui-ci est tout d'abord resuspendu dans 1 ml de CHCl₃ : MeOH : 1M HCl (v/v 2 :1 :0,01). Le solvant est ensuite évaporé sous flux d'azote et l'échantillon est lyophilisé pendant 1 heure. Ce cycle resuspension/évaporation sous azote est réalisé encore deux fois et les 0,5 mg de PtdIns((3,4)P₂ sont finalement repris dans 1 ml de CHCl₃ pour donner une concentration finale de 0,5 mg/ml.

Les autres lipides achetés chez Avanti Polar Lipids, à savoir la 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE ; MW : 718,01), la 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC ; MW : 760,1) et la 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (POPA ; MW : 696,92), sont vendus à 10 mg/ml, dans du CHCl₃.

Nous réalisons trois types de liposomes ou vésicules multi-lamellaires (MLV) selon les proportions stœchiométriques suivantes :

MLV1 : POPC : POPE (50 : 50)

MLV2 : POPC : POPE : POPA : PtdIns(3,4)P₂ (45 : 45 : 5 : 5)

MLV3 : POPC : POPE : POPA : PtdIns(3,4)P₂ (74 : 20 : 3 : 3)

On prépare 200 µl de chaque MLV à 2 mM total :

MLV1 : 1 mM POPC soit 15,2 µl à 13,16 mM

1 mM POPE soit 14,3 µl à 13,93 mM

170,5 µl de CHCl₃

MLV2 : 0,9 mM POPC soit 13,7 µl à 13,16 mM

0,9 mM POPE soit 12,9 µl à 13,93 mM

0,1 mM POPA soit 1,4 µl à 14,35 mM

0,1 mM PtdIns(3,4)P₂ soit 43,0 µl à 0,465 mM

129,0 µl de CHCl₃
MLV3 : 1,48 mM POPC soit 22,5 µl à 13,16 mM
0,4 mM POPE soit 5,7 µl à 13,93 mM
0,06 mM POPA soit 0,84 µl à 14,35 mM
0,06 mM PtdIns(3,4)P₂ soit 25,8 µl à 0,465 mM
129,0 µl de CHCl₃

Ces solutions sont mélangées puis le solvant est évaporé sous flux d'azote. Les lipides sont ensuite repris dans 200 µl de tampon d'interaction (20 mM Tris pH=7,4 ; 100 mM NaCl ; 1 mM DTT) et hydratés 2 h sur la glace avant d'être vortexés pour former les liposomes [Patki, 1997 #414; Takeuchi, 1998 #415]. Ceux-ci seront conservés à -20 °C.

III.1.A.2 Test de co-précipitation avec les liposomes

5 µM de protéines sont incubés avec 1 mM de lipides dans 100 µl final de tampon d'interaction, soit 500 pmol de protéines et 50 µl de MLV à 2 mM. Le mélange est incubé 15 min à température ambiante puis centrifugé soit 45 min à 13 000 rpm dans un rotor 100.4 TLA soit 1 h à 100 000 g dans un rotor Airfuge (Beckman Coulter). Le surnageant est séparé du culot qui est repris dans 100 µl de bleu de charge dénaturant. Les différentes fractions sont déposées sur gel SDS-PAGE à 12 % et l'intensité des bandes est quantifiée directement sur le gel par densitométrie (Gel Doc 2000, Biorad). Le rapport correspondant aux intensités des bandes culot/surnageant est calculé, pour représenter la proportion relative de protéines ayant interagit avec les lipides. Les MLV1 servent de contrôle négatif pour les liposomes puisqu'ils ne contiennent pas de phospholipides spécifiques du domaine PX de p47^{phox} et la BSA est utilisée comme contrôle positif pour les protéines puisqu'elle n'interagit pas avec les lipides.

III.1.B Résonance Plasmonique de Surface (Biacore™)

III.1.B.1 Formation des MLV et des SUV

Pour les études d'interaction p47^{phox}-liposomes par Biacore™, nous réalisons de nouvelles vésicules multi-lamellaires (MLV4 et 5) ainsi que des petites vésicules uni-lamellaires (SUV4 et 5), selon les proportions suivantes :

MLV et SUV 4 : POPC : POPE (80 : 20)

MLV et SUV 5 : POPC : POPE : PtdIns(3,4)P₂ (77 : 20 : 3)

On prépare 1,5 ml de chaque MLV à 0,1 mM total :

MLV et SUV4 : 80 μ M POPC soit 9,15 μ l à 13,16 mM
 20 μ M POPE soit 2,1 μ l à 13,93 mM
 200 μ l de CHCl_3

MLV et SUV5 : 77 μ M POPC soit 8,8 μ l à 13,16 mM
 20 μ M POPE soit 2,1 μ l à 13,93 mM
 3 μ M PtdIns(3,4) P_2 soit 9,7 μ l à 14,35 mM
 200 μ l de CHCl_3

Ces solutions sont mélangées puis le solvant est évaporé sous flux d'azote. Les lipides sont ensuite repris dans 1,5 ml de tampon d'interaction (20 mM Tris pH=7,2 ; 100 mM NaCl ; 0,1 mM DTT) et hydratés 2 h sur la glace avant d'être vortexés pour former les liposomes (Shen et al. 2008). Ceux-ci seront conservés à -20 °C.

Les SUV sont formés à partir des MLV par 19 cycles d'extrusion avec une membrane de 0,1 μ m. Le nombre de cycles doit être impair, afin de récupérer les SUV formés dans la seringue n'ayant pas été contaminée par les MLV.

III.1.B.2 Fonctionnalisation des surfaces L1 et HAP

Les surfaces L1 sont fonctionnalisées avec du dextran carboxyméthylé auquel des groupes lipophiles sont liés covalamment. Elles permettent ainsi la fixation directe des liposomes et la formation d'une bicouche lipidique. Elles permettent ainsi l'étude d'interaction avec des protéines transmembranaires ou avec des lipides.

Les surfaces HPA sont fonctionnalisées avec des résidus alcane-thiols directement liés à la surface d'or. Il en résulte une surface hydrophobe qui facilite l'adsorption d'une monocouche lipidique. Ces surfaces sont donc dédiées uniquement à l'interaction d'un ligand avec les lipides.

Ces surfaces sont équilibrées avec du tampon de course (25 mM Hepes pH=7,2 ; 150 mM NaCl) puis fonctionnalisées en injectant à 5 μ l/min des MLV ou des SUV à 0,1 mM jusqu'à obtenir un signal d'environ 6000 RU (unités de réponse). Les protéines sont ensuite injectées à 5 μ l/min.

III.2 Tests d'interaction p47^{phox}-p22^{phox}Cter

II.2.A Co-sédimentation

150 pmol de GST-p22^{phox}Cter sont incubées avec 300 pmol de p47^{phox}FL ou p47^{phox}S303/304/318E-FL pendant 30 min à 4 °C dans 200 µl de tampon d'interaction (137 mM NaCl ; 2,68 mM KCl ; 8,1 mM Na₂HPO₄ ; 1,47 mM KH₂PO₄ pH=7,4). Les mélanges sont ensuite incubés avec 50 µl de billes GST-sepharose pendant 30 min à 4 °C. Les billes sont lavées trois fois avec 200 µl de tampon d'interaction puis éluées avec 200 µl de tampon d'éluion (100 mM Tris-HCl pH=8,0 ; 10 mM glutathion réduit). 10 µl de chaque fraction (flow through, lavages 1 à 3, éluion) sont déposés sur gel SDS-PAGE à 12 %.

III.2.B Gel filtration

300 µg de p47^{phox} et de p22^{phox}Cter sont incubés 30 min à température ambiante, dans un volume total de 500 µl de tampon d'interaction (137 mM NaCl ; 2,68 mM KCl ; 8,1 mM Na₂HPO₄ ; 1,47 mM KH₂PO₄ pH=7,4). La colonne de gel filtration Superdex 75 est équilibrée avec le tampon d'interaction. La boucle d'injection est tout d'abord lavée en position LOAD. La seringue est enlevée en position INJECT et l'échantillon est chargé en position LOAD. L'injection, ainsi que l'éluion à 1 ml/min sont automatiquement déclenchées par le programme. Les fractions correspondant aux pics d'éluions sont déposées (20 µl) sur gel SDS-PAGE à 12 %.

III.2.C Résonance Plasmonique de Surface (Biacore™)

Les expériences de résonance plasmonique de surface sont réalisées avec un Biacore™ 3000 (Biacore™) équipé avec une sensor chip CM4. Ces surfaces d'or sont fonctionnalisées avec du dextran carboxyméthylé. Les protéines peuvent être liées covalamment aux groupes carboxyles du dextran via leurs fonctions amines, thiols, aldéhydes ou carboxyles. Les surfaces CM4 possèdent moins de groupes carboxyméthyles que les surfaces CM5, ce qui leur confère une charge négative moindre et en fait une cible de choix pour les molécules chargées négativement telles que les protéines.

La surface est tout d'abord équilibrée avec du tampon de course (137 mM NaCl ; 2,68 mM KCl ; 8,1 mM Na₂HPO₄ ; 1,47 mM KH₂PO₄ pH=7,4 et 0,005 % surfactant P20). 70 µl de NHS et 70 µl d'EDC sont mélangés et 50 µl de ce mélange sont injectés à 5 µl/min pour activer la surface. 10 µl de GST-p22^{phox}Cter diluée à 78,15 nM dans 20 mM d'acétate d'ammonium pH=5,0 sont ensuite injectés pour fonctionnaliser la surface. Celle-ci est finalement saturée avec 30 µl d'éthanolamine. Toutes les expériences sont réalisées à 20 °C et à 20 µl/min. Après chaque injection, la surface est régénérée avec l'injection de 10 µl de 10 mM NaOH à 20 µl/min. Pour chaque injection de p47^{phox} (60 µl), un contrôle négatif est effectué en parallèle sur une autre piste fonctionnalisée avec 10 µl de GST diluée à 78,15 nM dans 20 mM d'acétate d'ammonium pH=5,0 afin de soustraire les interactions non spécifiques. Les différentes concentrations de p47^{phox} sont injectées en commençant de la concentration la plus faible à la concentration la plus élevée, afin d'éviter un éventuel effet de saturation (au cas où la surface serait mal régénérée). D'autre part, nous observons une certaine dégradation de la surface lors de sa régénération. Ceci entraîne notamment une dérive de la ligne de base. Afin de minimiser les effets de cette dégradation, nous injectons toutes les constructions de p47^{phox} à une concentration donnée avant de passer à une autre concentration (gamme croisées). Enfin, les données sont analysées avec le logiciel BIAevaluation, en prenant en compte la dérive de la ligne de base (drifting baseline fit).

Chapitre IV : Spectrométrie de masse

I. MALDI-TOF

Les protéines ou peptides sont dilués en cascade dans 0,1 % TFA pour atteindre des concentrations allant de 1 à 50 μM . On dépose ensuite 1 μl de ces différentes concentrations sur la plaque MALDI et on rajoute 1 μl de matrice que l'on mélange avec le pipetman plusieurs fois. L'acide sinapinique (dans 0,1 % TFA) est utilisé pour les protéines et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (alpha-cyano ou matrice alpha 4) pour les peptides. Après évaporation du solvant, la plaque est insérée dans le MALDI-TOF (Autoflex, Bruker Daltonics) pour l'acquisition des données.

II. Echange hydrogène/deutérium

II.1 Cartographie

II.1.A Digestion protéolytique acide

200 pmol de p47^{phox} sont digérées par différentes protéases :

- La pepsine issue de muqueuse stomacale de porc (Sigma Aldrich)
- La protéase type XIII issue du champignon *Aspergillus saitoi* (Sigma Aldrich)
- La protéase type XVIII ou Rhizopuspepsine issue de champignons du genre *Rhizopus* (Sigma Aldrich)

La digestion est effectuée en milieu acide pendant 2 min à 0°C.

On utilise des rapports protéine/protéase (w/w) de 1/1, 1/12 et 1/15 pour la pepsine, la protéase type XIII et la protéase type XVIII, respectivement.

Les mélanges réactionnels sont les suivants :

- 4 μl p47^{phox} (50 μM) + 5,5 μl pepsine (1,7 mg/ml) + 4,5 μl 110 mM H_3PO_4 pH=1,6 + 36 μl 10 mM citrate pH=4,5
- 4 μl p47^{phox} (50 μM) + 7 μl protéase type XIII (16 mg/ml) + 3 μl 110 mM H_3PO_4 pH=1,6 + 36 μl 10 mM citrate pH=4,5

- 4 μl p47^{phox} (50 μM) + 8,8 μl protéase type XVIII (16 mg/ml) + 1,2 μl 110 mM H₃PO₄ pH=1,6 + 36 μl 10 mM citrate pH=4,5

II.1.B Séparation des peptides par chromatographie liquide

Les peptides ainsi obtenus sont directement chargés sur une colonne de dessalage MacroTrap (C8, Michrom Bioresources) où ils sont lavés pendant 1 min à 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ avec 0,03 % TFA (solvant A). Les peptides sont ensuite élués et séparés progressivement sur une colonne en phase inverse C18 (1 mm \times 100 mm, Interchrom) par un gradient d'acétonitrile (ACN). Ce gradient de 45 min est effectué par paliers de 8 min entre 0 % et 45 % de solvant B (95 % ACN ; 0,03 % TFA). Afin d'obtenir les mêmes digestions que lors des expériences d'échange H/D, nous réalisons ces expériences à 0°C et utilisons donc un montage « maison » nous permettant d'immerger les vannes, la MacroTrap et la colonne dans un bain de glace (Figure 67).

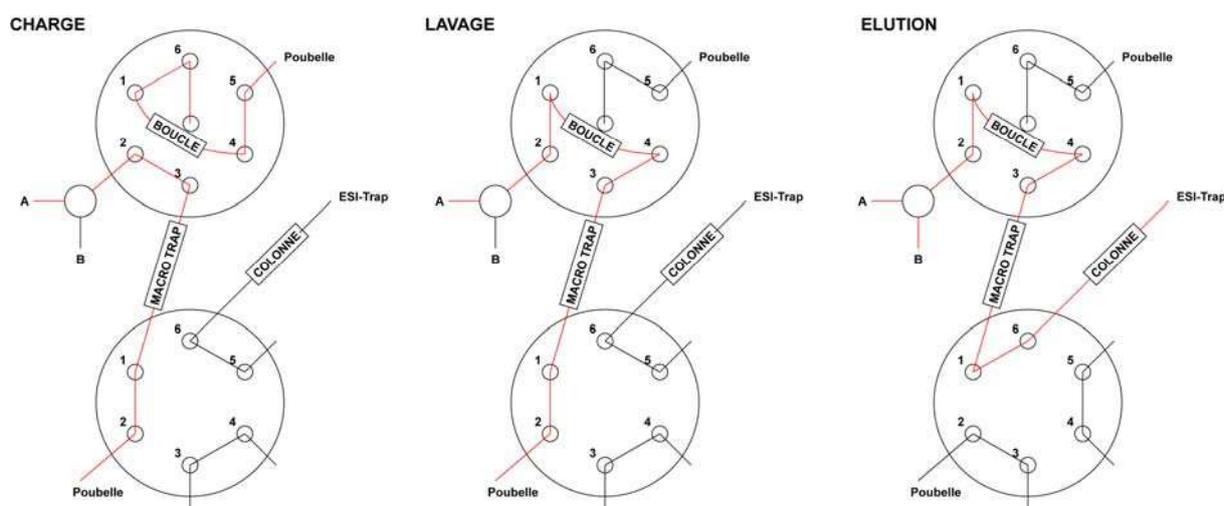


Figure 67. Schéma du système de LC couplé à l'ESI-Trap

Le flux de solvant est indiqué en rouge. En position charge, l'échantillon est injecté dans la boucle via le port 6 de la vanne d'injection et la MacroTrap est lavée avec 0 % B. En position lavage, l'échantillon est fixé par la MacroTrap et lavé avec 0 % B. En position élution, l'échantillon est élué par un gradient entre les solvants A et B et séparé sur la colonne C18 avant d'atteindre la source d'ionisation de la trappe ionique.

II.1.C Identification des peptides

II.1.C.1 Acquisition des données sur ESI-Trap

La cartographie de p47^{phox} est réalisée sur l'ESI-Trap (Esquire 3000+, Bruker Daltonics) équipée avec une source électrospray. Le capillaire chauffé est maintenu à 4,2 kV et la « end plate » à 500 V. Le « spray » est stabilisé avec un flux d'azote de 8 l/min chauffé à

250 °C est maintenu à 10 psi. Pour les expériences de MS/MS, les trois pics les plus intenses du « scan MS » précédent sont fragmentés puis exclus après que deux spectres soient obtenus. L'amplitude de fragmentation est fixée à 2 V. L'acquisition est réalisée dans la gamme de masse m/z (150-2000).

II.1.C.2 Analyse des données et cartographie

Les composants sont premièrement extraits automatiquement à l'aide du logiciel DataAnalysis, en fixant le nombre maximum de composants à 300 et le seuil d'intensité entre 10 000 et 100 000. Le fichier .mgf ainsi créé est confronté à la base de données en ligne Mascot (Matrix Science) dans laquelle nous avons préalablement rentré la séquence de p47^{phox}. Tous les spectres MS/MS correspondant aux peptides identifiés par Mascot sont vérifiés manuellement. Dans un second temps, nous tâchons d'identifier les peptides moins intenses qui seraient en dessous du seuil de détection de DataAnalysis ou bien les peptides très intenses correspondant à des peptides de taille moyenne (2000 à 3000) voire importante (> 3000). En effet, les peptides de petite taille sont plus faciles à identifier avec Mascot puisqu'ils portent en général une à deux charges et génèrent en se fragmentant des spectres plus facilement identifiables. Au contraire, les moyens et gros peptides portant de 3 à 7 charges vont générer des spectres très compliqués, avec de nombreux pics superposés et un risque d'erreur sur l'interprétation des états de charges liés à la résolution de l'appareil. Rappelons en effet, que plus un peptide est chargé et plus la résolution de son massif isotopique est ardue (pics séparés de $1/z$). C'est le cas avec l'ESI-Trap utilisée dans cette thèse (Esquire 3000+, Bruker Daltonics), pour des peptides de charge $z \geq 3$.

Une fois tous les peptides identifiés et confirmés manuellement, la même expérience est réalisée sur l'ESI-TOF (6210, Agilent Technologies) qui possède une résolution bien meilleure et sur lequel seront réalisées les expériences de deutération. Le but de cette expérience est double. Tout d'abord, il s'agit de confirmer la nature des peptides identifiés sur l'ESI-Trap en comparant la masse théorique et la masse expérimentale. D'autre part, les analyseurs ainsi que les systèmes d'optique de ces deux spectromètres étant différents, les peptides ne sont pas forcément détectés avec les mêmes états de charge ou aux mêmes intensités. Il est donc important de comparer les profils de digestion LC-MS sur les deux machines avant de passer aux expériences de deutération.

Les cartographies sont finalement établies en utilisant les scripts disponibles sur <http://ms.biomed.cas.cz/MSTools/>.

II.2 Echange H/D

II.2.A Cinétiques globales

II.2.A.1 Tampon de deutération

La deutération est initiée par la dilution par 20 d'un volume de p47^{phox} correspondant à 100-200 pmol dans un tampon deutéré à pD physiologique (5 mM HEPES pD=7,4 ; 1 mM EDTA ; 2 mM DTT ; 200 mM NaCl). Le pD ou potentiel deutérium est relié au pH par l'équation : $pD = pH + 0,4$. Afin de limiter le contre-échange, des solutions stocks de 4 M HEPES pD=7 ; 5 M NaCl ; 2 M DTT et 0,5 M EDTA sont préparées dans du D₂O et seront utilisées pour le tampon deutéré. De plus, la molarité de ce tampon (5 mM HEPES) n'est pas choisie au hasard. Il s'agit d'avoir un pouvoir tampon efficace mais faible, afin de pouvoir « quencher » les échantillons en utilisant le minimum d'acide et de réduire ainsi encore une fois le contre-échange. Le pD du tampon de deutération doit être vérifié avant chaque expérience.

II.2.A.2 Tampon de quenching

La solution acide permettant de « quencher » les aliquotes est également optimisée. Il faut choisir une solution nécessitant l'ajout d'un volume ni trop petit (mauvais mélange) ni trop important (contre-échange). Nous choisissons ainsi un rapport de « quench », correspondant au rapport volume de l'aliquote sur le volume de l'acide, entre 5 et 15. L'efficacité du tampon de « quenching » sur le tampon de deutération doit être vérifiée avant chaque utilisation.

II.2.A.3 Deutération

Nous souhaitons par exemple deutérer un échantillon de p47^{phox} à 50 μ M et prélever 11 échantillons de 200 pmol aux temps 10 sec, 30 sec, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, 5 h, 7 h, 9 h. Nous avons donc besoin de 4 μ l (200 pmol) pour chaque aliquote, soit 44 μ l que nous arrondissons à 50 μ l. En utilisant un ratio de deutération de 20, nous réalisons la deutération dans un volume total de 1 ml : 950 μ l de tampon deutéré et 50 μ l de p47^{phox}, ce qui donne une concentration finale pour p47^{phox} de 2,5 μ M.

L'efficacité du tampon de « quenching » (50 mM HCl) est testée sur le tampon de deutération :

100 µl de tampon D2O	+	0 µl de 50mM HCl	pD = 7,86
		2	6,85
		4	4,20
		6	3,49
		8	3,10
		10	2,85
		12	2,66
		13	2,60
		<u>14</u>	<u>2,54</u>
		15	2,48

14 µl de 50mM HCl sont ainsi nécessaires pour abaisser le pD à 2,54 afin de minimiser le phénomène de contre-échange. Nous utiliserons donc un ratio de « quenching » de : $100 / 14 = 7,14$. Nous prélèverons 80 µl de mélange deutéré correspondant à 200 pmol de p47^{phox}, à chaque temps de la cinétique. Le « quenching » nécessitera donc 11,2 µl de 50 mM HCl qui seront disposés au préalable dans des tubes eppendorf refroidis dans un bain de glace. A chaque prélèvement, les aliquotes seront plongées dans l'acide, vortexées et rapidement congelées dans de l'azote liquide, afin de limiter au maximum le contre-échange. Les aliquotes sont ensuite placées à -20 °C pour une analyse ultérieure. Dans le cas où nous souhaitons réaliser un grand nombre de cinétiques de deutération dans la même journée (différentes conditions, triplicatas), un script disponible sur <http://ms.biomed.cas.cz/MSTools/> permet de planifier les expériences en lançant plusieurs cinétiques en différé.

II.2.A.4 Dessalage de l'échantillon par LC

Une fois décongelés, les échantillons sont directement injectés dans le système LC couplé au spectromètre de masse ESI-TOF (6210, Agilent Technologies).

Les protéines sont directement chargées sur une colonne de dessalage MacroTrap (C4, Michrom Bioresources) où elles sont dessalées pendant 2 min à 300 µl/min avec le solvant A. Les protéines sont ensuite éluées en 4 min par 70 % de solvant B, puis la MacroTrap est lavée 1 min avec 100 % B et équilibrée 1 min avec 0 % B. Ces expériences sont réalisées à 0°C grâce à un montage « maison » nous permettant d'immerger les vannes et la MacroTrap dans un bain de glace (Figure 68).

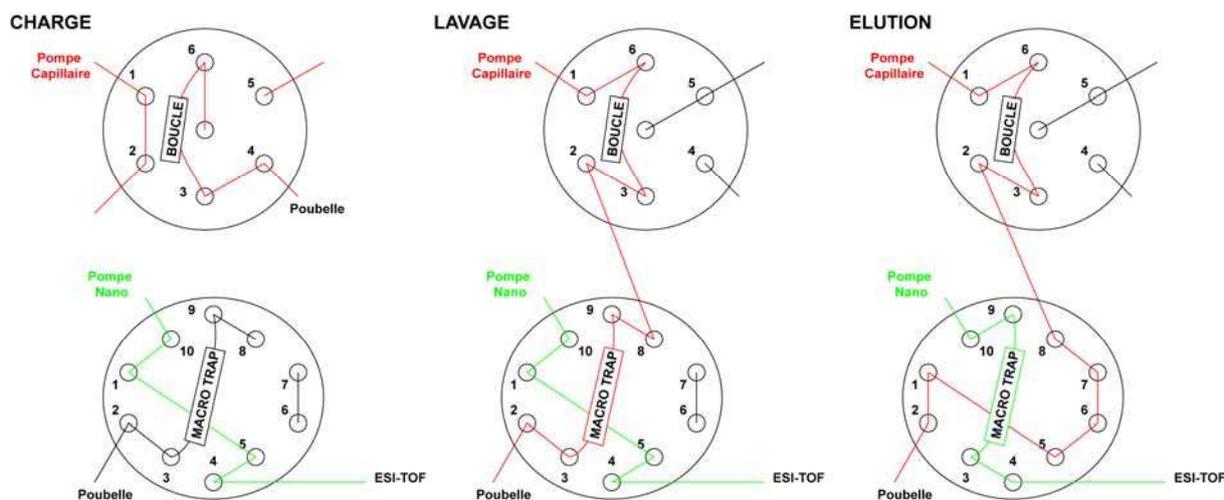


Figure 68. Schéma du système de LC couplé à l'ESI-TOF

Le flux de solvant de la pompe capillaire est indiqué en rouge et celui de la pompe nano en vert. En position charge, l'échantillon est injecté dans la boucle de la vanne d'injection. En position lavage, l'échantillon est fixé par la MacroTrap et lavé avec 0 % B par la pompe capillaire. En position élution, l'échantillon est élué par 95 % de B par la pompe nano, avant d'atteindre la source d'ionisation de l'ESI-TOF.

II.2.A.5 Acquisition et traitement des données

Le capillaire chauffé est maintenu à 4 kV. Le « spray » est stabilisé avec un flux d'azote de 7 l/min chauffé à 300°C et maintenu à 10 psi. Le fragmenteur est fixé à 250 V pour éviter les adduits de TFA (+114 Da). L'acquisition est réalisée dans la gamme de masse m/z (350-2000). Les données sont analysées avec le logiciel MassHunter (Agilent Technologies). Le pic d'élution du TIC est moyenné et le spectre relatif est exporté au format .csv puis déconvolué par le logiciel Magtran (Zhang and Marshall 1998) afin d'obtenir la masse moyenne de l'échantillon plus ou moins deutéré. On utilise l'enveloppe de charges pour définir cette masse moyenne.

Les pourcentages de deutération ensuite peuvent être calculés en utilisant l'équation (1) et le phénomène de contre-échange peut être corrigé à l'aide d'un échantillon totalement deutéré, selon l'équation (2) (Zhang and Smith 1993).

$$\%D = [(m_{x\%} - m) / N] \times 100 \quad (1)$$

$$D = \frac{m_{x\%} - m}{m_{100\%} - m} \times N \quad (2)$$

où m , $m_{x\%}$ et $m_{100\%}$ représentent la masse moléculaire moyenne de l'échantillon non deutéré, partiellement deutéré et totalement deutéré, respectivement et N , le nombre de protons échangeables (nombre de liaisons amides auquel on soustrait le nombre de résidus proline n'ayant pas d'hydrogène amidique).

II.2.B Cinétiques locales

II.2.B.1 Deutération, digestion et analyse LC-MS

La phase de deutération pour les cinétiques locales est identique à celle des cinétiques globales. Les échantillons sont deutérés, quenchés et congelés (c.f II.2.A.3).

Avant d'être injectés dans le système chromatographique, les échantillons sont digérés selon les conditions de digestion décrites auparavant (c.f II.1.A).

Les peptides ainsi obtenus sont directement chargés sur une colonne de dessalage MacroTrap (C8, Michrom Bioresources) où ils sont lavés pendant 1 min à 300 µl/min avec 0,03 % TFA (solvant A). Les peptides sont ensuite élués et séparés progressivement à 50 µl/min sur une colonne en phase inverse C18 (1 mm × 100 mm, Interchrom) par un gradient linéaire d'acétonitrile (ACN) allant de 17 % à 45 % B (95 % ACN ; 0,03 % TFA) en 45 min. Ces expériences sont réalisées à 0°C en utilisant le montage décrit précédemment (Figure 68) en y ajoutant la colonne C18 juste avant la source ESI. Ce montage permet d'immerger les vannes, la MacroTrap et la colonne dans un bain de glace, afin de réduire le contre-échange.

II.2.B.2 Acquisition et traitement des données

Les paramètres d'acquisition des données sont les mêmes que pour les cinétiques globales (c.f II.2.A.5).

On extrait, pour chaque peptide, l'ion correspondant à l'état de charge le plus intense et n'ayant pas de recouvrement avec un autre ion. Le pic d'éluion visible sur le chromatogramme EIC ainsi obtenu est moyenné afin d'obtenir le massif isotopique moyen du peptide. La même opération est répétée pour tous les temps de deutération, pour chacun des peptides et pour toutes les cinétiques réalisées.

Chaque massif isotopique est exporté au format .csv pour être analysé avec le logiciel MagTran. Pour chaque peptide, on définit un intervalle m/z encadrant les masses minimum (pic monoisotopique non deutéré) et maximum (dernier pic du massif isotopique le plus deutéré). Les massifs isotopiques correspondant aux différents temps de deutération sont successivement importés et tronqués de part et d'autre de cet intervalle prédéfini. Finalement, le centroïde du massif isotopique est déterminé par le logiciel. Cette valeur est consignée dans un fichier Excel, à partir duquel on pourra établir les courbes de cinétiques de deutération locales.

III. Protéolyse ménagée

p47^{phox} est incubée avec 0,5 % de protéase spécifique (w/w). Des aliquotes sont prises après 15 min, 30 min, 1 h et 3 h de digestion et directement congelées.

Pour les tests de digestion préliminaires sur gel SDS-PAGE à 12 %, on dépose 5 µg de protéine par puits, pour chacun des temps de la cinétique.

Pour les tests d'identification des peptides générés par ESI-TOF (6210, Agilent Technologies), on injecte 300 pmol de protéine digérée pour chacun des temps de la cinétique. Les peptides sont directement chargés sur une colonne de dessalage MacroTrap (C8, Michrom Bioresources) où ils sont lavés pendant 1 min à 300 µl/min avec 0,03 % TFA (solvant A). Les peptides sont ensuite élués et séparés progressivement à 50 µl/min sur une colonne en phase inverse C18 (1 mm × 100 mm, Interchrom) par un gradient d'acétonitrile (ACN). Ce gradient de 17 min est effectué par 3 paliers successifs : 5 min à 35 %, 10 min à 45 % et 2 min à 100 % de solvant B (95 % ACN ; 0,03 % TFA). On utilise le même montage expérimental que pour les cinétiques de deutération (Figure 68), avec la colonne C18 juste avant la source ESI mais sans bain de glace.

Pour l'identification des peptides, nous utilisons le logiciel GPMW 7.00 (<http://www.gpmaw.com/>), en précisant la protéase spécifique utilisée.

IV. Interactions non covalentes

Afin d'améliorer le rendement d'ionisation, les protéines étudiées sont préalablement dialysées contre 500 mM acétate d'ammonium pH=7,5 et 2 mM DTT. Le volume de dialyse, qui sera changé 3 fois, au bout de 4 h minimum, est 100 fois plus grand que celui de l'échantillon.

Les échantillons ainsi dialysés sont dilués 10 à 100 fois dans de l'eau avant d'être injectés dans la source ESI du spectromètre de masse Q-TOF micro (Waters Micromass). L'injection se fait par infusion directe à 20 µl/min à l'aide du pousse-seringue intégré. Les protéines sont injectées à des concentrations avoisinant les 10 µM.

Le capillaire chauffé à 80 °C est maintenu à 2,8 kV. Le « spray » est stabilisé avec un flux d'azote de 50 l/h et la désolvatation est réalisée grâce à un flux d'azote de 500 l/h chauffé à 150 °C. La pression de Pirani dans la source est augmentée à 5 mbar afin de favoriser la formation de complexes non covalents. Les tensions du cône d'échantillon et du cône

d'extraction sont fixés à 150 V et 5 V, respectivement, afin d'optimiser l'évaporation du solvant, tout en stabilisant les complexes non covalents. Les données sont analysées grâce au logiciel MassLynx (Waters).

V. Test de l'activité des plasmepsines

V.1 Test de digestion par électrophorèse sur gel SDS-PAGE

Après purification, l'activité protéolytique des plasmepsines 2 et 4 est testée en digérant p47^{phox} dans les conditions suivantes :

- Un pH acide (100 mM glycine pH = 2,2)
- Une température de 0 °C
- Un ratio enzyme/protéine (w/w) variable (1/1, 1/5 et 1/10)
- Des temps de digestion variables (2, 5, 10 et 30 min)

Après digestion, l'équivalent de 5 µg de protéine digérée est déposé sur gel SDS-PAGE à 12 % (c.f Chapitre III.I). La détermination de l'activité protéolytique des plasmepsines se fait ici de manière purement qualitative, en observant la quantité et la taille relative des peptides générés.

V.2 Tests de digestion par MALDI

Les mêmes ratios enzyme/protéine (w/w) sont testés (1/1, 1/5 et 1/10), pour un temps de digestion fixe de 2 min, un pH acide et une température de 0 °C. Afin d'optimiser le rapport sels/concentration en protéine, trois dilutions de p47^{phox} sont testées à partir de la solution stock. p47^{phox} est ainsi diluée au 10^{ème}, au 50^{ème} et au 100^{ème} dans 100 mM glycine pH = 2,2.

Pour les tests de digestion avec la version recombinante de la protéase type XVIII (Rey et al. 2009), celle-ci est activée au préalable 10 min à 25 °C avec 10 % de tampon acide (1 M glycine pH = 2,2).

Afin de visualiser les peptides générés, les protéines digérées sont déposées avec 1 µl de matrice alpha 4 (c.f Chapitre IV.I). Afin de vérifier que les peptides générés ne sont pas dus à de l'autoprotéolyse ou à de la dégradation, des contrôles sont réalisés en déposant sur la plaque MALDI la protéine p47^{phox} seule ainsi que les protéases seules.

V.3 Cartographie par ESI-Trap et ESI-TOF

300 pmol de p47^{phox} sont digérées par la plasmepsine 2, la plasmepsine 4 ou la protéase type XVIII recombinante, avec un ratio enzyme/protéine (w/w) de 1/1. Le volume final est complété à 100 µl par 100 mM glycine pH = 2,2. p47^{phox} est digérée 2 min à 0 °C avant d'être injectée dans le système LC où les peptides générés sont lavés et séparés selon le même protocole utilisés lors de la cartographie de p47^{phox} avec les protéases acides classiques (c.f IV II.1.B). Les paramètres de fragmentation au sein de l'ESI-Trap (Esquire 3000+, Bruker Daltonics) sont les mêmes qu'utilisés précédemment (c.f II.1.C.1) et les peptides sont également identifiés avec le serveur Mascot (c.f IV II.1.C.2).

La masse précise des peptides identifiés par ESI-Trap est finalement vérifiée par ESI-TOF (6210, Agilent Technologies), en utilisant les mêmes conditions de digestion. Les peptides générés sont lavés et séparés selon le protocole utilisé lors des cinétiques locales de deutération (c.f IV II.2.B.1).

**BUT DU TRAVAIL ET CONTEXTE
SCIENTIFIQUE**

Lors du début de cette thèse, l'équipe de Franck Fieschi au LPM venait de publier un article basé sur des études de SAXS qui apportait les premières informations structurales sur la forme entière de cette protéine modulaire. L'enveloppe structurale obtenue alors a ouvert la voie à un nouveau modèle d'auto-inhibition pour p47^{phox} (Durand et al. 2006). Cependant, les résultats de SAXS ne permettaient pas de comprendre comment était contrôlée cette organisation interne et plus particulièrement la transition d'un état auto-inhibé à un état activé. L'obtention de détails moléculaires plus fins ne pouvait venir ni de la cristallographie compte tenu de la plasticité générale de la protéine, ni de la RMN compte tenu de sa taille et de sa propension à agréger à haute concentration.

Parallèlement à l'évolution du sujet de la NADPH oxydase dans l'équipe de Franck Fieschi au LPM, l'équipe d'Eric Forest au LSMP continuait à utiliser et à développer l'approche d'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse (DXMS). Ce groupe avait d'ailleurs reçu en 2004 le prix John Beynon pour son travail sur l'utilisation de protéases acides alternatives permettant d'augmenter la résolution de la méthode (Cravello et al. 2003). Il est apparu que ce type d'approche était particulièrement bien adapté à la situation de p47^{phox} c'est-à-dire une protéine qui oscille entre différents états conformationnels. La flexibilité n'est pas un problème pour la SM, ni la taille, contrairement aux approches par cristallographie et RMN, respectivement.

C'est dans ce contexte que les deux équipes ont décidé d'unir leurs forces sur un projet commun centré sur une thèse en cotutelle. Ce travail s'est articulé autour de quatre axes :

Axe 1 : Génération de deux formes protéiques stables, représentatives des états auto-inhibé et activé de p47^{phox}. Validation du choix de nos outils protéiques par des tests fonctionnels.

Axe 2 : Détermination de l'existence de différences structurales entre ces deux constructions par des cinétiques globales DXMS et par protéolyse ménagée couplée à la SM. Le cas échéant, caractérisation de ces différences conformationnelles à l'aide des cinétiques locales DXMS.

Axe 3 : Caractérisation d'un inhibiteur de la NADPH oxydase interagissant potentiellement avec p47^{phox} (le celastrol).

Axe 4 : Développement de nouveaux outils enzymatiques permettant d'améliorer la résolution spatiale des expériences de DXMS. Purification et test de l'activité protéolytique des plasmepsines).

Les deux premiers axes avaient pour but de confirmer et de mieux caractériser le modèle d'autoinhibition proposé en 2006. Les axes 3 et 4 sont à considérer respectivement comme une application pharmaceutique et un développement technologique des tests structuraux et fonctionnels mis au point lors de cette thèse.

Ce travail a été réalisé avec la collaboration de Petr Man (post-doc) et Isabelle Petit-Haertlein (technicienne) pour l'axe 2 et Eric Thierry (étudiant en master 1) pour l'axe 4.

RESULTATS

Chapitre I : Mise en évidence de changements structuraux liés à l'activation de p47^{phox}

I. Introduction

Lors de son activation, p47^{phox} subit des changements conformationnels qui lui permettent de passer d'une forme autoinhibée à une forme interagissant avec les autres partenaires du complexe de la NADPH oxydase. Ainsi, le fait que la conformation activée de p47^{phox} soit « ouverte » semble être largement accepté par la communauté scientifique sans qu'aucune preuve structurale n'ait pu le confirmer. Par ailleurs, les enveloppes SAXS obtenues sur la protéine sauvage autoinhibée suggèrent une conformation moins globulaire que prévue (Durand et al. 2006). Il semblerait ainsi que le passage d'une forme fermée à une forme ouverte soit une vision trop simpliste du mécanisme d'activation de p47^{phox}.

Afin de mieux décrire les changements structuraux subis par p47^{phox} lors de son activation, nous avons décidé de comparer l'accessibilité au solvant d'une forme sauvage autoinhibée et d'une forme activée. Nous avons pour cela commencé par construire un triple mutant en remplaçant trois sérines par des glutamates (cf. II.1), afin de mimer leur phosphorylation qui constitue le signal d'activation de p47^{phox}. Ce triple mutant S303/304/328E n'a pas été choisi au hasard puisqu'il a déjà été démontré que ces mutations étaient nécessaires et suffisantes pour renforcer l'interaction avec des liposomes enrichis en PtdIns(3,4)P₂ (Karathanassis et al. 2002) et avec la région C-terminale de p22^{phox} (Ago et al. 1999; Groemping et al. 2003). Par la suite, l'abréviation TM sera utilisée pour se référer à ce triple mutant.

Une fois ces deux formes purifiées, nous avons pu mettre au point un test pour confirmer leurs propriétés différentes d'interaction avec les phospholipides spécifiques de la membrane phagosomale (c.f II.2.A). A ce stade de l'étude, nous ne disposons pas encore d'un test d'interaction avec la région C-terminale de p22^{phox} et le test en système acellulaire n'a finalement pas permis de distinguer des différences d'activité NADPH oxydase entre les deux conformations étudiées.

Cependant, nous avons développé deux tests structuraux complémentaires permettant d'observer des différences d'accessibilité au solvant par DXMS et à des protéases par protéolyse ménagée couplée à la SM (c.f II.3). Cette étude préliminaire a fait l'objet d'une publication dans le journal Febs Letters (c.f III), permettant de valider l'approche par DXMS

et constituant la première preuve structurale d'un changement conformationnel observé sur une forme « entière » de p47^{phox}.

II. Résultats préliminaires

II.1 Construction de la forme activée stable

Le triple mutant p47^{phox} S303/304/328E a été construit par mutations successives des codons TCG, TCC et AGC par les codons GAG, GAG et GAA, respectivement (c.f. Matériel et méthodes et Figure 69). La validité de chaque mutation a été vérifiée par séquençage. Les propriétés de surexpression de chacun des mutants ont été vérifiées et se sont avérées identiques.

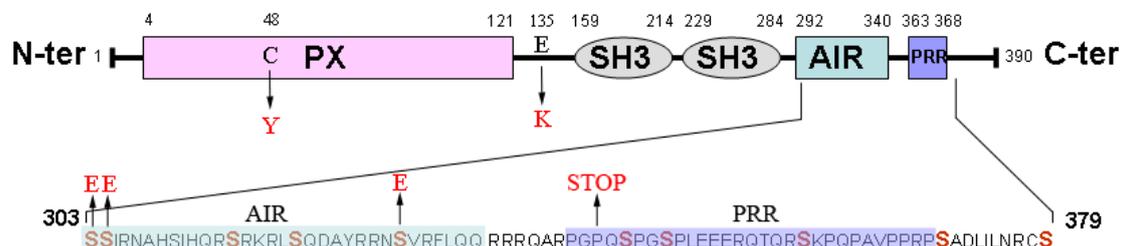


Figure 69. Schéma représentant les résidus mutés lors de l'optimisation du plasmide pour les formes autoinhibée et activée de p47^{phox}FL et ΔCter.

II.2 Mise au point du protocole de purification pour p47^{phox}FL, ΔCter et PX

Les premières purifications de p47^{phox} ont été réalisées avec un plasmide codant pour la forme entière de p47^{phox}. Le protocole préconisé utilisait des colonnes prépackées de Glu-Sepharose 4B (5 ml) et MonoS (1 ml). Etant donnée la très bonne surexpression de p47^{phox}, il fallait la plupart du temps repasser le perfusat plusieurs fois sur ces différentes colonnes afin de récupérer la totalité de la protéine exprimée.

Ainsi, lors de la purification de la forme entière du triple mutant S303/304/328E, nous avons dû réaliser 4 éluions avec la colonne Glu-Sepharose à partir de culots correspondant à 3 l de culture (Figure 70)

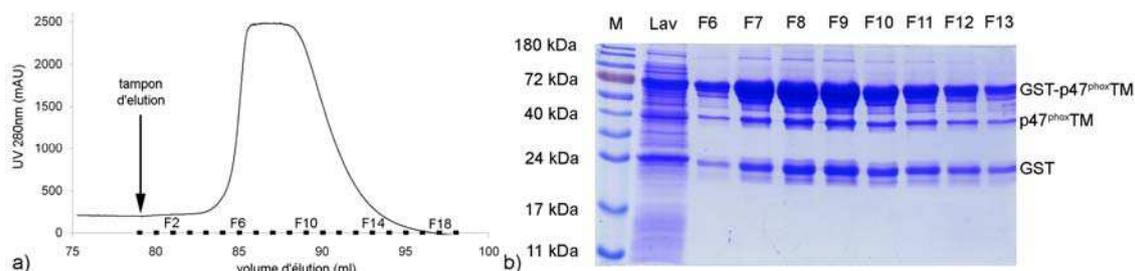


Figure 70. Purification par chromatographie d'affinité de p47^{phox}TM-FL

a) Chromatogramme d'éluion de p47^{phox}TM-FL. Les fractions de 1 ml sont indiquées (de F1 à F20). b) Dépôt des fractions d'intérêt sur gel SDS-PAGE à 12 %. Les bandes à 72 kDa, 45 kDa et 26 kDa correspondent à la GST- p47^{phox}TM-FL, p47^{phox}TM-FL et à l'étiquette GST seule, respectivement.

Par ailleurs, les formes entières de p47^{phox} étaient soumises à une forte protéolyse lors de la purification et les différentes formes de la protéine étaient très difficilement séparables sur colonne MonoS, comme l'atteste la Figure 71. En effet, la région Cter de p47^{phox} (en aval de l'AIR) est prédite pour être peu structurée (Durand et al. 2006) et donc facilement sujette à la protéolyse.

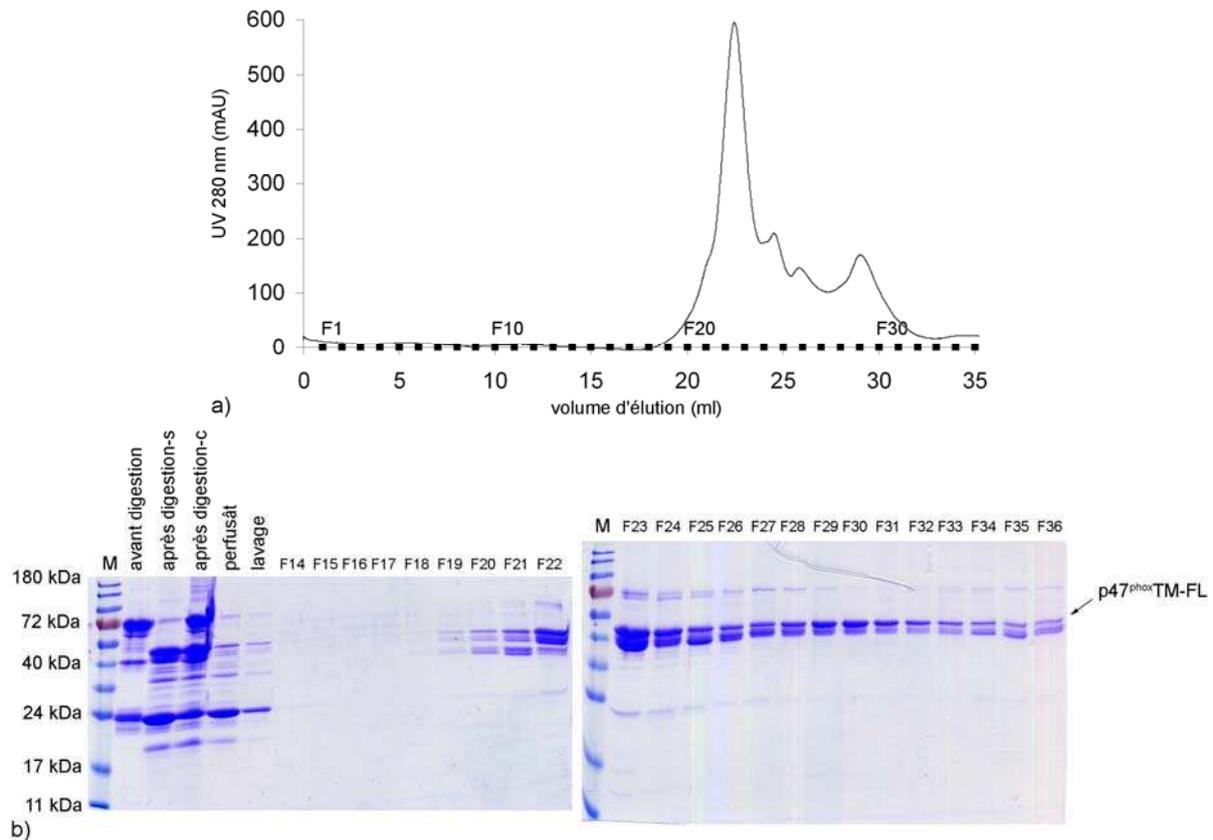


Figure 71. Purification par chromatographie échangeuse d'anions de p47^{phox}TM-FL
a) Chromatogramme d'éluion de p47^{phox}TM-FL. Les fractions de 1 ml sont indiquées (de F1 à F35). **b)** Dépôt des fractions d'intérêt sur gel SDS-PAGE à 12 %. La forme non tronquée de p47^{phox}TM-FL est indiquée par une flèche.

Nous avons ainsi décidé de travailler avec des formes tronquées de p47^{phox}, en introduisant une mutation STOP au niveau de la Pro342 (Figure 69). Cette construction, qui contient l'ensemble des modules essentiels à la transition de l'état auto-inhibé à l'état activé, sera dénommée dans la suite du manuscrit p47^{phox}ΔCter. Remarquons que ces formes tronquées ne possèdent plus la région polyproline (360-369) capable d'interagir avec le module SH3_B de p67^{phox}, ni la région 373-387 qui semble jouer un rôle dans l'activation de la NADPH oxydase (Morozov et al. 1998 ; Mizuki et al. 2005). Nous en avons également profité pour rétablir deux mutations découvertes sur notre plasmide, qui ne correspondaient pas à un polymorphisme connu : C48Y et E135K (Figure 69).

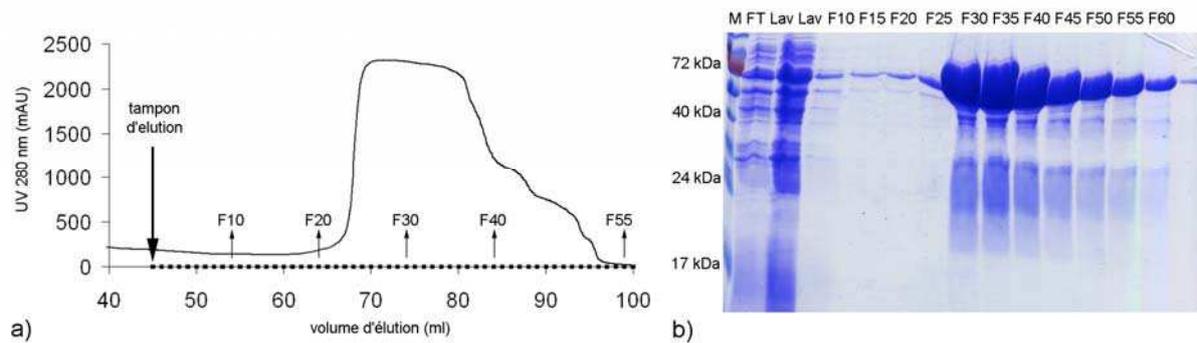


Figure 72. Purification par chromatographie d'affinité de p47^{phox}ΔCter
a) Chromatogramme d'élution de p47^{phox}ΔCter. Les fractions de 1 ml sont indiquées (de F1 à F56). **b)** Dépôt des fractions d'intérêt sur gel SDS-PAGE à 12 %. FT : perfusé.

Enfin, nous avons modifié le protocole de purification en utilisant désormais des colonnes Glu-Sepharose et SP-Sepharose packées par nos soins, avec des volumes de résine plus appropriés, de 30 ml et 25 ml, respectivement. Ces modifications du protocole ont permis de rendre la purification plus rapide en évitant de multiplier les éluions, et d'améliorer le rendement en limitant la précipitation et la protéolyse des protéines. Nous avons ainsi réussi à obtenir 172 mg de p47^{phox}ΔCter à partir de 3 l de culture et après 2 éluions sur Glu-Sepharose (Figure 72) et 2 éluions sur SP-sepharose (Figure 73).

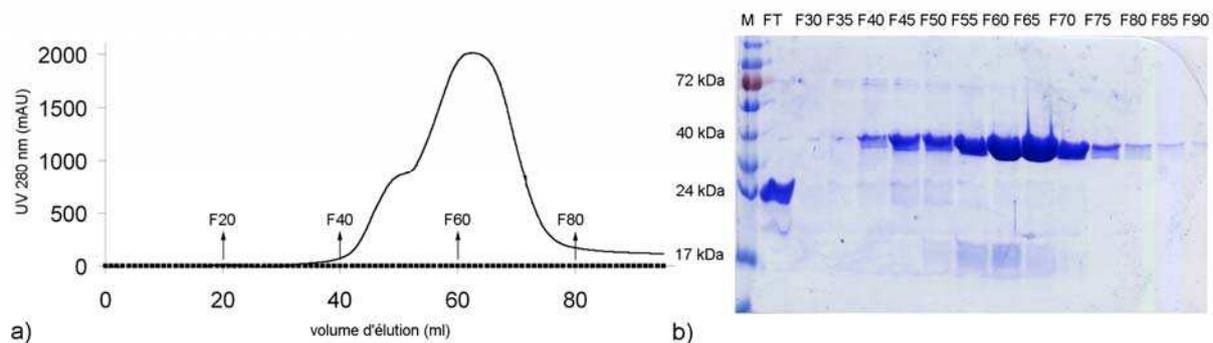


Figure 73. Purification par chromatographie échangeuse d'anions de p47^{phox}ΔCter
a) Chromatogramme d'élution de p47^{phox}ΔCter. Les fractions de 1 ml sont indiquées (de F1 à F96). **b)** Dépôt des fractions d'intérêt sur gel SDS-PAGE à 12 %. FT : perfusé.

Ce protocole a été utilisé pour purifier toutes les formes entières et tronquées de p47^{phox} comme le domaine PX (Figure 74), ainsi que tous les mutants dérivés à partir de ces constructions (c.f. Matériel et méthodes).

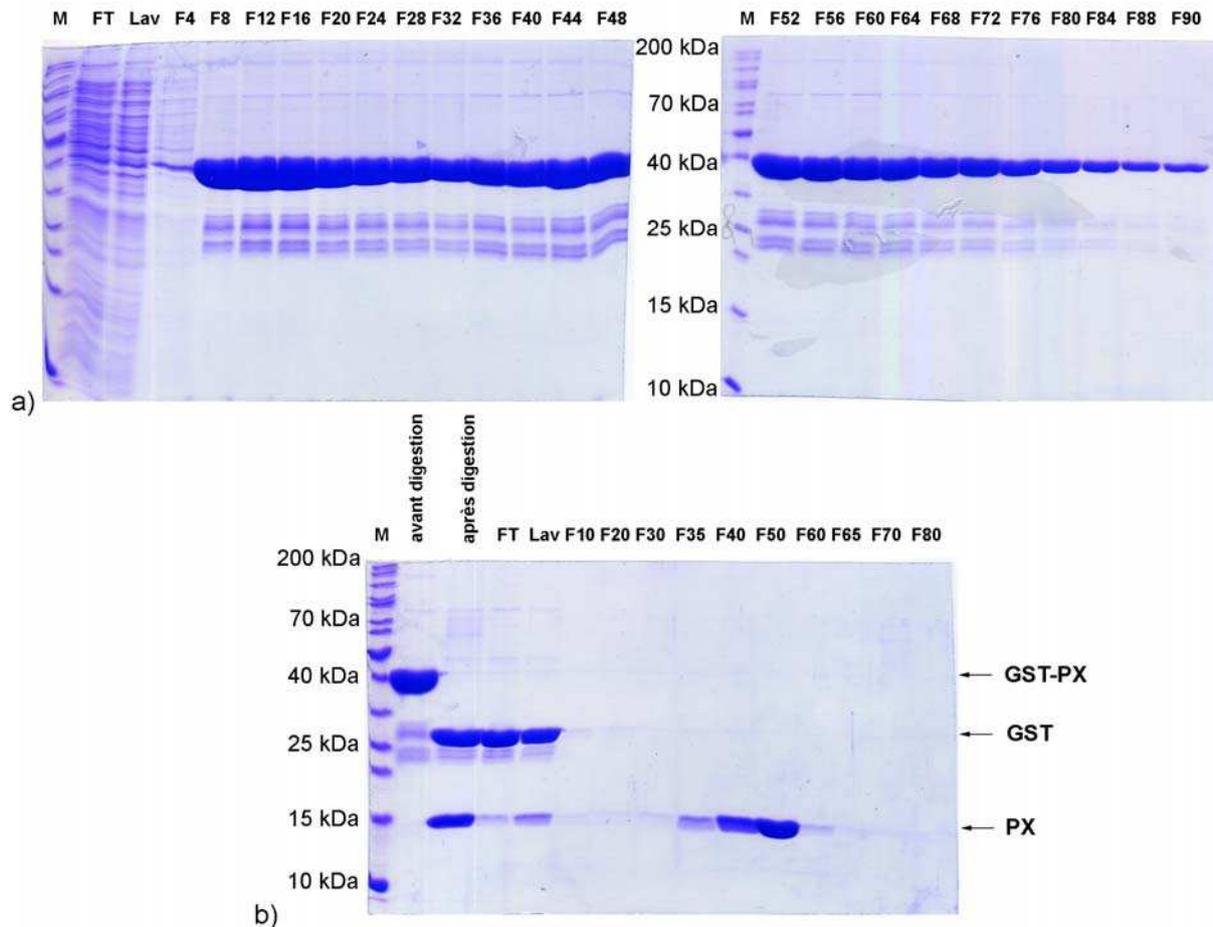


Figure 74. Purification du domaine PX de p47^{phox}

Gels SDS-PAGE à 12 % : **a)** Elution de GST-PX (42,1 kDa) sur colonne d'affinité. **b)** Digestion de l'étiquette GST (26,4 kDa) et purification du domaine PX (15,7 kDa) sur colonne SP-sepharose. FT : perfusât.

II.3 Purification des constructions tandem SH3s et tandem SH3s + AIR

Les seules constructions pour lesquelles nous n'avons pas utilisé le protocole décrit précédemment sont le tandem SH3s et le tandem SH3s + AIR.

Le protocole de purification du tandem SH3s est cependant très semblable (c.f Matériel et méthodes). Il nous a été fourni, ainsi que le plasmide, par l'équipe de Vincent Jaquet à Genève.

La purification du tandem SH3s + AIR requiert une étape supplémentaire de protéolyse ménagée à la chymotrypsine, à partir de p47^{phox}ΔCter (Figure 75a). Les peptides ainsi générés sont séparés sur colonne MonoS (Figure 75b) puis chaque fraction est analysée en MALDI-MS (Figure 75c), afin de rassembler les fractions intéressantes. Les masses expérimentales obtenues sont en accord avec les masses théoriques correspondant à une coupure en Cter du résidu Y139. En effet, les masses théoriques du PX (1-139) et du tandem SH3s + AIR (140-342) sont de 17402,12 Da et de 23014,92 Da, respectivement.

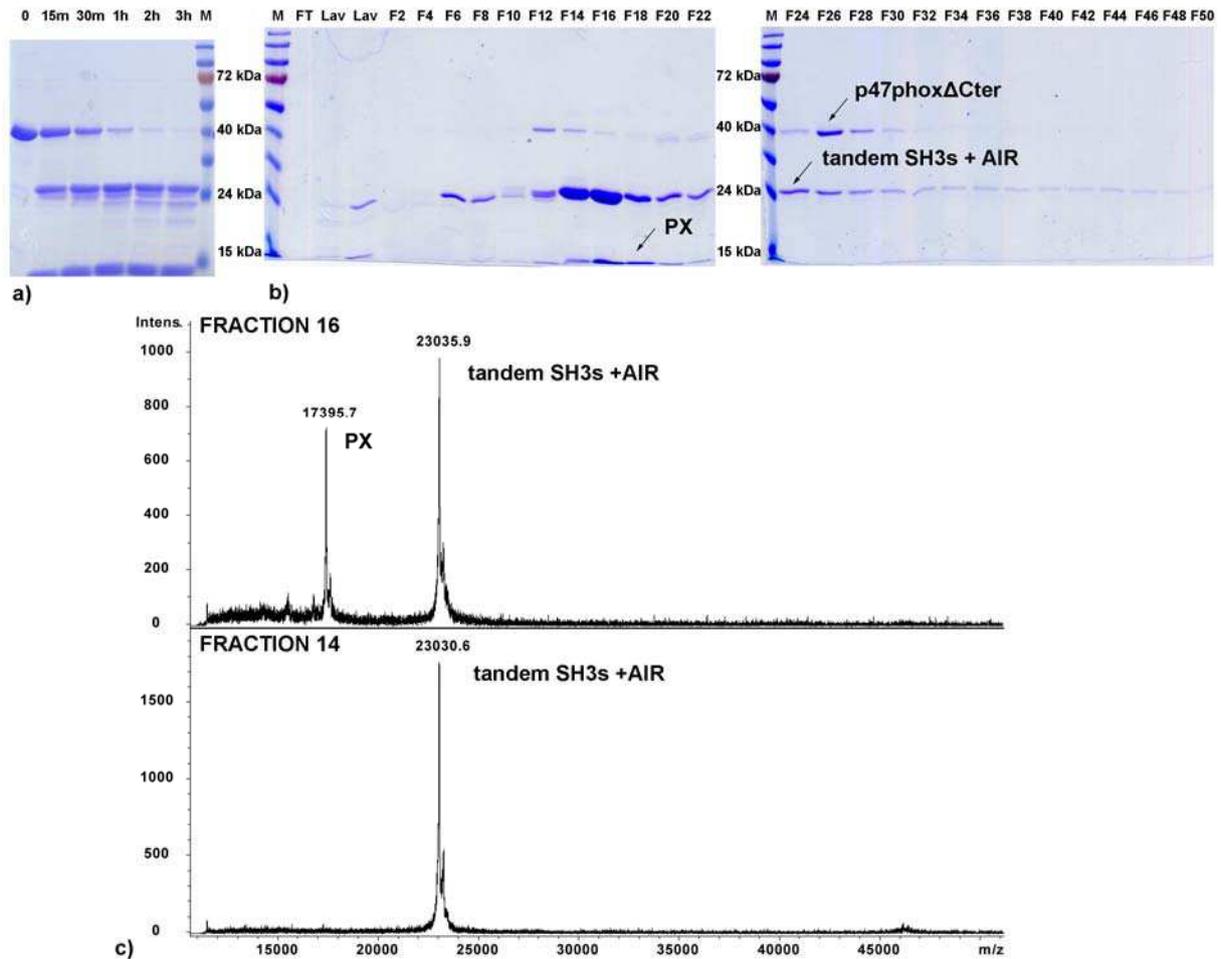


Figure 75. Purification du tandem SH3s + AIR

a) Protéolyse ménagée à la chymotrypsine de p47^{phox}ΔCter (40,4 kDa) b) Séparation sur colonne échangeuse d'anions MonoS c) Spectre MALDI-MS des fractions 14 et 16. FT : perfusé. Lav : lavage.

Les protéines obtenues sont en général très pures comme l'atteste le gel SDS-PAGE de la Figure 76 où l'on peut observer différentes constructions après concentration.

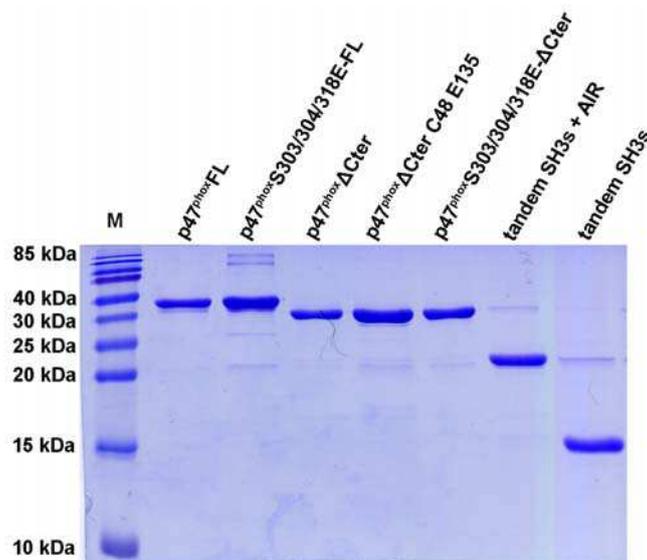


Figure 76. Gel SDS-PAGE de différentes constructions de p47^{phox}

II.4 Mise au point du test d'interaction avec les liposomes

Les premiers développements de ce test ont été réalisés sur les formes entières $p47^{\text{phox}}\text{FL}$ et $p47^{\text{phox}}\text{TM-FL}$. Comme nous l'avons déjà remarqué, ces formes sont sujettes à une protéolyse importante au niveau de leur extrémité C-terminale (c.f II.2). Les premiers gels obtenus sur ces protéines entières sont ainsi difficilement quantifiables, en raison de la présence d'un grand nombre de bandes de plus petits poids moléculaires (Figure 77a).

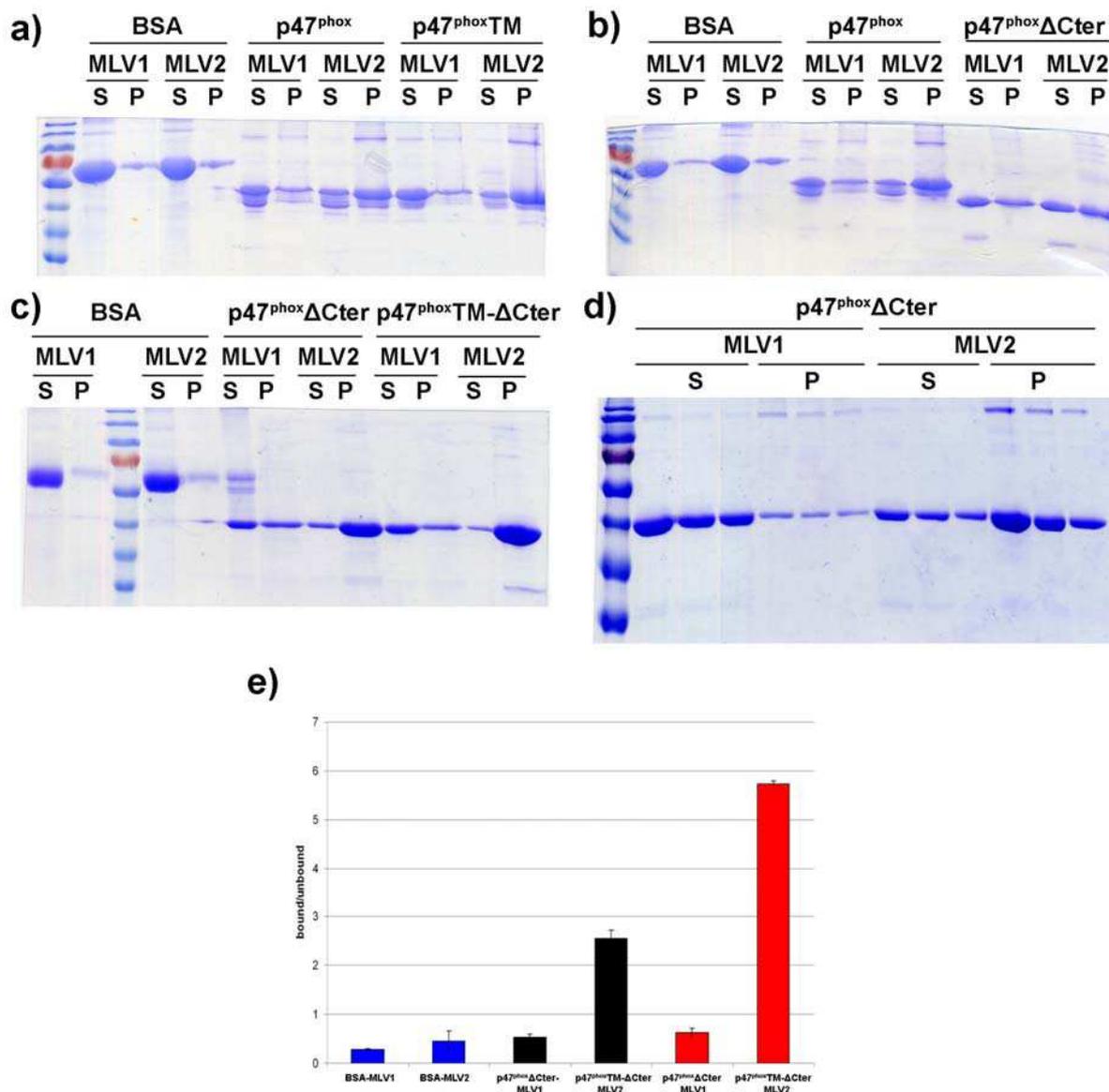


Figure 77. Mise au point du test de co-sédimentation avec les liposomes

Co-sédimentation de liposomes contrôles (MLV1) et de liposomes enrichis en phospholipides PtdIns(3,4)P2 (MLV2) avec les protéines : **a)** $p47^{\text{phox}}\text{FL}$ vs. $p47^{\text{phox}}\text{TM-FL}$ **b)** $p47^{\text{phox}}\text{-FL}$ vs. $p47^{\text{phox}}\Delta\text{Cter}$ et **c)** $p47^{\text{phox}}\Delta\text{Cter}$ vs. $p47^{\text{phox}}\text{TM-}\Delta\text{Cter}$. **d)** dépôts de 15 μl , 10 μl et 8 μl de surnageant (S) de 8 μl , 4 μl et 2 μl de culot (P) repris dans 20 μl . **e)** représente la quantification du gel **c)**.

La purification des formes tronquées p47^{phox}ΔCter et p47^{phox}TM-ΔCter a permis d'obtenir des gels beaucoup plus facilement quantifiables (Figure 77b). L'interaction basale de p47^{phox}ΔCter semble ainsi plus faible que celle de p47^{phox}FL, en raison très certainement de l'absence de ces bandes parasites (Figure 77b). Au final, nous observons une différence significative entre les formes autoinhibée et activée de p47^{phox}ΔCter (Figure 77c et e) Nous avons également testé différents rotors et centrifugeuses afin d'optimiser la sédimentation des lipides et surtout afin d'éviter leur resuspension dans le surnageant lors de leur prélèvement. Nous avons enfin testé différents volumes de surnageant et de culot à déposer, afin d'optimiser l'analyse des gels (Figure 77d).

Les centrifugations dans des rotors TLA 100.4 ou airfugeTM se sont avérées être les plus efficaces. L'airfugeTM est tout de même préférable car l'utilisation de tubes de 175 μl limite grandement la resuspension du culot. Nous déposons au final 8 μl de surnageant et de culot préalablement resuspendu dans 20 μl de bleu de charge (Figure 77d).

II.5 Mise au point de l'analyse structurale par protéolyse ménagée

Nous avons testé quatre protéases : la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase ainsi que la thermolysine. La trypsine et la chymotrypsine ont été choisies pour leur spécificité. En effet ces deux enzymes digestives pancréatiques coupent les chaînes polypeptidiques en Cter des résidus basiques Lys et Arg pour la trypsine et des résidus hydrophobes aromatiques Tyr, Trp et Phe pour la chymotrypsine. Les deux autres protéases sont moins spécifiques, mais ont tendance à couper en Cter de résidus hydrophobes volumineux tels que Leu, Ile et Phe pour la thermolysine et en Cter de petits résidus hydrophobes tels que Gly, Ala et Val pour l'élastase.

Les rapports protéase/p47^{phox}ΔCter (w/w) sont compris entre 1 % et 1 % et des aliquotes sont prises à 15 min, 30 min, 1 h, 2h et 3 h pour être déposées sur gels SDS-PAGE à 12 % (Figure 78). Il s'agit dans un premier temps de déterminer la concentration adéquate pour chaque enzyme permettant de générer des bandes stables sur le gel, correspondant vraisemblablement à des modules structurés indépendants.

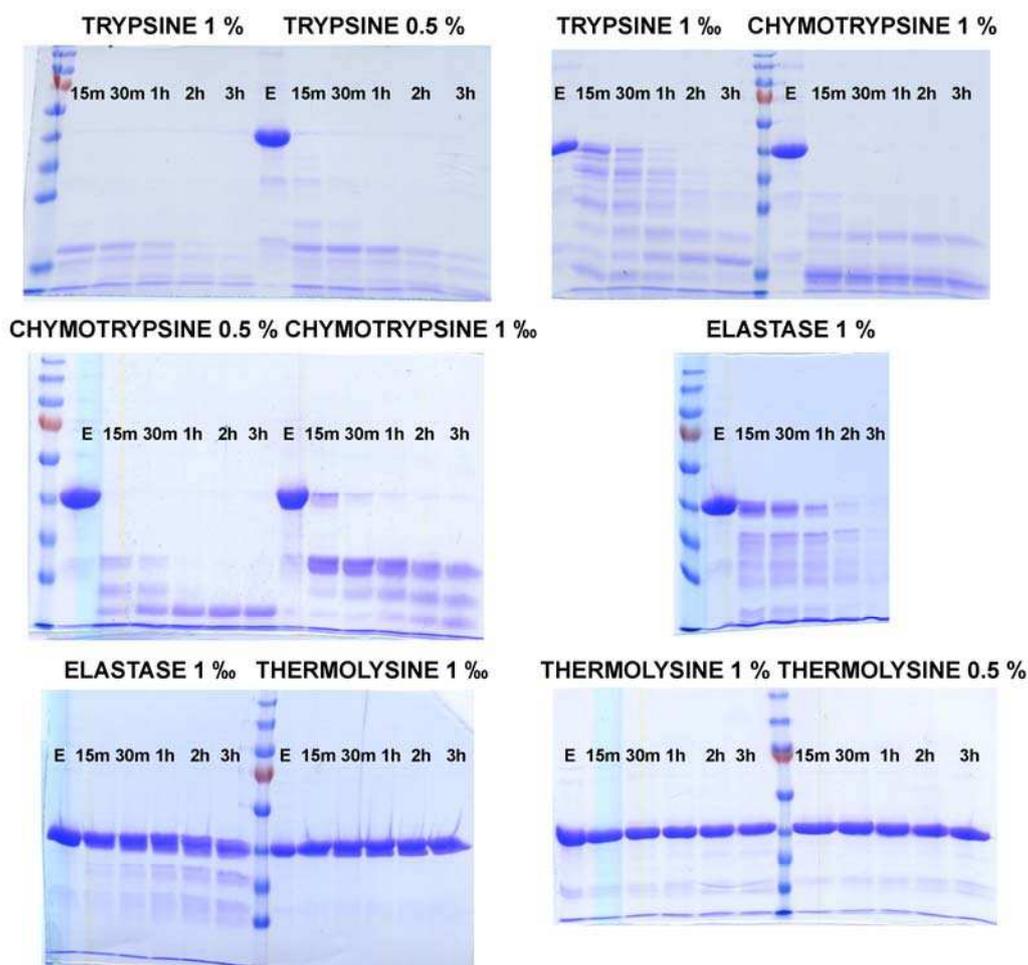


Figure 78. Protéolyse ménagée de p47^{phox}ΔCter par plusieurs protéases

Les différents puits correspondent aux aliquotes prises après 15 min, 30 min, 1 h, 2 h et 3 h de digestion. La protéine entière (E) est également déposée sur gel afin de suivre la digestion.

La trypsine, la chymotrypsine s'avèrent ainsi intéressantes pour des rapports inférieurs à 1 ‰ puisque nous n'observons pas de bandes stables pour un rapport de 1 ‰ (Figure 78). L'élastase semble intéressante pour un rapport compris entre 1 % et 1 ‰. La thermolysine n'est pas capable de digérer p47^{phox}ΔCter dans cette gamme de concentrations.

La seconde étape consiste à identifier plus précisément les conditions de protéolyse ménagée pour lesquelles nous observons un motif de digestion différent entre p47^{phox}ΔCter et p47^{phox}S303/304/328E-ΔCter reflétant une différence de conformation.

Nous comparons ainsi le motif de digestion de ces deux constructions dans quatre conditions de protéolyse ménagée, à savoir 0,5 ‰ chymotrypsine, 0,5 ‰ trypsine et 0,5 % élastase (Figure 79).

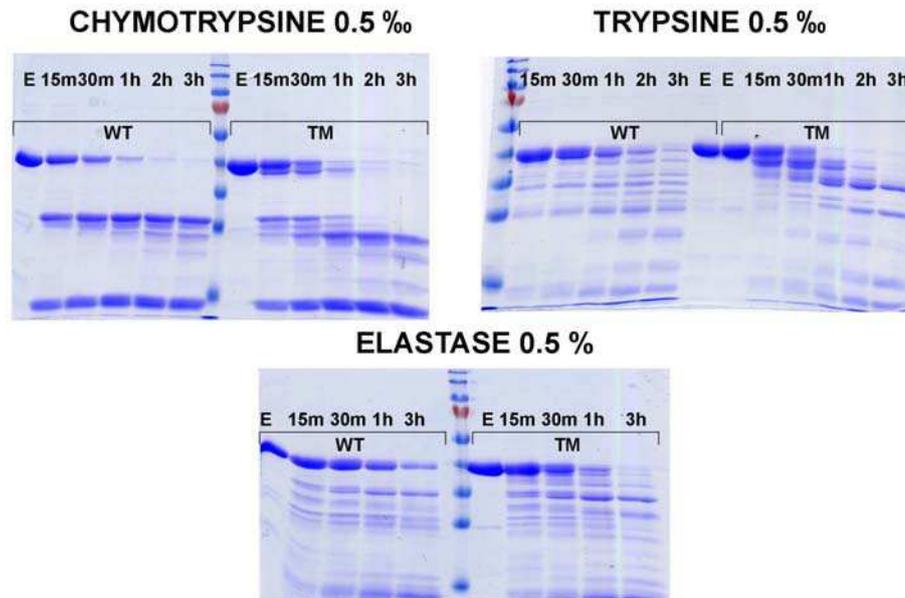


Figure 79. Motifs de digestions de p47^{phox}ΔCter et p47^{phox}TM-ΔCter par trois protéases
Des aliquotes de la protéine entière (E) p47^{phox}ΔCter (WT) ou p47^{phox}S303/304/328E-ΔCter (TM) sont déposées pour chaque condition.

Au final, nous observons des motifs de digestion différents entre p47^{phox}ΔCter et p47^{phox}TM-ΔCter dans les trois cas (Figure 79).

Nous observons avec la chymotrypsine, une bande de poids moléculaire d'environ 24 kDa qui résiste à l'action de l'enzyme chez p47^{phox}ΔCter alors que la digestion continue chez p47^{phox}TM-ΔCter pour donner une bande de poids moléculaire plus faible. Au contraire, nous observons chez p47^{phox}TM-ΔCter deux bandes résistantes à la trypsin, même après 3 h de digestion, alors que le nombre de bandes est plus important chez p47^{phox}ΔCter. Dans les deux cas, les bandes obtenues après digestion de p47^{phox}TM-ΔCter ont un poids moléculaire plus faible qu'avec p47^{phox}ΔCter, ce qui reflète une meilleure accessibilité aux protéases pour le TM. Dans le cas de l'élastase à 0,5 %, nous observons également des bandes de poids moléculaires plus faibles chez p47^{phox}TM-ΔCter. Cependant, ces bandes ne semblent pas aussi stables dans le temps et, en raison de la spécificité plus faible de l'élastase, nous décidons de n'utiliser que la trypsin et la chymotrypsine dans la suite de cette étude.

Les peptides générés lors de ces expériences de protéolyse ménagée sont identifiés par SM, d'après leur masse précise et en utilisant les règles de coupures propres à la trypsin et à la chymotrypsine. Sur la base des constructions de p47^{phox}, des outils de caractérisation décrits précédemment ainsi que de l'échange H/D, une étude a permis de mettre en évidence des différences structurales et fonctionnelles entre les formes autoinhibée et activée de p47^{phox}. Ces résultats sont décrits dans l'article publié dans Febs Letters présenté ci-dessous.

III. Publication : Changements conformationnels de p47^{phox} liés à son activation mis en évidence par échange hydrogène/deutérium et protéolyse ménagée couplés à la spectrométrie de masse



Conformational changes in p47^{phox} upon activation highlighted by mass spectrometry coupled to hydrogen/deuterium exchange and limited proteolysis

Julien Marcoux^{a,b,c,d}, Petr Man^{b,c,d,1}, Mathieu Castellan^{a,c,d}, Corinne Vivès^{a,c,d},
Eric Forest^{b,c,d,*}, Franck Fieschi^{a,c,d,*}

^aLaboratoire des Protéines Membranaires, CEA, DSV, Institut de Biologie Structurale (IBS), 41 rue Jules Horowitz, Grenoble F-38027, France

^bLaboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines, CEA, DSV, Institut de Biologie Structurale (IBS), 41 rue Jules Horowitz, Grenoble F-38027, France

^cCNRS, UMR 5075, Grenoble, France

^dUniversité Joseph Fourier, Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2008

Revised 21 January 2009

Accepted 23 January 2009

Available online 2 February 2009

Edited by Miguel De la Rosa

Keywords:

NADPH oxidase

p47^{phox}

H/D exchange

Limited proteolysis

Conformational change

ABSTRACT

The neutrophil NADPH oxidase is an enzymatic complex involved in innate immunity. Phosphorylation of p47^{phox} promotes its translocation with p67^{phox} and p40^{phox}, followed by membrane interaction and assembly with flavocytochrome b₅₅₈ into a functional complex. To characterise p47^{phox} conformational changes during activation, we used wild-type and the S303/304/328E triple mutant mimicking the phosphorylated state. Hydrogen/deuterium exchange and limited proteolysis coupled to mass spectrometry were used to discriminate between the various structural models. An increase in deuteration confirmed that p47^{phox} adopts an open and more flexible conformation after activation. Limited proteolysis correlated this change with increased auto-inhibitory region (AIR) accessibility. These results establish a structural link between the AIR release and the exposure of the Phox homology (PX) domain.

© 2009 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The neutrophil NADPH oxidase complex has been widely studied over the past 30 years [1]. This multi-component complex is the archetype for a recently expanded group of enzymes divided into seven families named on the basis of the membranal redox component: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 and Duox2 [2,3]. They are found in many cellular types and play different physiological roles, for instance in microbicidal activity, hormone synthesis and vascular tone control [3]. The neutrophil NADPH oxidase complex (based on Nox2) is one of the first barriers during the nonspecific immune response. Its main role is the destruction of

phagocytosed pathogens through the superoxide anion O₂⁻. The reactive oxygen is produced by the oxidase complex in neutrophilic vacuoles by transferring electrons from the NADPH donor to molecular oxygen. The importance of this complex is illustrated by the occurrence of chronic granulomatous disease (CGD) upon mutation(s) of one of its components.

The overall assembly process of this membranal complex has already been thoroughly studied [1,4]. However, its activation and regulation still need to be clearly elucidated. The catalytic core of the NADPH oxidase complex is represented by flavocytochrome b₅₅₈. It enables electron transfer and is composed of two membrane proteins, Nox2 and p22^{phox}. The other parts of the complex are cytosolic proteins: p40^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} and Rac(1 or 2), a small G protein. Except for Rac, these proteins undergo phosphorylation during the NADPH oxidase activation [5,6]. Upon phosphorylation, all cytosolic factors translocate to the membrane-bound catalytic core, which triggers the activation of the whole assembly.

Due to their modular nature, p40^{phox}, p67^{phox} and p47^{phox} have been reluctant to crystallisation trials and X-ray structure determination. Finally, the structure of the entire p40^{phox} has been recently released [7], while the structures of the entire p67^{phox} and p47^{phox} remain unknown. Therefore, structural and functional studies on these two proteins have long been conducted using their isolated

Abbreviations: ACN, acetonitrile; phox, phagocyte oxidase; AIR, autoinhibitory region; SH₃, src homology 3; PX, Phox homology; SAXS, small-angle X-ray scattering; GST, glutathione S-transferase; DTT, 1-4, dithiothreitol; PtdIns(3,4)P₂, phosphoinositol-3,4-bisphosphate; SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; ESI, electrospray ionization; TOF, time of flight.

* Corresponding authors. Address: Institut de Biologie Structurale (IBS), 41 rue Jules Horowitz, Grenoble F-38027, France. Fax: +33 4 38 78 54 94 (F. Fieschi).

E-mail addresses: eric.forest@ibs.fr (E. Forest), franck.fieschi@ibs.fr (F. Fieschi).

¹ Present address: Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i, CZ-14220 Prague 4, Czech Republic.

modules [8–14]. Indeed, p47^{phox} has been investigated to determine whether it plays a role as a complex organiser triggered by its activation. Based on structural data obtained with isolated modules, a model for the activation of p47^{phox} was proposed [6,10,15]. According to these studies, p47^{phox} exists as an auto-inhibited form in the resting state. The auto-inhibition state has been explained by intramolecular interactions between the Phox homology (PX) domain and the SH3_B [16,17] and between the tandem SH3s and an auto-inhibiting region (AIR) [9,12,18]. During activation, these modules are believed to be unmasked, enabling PX domain interaction with membrane anionic phospholipids [10,19] and the tandem SH3s interaction with the p22^{phox} C-terminus [13,14]. However, this model seems unlikely because the second SH3_B cannot interact with the PX and the AIR at the same time, since both partners would use the same binding site [9,17].

Our group recently presented a revised model based on small-angle X-ray scattering (SAXS) studies of the entire protein, showing that the p47^{phox} auto-inhibited form was more elongated than expected [20]. This new model suggests that the AIR binds to the tandem SH3s and proposes a new interaction mode for the PX domain with both SH3_A and the AIR. At this stage, additional data are required to confirm and refine the details of the auto-inhibited model but also to describe the molecular rearrangements occurring upon p47^{phox} activation.

In this study, we used wild-type auto-inhibited p47^{phox} and a triple mutant (S303/304/328E) known to mimic the phosphorylated activated form of p47^{phox} [9,10,15,21,22]. Using H/D exchange coupled to mass spectrometry, we followed solvent accessibility and flexibility modifications occurring upon conformational changes from the resting to the activated state. In addition, limited proteolysis identified modifications in the AIR's susceptibility to cleavage. Based on the results presented herein, we established a structural link between the simultaneous releases of the AIR and PX in a p47^{phox} construct integrating all the functional modules involved in the activation process.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Glutathione Sepharose high-performance and SP Sepharose high-performance columns came from GE Healthcare. The Jupiter 5 μm C18 column (50 × 1.00 mm; 300 Å) was from Phenomenex. Protein MacroTrap (C8) was purchased from Michrom Bioresources.

The following products were purchased from Avanti Polar Lipids: 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE), 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphate (POPA) and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phosphoinositol-3,4-bisphosphate] (PtdIns (3, 4)P₂).

2.2. p47^{phox} cloning, expression and purification

cDNA encoding p47^{phox} residues 1–342 was cloned into pGex-6P vector adding an N-terminal glutathione S-transferase (GST) fusion tag. After GST cleavage, 10 additional residues remained at the N-terminus of the protein. These additional residues will be referred to as negative numbers in peptide numbering and the resulting p47^{phox} (–10–342) construct as p47^{phox}ΔCter. The triple mutation S303/304/328E was introduced by PCR-mediated site-directed mutagenesis, leading to the form mimicking the activated p47^{phox}, referred to as p47^{phox}TM-ΔCter. The proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and purified according to Durand et al. [20].

2.3. Binding the PX domain to multi-lamellar vesicles (MLV)

The in vitro semi-quantitative liposome-binding assay was adapted from Ago et al. [16] with minor modifications. Liposomes were prepared by mixing POPC and POPE (50:50) for the control (MLV1) and POPC, POPE, POPA and PtdIns(3,4)P₂ (45:45:5:5) for specific liposomes (MLV2). The mixture was then dried under nitrogen and resuspended to a concentration of 2 mM of total lipids in a binding buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM 1-4, dithiothreitol (DTT)). After 2 h of incubation on ice, liposomes were obtained by vortexing. Proteins (5 μM) were incubated with liposomes (1 mM) for 15 min at 20 °C in 100 μL binding buffer. Liposomes were collected by ultracentrifugation (45 min at 49000 rpm in a TLA 100.4 rotor) and aliquots were taken for further analysis by 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE). Coomassie Blue-stained gels were scanned and analysed by densitometry. Three independent experiments were conducted.

2.4. Limited proteolysis analysis

Chymotrypsin and trypsin were chosen among other proteases (elastase, thermolysin) by SDS–PAGE digestion pattern screening. Aliquots (5 μg/well) were taken at 15 min, 30 min, 1 h, 2 h and 3 h and the different protein/enzyme ratios were analysed. p47^{phox} incubation with 0.5% chymotrypsin or trypsin at 20 °C displayed significant differences between p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter digestion patterns (Fig. 3).

The p47^{phox} digests were loaded onto a Protein MacroTrap and desalted with 0.03% TFA for 1 min. The peptides were eluted on a C18 column and separated by a three-step elution (5 min at 35% acetonitrile (ACN), 10 min at 45% ACN and 2 min at 100% ACN). The column was directly interfaced to an ESI-TOF-MS (Agilent). The most representative digestion times were reported here (1 h and 3 h for trypsin and chymotrypsin, respectively). The masses of detected peptides were searched for against the p47^{phox} sequence using the FindPept software.

2.5. Global H/D exchange kinetics

The exchange of p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter was initiated by a 20-fold dilution in a deuterated buffer (5 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EDTA, 2 mM DTT and 200 mM NaCl). Aliquots (40 μL) were taken after 10 s, 30 s, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, 5 h, 7 h and 9 h. The exchange was quenched by adding 5.6 μL of 50 mM HCl and rapid freezing in liquid nitrogen. Next, each sample was quickly thawed, online desalted on Protein MacroTrap, eluted with 70% ACN and analysed using ESI-TOF-MS. The spectra were smoothed and deconvoluted with Magtran software [23]. Deuteration levels were calculated according to Zhang and Smith [24]. Three independent measurements were taken.

3. Results and discussion

3.1. p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter are representative of the resting and activated states of full-length p47^{phox}

Conformational changes that occur during p47^{phox} phosphorylation promote new interactions with membrane lipids and p22^{phox} membrane protein [10,14,19]. The PX domain, the tandem SH3s and the AIR are directly involved in these interaction property changes. On the contrary, the C-terminal region of p47^{phox} (343–390) is only required for p67^{phox} and p40^{phox} interaction, allowing their co-translocation to the membrane [25,26]. In addition, this C-terminal region of p47^{phox} is not involved in binding

to p22^{phox} [9,18] or to PI(3,4)P₂ lipids [27]. The full-length recombinant form of p47^{phox} is well expressed but is unstable due to the high protease sensitivity of its C-terminal region during purification. Therefore, to avoid heterogeneity of the sample, a C-terminal truncated form of p47^{phox} (p47^{phox}ΔCter) was used. It contains all the structural elements involved in the locking of p47^{phox} in its resting state. Using NMR and CD spectroscopy, Shen et al. [27] have recently demonstrated that such C-terminal truncation does not induce global or domain unfolding.

It was previously shown that mutations of serines 303, 304 and 328 into glutamates were sufficient to mimic their phosphorylation and the transition from a resting to an activated state. These mutated forms were shown to bind membranes and p22^{phox} with a greater affinity than p47^{phox} [10,15,16]. Moreover, they induce the O₂⁻ production by the whole NADPH oxidase complex [21]. The truncated triple mutant S303/304/328E, p47^{phox}TM-ΔCter, was generated as a model of activated p47^{phox}. The existence of two distinct conformations, with increased flexibility in the activated state, has been suggested to account for the interaction with the membrane [15]. To confirm this hypothesis and demonstrate the functionality of the construct, p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter were first incubated with nonspecific and specific liposomes, with BSA as a negative control. As expected, none of the proteins bound to nonspecific vesicles (MLV1, bound/unbound <0.5); BSA did not interact with any vesicles (Fig. 1). In contrast, both p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter interacted with liposomes containing 5% PI(3,4)P₂ (MLV2), but at different levels. Interestingly, the weak interaction of p47^{phox}ΔCter shows that the auto-inhibited conformation is not locked as tightly as has often been suggested. This basal interaction of the p47^{phox}ΔCter form with lipids was also observed in similar pull-down experiments and suggests an equilibrium between two different conformations (closed and open) [10,16,27]. Interaction was greater for p47^{phox}TM-ΔCter (bound/unbound = 14.7 ± 0.2) than for the p47^{phox}ΔCter (bound/unbound = 6.4 ± 0.6). This stronger interaction between p47^{phox}TM-ΔCter and MLV2 clearly shows its activated conformation. The membrane-binding ratio increase for the activated state of p47^{phox} agrees with previous reports by other

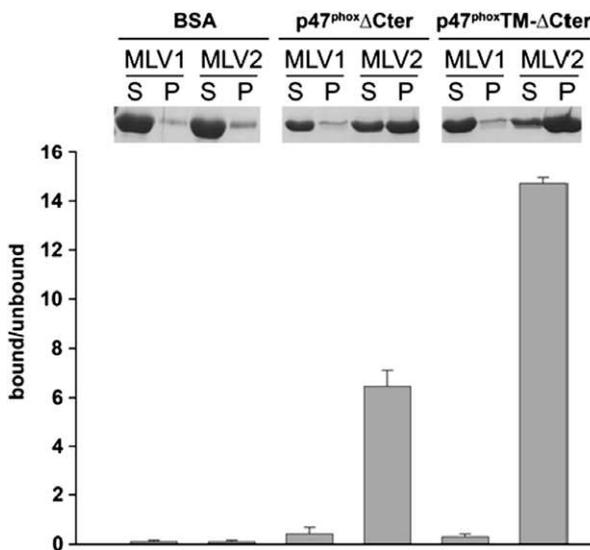


Fig. 1. Phosphoinositide-binding activity of p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter vs negative control, BSA. p47^{phox}ΔCter, p47^{phox}TM-ΔCter or BSA were incubated with liposomes containing POPC:POPE 50:50 (MLV1) or POPC:POPE:POPA:PtIn(3,4)P₂ 45:45:5:5 (MLV2). S and P are liposomal supernatant and pellet after centrifugation, corresponding to the unbound and bound fraction, respectively. Samples were analysed by SDS-PAGE and quantified by densitometry.

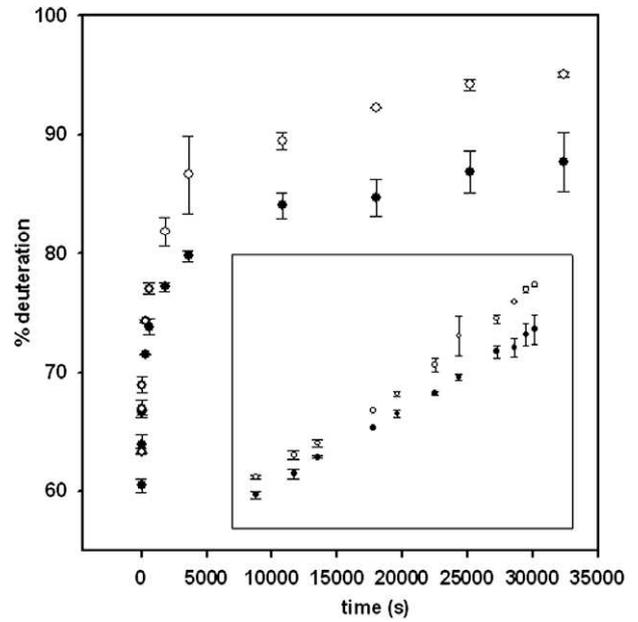


Fig. 2. Deuteration kinetics for p47^{phox}ΔCter (●) and p47^{phox}TM-ΔCter (○) at pD 7.4. The inset is a replot of the curves on the logarithmic scale.

groups [10,16], confirming that the mutations introduced favor a more open conformation and increased access to the PX module.

3.2. The activated state of p47^{phox} presents an increased solvent accessible surface and flexibility

Until now, the activated state of the entire p47^{phox} has been defined as an open state, as demonstrated by functional studies [15]. Indeed, the structural data obtained so far have always been determined on isolated modules leading to inconsistent sets of data regarding the locking mechanism of the entire protein, as described previously [20]. To structurally describe the potential conformational events occurring in the whole protein upon activation, we followed the time course of deuteration for both p47^{phox} forms. This technique is today widely used to better characterise non-

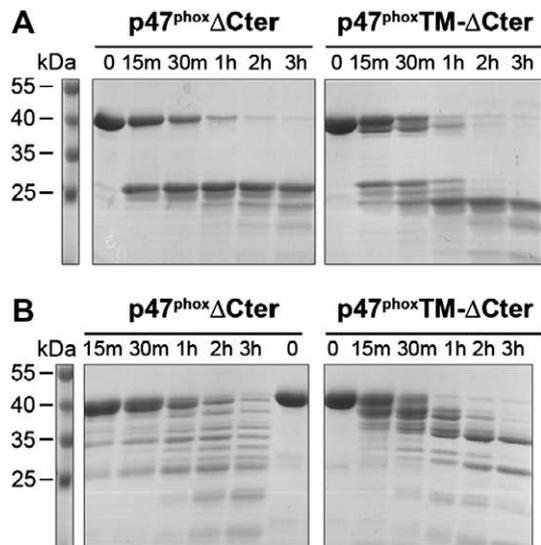


Fig. 3. SDS-PAGE of p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter proteolysis with 0.5% chymotrypsin (A) and trypsin (B).

crystallizing protein and protein dynamics or interactions [24,28,29]. The deuteration kinetics showed a significant difference between p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter proteins (Fig. 2). Higher deuteration levels of p47^{phox}TM-ΔCter that are already visible after few seconds of exchange (inset, Fig. 2) could be interpreted as “opening” the protein, resulting in an increase in the surface exposed to the solvent. The steady increase in the difference between p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter may also point to another change: higher structural flexibility of the activated form. These global deuteration kinetics are the first experimental evidence of structural differences between the auto-inhibited and activated forms of p47^{phox}.

3.3. Upon activation, the AIR goes from a hindered to an exposed state

Local information on structural differences can be obtained by limited proteolysis, as is commonly used for protein domain determination [30]. The digestion time course was followed with 0.5% trypsin or chymotrypsin. Aliquots were collected at the times indicated above and all samples were resolved on SDS-PAGE (Fig. 3). Direct visual inspection of Coomassie Blue-stained gels clearly showed lower molecular-weight bands for p47^{phox}TM-ΔCter than for p47^{phox}ΔCter, reflecting better protease accessibility and suggesting a more open and/or flexible conformation for the activated form. LC-ESI-TOF analysis of p47^{phox}ΔCter digested with 0.5% chy-

motrypsin supported these findings by identifying the two major masses corresponding to the –10–139 and 140–342 peptides (Fig. 4A). However, more than two peaks were obtained after digestion of p47^{phox}TM-ΔCter (Fig. 4B). Two major peaks again corresponded to the –10–139 and 140–342 peptides while other peaks matched the –10–324, –10–331, 140–324 and 140–331 peptides. Trypsin limited proteolysis (0.5%) generated more peptides than chymotrypsin after 1 h (see supplementary data). We identified 19 peaks for each protein (Table 1) generated through 12 cleavage sites. From the trypsin and chymotrypsin digests, four common cleavage sites were identified: Arg₈₅, Tyr₁₃₉, Lys₁₄₃ and Lys₁₄₆. We also found specific cleavage sites after Arg_{335/336/337} for p47^{phox}ΔCter and after Arg_{292/296/314/316/318}, Lys₂₉₅, Tyr₃₂₄ and Phe₃₃₁ for p47^{phox}TM-ΔCter.

These common sites are easily explained by our model. Tyrosine 139 and lysines 143 and 146 are situated in a linker region between the PX domain and the SH₃ tandem expected to be unstructured and highly flexible (Fig. 5) [20]. However, this region has recently been suggested to be involved in the activation process and more precisely to play an active role in maintaining the auto-inhibited conformation [27]. If different structural states of this linker exist in both p47^{phox} forms, this approach cannot discriminate them. The fourth common site, Arg₈₅, is located at the beginning of a loop linking two helices in the PX structure [10], whereas the other lysines and arginines from PX belong to secondary structure elements. Thus, only Arg₈₅ is accessible by trypsin in the PX domain. The existence of this cleavage site in both p47^{phox} forms suggests that this side of the PX is always accessible and probably not involved in a locking interaction in the auto-inhibited form.

The specific cleavage sites, Arg_{335,336,337}, are situated in the flexible C-terminal part of p47^{phox} downstream of the AIR, which

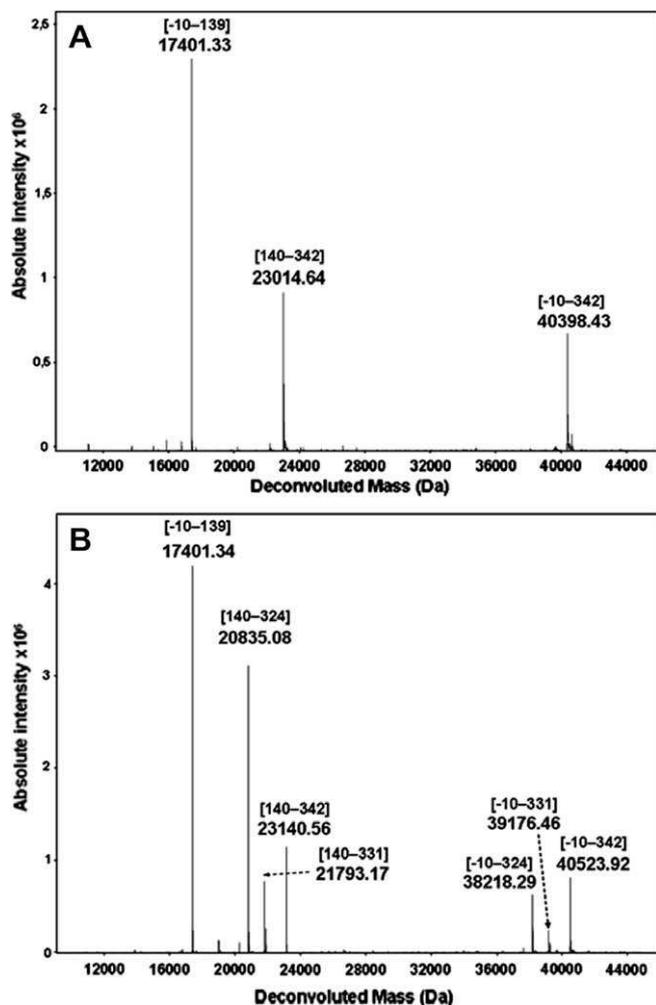


Fig. 4. Deconvoluted ESI-TOF mass spectra of p47^{phox}ΔCter (A) and p47^{phox}TM-ΔCter (B) after 3 h of digestion with chymotrypsin at 0.5%. Annotations show first and last amino acids of each peptide detected.

Table 1

Identified peptides after digestion of p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter with 0.5% trypsin or chymotrypsin (experimental masses and mass errors are given).

Limited proteolysis							
p47 ^{phox} ΔCter				p47 ^{phox} TM-ΔCter			
Exp. mass	Sequence		ppm	Exp. mass	Sequence		ppm
	From	To			From	To	
<i>Trypsin</i>							
40399.7	-10	342	-17	37541.54	-10	318	-13
39890.03	-10	337	-14	37257.74	-10	316	-21
39733.58	-10	336	-8	37014.65	-10	314	-22
39577.42	-10	335	-8	36604.66	1	318	99
39462.68	1	342	-17	36320.65	1	316	-14
38952.92	1	337	-12	36077.41	1	314	-23
38796.05	1	336	5	34908.12	-10	296	-20
38640.62	1	335	-14	34752.1	-10	295	-27
28700.65	86	337	-7	34382.76	-10	292	-22
28388.28	86	335	-7	33971.29	1	296	-21
21736.55	147	337	-53	33445.46	1	292	-17
21723.05	144	335	13	18860.38	147	314	-25
21422.84	147	335	8	18172.36	-10	146	-16
18172.33	-10	146	-12	17872.17	-10	143	-23
17872.19	-10	143	-20	17235.43	1	146	-24
17235.48	1	146	-19	16934.87	1	143	-9
16934.9	1	143	-12	16228.42	147	292	-20
11206.87	-10	85	1	11206.88	-10	85	9
10270.31	1	85	-31	10270.56	1	85	-59
<i>Chymotrypsin</i>							
40398.43	-10	342	15	40523.92	-10	342	30
23014.64	140	342	12	39176.46	-10	331	29
17402.33	-10	139	-12	38218.29	-10	324	32
				23140.56	140	331	20
				21793.17	140	342	14
				20835.08	140	324	15
				17401.34	-10	139	45

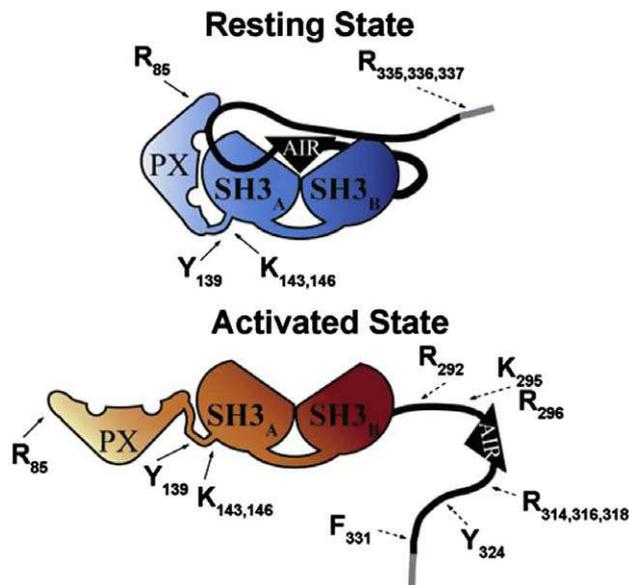


Fig. 5. Schematic representation of the cleavage sites obtained after digestion with 0.5% trypsin and chymotrypsin. Common sites are represented with solid arrows and specific sites for p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter with dashed arrows. AIR, auto-inhibiting region (represented in black).

explains their accessibility in p47^{phox}ΔCter. Peptides generated by these cleavage sites in p47^{phox}ΔCter, such as 1–335, 1–336 and 1–337, are not present when digesting the p47^{phox}TM-ΔCter because the tryptic proteolysis went further and generated shorter peptides, such as 1–316, 1–314 or 1–292. Moreover, all eight specific cleavage sites (Arg_{292/296/314/316/318}, Lys₂₉₅, Tyr₃₂₄ and Phe₃₃₁) of p47^{phox}TM-ΔCter are part of the AIR. This domain was shown to be implicated in the auto-inhibition of tandem SH3s [9] and we confirm here that it is more accessible and flexible in the p47^{phox}TM-ΔCter activated state.

3.4. Conclusion and perspectives

This study compared two conformational states of p47^{phox} that play a key role in the activation process of the neutrophil NADPH oxidase. The global H/D exchange kinetics revealed a significant difference in deuteration between the two constructs, which can be interpreted as an increase in both solvent accessibility and structural flexibility of the activated form. This was further supported by limited proteolysis of p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter, identifying eight extra cleavage sites in the AIR of p47^{phox}TM-ΔCter. To our knowledge, this work is the first structural approach on a p47^{phox} form integrating all the modules involved in its auto-inhibition. It confirms the existence of conformational changes between the inhibited and activated forms. We demonstrated that incorporation of negative charges in positions 303, 304 and 328 results in the release of the AIR from a hindered to an accessible state. This confirms that the AIR and the tandem SH3s form a super-complex in auto-inhibited p47^{phox}, as has previously been hypothesised from structural analysis on isolated domains [9]. Furthermore, enhancement of the PX–lipid interaction is associated with the AIR release, confirming the need for a well-constituted “tandem SH3s-AIR super-complex” for PX locking. From our previously described SAXS-derived envelope of the entire p47^{phox}, the PX domain can only fit laterally to this “tandem SH3s-AIR super-complex” in the auto-inhibited state [20]. Altogether, this suggests that there are contacts between the PX and parts of this super-complex (Fig. 5). This model is in full agreement with the behaviour of the W263R mutation in the tandem

SH3s, as previously described [10]. This mutation is an alternate way to generate a lipid-binding activated state of p47^{phox}. Indeed, in this mutant, exaltation of the PX properties may result from the initial disruption of the “tandem SH3s-AIR super-complex”. In accordance with this view, a recent *in vivo* study has contributed new data arguing in favor of this type of organisation [22].

A complete characterisation of the p47^{phox} auto-inhibitory organisation would require the identification of an interaction interface between the PX domain and the SH3_A domain and/or loop(s) within the AIR. The difference observed during global deuteration kinetics opens the way to local hydrogen/deuterium exchange kinetics so that the spatial resolution of these results can be increased considerably [24,28,29]. This approach is particularly well suited to identifying such interfaces and is currently underway.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.febslet.2009.01.046](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.01.046).

References

- [1] Vignais, P.V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 1428–1459.
- [2] Lambeth, J.D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189.
- [3] Nauseef, W.M. (2008) Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *J. Biol. Chem.* 283, 16961–16965.
- [4] Li, X.J., Fieschi, F., Paclat, M.H., Grunwald, D., Campion, Y., Gaudin, P., Morel, F. and Stasia, M.J. (2007) Leu505 of Nox2 is crucial for optimal p67phox-dependent activation of the flavocytochrome b558 during phagocytic NADPH oxidase assembly. *J. Leukoc. Biol.* 81, 238–249.
- [5] 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.
- [6] Massenet, C., Chenavas, S., Cohen-Addad, C., Dagher, M.C., Brandolin, G., Pebay-Peyroula, E. and Fieschi, F. (2005) Effects of p47phox C terminus phosphorylations on binding interactions with p40phox and p67phox. Structural and functional comparison of p40phox and p67phox SH3 domains. *J. Biol. Chem.* 280, 13752–13761.
- [7] Honbou, K., Minakami, R., Yuzawa, S., Takeya, R., Suzuki, N.N., Kamakura, S., Sumimoto, H. and Inagaki, F. (2007) Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. *EMBO J.* 26, 1176–1186.
- [8] Grizot, S., Fieschi, F., Dagher, M.C. and Pebay-Peyroula, E. (2001) The active N-terminal region of p67phox. Structure at 1.8 Å resolution and biochemical characterizations of the A128V mutant implicated in chronic granulomatous disease. *J. Biol. Chem.* 276, 21627–21631.
- [9] 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.
- [10] Karathanassis, D., Stahelin, R.V., Bravo, J., Perisic, O., Pacold, C.M., Cho, W. and Williams, R.L. (2002) Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3, 4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO J.* 21, 5057–5068.
- [11] Taylor, R.M. et al. (2007) Characterization of surface structure and p47phox SH3 domain-mediated conformational changes for human neutrophil flavocytochrome b. *Biochemistry* 46, 14291–14304.
- [12] Yuzawa, S., Ogura, K., Horiuchi, M., Suzuki, N.N., Fujioka, Y., Kataoka, M., Sumimoto, H. and Inagaki, F. (2004) Solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox in an autoinhibited form. *J. Biol. Chem.* 279, 29752–29760.
- [13] Nobuhisa, I., Takeya, R., Ogura, K., Ueno, N., Kohda, D., Inagaki, F. and Sumimoto, H. (2006) Activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase requires co-operation between the tandem SH3 domains of p47phox in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent alpha-helix of p22phox. *Biochem. J.* 396, 183–192.
- [14] Ogura, K., Nobuhisa, I., Yuzawa, S., Takeya, R., Torikai, S., Saikawa, K., Sumimoto, H. and Inagaki, F. (2006) NMR solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox complexed with a p22phox-derived proline-rich peptide. *J. Biol. Chem.* 281, 3660–3668.
- [15] 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.
- [16] 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. USA* 100, 4474–4479.
- [17] Hiroaki, H., Ago, T., Ito, T., Sumimoto, H. and Kohda, D. (2001) Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nat. Struct. Biol.* 8, 526–530.
- [18] Yuzawa, S., Suzuki, N.N., Fujioka, Y., Ogura, K., Sumimoto, H. and Inagaki, F. (2004) A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes Cells* 9, 443–456.
- [19] Ago, T., Takeya, R., Hiroaki, H., Kuribayashi, F., Ito, T., Kohda, D. and Sumimoto, H. (2001) The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 733–738.
- [20] Durand, D., Cannella, D., Dubosclard, V., Pebay-Peyroula, E., Vachette, P. and Fieschi, F. (2006) Small-angle X-ray scattering reveals an extended organization for the autoinhibitory resting state of the p47(phox) modular protein. *Biochemistry* 45, 7185–7193.
- [21] Inanami, O., Johnson, J.L. and Babior, B.M. (1998) The leukocyte NADPH oxidase subunit p47PHOX: the role of the cysteine residues. *Arch. Biochem. Biophys.* 350, 36–40.
- [22] Ueyama, T. et al. (2008) Sequential binding of cytosolic Phox complex to phagosomes through regulated adaptor proteins: evaluation using the novel monomeric Kusabira-Green System and live imaging of phagocytosis. *J. Immunol.* 181, 629–640.
- [23] Zhang, Z. and Marshall, A.G. (1998) A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9, 225–233.
- [24] Zhang, Z. and Smith, D.L. (1993) Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation. *Protein Sci.* 2, 522–531.
- [25] Dusi, S., Donini, M. and Rossi, F. (1996) 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.* 314 (Pt 2), 409–412.
- [26] Heyworth, P.G., Curnutte, J.T., Nauseef, W.M., Volpp, B.D., Pearson, D.W., Rosen, H. and Clark, R.A. (1991) Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *J. Clin. Invest.* 87, 352–356.
- [27] Shen, K., Sergeant, S., Hantgan, R.R., McPhail, L.C. and Horita, D.A. (2008) Mutations in the PX-SH3A linker of p47phox decouple PI(3, 4)P2 binding from NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 47, 8855–8865.
- [28] Brier, S., Lemaire, D., Debonis, S., Forest, E. and Kozielski, F. (2004) Identification of the protein binding region of S-trityl-L-cysteine, a new potent inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Biochemistry* 43, 13072–13082.
- [29] Man, P., Montagner, C., Vernier, G., Dublet, B., Chenal, A., Forest, E. and Forge, V. (2007) Defining the interacting regions between apomyoglobin and lipid membrane by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry. *J. Mol. Biol.* 368, 464–472.
- [30] Gao, X. et al. (2005) High-throughput limited proteolysis/mass spectrometry for protein domain elucidation. *J. Struct. Funct. Genomics* 6, 129–134.

Supplementary Data

After 1h digestion with 0.5% trypsin, samples were loaded onto a Protein MacroTrap and desalted with 0.03% TFA for 1 min. Peptides were then eluted on a C18 column and separated by a step gradient (5 min at 35% ACN, 10 min at 45% ACN and 2 min at 100% ACN). We basically obtained two chromatographic peaks, first at 12-14 min (45% ACN) and second at 22-24 min (100% ACN). We show here the spectra obtained for both p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter, after deconvolution of sum of scans over each chromatographic peak.

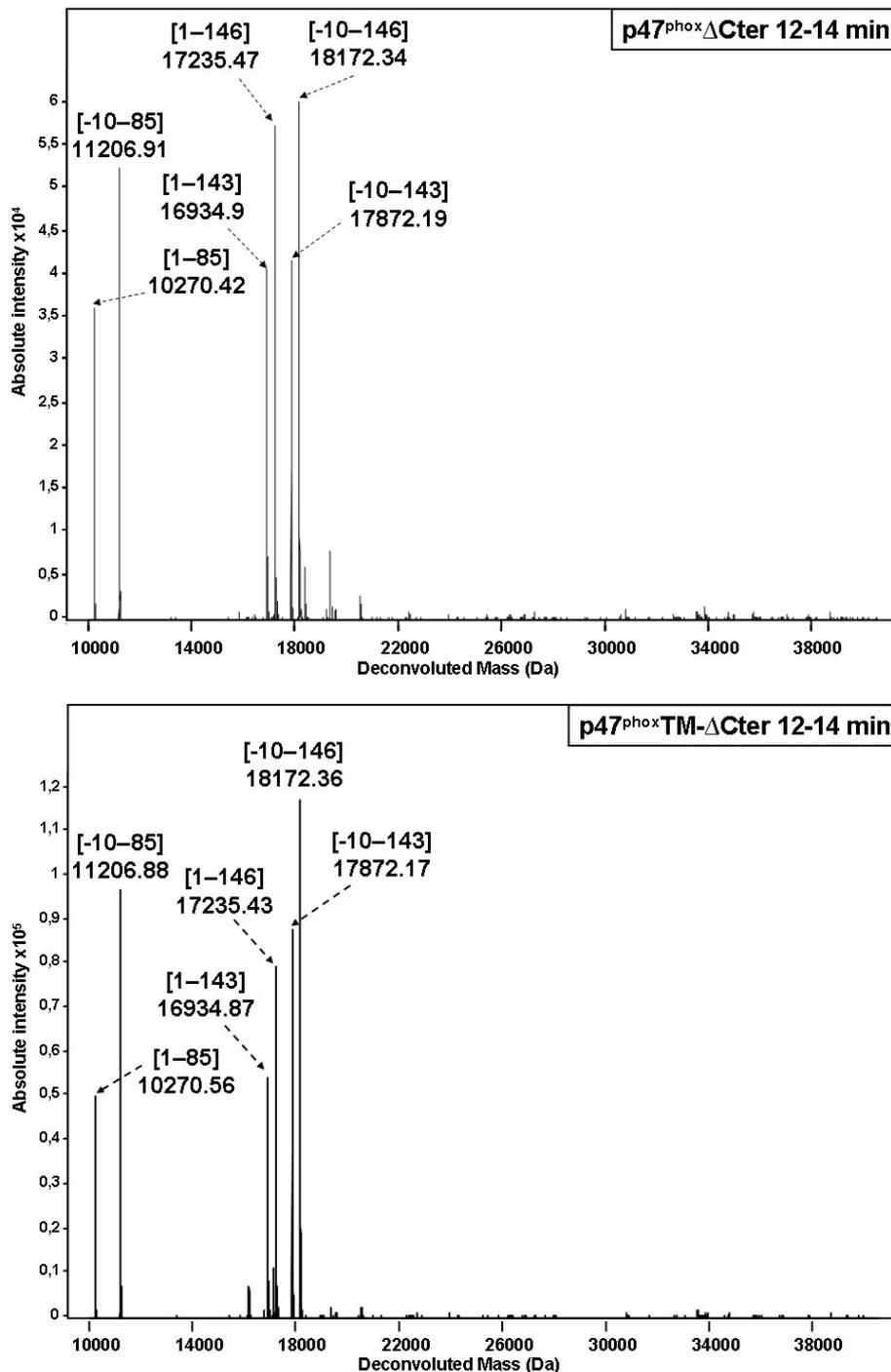


Figure 1: Deconvoluted spectra (first peak) after 1h digestion of p47^{phox}ΔCter (top) and p47^{phox}TM-ΔCter (bottom) with 0.5% trypsin.

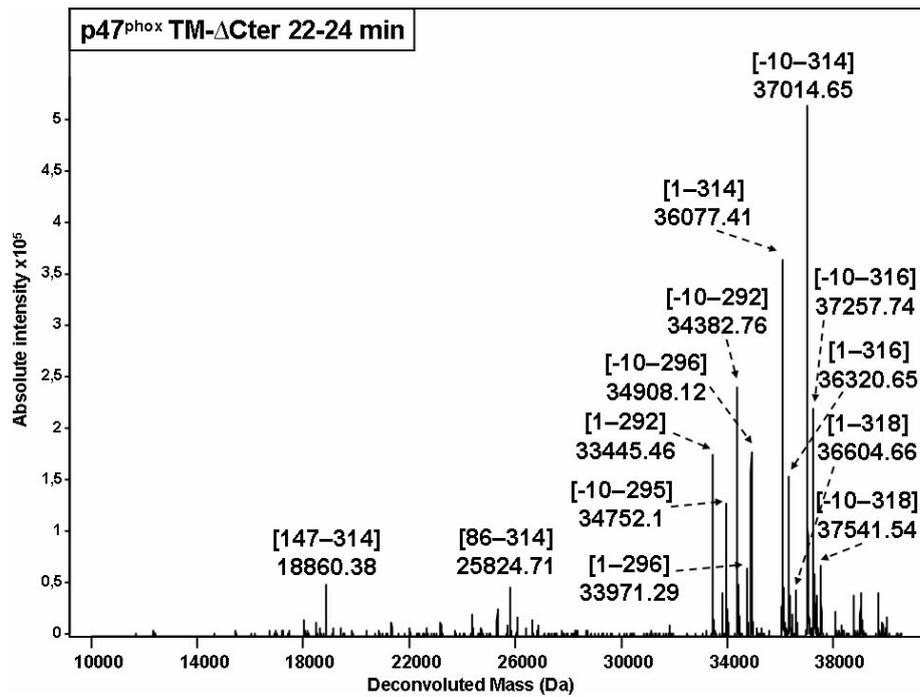
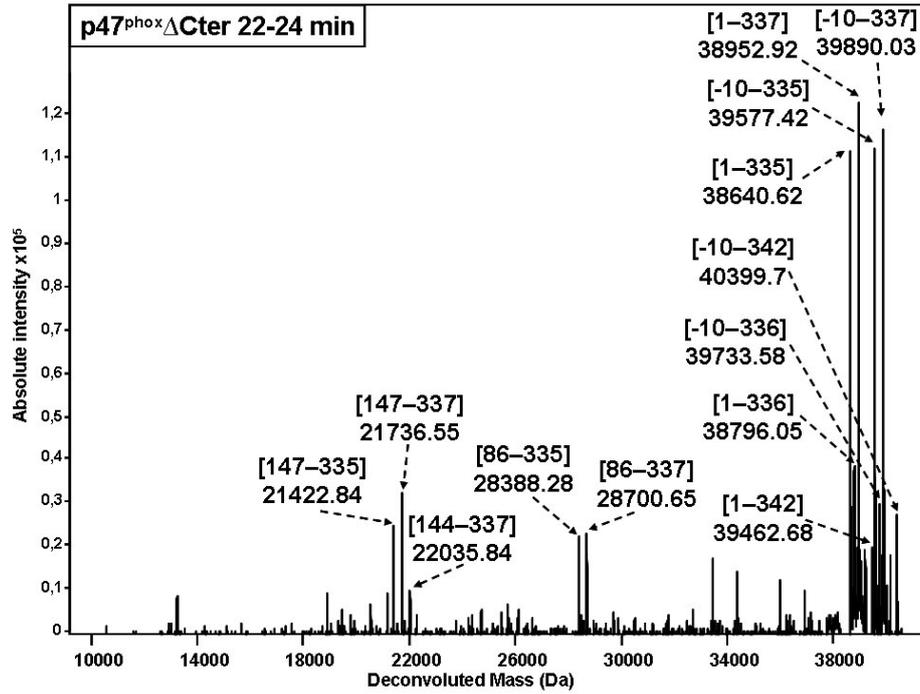


Figure 2: Deconvoluted spectra (second peak) after 1h digestion of p47^{phox} WT (top) and p47^{phox} TM (bottom) with 0.5% trypsin.

IV. CONCLUSION

Les résultats obtenus dans la première partie de ce travail ont permis tout d'abord de confirmer la validité de la démarche suivie, en démontrant des différences à la fois fonctionnelles et structurales entre la forme sauvage autoinhibée et la forme triple mutante activée de p47^{phox}. Il a ainsi été démontré que p47^{phox}TM interagissait mieux que p47^{phox} avec les phospholipides spécifiques de la membrane phagosomale. La mutation des trois sérines 303/304/328 en glutamates entraîne donc une exaltation de cette interaction, validant le choix de cette construction pour mimer les phosphorylations de la forme activée de p47^{phox}.

Par ailleurs, les différences observées lors des cinétiques globales de deutération sont une première preuve des différences conformationnelles entre ces deux constructions. Elles reflètent une meilleure accessibilité au solvant pour la forme activée, c'est-à-dire une conformation plus « ouverte ».

Enfin, la protéolyse ménagée couplée à la spectrométrie de masse a permis de confirmer le relargage de la région auto-inhibitrice suite à l'activation de p47^{phox}.

Ce premier travail a permis finalement de démontrer sur des formes entières de p47^{phox} que l'ouverture du domaine PX et le relargage de l'AIR sont couplés.

Cependant, la nature de l'interaction intramoléculaire permettant le masquer le site de reconnaissance des phospholipides du domaine PX à l'état de repos est toujours mal connu. Une meilleure connaissance de l'aspect structural de cette interaction permettrait certainement de mieux comprendre comment la phosphorylation des sérines entraîne *in fine* l'ouverture du PX, via le relargage de l'AIR. C'est l'objet de la suite de ce travail de thèse.

Chapitre II : Identification des surfaces exposées au solvant lors de l'activation de p47^{phox}

I. Introduction

A ce point de l'étude, nous disposons d'une preuve fonctionnelle de l'augmentation de l'interaction p47^{phox}-lipides et d'une preuve structurale de l'abolition de l'interaction p47^{phox}-AIR sur la forme activée. Il nous manque donc les résultats complémentaires, à savoir une preuve structurale de l'abolition de l'interaction intramoléculaire masquant le domaine PX et une preuve fonctionnelle de l'augmentation de l'interaction p47^{phox}-p22^{phox}, sur la forme activée.

Concernant l'aspect fonctionnel, nous avons essayé de mettre au point un test d'interaction entre p47^{phox} et GST-p22^{phox}Cter par co-sédimentation et par chromatographie d'exclusion stérique. Ces méthodes se sont révélées inadaptées et la mise au point d'un test par résonance plasmonique de surface (BiacoreTM) a finalement permis de mettre en évidence les différences fonctionnelles souhaitées (c.f II.3.A).

Nous avons également tenté de mettre au point un test par BiacoreTM équivalent pour quantifier l'interaction entre p47^{phox} et les lipides, sans obtenir de résultats satisfaisants (c.f II.3.B). Le test de co-précipitation avec les liposomes a donc été conservé pour la suite des expérimentations.

D'un point de vue structural, nous avons naturellement enchaîné les cinétiques globales de DXMS par des cinétiques locales, afin d'identifier les surfaces exposées au solvant lors de l'activation de p47^{phox}. La cartographie complète de p47^{phox} fut établie en utilisant conjointement la pepsine et les protéases de type XIII et XVIII (c.f II.1).

L'ensemble des tentatives de mises au point sont présentées ci-dessous dans les résultats préliminaires (c.f II.) et l'ensemble des résultats obtenus sont rassemblés dans une seconde publication en cours de rédaction, présentée dans ce chapitre (c.f III.).

II. Résultats préliminaires

Les expériences de cinétiques locales de deutération nécessitent comme prérequis l'identification préalable de tous les peptides générés par les protéases acides utilisées après digestion de la protéine étudiée. Cette étape est facilitée par l'utilisation d'une base de

données Mascot contenant la séquence de p47^{phox}ΔCter. Celle-ci permet de comparer les spectres MS/MS expérimentaux avec tous les spectres MS/MS théoriques générés à partir de la séquence de p47^{phox}ΔCter. Cependant, cette comparaison est également effectuée manuellement sur les peptides les plus intenses non reconnus par Mascot, afin d'obtenir une couverture totale de la séquence et un nombre maximum de peptides. Le logiciel GPMAW, qui permet de générer les fragmentations théoriques d'un peptide donné, sera utilisé pour l'analyse manuelle des spectres MS/MS expérimentaux.

II.1 Cartographie par SM

Après digestion de p47^{phox}ΔCter à la pepsine pendant 2 min à 0°C et pH 2,6, nous injectons les peptides dans le système LC-ESI-Trap et obtenons le profil chromatographique (TIC) de la Figure 80a. En extrayant les composés et en comparant ces spectres MS/MS expérimentaux aux spectres théoriques de Mascot, nous obtenons automatiquement une couverture de 70 %, avec 28 peptides ayant un score supérieur à 3 (Figure 81a).

Prenons l'exemple du peptide 171-184 de masse monoisotopique 1588,74 Da : il est élué entre 26 et 32 min et détecté comme ion doublement chargé de $m/z=796,35$, correspondant à une masse expérimentale de 1588,68 Da (Figure 80b).

Les résidus AIADYEK sont aisément identifiés d'après le spectre brut MS/MS (Figure 80c), ce qui permet d'associer la masse de 1588,74 Da au peptide 171-184.

Cependant, l'utilisation de la base de données Mascot permet de gagner du temps en comparant automatiquement chaque spectre MS/MS expérimental avec les spectres MS/MS de tous les peptides ayant une masse proche de l'ion d'intérêt, et susceptibles d'être générés à partir de la séquence de p47^{phox}. Dans le cas du peptide 171-184, celui-ci est reconnu grâce aux 12 ions fils représentés en rouge Figure 81b qui sont identifiés par Mascot. Remarquons la prédominance de fragments générés de type b et y, typiques de la fragmentation par CID utilisée dans cette trappe ionique.

Après avoir confirmé manuellement l'identité de tous les peptides identifiés par Mascot, nous essayons d'améliorer la couverture de séquence, en tâchant d'identifier d'autres peptides. Les peptides comportant plus de 3 charges sont en effet rarement reconnus par Mascot, à cause des limites résolutive de l'ESI-Trap. En effet les spectres MS/MS sont en général très chargés et comportent beaucoup de pics chevauchants que seule une analyse manuelle permet d'identifier. Par ailleurs, certains peptides peu intenses ne sont pas reconnus par Mascot mais peuvent l'être à la main. Enfin, la connaissance progressive des sites de

coups de la protéine permet d'extraire manuellement des peptides situés entre deux sites de coupures adjacents.

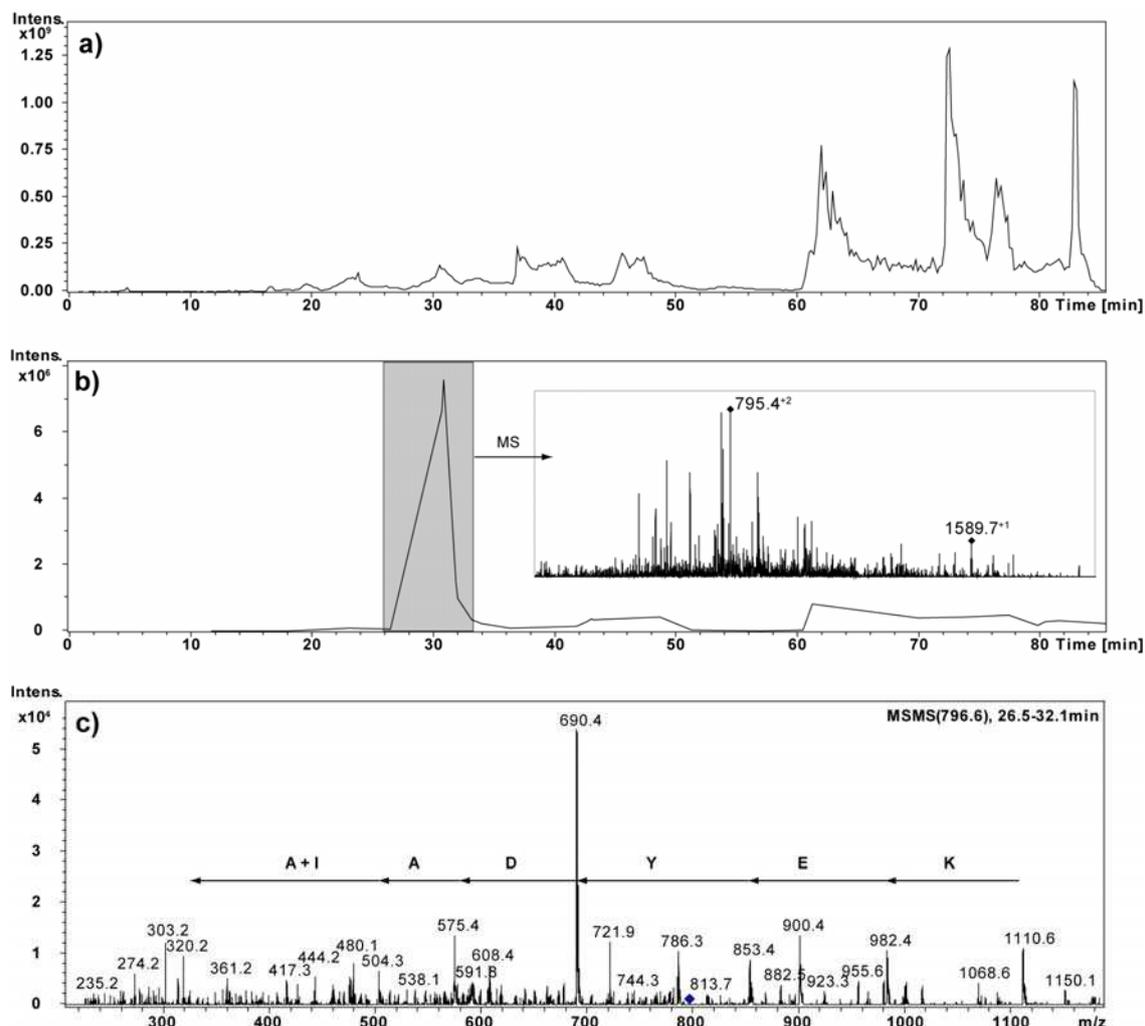
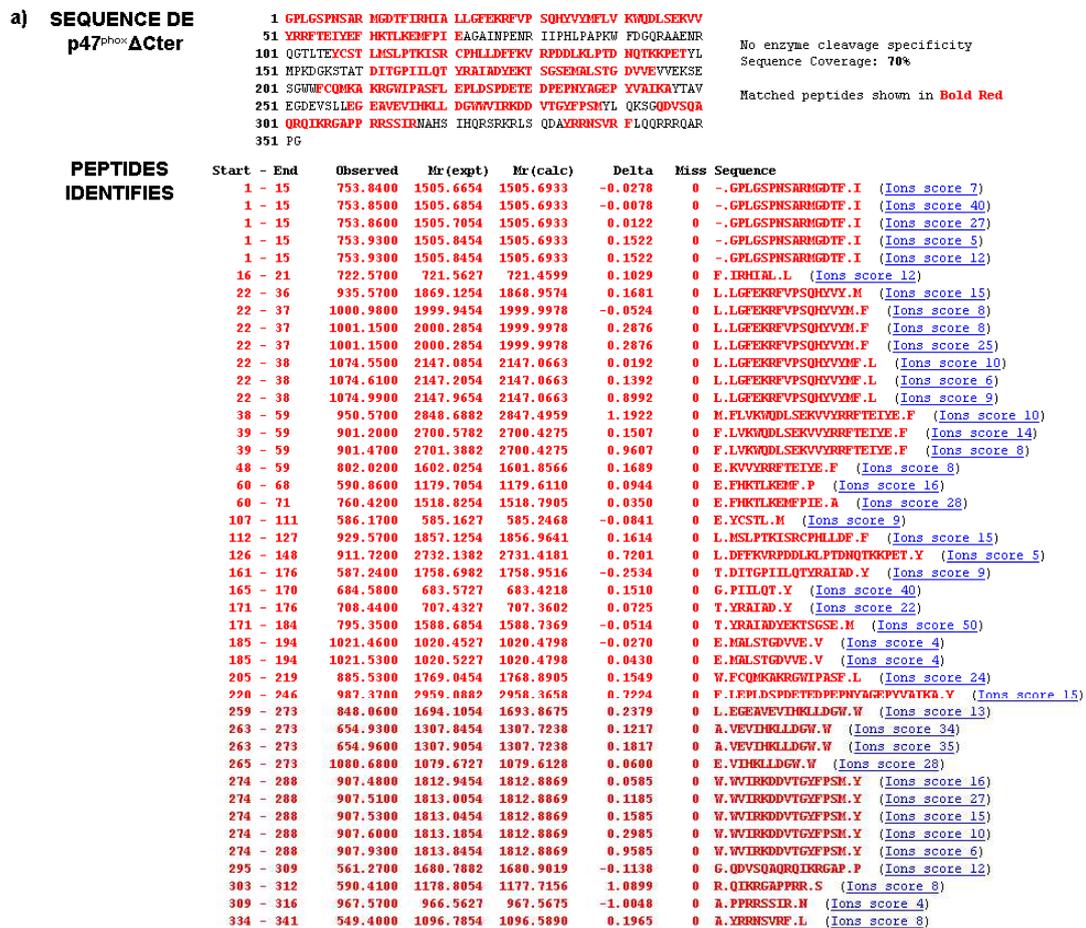


Figure 80. Données brutes d'ESI-Trap obtenues après digestion de p47^{phox}ΔCter à la pepsine
a) Courant ionique total (TIC) **b)** Spectre d'extraction (EIC) de l'ion $m/z=796,6$. L'encart correspond au spectre MS moyenné sur la région grisée **c)** Spectre MS/MS de l'ion parent $m/z=796,6$, moyenné sur la région grisée. L'attribution des pics permet d'identifier le peptide 171-184 (YRAIADYEKTSGSE).

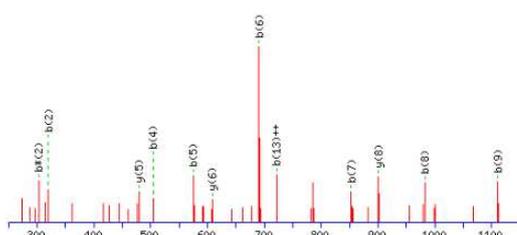
Nous avons identifié 161 peptides différents issus de la digestion de p47^{phox}FL avec la pepsine (75), la protéase type XIII (60) et la protéase type XVIII (46) (c.f Annexes Tableau1).

Cependant, tous ces peptides ne pourront pas être utilisés lors des cinétiques locales de deutération, pour différentes raisons. Tout d'abord, les cinétiques locales se font sur l'ESI-TOF, car cette machine est plus précise en masse, alors que la cartographie est faite sur l'ESI-Trap, puisque cette étape nécessite la SM en tandem. L'intensité des peptides liée à leur rendements d'ionisation et de transfert n'est pas la même sur les deux machines. Il est donc possible d'identifier un peptide avec l'ESI-Trap et de ne plus l'observer sur l'ESI-TOF. De plus, après deutération, l'intensité d'un peptide est en général plus faible, en raison de la multiplication des espèces isotopiques observées due à une deutération inhomogène. En effet,

pour une quantité de molécules ionisées donnée, plus le massif isotopique sera large et plus l'intensité des pics sera faible. Enfin, des massifs isotopiques qui étaient parfaitement séparés peuvent se chevaucher après deutération, les rendant inutilisables.



b) SPECTRE EXPERIMENTAL DU PEPTIDE 171-184



FRAGMENTS THEORIQUES DU PEPTIDE 171-184

#	b	b ⁺⁺	b [*]	Seq.	y	y ⁺⁺	y [*]	#
1	164.0706	82.5389		Y				14
2	320.1717	160.5895	303.1452	R	1426.6809	713.8441	1409.6543	13
3	391.2088	196.1081	374.1823	A	1270.5798	635.7935	1253.5532	12
4	504.2929	252.6501	487.2663	I	1199.5426	600.2750	1182.5161	11
5	575.3300	288.1686	558.3035	A	1086.4586	543.7329	1069.4320	10
6	690.3570	345.6821	673.3304	D	1015.4215	508.2144	998.3949	9
7	853.4203	427.2138	836.3937	Y	900.3945	450.7009	883.3680	8
8	982.4629	491.7351	965.4363	E	737.3312	369.1692	720.3046	7
9	1110.5578	555.7826	1093.5313	K	608.2886	304.6479	591.2620	6
10	1211.6055	606.3064	1194.5790	T	480.1936	240.6005		5
11	1298.6375	649.8224	1281.6110	S	379.1460	190.0766		4
12	1355.6590	678.3331	1338.6325	G	292.1139	146.5606		3
13	1442.6910	721.8492	1425.6645	S	235.0925	118.0499		2
14				E	148.0604	74.5339		1

Figure 81. Recherche Mascot après digestion de p47^{phox} ΔCter à la pepsine

a) Liste des peptides identifiés automatiquement par Mascot. Les peptides identifiés sont indiqués en rouge sur la séquence de p47^{phox} b) Spectre expérimental MS/MS du peptide 171-184. Le tableau représente les fragments théoriques pouvant être obtenus par fragmentation de ce peptide. Les ions reconnus sont indiqués en rouge.

Pour ces différentes raisons, parmi les 46 peptides générés par la protéase type XVIII et identifié par MS/MS, seulement 4 ont pu être analysés après deutération. L'utilisation de la pepsine et de la protéase type XIII étant suffisante pour obtenir une couverture de 99% avec

de nombreux peptides chevauchants (c.f III. Figure S1), les résultats de deutération obtenus avec la protéase de type XVIII ne seront pas présentés dans l'article en cours de rédaction.

II.2 Tests fonctionnels

II.2.A Test d'interaction p47^{phox}-GST-p22^{phox}Cter

II.2.A.1 Co-sédimentation

Les tests de co-sédimentation de p47^{phox}TM-FL et GST-p22^{phox}Cter ne permettent pas de mettre en évidence une interaction entre ces deux protéines. Lors de l'éluion avec le glutathion, une bande correspondant à GST-p22^{phox}Cter est bien observée (Figure 82). Cependant, les bandes correspondant à p47^{phox}FL et p47^{phox}TM-FL sont très faibles et rien ne permet d'affirmer que ces bandes sont bien liées à une éluion et non à un quatrième lavage. Cette faible intensité ne permet pas d'observer de différences entre les bandes correspondant à ces deux constructions.

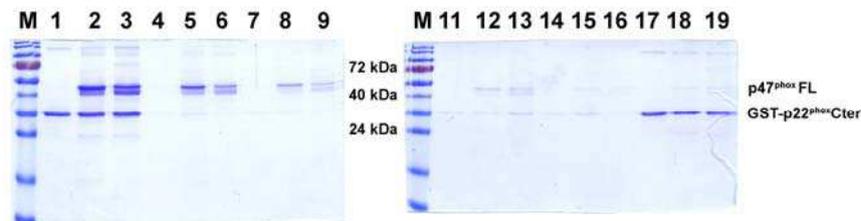


Figure 82. Test d'interaction p47^{phox}/GST-p22^{phox}Cter par co-sédimentation

M : marqueur moléculaire, 1 à 3 : avant dépôt, 4 à 6 : perfusat, 7 à 9 : lavage 1, 11 à 13 : lavage 2, 14 à 16 : lavage 3, 17 à 19 : éluion. 1-4-7-11-14-16 : GST-p22^{phox}Cter, 2-5-8-12-15-18 : p47^{phox}FL + GST-p22^{phox}Cter, 3-6-9-14-16-19 : p47^{phox}TM-FL + GST-p22^{phox}Cter

50 μ M d'acide arachidonique et 1 % de triton X100 sont rajoutés pour favoriser l'interaction, et une précipitation au TCA est réalisée afin de concentrer les éluâts, sans qu'aucune différence ne soit observée. Ce test a enfin été essayé sur le tandem SH3s, mais là encore, la technique de co-sédimentation ne semble pas être adaptée pour prouver l'interaction avec GST-p22^{phox}Cter.

II.2.A.2 Chromatographie d'exclusion stérique

Lorsque p47^{phox} Δ Cter ou p47^{phox}TM- Δ Cter sont injectés après incubation avec GST-p22^{phox}Cter, le profil chromatographique sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique Superdex 75 est inchangé (Figure 83a à e). Nous n'observons ni modification du temps de rétention, ni apparition d'un troisième pic qui apparaîtrait plus tôt et correspondrait à un hétérodimère. De plus, étant données les tailles relativement proches de p47^{phox} Δ Cter (40,4 kDa) et de GST-p22^{phox}Cter (33,5 kDa), leur séparation sur colonne est assez faible (Figure 83f et g). Il est donc impossible de conclure à ce stade sur une quelconque interaction.

L'utilisation de petits peptides fluorescents de p22^{phox} (151-165), sans étiquette GST, auraient sans doute permis de mettre en évidence cette interaction.

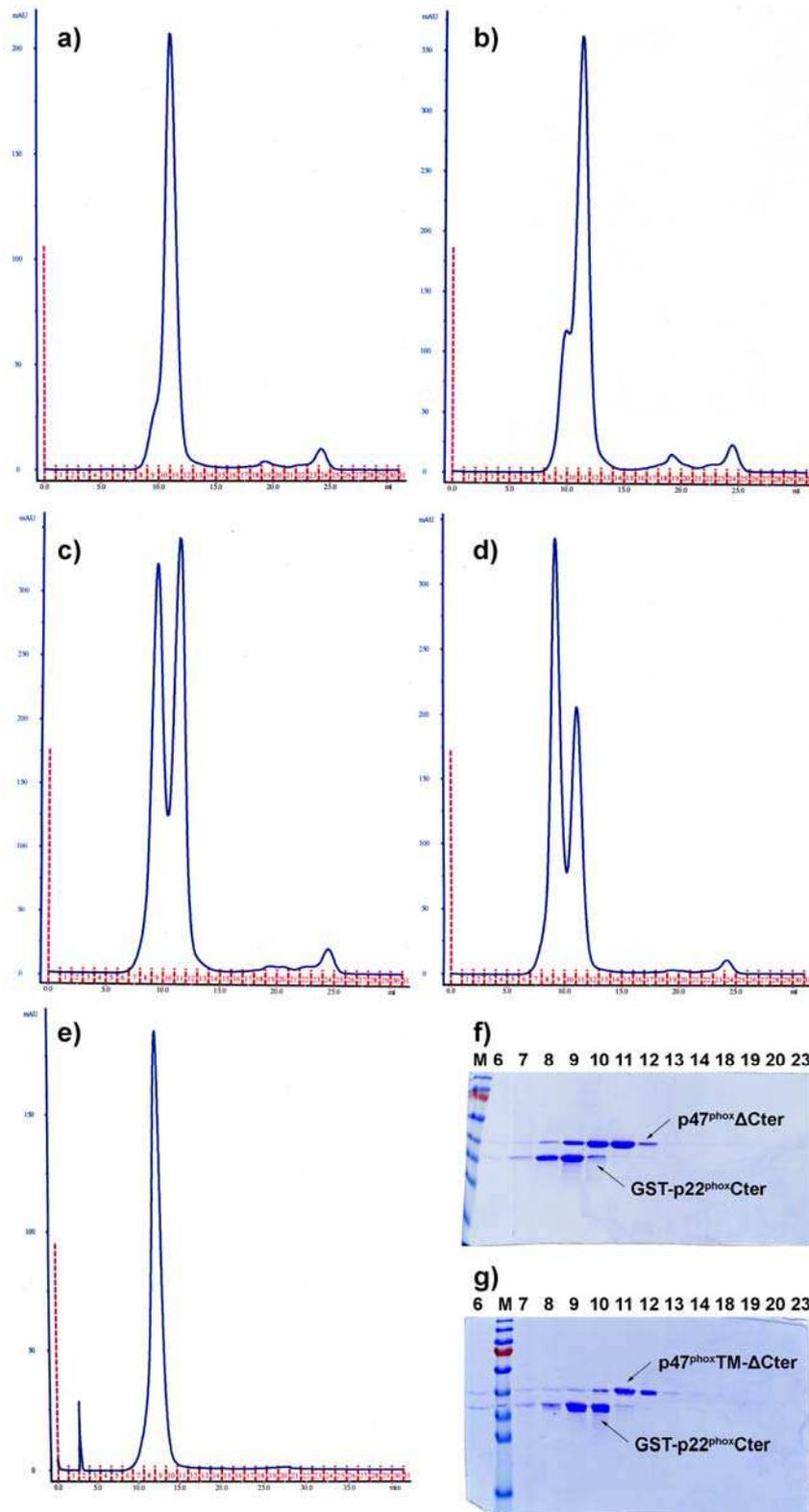


Figure 83. Etude de l'interaction p47^{phox}ΔCter – GST-p22^{phox} par chromatographie d'exclusion stérique
 Profils chromatographiques obtenus pour **a)** p47^{phox}ΔCter **b)** p47^{phox}S303/304/328E-ΔCter **c)** p47^{phox}ΔCter + GST-p22^{phox}Cter **d)** p47^{phox}S303/304/328E-ΔCter + GST-p22^{phox}Cter et **e)** GST-p22^{phox}Cter. Gels SDS-PAGE à 12 % obtenus lors de l'incubation de GST-p22^{phox}Cter avec **f)** p47^{phox}ΔCter et **g)** p47^{phox}S303/304/328E-ΔCter. M : marqueur moléculaire. Les nombres indiqués correspondent aux fractions.

II.2.A.3 Mise au point du test par résonance plasmonique de surface

L'optimisation des tests d'interactions entre p47^{phox} et p22^{phox}Cter par BiacoreTM a été réalisée en fonctionnalisant une surface CM4 avec GST-p22^{phox}Cter et en utilisant le tandem SH3s de p47^{phox} comme contrôle positif. En injectant des concentrations décroissantes du tandem SH3s, nous avons obtenu un signal qui diminuait progressivement (Figure 84a). La régénération avec 10 µl de NaOH à 10 mM est efficace. Cependant, nous notons une dégradation de la surface au cours des cycles de régénération. En effet, en comparant le signal obtenu pour une même injection de 60 µl du tandem SH3s avant et après la gamme, une diminution de moitié du signal est observée (Figure 84b). La gamme est donc limitée à des concentrations comprises entre 40 nM et 2,56 µM, afin de réduire le nombre d'injections sur la même surface. Pour minimiser le biais résultant de cette dégradation de la surface, les différentes formes protéiques à comparer sont injectées successivement pour chaque concentration. Les concentrations les plus faibles sont injectées en premier. Ces gammes de concentrations croisées seront ensuite analysées par un algorithme prenant en compte la dérive de la ligne de base (Figure 84c et d). Ce test BiacoreTM sera donc utilisé dans la suite des expériences, afin de quantifier l'interaction entre p47^{phox} et GST-p22^{phox}Cter.

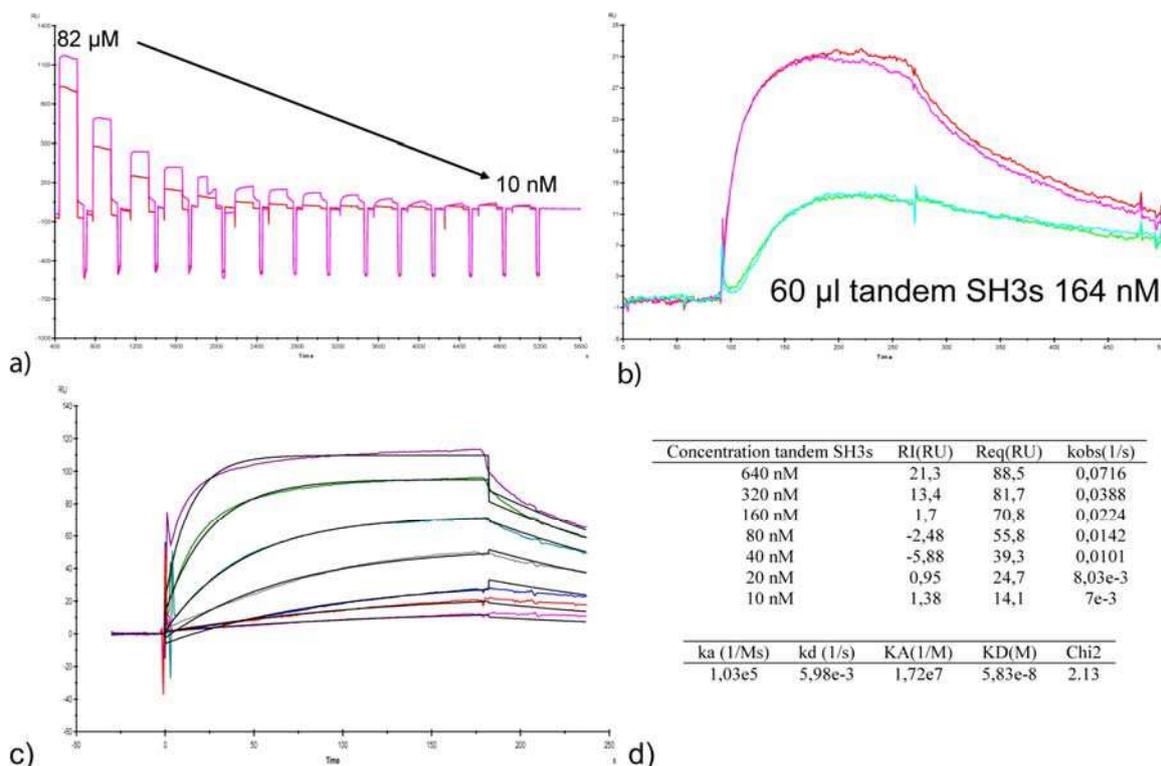


Figure 84. Etude de l'interaction p47^{phox} – GST-p22^{phox}Cter par BiacoreTM

a) Injections répétées de 60 µl du tandem SH3s de p47^{phox} à des concentrations décroissantes de 82 µM à 10 nM. Les sensorgrammes correspondant aux surfaces fonctionnalisées avec GST et GST-p22^{phox}Cter sont représentées en rose et rouge, respectivement. **b)** Injections répétées de 60 µl du tandem SH3s de p47^{phox} à 164 nM, avant (rose et rouge) et après (vert et jaune) la gamme de concentrations. **c)** Gamme croisée du tandem SH3s pour des concentrations de 10 nM à 640 nM. **d)** Détermination des constantes cinétiques de l'interaction entre le tandem SH3s et GST-p22^{phox}Cter à l'aide d'un algorithme prenant en compte la dérive de la ligne de base.

II.2.B Tests d'interaction p47^{phox}-liposomes par Biacore™

Pour caractériser plus finement l'interaction entre p47^{phox} et les phospholipides, nous avons tenté de mettre au point un test par résonance plasmonique de surface. Deux approches ont été utilisées, utilisant soit des surfaces de type L1, soit des surfaces de type HPA (c.f Matériel et Méthodes).

La fonctionnalisation des surfaces L1 est beaucoup plus efficace après extrusion des liposomes. En effet, nous obtenons la même fonctionnalisation avec 500 µl de grosses vésicules multilamellaires MLV et 200 µl de petites vésicules unilamellaires SUV (Figure 85a et b). Après avoir saturé la surface avec de la BSA à 0,1 mg/ml, celle-ci est régénérée avec 50 µl de NaOH à 10 mM (Figure 85c). Cependant, après l'injection de 60 µl de p47^{phox} à 5 µM, une interaction avec la bicouche est observée, mais il s'avère impossible de régénérer la surface, même avec 10 µl de NaOH 100 mM, HCl 100 mM, NaCl 5 M, urée 8 M ou 70 % EtOH (Figure 85c). Ces problèmes de régénération suggèrent des interactions non spécifiques importantes qui sont mal contrôlées (Figure 85d). L'absence de protocole de régénération efficace rend la réalisation de gammes de concentrations impossible. Des résultats similaires ont été obtenus avec les surfaces HPA, à savoir une fonctionnalisation efficace mais des interactions non spécifiques et une mauvaise régénération des surfaces.

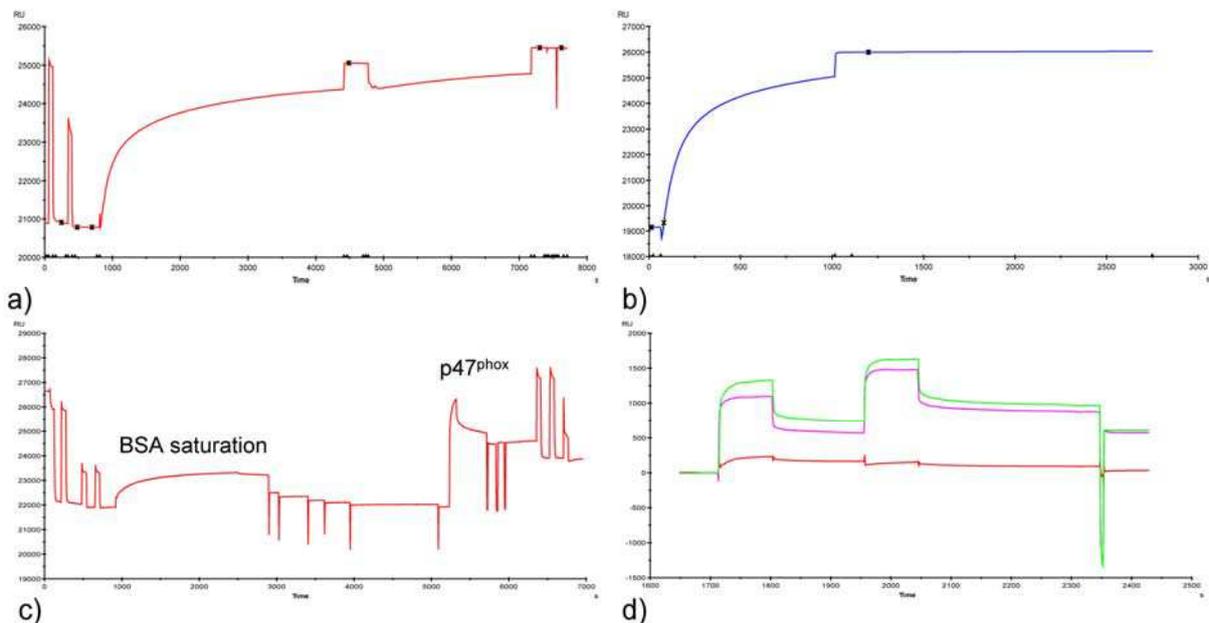


Figure 85. Tests d'interaction entre p47^{phox} et des liposomes par Biacore™

Surfaces L1 fonctionnalisées avec a) 500 µl 0,1 mM MLV et b) 200 µl 0,1 mM SUV. c) Saturation de la surface à la BSA, régénération et interaction avec p47^{phox}. d) Répétition de l'injection de 30 µl de p47^{phox}™ sur une surface fonctionnalisée avec des SUV1 (vert) et des SUV2 (rose). La différence de signal SUV2 – SUV1 est représentée en rouge.

Face à ces difficultés, dans la suite de l'étude, nous nous limiterons au test de co-sédimentation pour quantifier l'interaction de p47^{phox} avec les phospholipides.

L'article suivant, en cours de rédaction, met en jeu l'ensemble des approches définies et mises au point ci-dessus pour :

- Etablir une carte peptidique de p47^{phox} après digestion à la pepsine et à la protéase XIII.
- Identifier par DXMS les surfaces protéiques impliquées dans la dynamique conformationnelle de p47^{phox} liée à son activation.
- Valider ces régions par des tests fonctionnels sur une série de mutants. Ceux-ci seront caractérisés à l'aide des tests d'interactions avec les phospholipides (co-sédimentation) et avec GST-p22^{phox}Cter (BiacoreTM) définis précédemment.

III. Publication : Activation moléculaire de p47^{phox} pour l'assemblage du complexe de la NADPH oxydase des neutrophiles.

p47^{phox} molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex

Julien Marcoux^{a,b,c,d}, Petr Man^{b,c,d,e,f}, Isabelle Petit-Haertlein^{a,c,d}, Corinne Vivès^{a,c,d},
Eric Forest^{b,c,d,*}, Franck Fieschi^{a,c,d*}

^aLaboratoire des Protéines Membranaires, ^bLaboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines, CEA, DSV, Institut de Biologie Structurale (IBS), 41 rue Jules Horowitz, Grenoble, F-38027, France; ^cCNRS, UMR 5075, Grenoble, France; ^dUniversité de Grenoble, Grenoble, France; ^eInstitute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i, Videnska 1083, CZ-14220 Prague 4, Czech Republic; ^f Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 8, CZ-12840 Prague 2, Czech Republic.

SUMMARY

The p47^{phox} cytosolic factor from neutrophilic NADPH oxydase (Nox2) has always been resistant to crystallogensis trials, due to its modular organization leading to relative flexibility. Hydrogen/Deuterium exchange coupled to mass spectrometry was used to obtain structural information on the conformational mechanism that underlies p47^{phox} activation. We confirmed a relative opening of the protein with exposure of the SH3 Src loops that are known to bind p22^{phox} upon activation. A new surface was shown to be unmasked after activation, becoming a potential auto-inhibitory surface that may block the interaction of the PX domain with the membrane in the resting state. Within this surface, we identified two residues involved in the interaction with the PX domain. The double mutant R162A/D166A showed a higher affinity for specific phospholipids but none for C-terminal part of p22^{phox}, reflecting an intermediate conformation between the auto-inhibited and activated forms.

Keywords: NADPH oxidase, p47^{phox}, H/D exchange, conformational changes, SPR, liposome binding assay.

* Corresponding authors :

franck.fieschi@ibs.fr Tel: +334 3878 91 77

eric.forest@ibs.fr Tel: +334 38 78 34 03 Fax: +33 4 38 78 54 94

Abbreviations: ACN, acetonitrile; phox, phagocyte oxidase; AIR, autoinhibitory region; SH₃, src homology 3; PX, Phox homology; SAXS, small-angle X-ray scattering; SPR, surface plasmon resonance; GST, glutathione S-transferase; IPTG, iso-propyl-β-D-thiogalacto pyranoside; DTT, 1-4, dithiothreitol; PtdIns(3,4)P₂, phosphoinositol-3,4-biphosphate; ESI, electrospray ionization; TOF, time of flight.

INTRODUCTION

NADPH oxidases (Nox) and Dual oxidases (Duox) are multienzymatic complexes found in many cell types (Krause, 2004), which play a wide range of physiological roles (Bedard and Krause, 2007). The seven different isoforms of these enzymatic complexes differ in their membrane redox components: Nox 1 to Nox 5, Duox 1 and Duox 2. Despite this molecular heterogeneity, they all share the common feature of reactive oxygen species (ROS) production, which is either constitutive (Nox4) or inducible by cytosolic factors (Nox1, Nox2 and Nox3) or Ca^{2+} (Nox5, Duox1 and Duox2).

The neutrophilic isoform containing Nox2, formerly called gp91^{phox}, is often referred to as a specialized ROS producer, as its main role is to trigger the oxidative burst in neutrophilic phagosomes leading to the killing of phagocytized pathogens. Of course, this catalytic activity must be tightly regulated to avoid excessive ROS production, leading to the alteration of self tissue. In contrast, a defect in NADPH

oxidase activity results in chronic granulomatous disease, an inherited immunodeficiency characterized by an abnormal inflammatory response and recurrent bacterial and fungal infections (Segal, 1996). This tight regulation is enabled by a physical separation before activation between the membrane-related flavocytochrome b₅₅₈ (heterodimer of Nox2 and p22^{phox}), a small G protein (Rac 1 or 2) and the cytosolic factors p40^{phox}, p47^{phox} and p67^{phox}. In the resting state, these modular proteins form a heterotrimeric complex based on different interactions between their conserved binding domains (Lapouge et al., 2002): p40^{phox} and p67^{phox} interact via their respective PB1 domains (Nakamura et al., 1998; Noda et al., 2003) and the p47^{phox} proline-rich region (PRR) binds the p67^{phox} C-terminal SH3 domain (Massenet et al., 2005).

The p47^{phox} subunit is a key component in the activation process. It contains an N-terminal phox homology domain (PX) and SH3 domains arranged in tandem, and ends with a proline-rich region (PRR) (Figure 1).

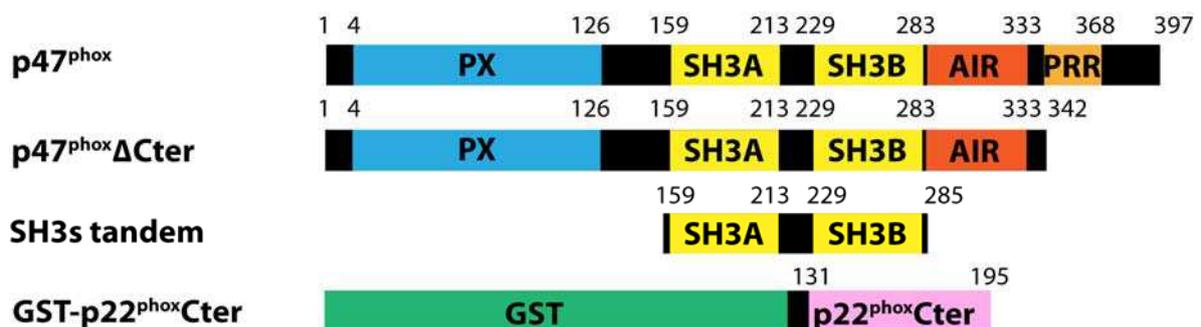


Figure 1. Molecular constructs used in this study. In the whole NADPH oxidase assembly it acts as a sensor of the activation signal through multiple phosphorylations on serines within its auto-inhibitory region (AIR). The activated form of p47^{phox} drives the translocation of the other cytosolic factors for assembly onto flavocytochrome b₅₅₈ through the following mechanisms. Upon activation, the PX and tandem SH3s domains promote assembly through interactions with phosphoinositides (Ago et al., 2003; Hiroaki et al., 2001; Kanai et al., 2001; Stahelin et al., 2003; Zhan et al., 2002) and p22^{phox} C-terminal PRR (Sumimoto et al., 1994; Taylor et al., 2007; Wilson et al., 1997), respectively. To avoid any constitutive binding to the membrane and maintain p47^{phox} cytosolic location, the tandem SH3s and PX domains must be masked in the resting state. Two functional states of p47^{phox} had already been proposed, corresponding to both activated and auto-inhibited conformations.

The first p47^{phox} auto-inhibited model suggested an interaction between the tandem SH3s and some downstream residues (Sumimoto et al., 1994), lately defined as the auto-inhibitory region (AIR). Since the original proposal, many studies have tried to decipher the relative organization of the different domains in the auto-inhibited state. Concomitantly with this first interaction arose the hypothesis of another interaction

between the PX and SH3B domains (Hiroaki et al., 2001), which was widely accepted in the field (Ago et al., 2003; Karathanassis et al., 2002; Lapouge et al., 2002; Massenet et al., 2005; Nauseef, 2004). New insights into the molecular mechanism of inhibition were provided by the structure of the tandem SH3s interacting either with the AIR or the C-terminal part of p22^{phox} (Groemping et al., 2003). However, this result was totally incompatible with the interaction between the PX and SH3B domains because both interactions involve the same binding region in the tandem SH3s, as pointed out by several groups (Durand et al., 2006; Groemping et al., 2003; Nauseef, 2004; Yuzawa et al., 2004b).

Recently, our group proposed a model for the global conformation of the entire p47^{phox} in the auto-inhibited form, using small angle x-ray scattering (SAXS) (Durand et al., 2006). It allowed us to definitely discard the hypothesis of an interaction between the PX and SH3B domains. p47^{phox} SAXS envelopes suggested that the PX domain set aside the first SH3 domain (SH3A) but it was not possible to conclude on whether the PX interacts directly with the SH3A or is maintained in close proximity by a structured linker. Moreover, this work has strengthened the AIR-tandem SH3s interaction hypothesis initially based on studies using p47^{phox}

isolated modules. The AIR release from the tandem SH3s, occurring upon activation, has recently been confirmed by limited proteolysis coupled to mass spectrometry (Marcoux et al., 2009). Coupling between the AIR release and enhanced lipid binding affinity was shown, suggesting changes in PX domain accessibility. Deuterium exchange coupled to mass spectrometry (DXMS) performed on the entire proteins confirmed the conformational difference between the activated and auto-inhibited state (Marcoux et al., 2009). However, conclusive data regarding the molecular mechanism of PX inhibition in the resting state and more precisely proofs of its involvement in any intramolecular interaction were still missing.

In order to get detailed insight into the structural changes of p47^{phox} we extended our previous study and followed local deuteration kinetics in the individual parts of the protein in both states. We confirmed and more precisely described the exposure of the Src loops, from both SH3s, due to AIR release. Remarkably, for the first time we identify a novel surface within the SH3A domain that is unmasked during activation. Using site-directed mutagenesis and the liposome binding assay, we confirm that this region is involved in the inhibition of the PX domain lipid-binding properties.

This study contributes a final response to the question of the p47^{phox} auto-

inhibitory mechanism. The modular organization deciphered here, involving up to four regions, has never been reported, and more particularly regarding PX and SH3 domain interaction.

RESULTS

p47^{phox}TM-ΔCter interacts with the C-terminus of p22^{phox}.

To study the structural modifications occurring in p47^{phox} upon activation, we previously designed two recombinant forms, corresponding to the auto-inhibited and activated states (Marcoux et al., 2009). These p47^{phox} constructs are C-terminally truncated but still contain all the domains involved in the activation process (PX domain, tandem SH3s and AIR) (Figure 1). This C-terminal truncation (from residue 343) improves the homogeneity of the purified protein, without affecting the structural integrity of the protein, as previously published (Shen et al., 2008).

To mimic serine phosphorylations occurring upon p47^{phox} activation, the corresponding serines 303, 304 and 328 were mutated into glutamic acid. We and others have shown that this triple mutant (p47^{phox}TM-ΔCter) presented an enhanced binding affinity for phosphoinositide lipids compared to p47^{phox}ΔCter (Ago et al., 2003; Karathanassis et al., 2002; Marcoux et al., 2009). In addition, structural analysis by

deuterium exchange and limited proteolysis coupled to mass spectrometry also showed that this p47^{phox}TM-ΔCter presented a more open conformation, notably through release of the AIR (Marcoux et al., 2009). These previous characterizations supported the notion that p47^{phox}TM-ΔCter is a good mimic of the activated state. However, as a prerequisite to pursuing the detailed structural characterization of these two constructs, we needed to fully validate that the p47^{phox}TM-ΔCter is able to interact with p22^{phox}, as described earlier on the full-length p47^{phox} (Ago et al., 1999; Groemping et al., 2003).

Surface plasmon resonance (SPR) was used to quantify this interaction. CM4 surfaces were functionalized with a GST-p22^{phox}Cter construct (Figure 1) or GST alone (negative control). Increasing p47^{phox}tandem SH3s concentrations were used as positive control experiments to compare with other p47^{phox} constructs. No significant interaction with the GST-p22^{phox}Cter surface could be detected using p47^{phox}ΔCter, confirming its auto-inhibited state (Figure 2). Triple mutation S303/304/328E was sufficient to recover an affinity similar to that of p47^{phox}tandem SH3s alone: 109 nM vs. 34 nM (Figure 2). Similar results were obtained with the full-length forms of the protein: no interaction between GST-p22^{phox}Cter and p47^{phox} was observed and the dissociation constant was

determined at 55 nM for the full-length p47^{phox}TM (data not shown).

The lack of affinity of wild-type p47^{phox} constructs compared with the S303/304/328E triple mutants clearly shows the conformational change occurring during p47^{phox} activation and validates the use of p47^{phox}TM-ΔCter as a true mimic of the activated state.

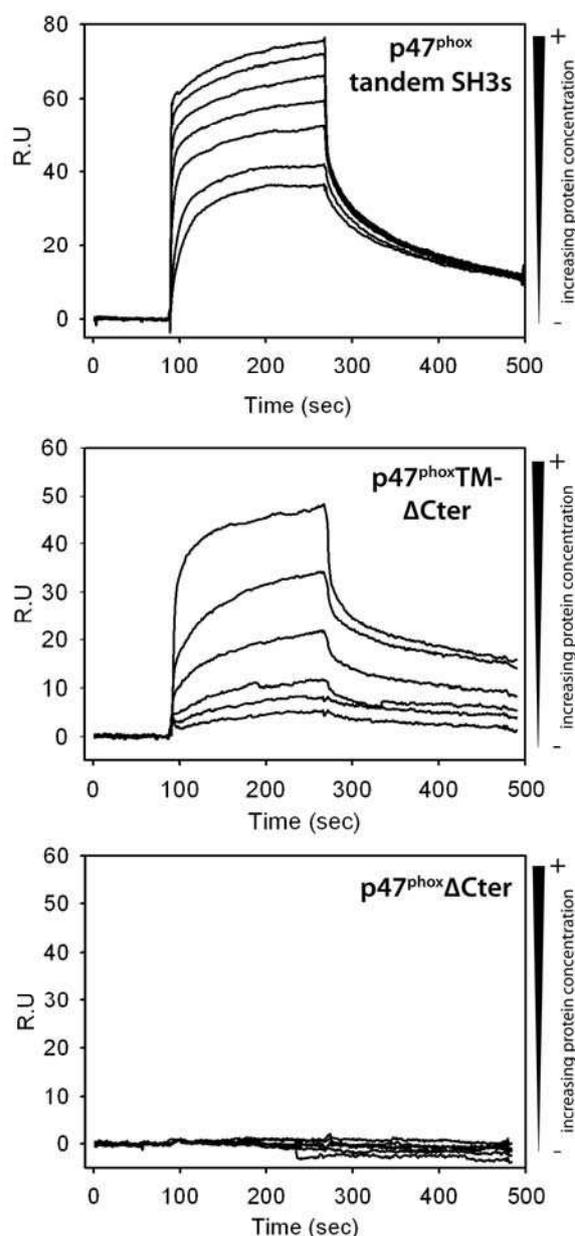


Figure 2. Surface plasmon resonance results obtained for p47^{phox}tandem SH3s, p47^{phox}TM-ΔCter and p47^{phox}ΔCter on CM4 chips

functionalized with GST-p22^{phox}Cter. Increasing concentrations (from 40 nM to 2.56 μ M) of each

Peptide mapping

Proteolysis with acidic proteases was used to localize the differences in deuteration between the activated and auto-inhibited forms of p47^{phox}. Due to ragged and non-specific digestion the generated peptides had to be identified by means of tandem mass spectrometry. The separate use of pepsin and protease type XIII generated 89 cleavage sites, providing a total of 127 peptides with only five occurring in both digests (Figure S1). The combination of peptides generated by both proteases provided 99% sequence coverage. Generated peptides have an average size of 14 residues. The average number of cleavage sites and generated peptides in the AIR were twice as low (17 cleavage sites and 23 peptides per 100 residues) as in the rest of the protein where a rather good resolution was obtained (28 cleavage sites and 40 peptides per 100 residues). The polybasic nature of the AIR is most probably behind the low spatial resolution in this region. Whereas pepsin is known to prefer hydrophobic sites (Tang, 1963) and thus provided only long peptides, fungal protease XIII was shown to have preference for basic amino acids (Zhang et al., 2008), and here most probably generated very short peptides that were not detected.

construct were injected.

Solvent accessibility of different p47^{phox} Δ Cter region

The exchange kinetics of individual p47^{phox} Δ Cter regions were followed on 30 peptides from the pepsin digest and ten from the protease XIII digest, together covering 92% of the sequence. The missing 7 % are due to the four N-terminal residues and to the gaps coming from the fact that we do not monitor exchange on the N-terminal amine of the peptides. Peptides used for DXMS study are shown in supplementary data figure S1 and deuteration kinetics for selected peptides, are shown in supplementary data Figure S2. Seven regions were determined by the difference between overlapping peptides. As an example, deuteration percentage of region 276-279 was obtained by subtracting peptides 264-275 data from peptide 264-279 data (Figure S3). Moreover, spatial resolution was increased by the presence of short peptides. For instance, information given by peptide 161-174 was improved by the combine use of peptides 161-166 and 167-174 (Figure S4).

First information given by the local kinetics is the solvent accessibility of different p47^{phox} regions (Figure S3). As expected, the C-terminal region of p47^{phox} (residues 333–342) was quickly deuterated,

as was the linker region between the PX domain and the first SH3 (residues 119–

160). As shown by the protection plots, 160). As shown by the protection plots,

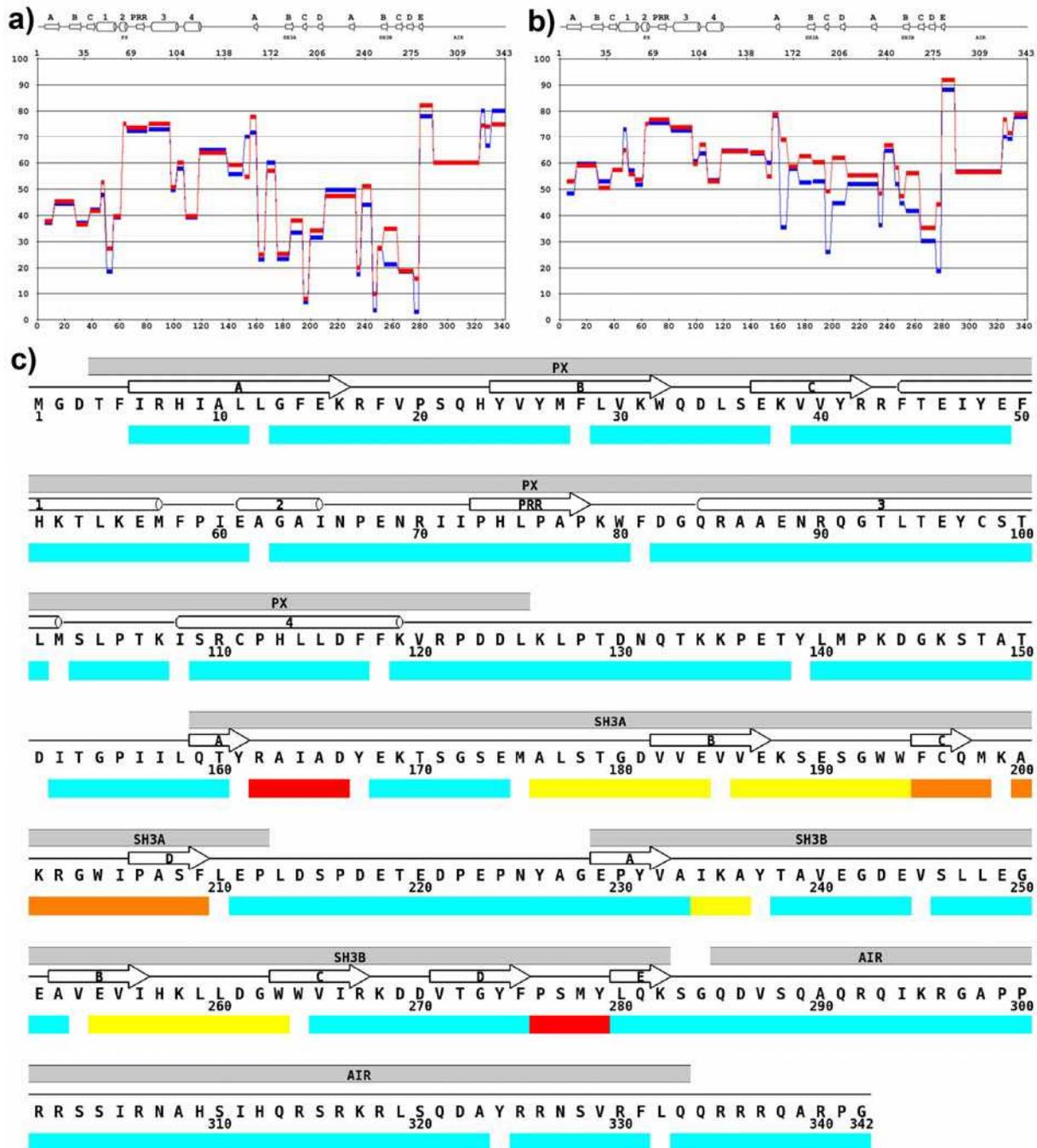


Figure 3. Protection plots showing the deuteration levels of p47^{phox}ΔCter (blue) and p47^{phox}TM-ΔCter (red) after a) 30 sec and b) 8 hrs of deuteration. c) Difference of deuteration between the two constructs after 8 hrs of deuteration: $\Delta\%D = \% \text{ p47}^{\text{phox}}\text{TM-}\Delta\text{Cter} - \% \text{ p47}^{\text{phox}}\Delta\text{Cter}$. cyan $\leq 8\% <$ yellow $\leq 15\% <$ orange $\leq 25\% <$ red $\leq 35\%$.

these two regions are already deuterated more than 50%, after only 30 s of deuterium exchange (Figure 3a and b). This is in

complete agreement with the predicted unfolded nature of these segments (Durand et al., 2006). It is also supported by our

recent results obtained by limited proteolysis (Marcoux et al., 2009). Even if it seems poorly compatible with the structural and functional role that has recently been suggested for this linker (Shen et al., 2008), the latter one cannot be excluded, as other structured regions show fast deuteration kinetics (e.g., helix 3 from PX; Figure S3). Regarding the AIR, fast deuteration kinetics are also observed, as expected from the structure, due to its unfolded sequence exposed at the surface of the tandem SH3s (Groemping et al., 2003).

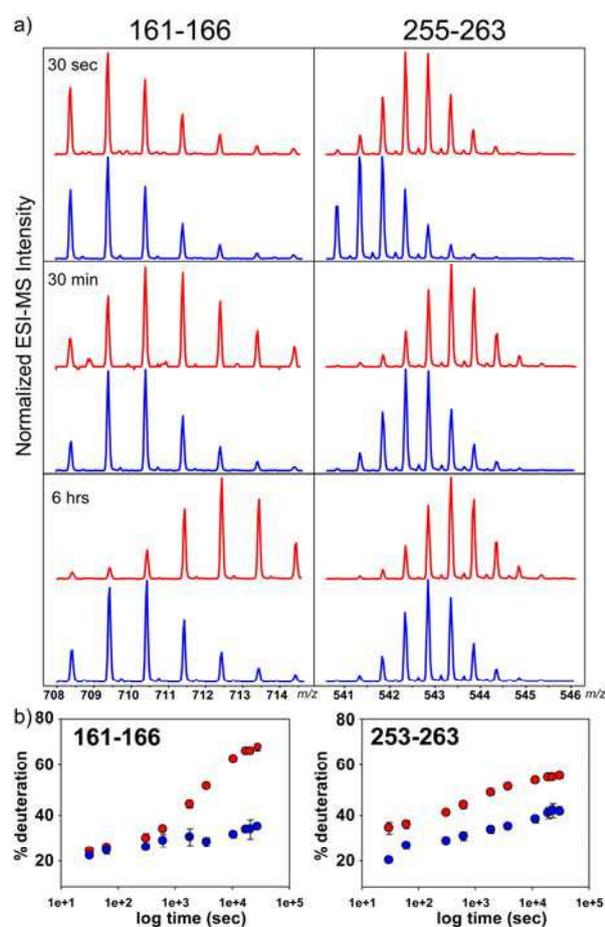


Figure 4. a) Details of isotopic profiles of two selected peptic peptides (161-166 and 255-263) from p47^{phox}ΔCter (blue) and p47^{phox}TM-ΔCter (red) demonstrating shifts toward higher masses

during the deuteration. Three time points - 30 sec, 30 min and 6 hrs - are shown. b) Deuteration kinetics of the two peptides shown in part a) plotted as percentage of deuteration vs. time for p47^{phox}ΔCter (blue circles) and p47^{phox}TM-ΔCter (red circles). Values are the average of two independent experiments.

Half of the secondary structural elements described by the crystallographic and NMR results (Groemping et al., 2003; Hiroaki et al., 2001; Karathanassis et al., 2002; Yuzawa et al., 2004a; Yuzawa et al., 2004b), such as sheets 1 and helices 1–4 from PX, sheets B-C-D from SH3A and SH3B, show slow deuteration kinetics, as expected. The other α -helices and β -sheets do not show such slow deuterium incorporation probably because corresponding segments are covered by peptides including both unstructured and structured region (e.g. peptide 279-289)

Deuterium exchange comparison between auto-inhibited and activated forms: identification of unmasked surfaces upon activation.

Structural changes occurring upon p47^{phox} activation are best evidenced by examining the differences between p47^{phox}TM-ΔCter and p47^{phox}ΔCter deuteration percentages (Figure 3c). Actually, upon deuterium incorporation, the isotopic distributions of the peptides are shifted to the higher masses and for some peptides, such as 161–166 or 255–263 (Figure 4), the incorporation is faster for p47^{phox}TM-ΔCter than for

p47^{phox}ΔCter. This faster deuterium incorporation for p47^{phox}TM-ΔCter can be directly interpreted as better accessibility to the solvent following conformational changes. Five regions, all located within the tandem SH3s, showed increased deuteration rates for p47^{phox}TM-ΔCter, while no significant differences were highlighted in the PX domain. Deuteration differences between both auto-inhibited and activated forms of p47^{phox} were plotted onto the available structures of the "tandem SH3s-AIR super-complex" and of the PX domain (Figure 5a) (Groemping et al., 2003). When looking at the tandem SH3s, two different events can be distinguished to interpret the observed unmasked surfaces in the activated form. The first one corresponds to peptides encompassing residues 186–194 from SH3A and 254–263 from SH3B. These two regions, facing each other, are the two Src loops that are known to be exposed to the solvent after activation, in order to bind the p22^{phox}Cter part (Ago et al., 1999; Nobuhisa et al., 2006; Ogura et al., 2006; Shiose and Sumimoto, 2000; Sumimoto et al., 1996; Sumimoto et al., 1994; Taylor et al., 2007). Two other regions within SH3B (234–236 and 276–279) are protected in the auto-inhibited state and form an inner surface masked by the AIR. In all these regions, the better accessibility to the solvent upon activation can be explained by the release of the AIR, as illustrated in Figure 5b and c.

Secondly, another surface exposed upon p47^{phox} activation was detected by DXMS (residues 162–166, 176–185 and 195–209). This region encompasses the whole SH3A lateral surface (Figure 5d and e), which has never been suggested to be involved in the activation process. In a recent study of the p47^{phox} resting state, crystallographic structures of the PX domain and tandem SH3s (Groemping et al., 2003; Karathanassis et al., 2002) have been fitted in the low-resolution envelopes of the whole protein obtained by SAXS (Durand et al., 2006). From the derived domain arrangement, the surface identified here is potentially localized in close vicinity of the PX domain, in the auto-inhibited state. The unmasking of these regions, coupled with the enhancement of lipid-binding properties, strongly support our initial proposal that the SH3A lateral surface is involved in the PX domain locking, in the resting state (arrow, Figure 5a).

We expected to see a deuteration difference within the PX domain and the AIR since previous work clearly showed the PX domain and AIR releases upon activation (Marcoux et al., 2009). The absence of difference in the PX can be explained by differences located for the most part at the protein surface that cannot be detected by DXMS, as lateral chain hydrogens are not monitored

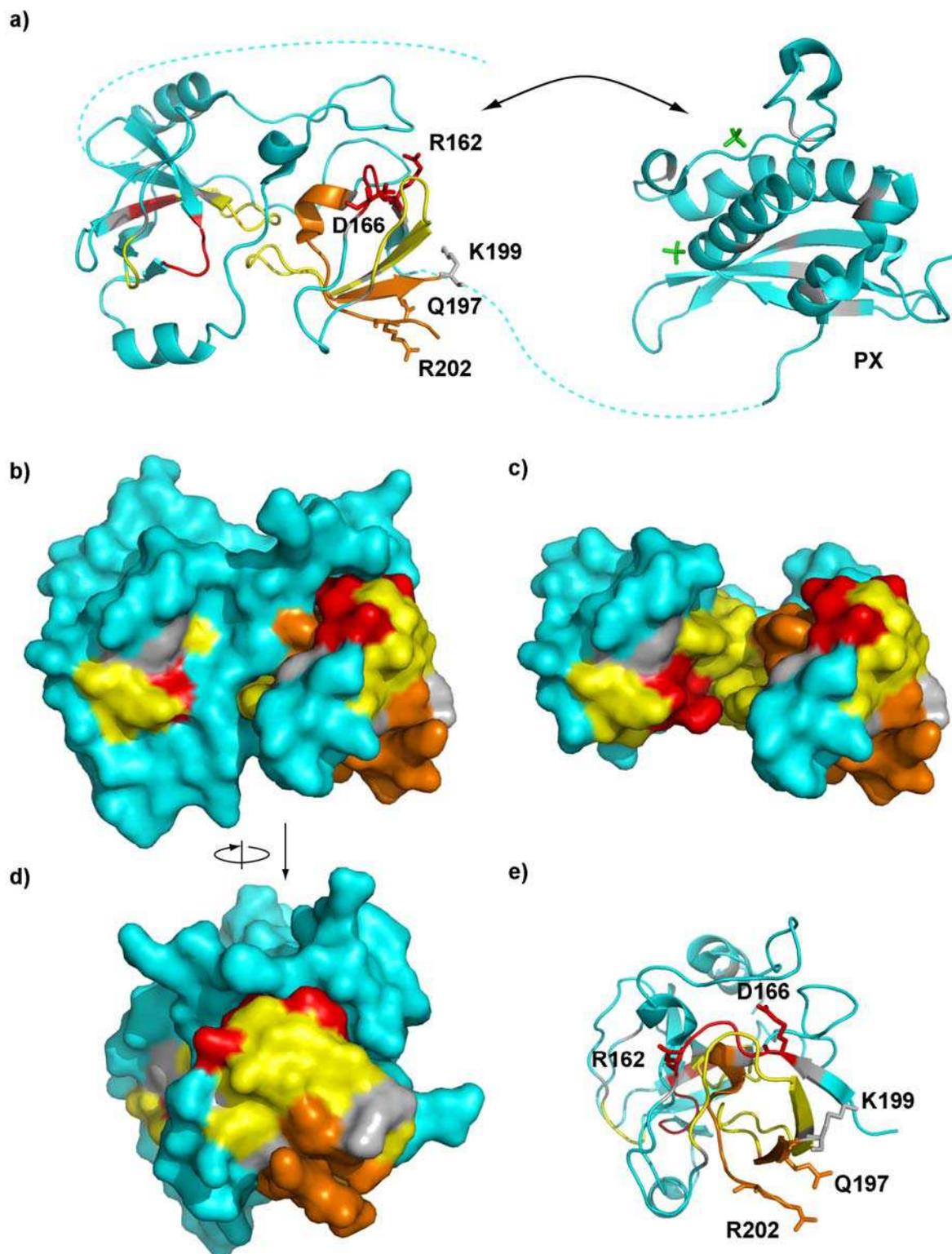


Figure 5. Local kinetics of H/D exchange transferred onto the crystallographic structures of the auto-inhibited SH₃ tandem (Groemping et al., 2003) and PX domain (Karathanassis et al.). Difference of deuteration between the two constructs after 8 hrs of deuteration: $\Delta\%D = \% p47^{\text{phox}}\text{TM}-\Delta\text{Cter} - \% p47^{\text{phox}}\Delta\text{Cter}$. cyan $\leq 8\%$ < yellow $\leq 15\%$ < orange $\leq 25\%$ < red $\leq 35\%$. a) Undetermined structures of flexible regions are represented as dashed lines, mutated residues as sticks. The sulfates bound in the phospholipid binding sites are shown in stick representation (green). The surface of the auto-inhibited

tandem SH3s is represented b) with or c) without the AIR, mimicking the resting and activated states, respectively. Lateral view of the auto-inhibited tandem SH3s showing the highlighted region d) as a surface or e) as sticks.

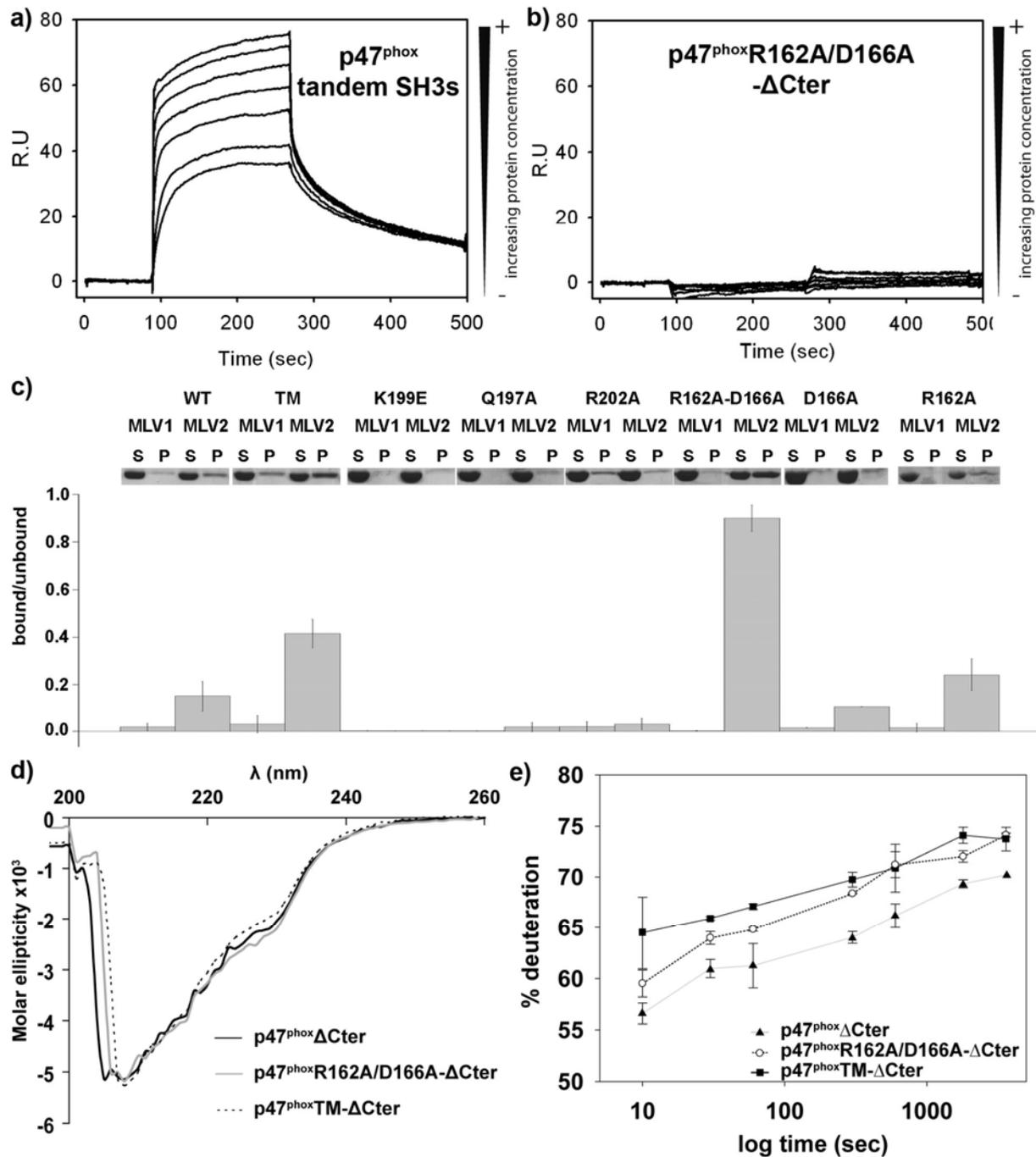


Figure 6. Surface plasmon resonance results obtained for a) p47^{phox} tandem SH3s and b) p47^{phox}R162A/D166A-ΔCter on CM4 chips functionalized with GST-p22^{phox}Cter. Increasing concentrations (from 40 nM to 2.56 μM) of each construct were injected. c) Phosphoinositide-binding activity of p47^{phox}ΔCter, p47^{phox}TM-ΔCter, p47^{phox}K199E-ΔCter, p47^{phox}Q197A-ΔCter, p47^{phox}R202A-ΔCter, p47^{phox}R162A/D166A-ΔCter, p47^{phox}R162A-ΔCter and p47^{phox}D166A-ΔCter. All proteins were incubated with liposomes containing POPC:POPE 50:50 (MLV1) or POPC:POPE:POPA:PtdIns(3,4)P2 45:45:5:5 (MLV2). S and P are liposomal supernatant and pellet after centrifugation, corresponding to the unbound and bound fraction, respectively. Samples were analyzed by SDS-PAGE and quantified by densitometry. d) Circular dichroism of p47^{phox}ΔCter, p47^{phox}R162A/D166A-ΔCter and p47^{phox}S303/304/328E-ΔCter. e) Deuteration kinetics for

p47^{phox}ΔCter (black triangles, grey line), p47^{phox}TM-ΔCter (black squares) and p47^{phox}R162A/D166A-ΔCter (open circles, dashed line) at pD 7.4.

R162A/D166A mutations in the SH3A lateral surface induce the PX domain release.

To confirm the direct interaction between the SH3A and the PX domain through the surface highlighted by DXMS, a mutagenesis study was conducted. Some of the residues exposed to the solvent, potentially responsible for this interaction (Figure 5 a and e), were chosen. The following simple and double mutations were made: R162A, D166A, R162A/D166A, Q197A, K199E and R202A. Binding to the C-ter part of p22^{phox} was tested for each mutant using SPR analysis. In contrary to the tandem SH3s, none of these mutants was able to interact with p22^{phox} (Figure 6 a-b and data not shown). This proves that the "tandem SH3s-AIR super-complex" is not disrupted in mutants of this lateral surface. Release of the PX domain for each mutant was determined by pull-down assay with liposomes, as described previously (Marcoux et al., 2009). Of the tested mutants, only R162A/D166A showed drastically enhanced binding properties with specific phospholipids PtdIns(3,4)P2 compared to p47^{phox}ΔCter (Figure 6c). The structural integrity of p47^{phox}ΔCter, p47^{phox}TM-ΔCter and p47^{phox}R162A/D166A-ΔCter, were confirmed by circular dichroism (Figure 6d). These data suggest a

specific role of residues R162 and D166 in PX domain inhibition. To highlight the importance of both residues in the maintenance of p47^{phox} auto-inhibited state, the global kinetics of deuteration were determined, as described previously (Marcoux et al., 2009). The p47^{phox}R162A/D166A-ΔCter deuteration rate is in between the rates of p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter (Figure 6e). This result reflects an intermediate conformation of this mutant that has never been described. Indeed, it possesses a closed "tandem SH3s-AIR super-complex" with an open PX domain accessible for lipid binding.

DISCUSSION

The molecular activation of the NOX2-based NADPH oxidase has been the subject of intense studies over the last few decades. Considering the level of reactive oxygen species potentially produced by this professional system, tight regulation is of primary importance. Indeed, an abnormal increase in this activity can lead to dramatic consequences, as observed in neurodegenerative pathologies (Alzheimer disease, Parkinson disease, HIV dementia, demyelinating disease) (for review see Bedard and Krause, 2007). For instance, in

Alzheimer disease, the NADPH oxidase of microglia cells (phagocytes from the CNS expressing high levels of Nox2-based oxidase) is misactivated, leading to ROS generation and the death of neighboring neurons. Therefore, better knowledge of the molecular mechanism behind this tightly regulated system is of paramount importance, not only for basic knowledge, but also to advance toward therapeutic strategies for better control of the pathological deregulation.

Two main events are central in the activation of NADPH oxidase. Flavocytochrome b_{558} requires direct interaction with Rac1/2 and p67^{phox} to trigger the electron transfer (Gorzalczany et al., 2000; Li et al., 2007). The presence of p67^{phox} at the membrane requires conformational changes of p47^{phox} that will orchestrate their co-translocation from the cytosol. Despite the crucial role played by these two activation steps, the related molecular mechanisms are poorly understood. Our study brings new insights into the structural changes undergone by p47^{phox} upon activation.

Interaction of activated p47^{phox} with p22^{phox}

It was shown that p47^{phox}TM- Δ Cter lipid-binding properties are enhanced in contrast to p47^{phox} Δ Cter (Marcoux et al., 2009). However, its capacity to interact with p22^{phox} remained to be confirmed. The

interaction properties of the auto-inhibited (p47^{phox} Δ Cter) and activated-state mimic (p47^{phox}TM- Δ Cter) with GST-p22^{phox}Cter have thus been addressed by SPR. As expected, p47^{phox} Δ Cter did not interact, while p47^{phox}TM- Δ Cter showed interaction properties that were similar to the p47^{phox}tandem SH3s (positive control, Figure 2). The interaction between p47^{phox} and the C-terminal region of p22^{phox} has already been effectively described from the biochemical (Ago et al., 1999; Groemping et al., 2003; Nobuhisa et al., 2006; Shiose and Sumimoto, 2000; Sumimoto et al., 1996; Sumimoto et al., 1994) and structural (Ogura et al., 2006; Taylor et al., 2007) points of view.

Concerning tandem SH3s, the dissociation constant relative to this interaction using isothermal titration calorimetry (Groemping et al., 2003) and fluorescence titration methods (Groemping et al., 2003; Ogura et al., 2006) led to K_d values of 0.19 μ M, 0.40 μ M and 0.64 μ M, respectively. As for full-length p47^{phox}TM, a higher K_d value was determined by fluorescence titration at 17.8 μ M (Groemping et al., 2003). These affinities are lower than the affinity reported here, with a K_d estimated at 34 nM for the tandem SH3s and 109 nM for the p47^{phox}TM- Δ Cter. This difference might be attributed to the use of a p22^{phox} C-terminus, which is three times longer (63 residues versus 20) than reported

in previous studies. The C-terminus of p22^{phox} used in this study corresponds to the entire cytosolic region following the last putative transmembrane segment. The improvement in affinity suggests that the additional residues, apart from the canonical PRR, may also play a role in stabilizing the p47^{phox}/p22^{phox} interaction. However, the affinity obtained with different analytical methods, p47^{phox} constructs and p22^{phox}Cter peptides of various lengths may only be compared with great caution. The most important information here is the ability to discriminate between open and closed tandem SH3s, reflecting the activated or the auto-inhibited states of the protein.

Deciphering the molecular opening of p47^{phox}

The DXMS local kinetics presented here is a natural follow-up to our first study of the conformational changes occurring upon p47^{phox} activation (Marcoux et al., 2009). Here we precisely localized unmasked regions during AIR and PX release. Indeed, the bottom of the tandem SH3s groove, including the Src loops extending from both SH3s, becomes accessible. This is a definitive structural demonstration that addition of targeted negative charges induces AIR release (by mutation here and phosphorylation *in vivo*). At this point, p47^{phox} is now able to progress

further to the next step along the activation process: the interaction with p22^{phox}.

The existence of a "dormant" state of p47^{phox}, involving region unmasking upon activation, was proposed 16 years ago (Sumimoto et al., 1994). Since then, the two SH3s domains and the N-terminal region of the protein (designated as the PX domain in 1996) have been pointed out in this mechanism. (Leto et al., 1994; Ponting, 1996). The PX domain lipid-binding property was identified in 2001 (Kanai et al., 2001), and its enhancement in the activated form clearly established 2 years later (Ago et al., 2003). Over this long period, the PX domain was believed to interact internally with SH3B (Ago et al., 2003; Ago et al., 1999; Karathanassis et al., 2002; Lapouge et al., 2002; Massenet et al., 2005; Shiose and Sumimoto, 2000). The structure of the "tandem SH3s-AIR super-complex" raised doubts about this interaction (Groemping et al., 2003; Nauseef, 2004; Yuzawa et al., 2004b). Finally, SAXS molecular envelopes of the entire p47^{phox} instead suggested that SH3A was the internal PX target (Durand et al., 2006). Our present study reveals the unmasking of a new surface on the lateral side of SH3A. This enhanced accessibility and the higher lipid-binding property of the activated state (Figure 6c) strongly support the proposal that this lateral surface can be involved in PX interaction.

Identification of residues involved in PX-SH3A interaction by site-directed mutagenesis

To more precisely identify the residues that are directly involved in PX binding, five mutants were created within the new surface identified by DXMS. None of them showed interaction with the p22^{phox}Cter part (Figure 6a-b and data not shown), confirming "tandem SH3s-AIR super-complex" integrity. However, the double mutant p47^{phox}R162A/D166A-ΔCter was able to interact with specific phospholipids (Figure 6c), reflecting PX domain release. The single mutants R162A and D166A do not show such enhancement in lipid binding (Figure 6c), showing a synergistic effect of both residues in PX domain locking. Interestingly, the two residues identified are located within peptide 161–166, which shows the largest deuteration difference between p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter in DXMS local kinetics (Figure 4b). This suggests that these residues play a role in the p47^{phox} auto-inhibition mechanism. This semi-open conformation is further supported by DXMS global kinetics showing an intermediate surface accessibility between the inhibited and activated states for p47^{phox}R162A/D166A-ΔCter.

A recent study pointed out that the region upstream from the SH3A module (residues 151–158) could be involved in the

lipid-binding site inhibition, as shown by the PX domain opening upon substitution by a polyglycine linker (Shen et al., 2008). Another study showed that residues I152 and T153 are crucial for Nox2 activation (Taura et al., 2009) but do not affect p47^{phox} translocation properties in response to phorbol myristate acetate addition. These two studies underline a role for this stretch of amino acids localized close to the surface highlighted here by DXMS. However, this stretch is already fully deuterated after 30 s and no deuteration difference can be seen between p47^{phox} activated and auto-inhibited forms (Figure 3c). These DXMS data firstly prove that this 151-158 region is readily accessible. Secondly, the absence of deuteration difference between both states does not allow conferring on this region any structural role in p47^{phox} activation. It may be involved at a later stage, after oxidase assembly, as suggested by Taura et al. (Taura et al., 2009).

Intramolecular signal transduction within p47^{phox} upon activation: coupling between AIR release and PX opening.

Apart from identifying the PX docking site on SH3A, an even more important pursuit is understanding the domino effect explaining how phosphorylations, occurring in the p47^{phox} C-terminal part, make the PtdIns(3,4)P₂-binding site accessible, three modules

upstream along the protein. Among the different mutants studied here, the properties of the double mutant R162A/D166A address this question.

When looking closer at the "tandem SH3s-AIR super-complex" structure (Groemping et al., 2003; Yuzawa et al.,

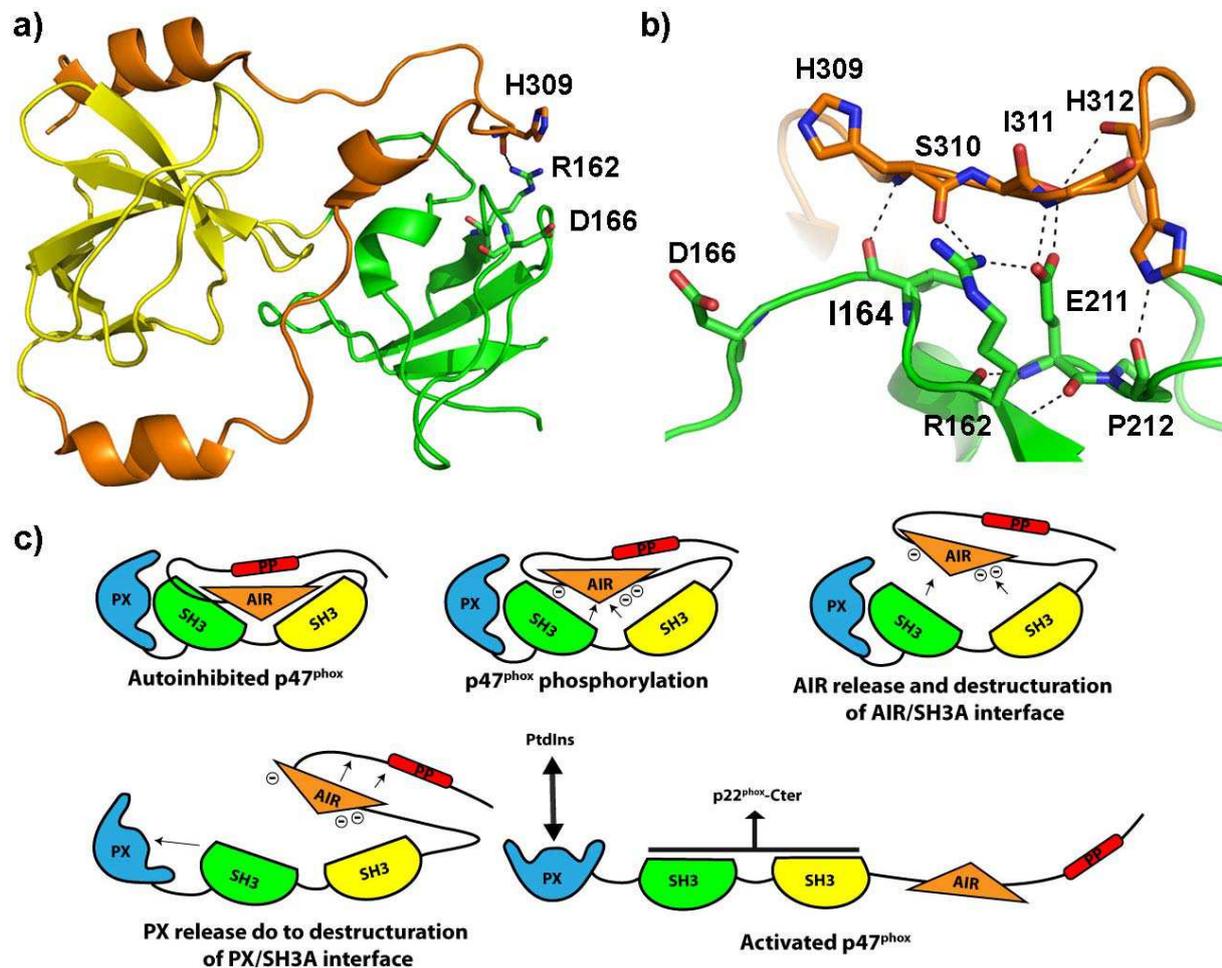


Figure 7. a) Structure of the tandem SH3s (SH3A in green and SH3B in yellow) inhibited by the AIR (orange) (Groemping et al., 2003) (PDB: 1NG2). Residues R162, D166 and H309 are shown as sticks. b) Close-up showing the network of polar interactions between residues R162, I164, E211 and P212 from SH3A (green) and residues H309, S310, I311 and H312 from AIR (orange). c) Schematic representation of p47^{phox} activation mechanism showing how phosphorylation of the AIR leads to the PX domain release through the surface identified in this study.

2004b), residue R162 from SH3A appears to be directly connected to the AIR (Figure 7a). R162 is at the center of a hydrogen bond network connecting the SH3A surface with the AIR in its bound state (Figure 7b). It interacts directly with H309 and indirectly with S310 through stabilization of residue

E211. From this core network around R162, additional residues I164 and P212 from the SH3A and I311, H312 from the AIR are involved in additional contact within this interface (Figure 7b).

In contrast, no interaction of residue D166 with the AIR can be stated from the

available crystal structures (pdb 1NG2 and 1UEC). Therefore, the synergistic effect observed in the double mutant can be explained by a combined stabilization of the PX domain by residues R162 and D166. Mutations of these residues lead to PX domain release, without affecting "tandem SH3s-AIR super-complex" integrity, but AIR release (such as in p47^{phox}TM-ΔCter) also leads to PX domain release.

The coupling between AIR and the PX domain can be assigned to R162. Upon AIR release, triggered by serine phosphorylations, disruption of the hydrogen bond network around R162 will disorganize the side chain structural organization of the highlighted peptide 162–166. This could be sensed by the PX domain docked on this lateral surface and would finally trigger its release (Figure 7c). A more systematic site-directed mutagenesis study must be conducted on both regions encompassing residues 306–312 from the AIR and this newly identified surface from SH3A to describe this mechanism more accurately. Mutations in the PX domain could also lead to the identification of the residues involved in the interaction with this SH3A lateral surface.

For many years, researchers have been trying to explain how the phosphorylation of at least three serine residues on one part of p47^{phox} leads to the PX domain release. Here, a surface involved

in PX auto-inhibition has finally been localized on SH3A. Moreover, two residues from this region are pointed out as playing a key role in the intramolecular signal transduction from the AIR to the PX domain. The emerging mechanism deciphered here in p47^{phox} to control a global assembly process in response to phosphorylations has never been reported before. To our knowledge, it is a unique structural organization enabling an internal signal transduction along four distinct modules.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Material

Glutathione Sepharose High Performance and SP Sepharose High Performance columns were from GE Healthcare Bio-Sciences (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Jupiter, C18 column (50×1 mm; 5μm, 300 Å) was from Phenomenex (Torrance, CA, USA). C4 and C8 Macro-traps were from Michrom Bioresources, Inc. (Auburn, CA, USA).

Pepsin from porcine gastric mucosa and protease type XIII from *Aspergillus saitoi* were from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

Protein Cloning, Expression and Purification

cDNA encoding p47^{phox} residues 1–397 (p47^{phox}) or 1–342 (p47^{phox}ΔCter) and the cytosolic region of p22^{phox} (residues 132–195) were cloned into pGex-6P vectors adding an N-terminal GST fusion tag (Figure 1). Mutations were introduced by PCR-mediated site-directed

mutagenesis. All constructs were sequenced to confirm their identities.

p47^{phox}, p47^{phox}ΔCter and GST-p22^{phox}Cter constructs were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and purified according to Durand et al. (Durand et al., 2006), with slight differences described hereafter. Lysis buffer for p47^{phox} purification included 1 mM EDTA, but we used 2 mM MgCl₂ supplemented with DNase and Complete EDTA-free protease inhibitor (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) for GST-p22^{phox}Cter purification. Buffers were set at pH 7.5 for p47^{phox} construct purification and at pH 7 (lysis buffer) and pH 8 (elution buffer) for GST-p22^{phox}Cter purification. GST cleavage gave rise to p47^{phox} encoding residues 1–342, which will be referred to as p47^{phox}ΔCter. GST-p22^{phox}Cter was not cleaved after Glutathione Sepharose elution but was reloaded twice on the same column, to bind any residual GST, and concentrated on an Amicon centrifugal device with a 10-kDa cutoff (Millipore, Billerica, MA, USA).

GST used for Surface Plasmon Resonance (SPR) experiments was obtained after GST-p47^{phox}ΔCter overnight cleavage with PreScission protease (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). It was recovered from SP Sepharose column flow-through and concentrated on an Amicon centrifugal device with a 10 kDa cutoff.

p47^{phox}tandem SH3s was also purified according to Durand et al. (Durand et al., 2006), with slight differences. The culture pellet was resuspended in 50 mM Tris pH 7, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 4 mM DTT in presence of Complete protease inhibitor. After overnight

digestion at 4°C with PreScission protease, the cleaved protein was precipitated with 60% ammonium sulfate and purified using a Superdex 75 prep grade column (GE Healthcare). The p47^{phox}tandem SH3s was finally eluted as a dimer and the fractions were pooled and concentrated to 2.5 mg/ml on an Amicon centrifugal device with a 10 kDa cutoff.

Surface Plasmon Resonance

SPR experiments were conducted using a Biacore 3000 instrument (Biacore AB, Paris, France) equipped with a CM4 sensor chip. The machine was primed with the running buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄ pH 7.4 and 0.005% surfactant P20). p47^{phox} was diluted in the running buffer to the required concentrations reported in Figure 2. Before immobilization, 70 μl of NHS and 70 μl of EDC were first mixed and 50 μl of the resulting mix was injected to prime the surface at 5 μl/min, as recommended by the manufacturer. Ten microliters of 78.2 nM GST-p22^{phox}Cter diluted in 4 mM sodium acetate pH 5 were then immobilized at 5 μl/min and 30 μl of ethanolamine were finally injected to saturate the surface. All runs were carried out at 20°C and at a flow rate of 20 μl/min. After each injection, the surface was regenerated by a 10-μl injection of 10 mM NaOH at a flow rate of 20 μl/min. For each p47^{phox} injection (60 μl), a blank was run in parallel on a surface functionalized with 78.2 nM GST to subtract nonspecific binding. For the p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter comparison, we carried out crossed scales to overcome the possible problems of surface degradation over time by

alternating injections between p47^{phox}ΔCter, p47^{phox}TM-ΔCter and p47^{phox}tandem SH3s. For point mutation analysis, crossed scales between p47^{phox}tandem SH3s and the mutants analyzed were carried out. Every third full-scale analysis, new CM4 surfaces were functionalized with both GST and GST-p22^{phox}Cter.

H/D Exchange and data analysis

Deuteration of p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter was initiated by a 20-fold dilution into a deuterated buffer (5 mM Hepes pD 7.4, 1 mM EDTA, 2 mM DTT and 200 mM NaCl). Aliquots (40 μl) were taken after 30 sec, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 1 hr, 3 hrs, 5 hrs, 6 hrs and 8 hrs for the local kinetics and 10 sec, 30 sec, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min and 1 hrs for the global kinetics. The exchange was done at 21°C and was quenched by addition of 5.6 μl of 50 mM HCl and rapid freezing in liquid nitrogen. Each sample was quickly thawed and digested on ice for 2 min with pepsin (enzyme/protein w/w ratio 1) or protease type XIII (enzyme/protein w/w ratio 12) before mass spectrometric analysis.

HPLC separation

The digestion mixture was loaded on a peptide MacroTrap and desalted with 0.03% TFA (solvent A) for 1 min at a flow rate of 400 μl/min. After that, peptides were eluted with a linear gradient (from 17% to 45% B in 20 min, where solvent B was 95% ACN / 0.03% TFA).

Mass spectrometric analysis

Peptide sequencing was performed using a quadrupole ion trap mass spectrometer (ESQUIRE 3000+, Bruker Daltonics) equipped

with an electrospray source. For the MS/MS experiments, the three most intense ions from the preceding MS scan were fragmented. Tandem mass spectra were searched using Mascot and the assignments were verified manually and by accurate mass measurements.

Accurate mass measurements and the analysis of the local kinetics of deuteration were done on a time-of-flight (TOF) mass spectrometer (6210, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with an electrospray source. Data were processed with Analyst QS and MassHunter Qualitative Analysis and the deconvolution and calculation of the average masses were carried out in Magtran (Zhang and Marshall, 1998). Deuteration percentages (%D) were calculated using Eq. (1)

$$\%D = [(m_{x\%} - m) / N] \times 100 \quad (1)$$

where m and $m_{x\%}$ represent the average molecular mass of nondeuterated and partially deuterated samples, respectively, and N , the number of exchangeable amide protons. Two independent measurements were taken and the data were averaged.

Data were processed with the scripts available at <http://ms.biomed.cas.cz/MSTools/>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Daniel Kavan for developing the scripts, thus facilitating data processing and interpretation. This study was supported by grants from the Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). The authors also thank Patrice Vachette and Dominique

Durand for their careful reading of the manuscript and fruitful scientific discussions.

REFERENCES

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 4474-4479.
- 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. *The Journal of biological chemistry* *274*, 33644-33653.
- Bedard, K., and Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* *87*, 245-313.
- Durand, D., Cannella, D., Dubosclard, V., Pebay-Peyroula, E., Vachette, P., and Fieschi, F. (2006). Small-angle X-ray scattering reveals an extended organization for the autoinhibitory resting state of the p47(phox) modular protein. *Biochemistry* *45*, 7185-7193.
- Gorzalczany, Y., Sigal, N., Itan, M., Lotan, O., and Pick, E. (2000). Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly. *The Journal of biological chemistry* *275*, 40073-40081.
- 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.
- Hiroaki, H., Ago, T., Ito, T., Sumimoto, H., and Kohda, D. (2001). Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nature structural biology* *8*, 526-530.
- Kanai, F., Liu, H., Field, S.J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G.E., Cantley, L.C., and Yaffe, M.B. (2001). The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nature cell biology* *3*, 675-678.
- Karathanassis, D., Stahelin, R.V., Bravo, J., Perisic, O., Pacold, C.M., Cho, W., and Williams, R.L. (2002). Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *The EMBO journal* *21*, 5057-5068.
- Krause, K.H. (2004). Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Japanese journal of infectious diseases* *57*, S28-29.
- Lapouge, K., Smith, S.J., Groemping, Y., and Rittinger, K. (2002). Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *The Journal of biological chemistry* *277*, 10121-10128.
- Leto, T.L., Adams, A.G., and de Mendez, I. (1994). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 10650-10654.
- Li, X.J., Fieschi, F., Paclat, M.H., Grunwald, D., Champion, Y., Gaudin, P., Morel, F., and Stasia, M.J. (2007). Leu505 of Nox2 is crucial for optimal p67phox-dependent activation of the flavocytochrome b558 during phagocytic NADPH oxidase assembly. *Journal of leukocyte biology* *81*, 238-249.
- Marcoux, J., Man, P., Castellan, M., Vives, C., Forest, E., and Fieschi, F. (2009). Conformational changes in p47(phox) upon activation highlighted by mass spectrometry coupled to hydrogen/deuterium exchange and limited proteolysis. *FEBS letters* *583*, 835-840.
- Massenet, C., Chenavas, S., Cohen-Addad, C., Dagher, M.C., Brandolin, G., Pebay-Peyroula, E., and Fieschi, F. (2005). Effects of p47phox C terminus phosphorylations on binding interactions with p40phox and p67phox. Structural and functional comparison of p40phox and p67phox SH3 domains. *The Journal of biological chemistry* *280*, 13752-13761.
- Nakamura, R., Sumimoto, H., Mizuki, K., Hata, K., Ago, T., Kitajima, S., Takeshige, K., Sakaki, Y., and Ito, T. (1998). The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40phox and p67phox, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase. *European journal of biochemistry / FEBS* *251*, 583-589.
- Nauseef, W.M. (2004). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochemistry and cell biology* *122*, 277-291.
- Nobuhisa, I., Takeya, R., Ogura, K., Ueno, N., Kohda, D., Inagaki, F., and Sumimoto, H. (2006). Activation of the superoxide-producing

- phagocyte NADPH oxidase requires cooperation between the tandem SH3 domains of p47phox in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent alpha-helix of p22phox. *The Biochemical journal* 396, 183-192.
- Noda, Y., Kohjima, M., Izaki, T., Ota, K., Yoshinaga, S., Inagaki, F., Ito, T., and Sumimoto, H. (2003). Molecular recognition in dimerization between PB1 domains. *The Journal of biological chemistry* 278, 43516-43524.
- Ogura, K., Nobuhisa, I., Yuzawa, S., Takeya, R., Torikai, S., Saikawa, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2006). NMR solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox complexed with a p22phox-derived proline-rich peptide. *The Journal of biological chemistry* 281, 3660-3668.
- Ponting, C.P. (1996). Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci* 5, 2353-2357.
- Segal, A.W. (1996). The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Molecular medicine today* 2, 129-135.
- Shen, K., Sergeant, S., Hantgan, R.R., McPhail, L.C., and Horita, D.A. (2008). Mutations in the PX-SH3A linker of p47phox decouple PI(3,4)P2 binding from NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 47, 8855-8865.
- Shiose, A., and Sumimoto, H. (2000). Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry* 275, 13793-13801.
- Stahelin, R.V., Burian, A., Bruzik, K.S., Murray, D., and Cho, W. (2003). Membrane binding mechanisms of the PX domains of NADPH oxidase p40phox and p47phox. *The Journal of biological chemistry* 278, 14469-14479.
- Sumimoto, H., Hata, K., Mizuki, K., Ito, T., Kage, Y., Sakaki, Y., Fukumaki, Y., Nakamura, M., and Takeshige, K. (1996). Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry* 271, 22152-22158.
- Sumimoto, H., Kage, Y., Nunoi, H., Sasaki, H., Nose, T., Fukumaki, Y., Ohno, M., Minakami, S., and Takeshige, K. (1994). Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5345-5349.
- Tang, J. (1963). Specificity of Pepsin and Its Dependence on a Possible 'Hydrophobic-binding Site'. *Nature* 199, 1094-1095.
- Taura, M., Miyano, K., Minakami, R., Kamakura, S., Takeya, R., and Sumimoto, H. (2009). A region N-terminal to the tandem SH3 domain of p47phox plays a crucial role in the activation of the phagocyte NADPH oxidase. *The Biochemical journal* 419, 329-338.
- Taylor, R.M., Lord, C.I., Riesselman, M.H., Gripenrog, J.M., Leto, T.L., McPhail, L.C., Berdichevsky, Y., Pick, E., and Jesaitis, A.J. (2007). Characterization of surface structure and p47phox SH3 domain-mediated conformational changes for human neutrophil flavocytochrome b. *Biochemistry* 46, 14291-14304.
- Wilson, L., Butcher, C., Finan, P., and Kellie, S. (1997). SH3 domain-mediated interactions involving the phox components of the NADPH oxidase. *Inflamm Res* 46, 265-271.
- Yuzawa, S., Ogura, K., Horiuchi, M., Suzuki, N.N., Fujioka, Y., Kataoka, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2004a). Solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox in an autoinhibited form. *The Journal of biological chemistry* 279, 29752-29760.
- Yuzawa, S., Suzuki, N.N., Fujioka, Y., Ogura, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2004b). A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes Cells* 9, 443-456.
- Zhan, Y., Virbasius, J.V., Song, X., Pomerleau, D.P., and Zhou, G.W. (2002). The p40phox and p47phox PX domains of NADPH oxidase target cell membranes via direct and indirect recruitment by phosphoinositides. *The Journal of biological chemistry* 277, 4512-4518.
- Zhang, H.M., Kazazic, S., Schaub, T.M., Tipton, J.D., Emmett, M.R., and Marshall, A.G. (2008). Enhanced Digestion Efficiency, Peptide Ionization Efficiency, and Sequence Resolution for Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*.
- Zhang, Z., and Marshall, A.G. (1998). A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 9, 225-233.

SUPPLEMENTARY DATA

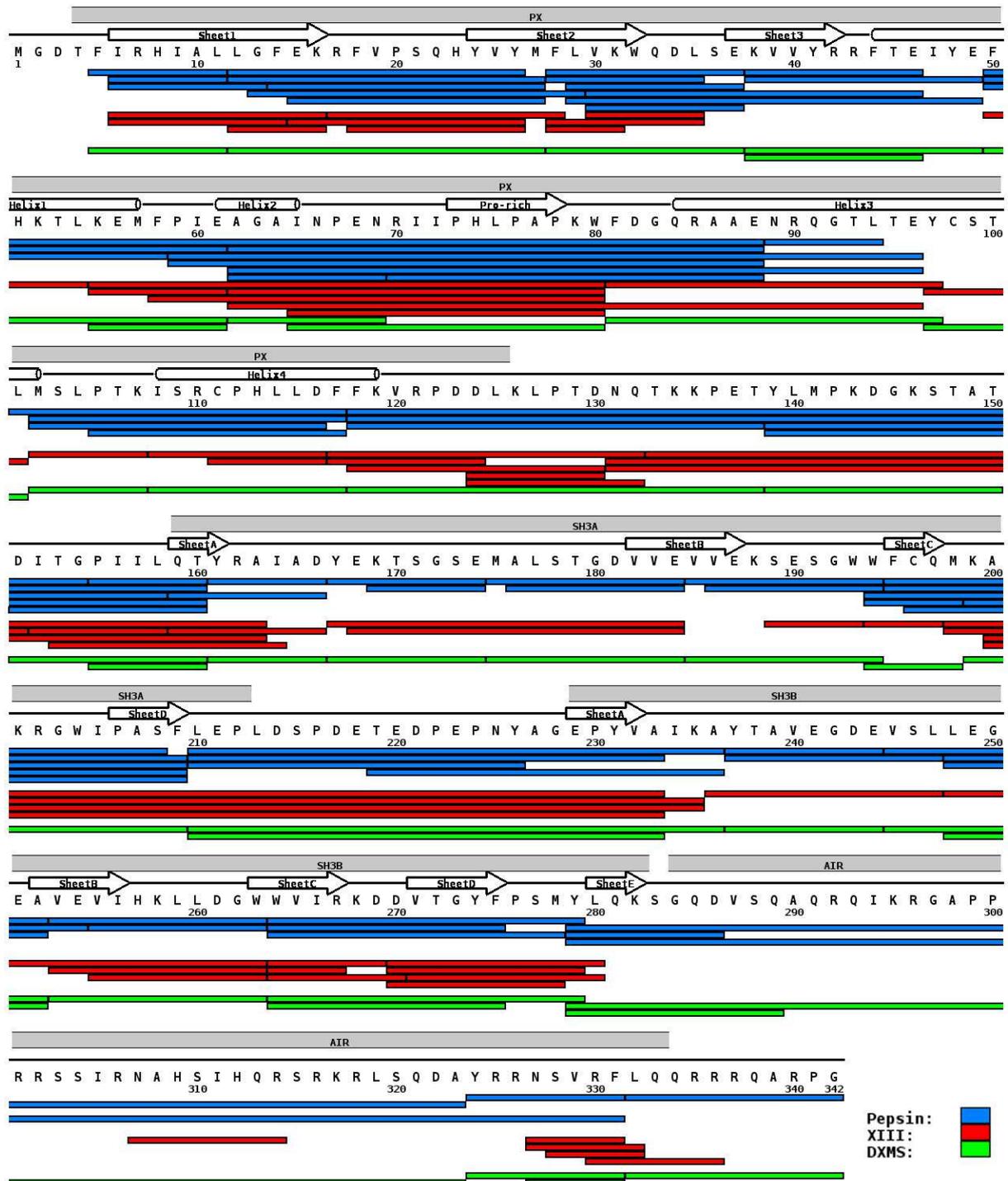


Figure S1. Mapping of p47^{phox} ΔCter. Peptides obtained with pepsin and protease type XIII are shown in blue and red, respectively. Peptides used for DXMS studies are shown in green. Secondary structure elements from NMR (Hiroaki et al., 2001) and crystallographic (Groemping et al., 2003; Karathanassis et al., 2002) data are represented above the sequence (arrows: β -sheets, cylinders: α -helices) and structural domains are represented in grey.

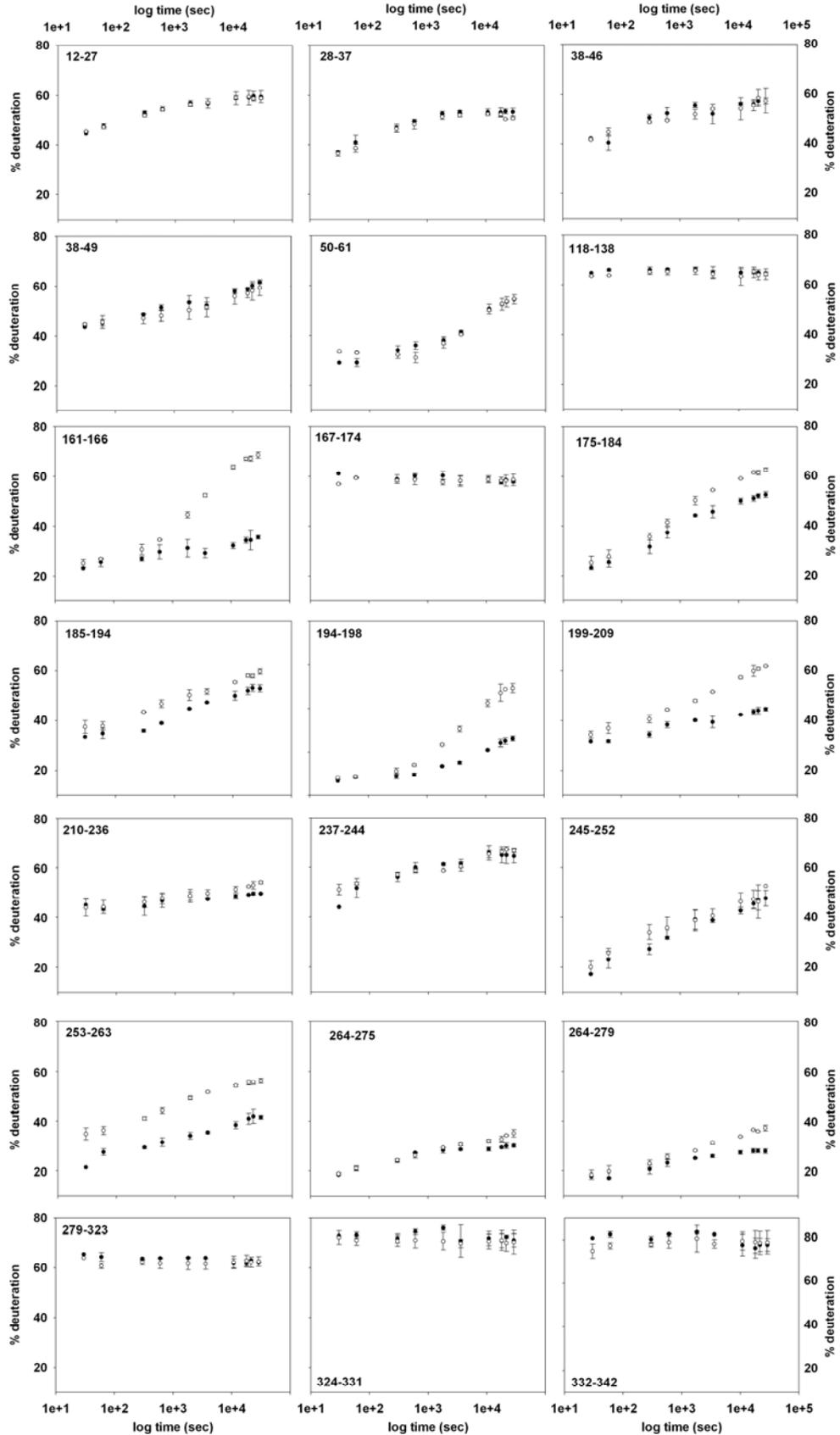


Figure S2. Local kinetics of H/D exchange for selected peptides obtained after digestion with pepsin. p47^{phox}ΔCter and p47^{phox}TM-ΔCter are represented with black and white circles, respectively. The values represent the average of two independent experiments. The centroid of each isotopic distribution was obtained in Magtran and the percentage of deuteration was calculated using Eq. (1).

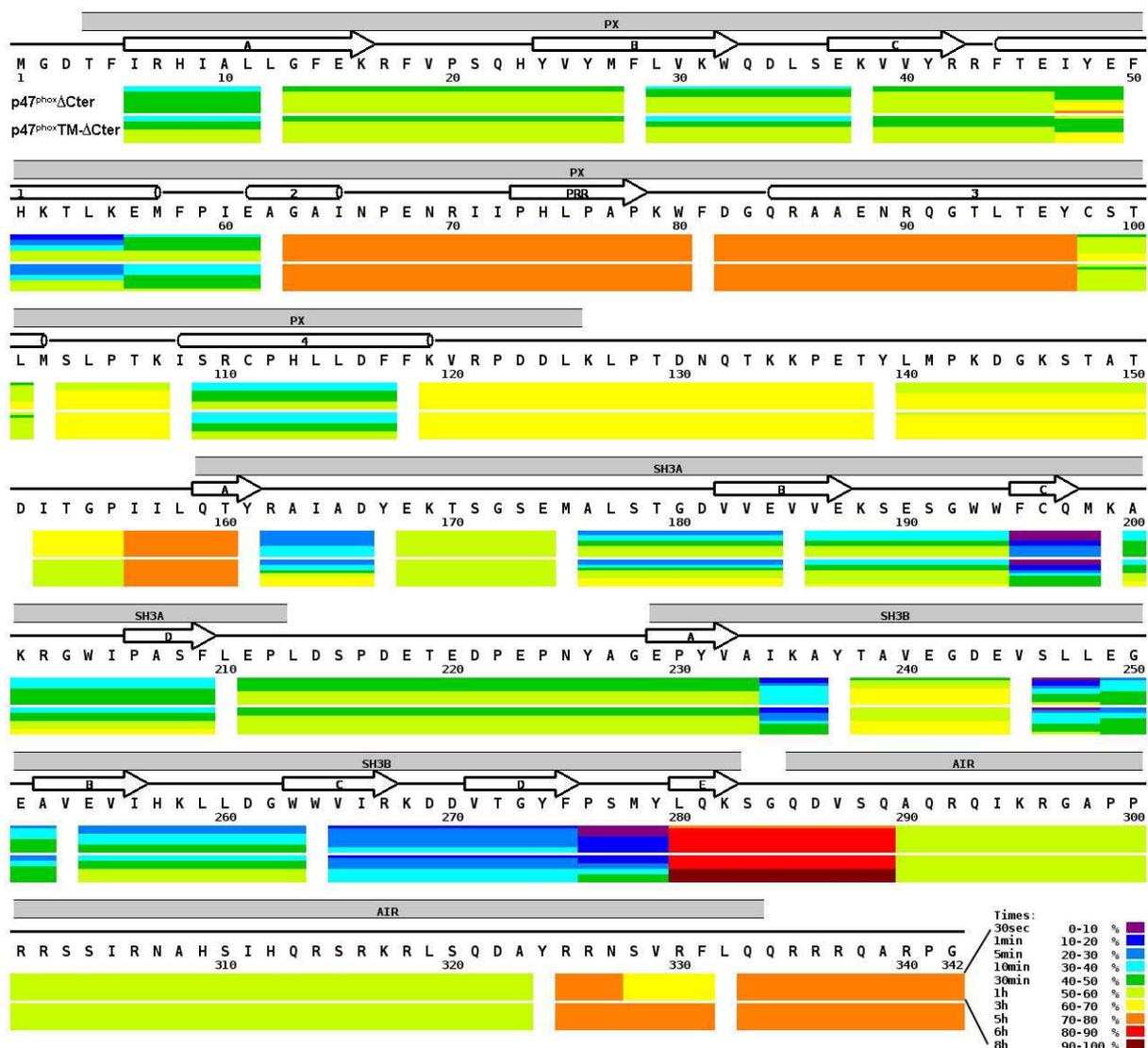


Figure S3. H/D exchange results of p47^{phox}ΔCter (top) and p47^{phox}-TM-ΔCter (bottom). Each block contains ten time-points; from the top, 30 sec, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 1 hr, 3 hrs, 5 hrs, 6 hrs and 8 hrs. The deuteration levels of each segment at each time-point are shown by different colors from purple ($\leq 10\%$ deuteration) through maroon ($\leq 90\%$), as indicated on the right of the Figure. Secondary structure elements from NMR (Hiroaki et al., 2001) and crystallographic (Groemping et al., 2003; Karathanassis et al., 2002) data are represented above the sequence (arrows: β -sheets, cylinders: α -helices) and structural domains are represented in grey.

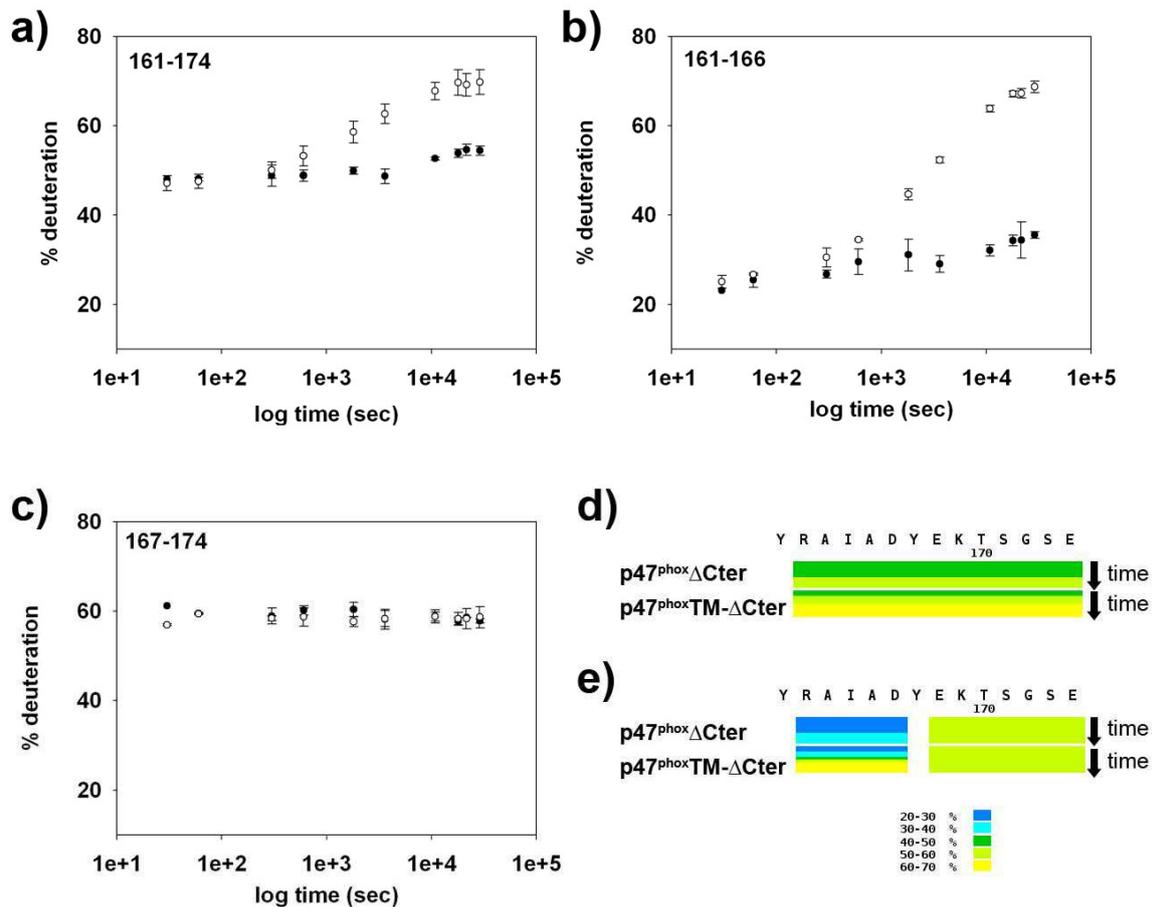


Figure S4. Increase of spatial resolution by the use of smaller non-overlapping peptides. Local kinetics obtained for peptides a) 161-174 b) 161-166 and c) 167-174. Colored scale representations of region 162-174 using d) peptide 161-174 or e) peptides 161-166 and 167-174.

IV. Conclusion

Dans cette deuxième partie de l'étude, les résultats publiés dans le premier article sont non seulement confirmés mais largement complétés par des données nouvelles permettant de mieux comprendre et décrire le mécanisme d'activation de p47^{phox}

D'un point de vue fonctionnel, l'augmentation de l'interaction p47^{phox}-p22^{phox} chez la forme activée est confirmée et quantifiée par BiacoreTM. Le K_d déterminé pour p47^{phox}S303/304/328- Δ Cter est du même ordre de grandeur que celui du tandem SH3s seul. A ce jour il s'agit de la valeur de K_d la plus forte jamais décrite pour cette interaction, mais c'est la première fois que celle-ci est étudiée par BiacoreTM en utilisant des formes aussi longues de p47^{phox} et p22^{phox}.

D'un point de vue structural, les cinétiques locales d'échange hydrogène/deutérium ont permis de mettre en évidence deux phénomènes :

- Une meilleure accessibilité au solvant des boucles Src chez p47^{phox} S303/304/328E. Ces boucles sont déjà connues pour interagir avec la région C-terminale de p22^{phox} après activation.

Ce résultat est ainsi complémentaire des résultats précédents puisque nous avons montré successivement: 1) le relargage de l'AIR (protéolyse ménagée) qui entraîne 2) une meilleure accessibilité au solvant des boucles Src (DXMS), permettant 3) l'interaction avec la région C-terminale de p22^{phox} (BiacoreTM).

- Par ailleurs, nous avons découvert une surface latérale sur le module SH3A de p47^{phox} qui est également plus accessible dans la forme activée, et qui pourrait être une surface d'interaction avec le PX. Cette surface n'a pas été répertoriée jusqu'alors et n'était pas encore connue pour jouer un rôle dans le mécanisme d'activation de p47^{phox}.

L'étude de mutagenèse dirigée dans cette région nous a permis d'identifier un double mutant chez qui, bien que l'interaction entre le tandem SH3s et l'AIR soit conservée (BiacoreTM), on observe une augmentation de l'interaction avec les lipides (test liposomes). Les deux résidus mutés R162 et D166 sont localisés non seulement dans cette surface latérale, mais qui plus est, dans le peptide où nous observons le plus de différences en DXMS. De plus, la courbe de deutération globale de ce double mutant se situe juste entre celles des formes inhibées et activées de p47^{phox}. Le double mutant R162A/D166A constitue donc une

sorte d'intermédiaire conformationnel, partiellement ouvert, à mi-chemin entre la forme autoinhibée sauvage et la forme activée du triple mutant S303/304/328E. Ces résultats nous permettent donc d'affirmer que ces deux résidus sont impliqués dans l'inhibition du PX.

L'analyse de la structure haute résolution du tandem SH3s auto-inhibé suggère que ces deux résidus pourraient jouer un rôle dans le transfert du signal d'activation entre l'AIR et le PX. En effet, une liaison hydrogène entre la chaîne latérale de R162 et le groupement OH du résidu H309 est visible sur la structure (Figure 86). Cette interaction est par ailleurs stabilisée par un réseau de liaisons hydrogènes entre les résidus H309, S310, I311 et H312 de l'AIR et les résidus I164, R162, E211 et P212 du module SH3A (Figure 87).

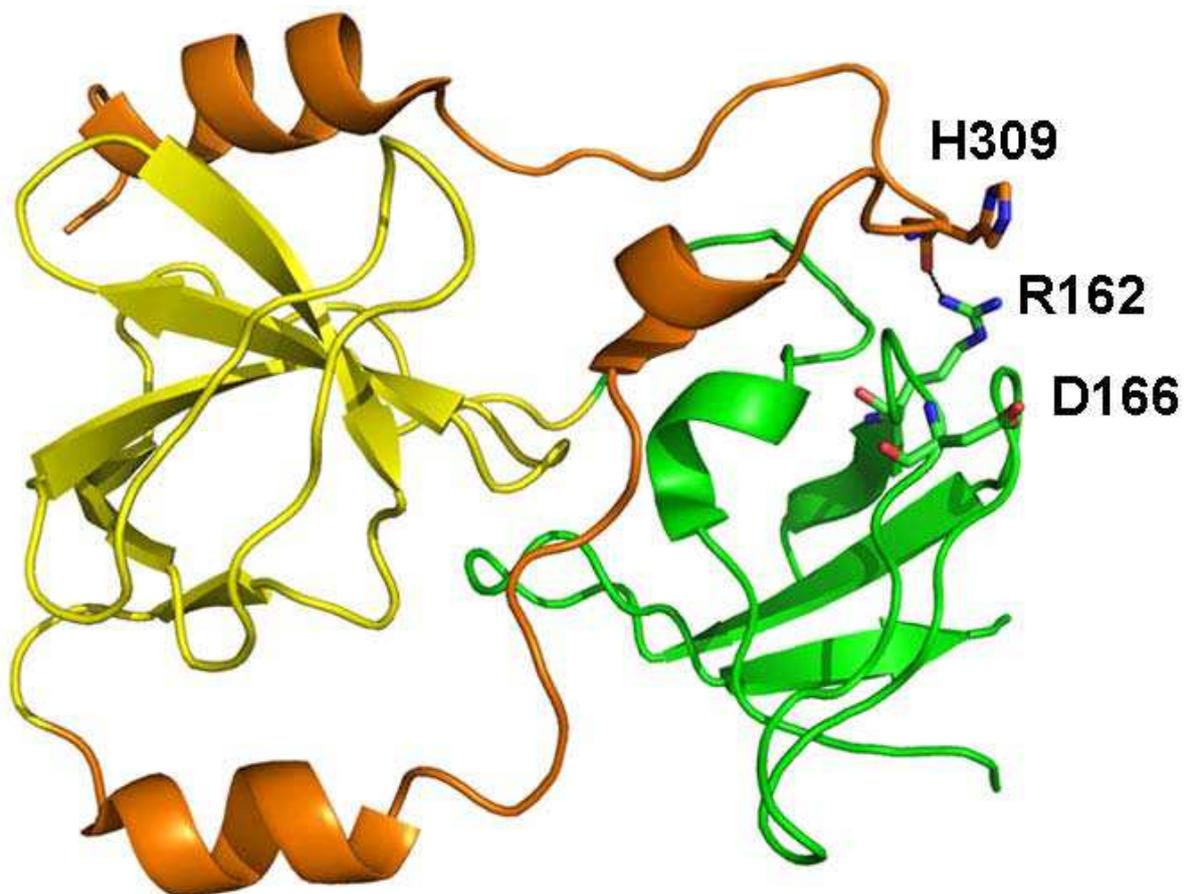


Figure 86. Rôle des résidus R162 et D166 dans le mécanisme d'activation

Structure du tandem SH3s autoinhibé d'après (Groemping et al. 2003). Les domaines SH3A et B sont colorés en vert et jaune, respectivement. L'AIR est représentée en orange. L'interaction intramoléculaire entre R162 et H309 est représentée par des pointillés.

Cette structure cristallographique ne permet pas d'observer de résidu de l'AIR interagissant directement avec le résidu D166. On peut alors penser que ce résidu interagisse directement avec le domaine PX.

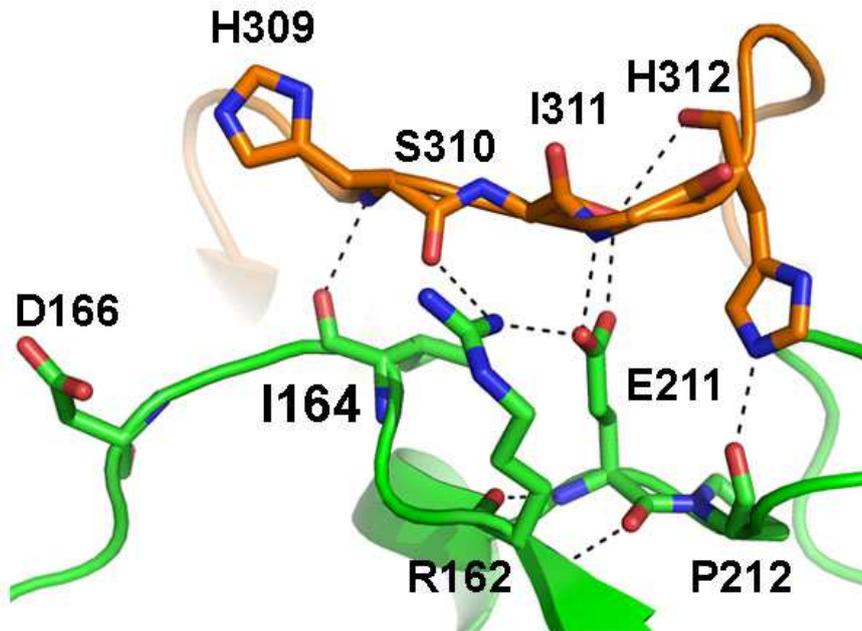


Figure 87. Réseau de liaisons hydrogènes entre le SH3A et l'AIR
Le module SH3A et l'AIR sont représentés en vert et orange, respectivement.

Dès lors, ces résidus pourraient jouer un rôle de senseur. En effet, R162 et D166 étant situés à l'interface entre l'AIR et le domaine PX, nous pouvons imaginer que lors du relargage de l'AIR, la déstabilisation de ces résidus entraîne l'ouverture du PX. Ce mécanisme permettrait d'expliquer comment des charges négatives apportées sous forme de phosphorylations à l'une des extrémités de p47^{phox} (AIR) peuvent avoir des répercussions, de proche en proche, à l'autre extrémité de la protéine (domaine PX) (Figure 88).

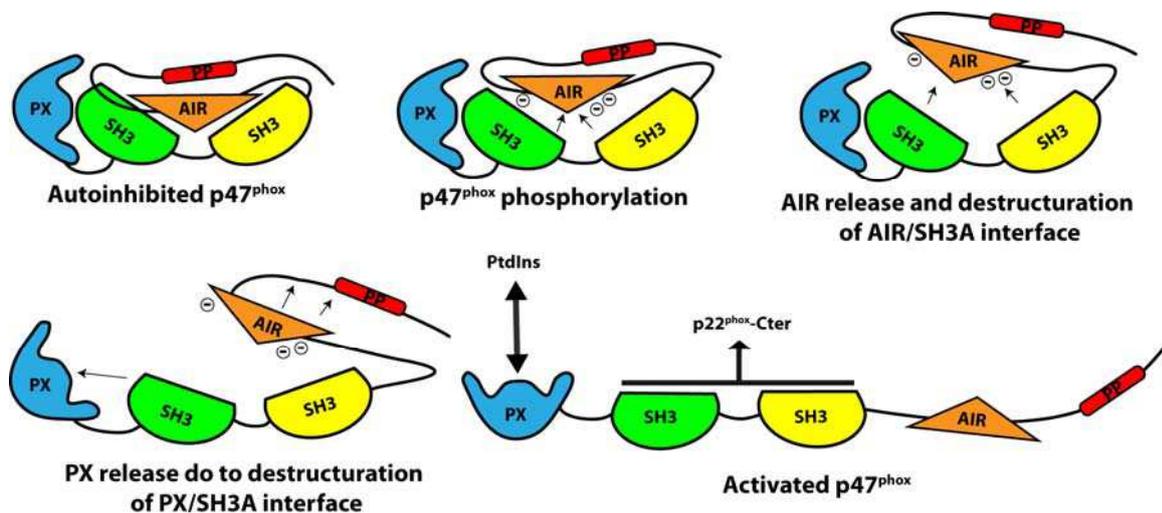


Figure 88. Modèle du mécanisme d'activation de p47^{phox} montrant le lien entre les relargages de l'AIR et du PX

Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de poursuivre ce travail par une étude de mutagenèse dirigée sur les résidus de l'AIR et du module SH3A impliqués dans cette interface.

Chapitre III : Etude d'un inhibiteur potentiel de p47^{phox} :

le celastrol

I. Introduction

Le celastrol est un antioxydant triterpénoïde naturel issu de l'herbe chinoise *Tripterygium wilfordii* (lei gong teng ou thunder god vine) (Figure 89). Cette plante de la famille des Celastraceae est utilisée par la médecine chinoise depuis des centaines d'années et est étudiée depuis la fin des années 90 pour ses vertus anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Le celastrol a ainsi été utilisé pour des traitements contre des maladies auto-immunes, l'asthme, des inflammations chroniques ainsi que des maladies neurodégénératives (Yang et al. 2006).

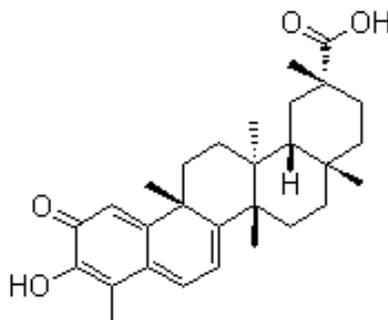


Figure 89. Structure du celastrol

Le celastrol est capable d'induire l'apoptose de cellules tumorales, d'inhiber la prolifération de cellules cancéreuses ainsi que l'angiogénèse (Sethi et al. 2007; Huang et al. 2008; He et al. 2009; Zhou and Huang 2009). Bien que tous les mécanismes moléculaires mis en jeu ne soient pas connus, il semblerait que le celastrol soit un inhibiteur de la voie NF-kappaB, du protéasome ainsi que de l'expression du récepteur au facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGFR). Depuis peu, le celastrol a été proposé comme inhibiteur de la NADPH oxydase (Wu et al. 2009).

Remarquons sur ce point que la recherche de petites molécules capables d'inhiber l'activité Nox a été très active au cours des vingt dernières années en raison de l'implication des ROS générés dans les nombreuses pathologies décrites plus haut (Introduction Bibliographique Chapitre I. I.3). Une revue récente décrit l'état d'avancement de la recherche de telles molécules (Jaquet et al. 2009). La difficulté principale qui en ressort est de trouver

des molécules qui soient spécifiques des Nox et plus particulièrement des différentes isoformes. En effet, parmi les centaines d'inhibiteurs de Nox dont parle Cross et al. (Cross and Segal 2004), un grand nombre d'entre eux sont des inhibiteurs indirects puisqu'ils agissent en amont (inhibiteurs de kinases par exemple) ou en aval (scavengers de ROS et antioxydants) de la NADPH oxydase (Jaquet et al. 2009). Une autre partie de ces inhibiteurs agit de manière directe mais peu spécifique, en inhibant toutes les isoformes, comme c'est le cas pour le diphenyleneiodonium (DPI) qui inhibe en plus d'autres enzymes telles que la NOS et la NADH coenzyme Q réductase.

La recherche d'inhibiteurs de Nox spécifiques est donc en plein essor et le nombre grandissant de publications observant un lien direct entre les binômes Nox-cancer, celastrol-cancer et celastrol-Nox nous a poussé à réaliser des tests d'inhibition et d'interaction avec p47^{phox}.

Comme mentionné plus haut, une équipe vient récemment de montrer que le celastrol était capable d'inhiber la formation de peroxydite endogène, en inhibant la formation de NO[•] par la iNOS et de l'ion superoxyde O₂⁻ par Nox1 (Wu et al. 2009). Nos collaborateurs de Genève (Vincent Jaquet et Karl-Heinz Krause) ont récemment caractérisé l'inhibition de différentes isoformes des Nox par le celastrol (données non publiées). L'inhibition d'isoformes de Nox ne possédant pas de facteurs cytosoliques laisse suggérer que le celastrol agit directement sur la partie membranaire du complexe. Cependant, d'après cette même étude, le celastrol aurait un effet fortement plus marqué sur l'isoforme Nox2, suggérant qu'il puisse agir également au niveau des facteurs cytosoliques. Ainsi, des tests préliminaires effectués par l'équipe genevoise ont suggéré que le celastrol pouvait inhiber l'interaction entre p47^{phox} et la partie C-terminale de p22^{phox}. C'est dans ce contexte que nous avons initié une collaboration avec l'équipe de Vincent Jaquet afin d'évaluer les propriétés d'interaction du celastrol vis-à-vis de p47^{phox}, en utilisant différentes approches structurales et fonctionnelles.

II. Résultats

II.1 Fluorescence des tryptophanes

La fluorescence d'une protéine est due à ses résidus aromatiques, en particulier les tryptophanes et dans une proportion moindre aux résidus tyrosine et phénylalanine. Le

maximum d'absorption des tryptophanes est situé à une longueur d'onde de 280 nm et leur pic d'émission est situé entre 300 et 350 nm, en fonction de la polarité de leur environnement. Cette fluorescence peut donc être utilisée pour étudier l'état conformationnel d'une protéine. Cette méthode possède l'avantage d'utiliser la fluorescence intrinsèque de la protéine et ne nécessite donc pas l'utilisation de sondes fluorescentes qui pourraient modifier la structure de la protéine. Elle est particulièrement bien adaptée à p47^{phox} qui possède 7 résidus tryptophanes. Une étude a ainsi montré que l'intensité de fluorescence des tryptophanes de p47^{phox} diminuait suite à sa phosphorylation (Swain et al. 1997). Le but de notre approche est d'une part de comparer cette fluorescence chez les formes activée et autoinhibée de p47^{phox} et d'autre part de tester l'effet du celastrol sur ces deux conformations. En effet, si le celastrol interagit avec p47^{phox}, nous espérons observer une baisse de la l'intensité de fluorescence par « quenching ».

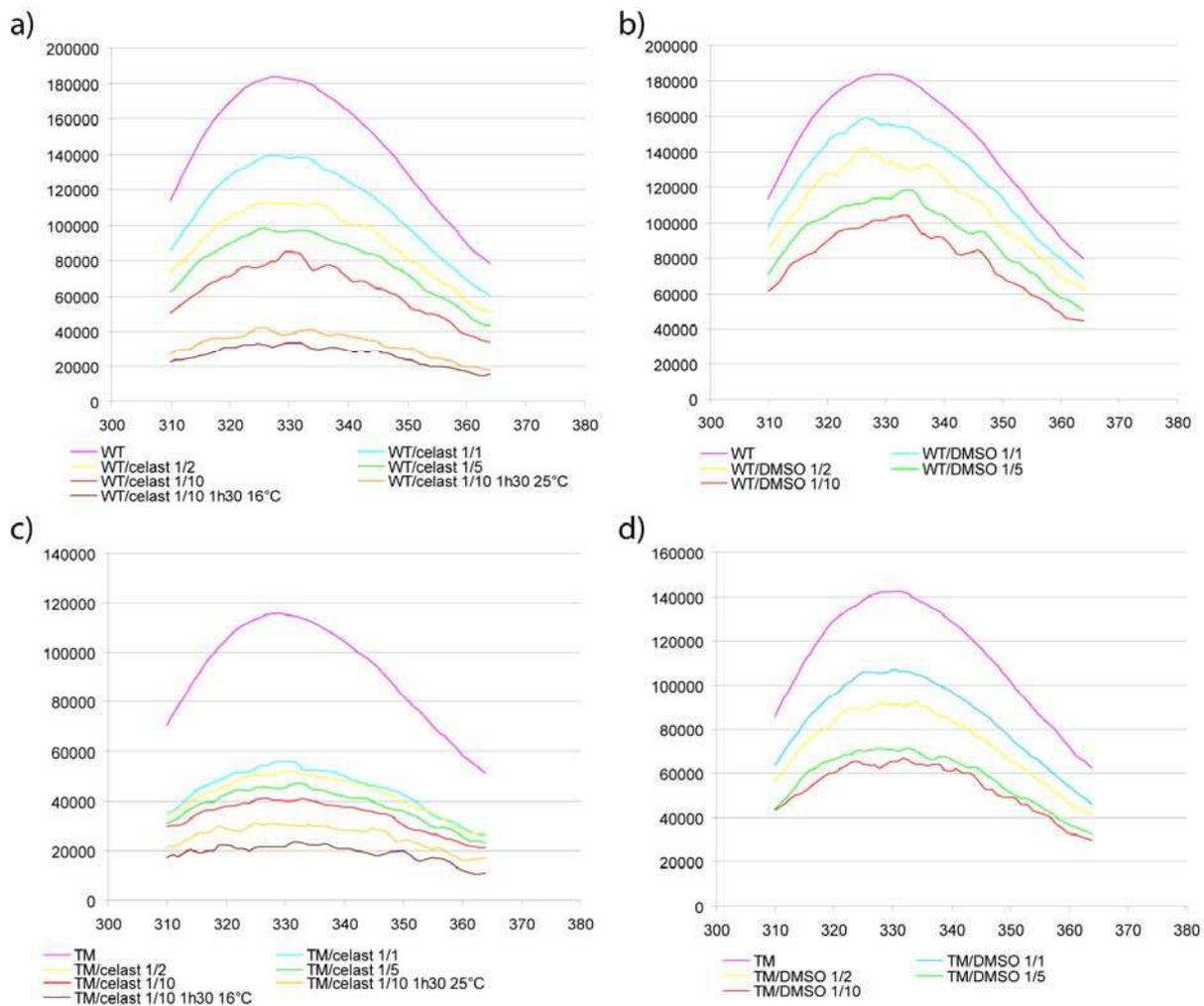


Figure 90. Spectres d'émission de fluorescence de p47^{phox} WT et TM avec différents ratios de celastrol ou de DMSO
p47^{phox} est concentrée 140 nM et soumise à une longueur d'onde d'excitation de 295 nm. L'émission de fluorescence est enregistrée entre 310 nm et 380 nm.

Le celastrol est très peu soluble dans l'eau et nous avons suivi les instructions du fournisseur en le solubilisant dans du DMSO, à 10 mg/ml. Lors des premiers tests d'émission de fluorescence de p47^{phox}, nous avons observé une diminution de l'intensité de fluorescence lors de l'ajout de celastrol (Figure 90a). Il semblait par ailleurs que cet effet était plus marqué sur p47^{phox}S303/304/328E-ΔCter (Figure 90c) que sur p47^{phox}ΔCter. Cependant, l'intensité de fluorescence diminuait également en présence de DMSO (contrôle négatif) mais dans des proportions moindres (Figure 90b et d). En réalité, nous nous sommes rendus compte que la fluorescence de la protéine n'était pas stable dans le tampon C (50 mM Hepes pH=7,5 ; 50 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 2 mM DTT) utilisé initialement. Cette dérive d'intensité a été attribuée à une aggrégation de la protéine dans le temps.

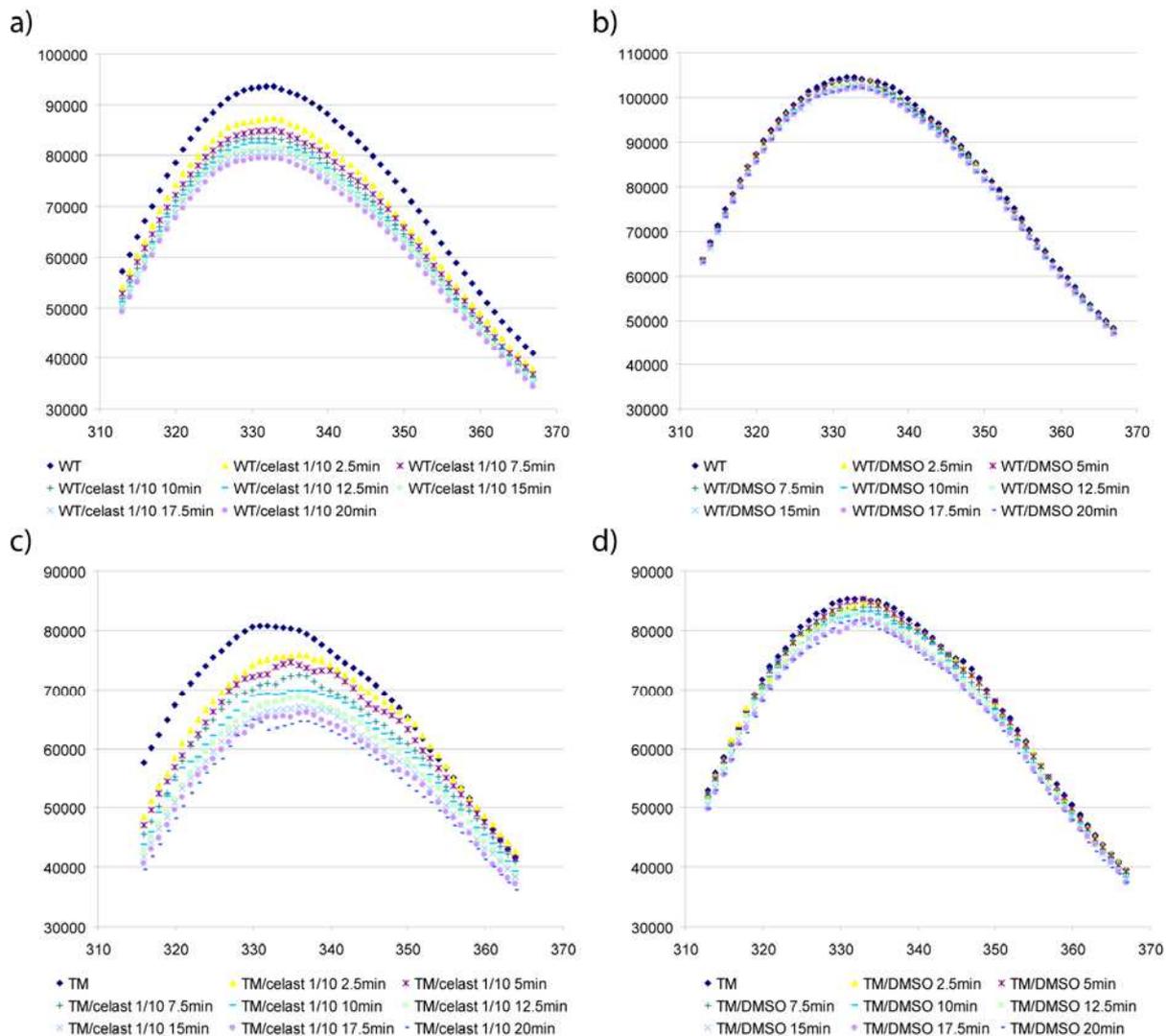


Figure 91. Spectres d'émission de fluorescence de p47^{phox} WT et TM avec un ratio 1/10 de celastrol ou de DMSO
p47^{phox} est concentrée 140 nM et soumise à une longueur d'onde d'excitation de 295 nm. L'émission de fluorescence est enregistrée entre 310 nm et 380 nm.

Nous avons donc testé la stabilité de p47^{phox} dans différents tampons et le tampon C' (50 mM Hepes pH=7,5 ; 500 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 2 mM DTT) supplémenté avec 10 % glycérol s'est avéré être le plus efficace. Nous avons ainsi pu stabiliser la protéine pendant 20 min et tester l'effet du celastrol au cours du temps en utilisant un ratio constant de 1/10. Cette stabilisation de la protéine se traduit par une fluorescence qui n'est pas modifiée au cours du temps après l'ajout de DMSO (Figure 91b et d).

Par contre, nous observons un effet du celastrol, et ceci dès 2,5 min d'incubation. Ce « quench » de la fluorescence est de l'ordre de 15 % chez p47^{phox}ΔCter (Figure 91a) et de 20 % chez p47^{phox}S303/304/328E-ΔCter (Figure 91c). De plus, nous observons un léger déplacement du maximum d'absorbance, de 332 nm pour p47^{phox}ΔCter à 338 nm pour p47^{phox}S303/304/328E-ΔCter.

Ces résultats enthousiasmants indiquent la présence d'une interaction spécifique entre le celastrol et p47^{phox}.

II.2 Tests d'interactions non covalentes

Des tests de cinétiques globales de DXMS ont été réalisés en présence de celastrol, afin de mettre en évidence une éventuelle interaction avec p47^{phox}. En effet, le cas échéant, le masquage du site d'interaction par une petite molécule peut entraîner une deutération plus faible que si la protéine était deutérée toute seule. Le DXMS est souvent utilisé pour mettre en évidence ce genre d'interactions entre une protéine et un ligand (Brier et al. 2006).

Ces tests de cinétiques globales de DXMS n'ont pas permis de mettre en évidence une surface d'interaction entre p47^{phox} et le celastrol. Cependant, un adduit à + 450 Da, la masse du celastrol, a été observé sur la forme entière de p47^{phox} et sur le tandem SH3s (Figure 92a). De plus, cet adduit n'est pas observé sur le spectre recomposé de l'apomyoglobine de cachalot utilisée comme témoin négatif (Figure 92b), preuve de la spécificité de l'interaction. Cependant, ces expériences sont réalisées en conditions dénaturantes (0,01 % TFA), et un test d'interaction en conditions natives est nécessaire à la validation de l'existence réelle et de la spécificité de cette interaction. En effet, il est possible, en utilisant une source électrospray, d'observer par SM des complexes non covalents, dans des conditions proches des conditions physiologiques (c.f. Introduction Bibliographique Chapitre III.V).

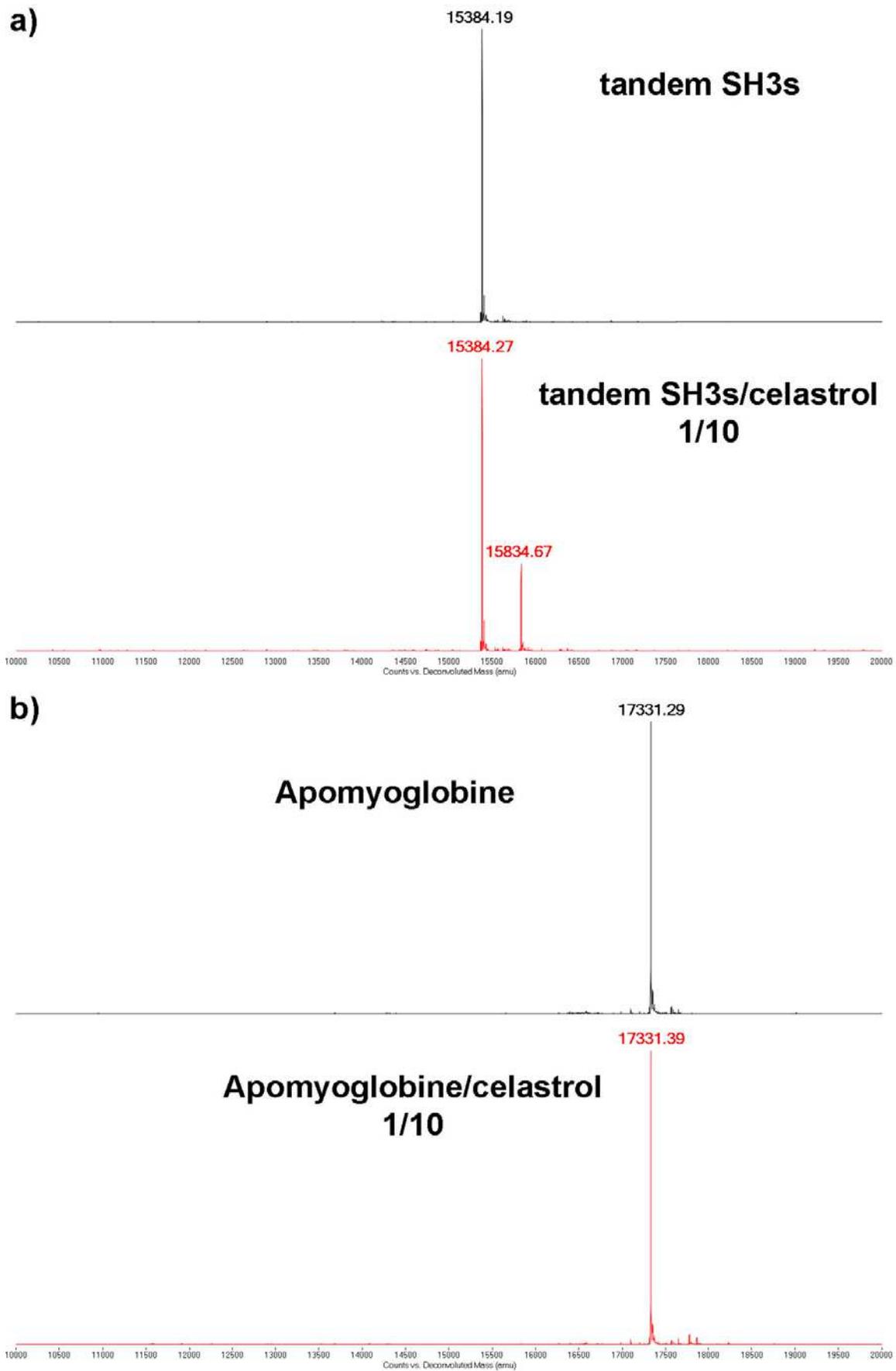


Figure 92. Interaction non covalentes observées par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes Spectres ESI-TOF déconvolués **a)** du tandem SH3s et **b)** de l'apomyoglobine, avec ou sans celastrol (ratio molaire de 1/10).

Ces tests réalisés sur le microQ-TOF, après dialyse des échantillons dans un tampon proche des conditions physiologiques et compatible avec la SM, ont permis de confirmer la présence de jusqu'à trois adduits correspondant à 3 molécules de celastrol liées par molécule de protéine (Figure 93).

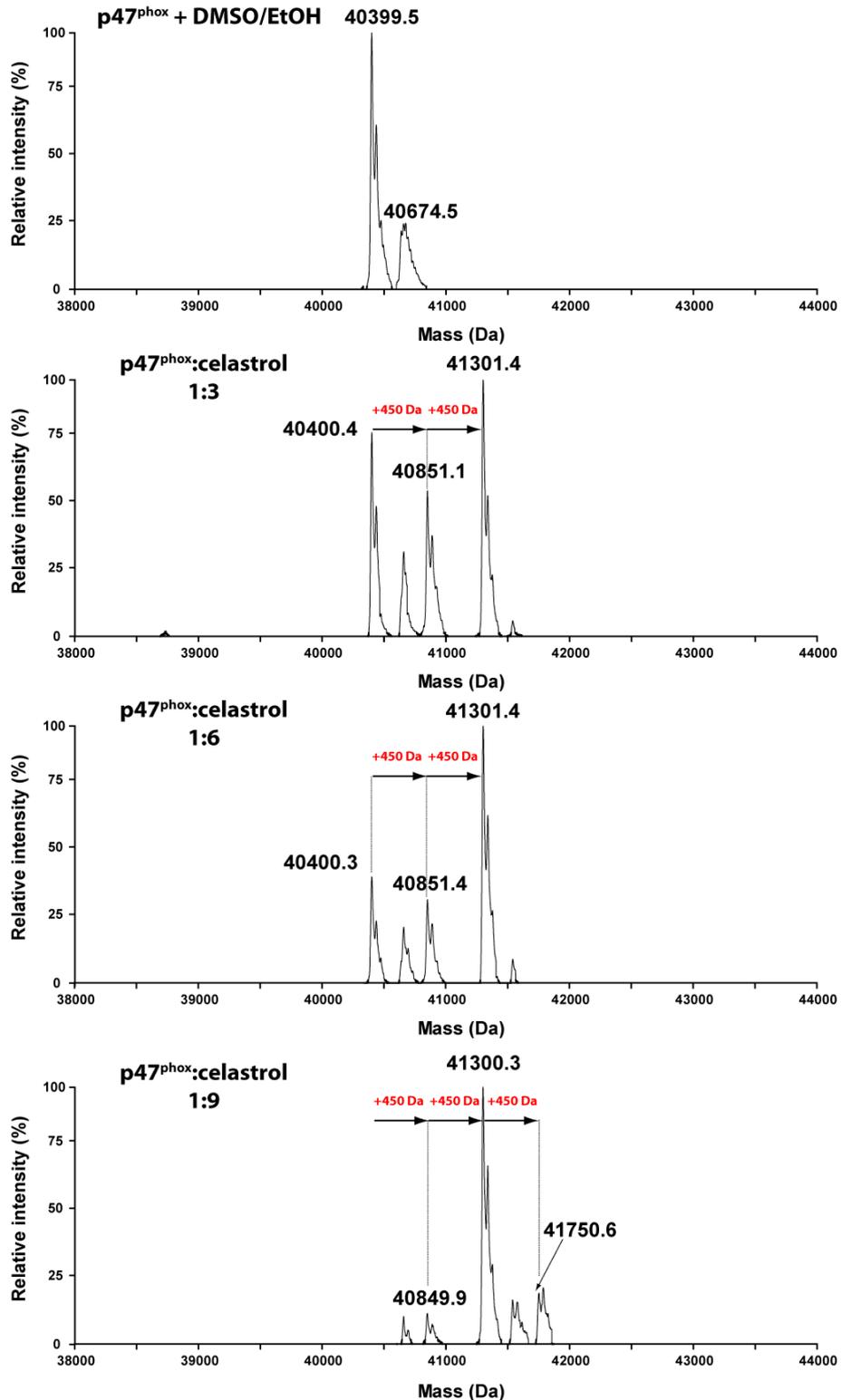


Figure 93. Interactions non covalentes observées par spectrométrie de masse native sur p47^{phox} ΔCter
 Spectres déconvolués de p47^{phox} ΔCter a) seule ou incubée avec des ratios molaires p47^{phox}:celastrol de b) 1:3 c) 1:6 et d) 1:9.

Un contrôle négatif a ensuite été réalisé sur l'apomyoglobine et le lysozyme, afin de vérifier la spécificité de l'interaction non covalente entre p47^{phox} et le celastrol. Celle-ci a pu être validée, car aucun adduit de celastrol n'est observé sur les spectres (Figure 94).

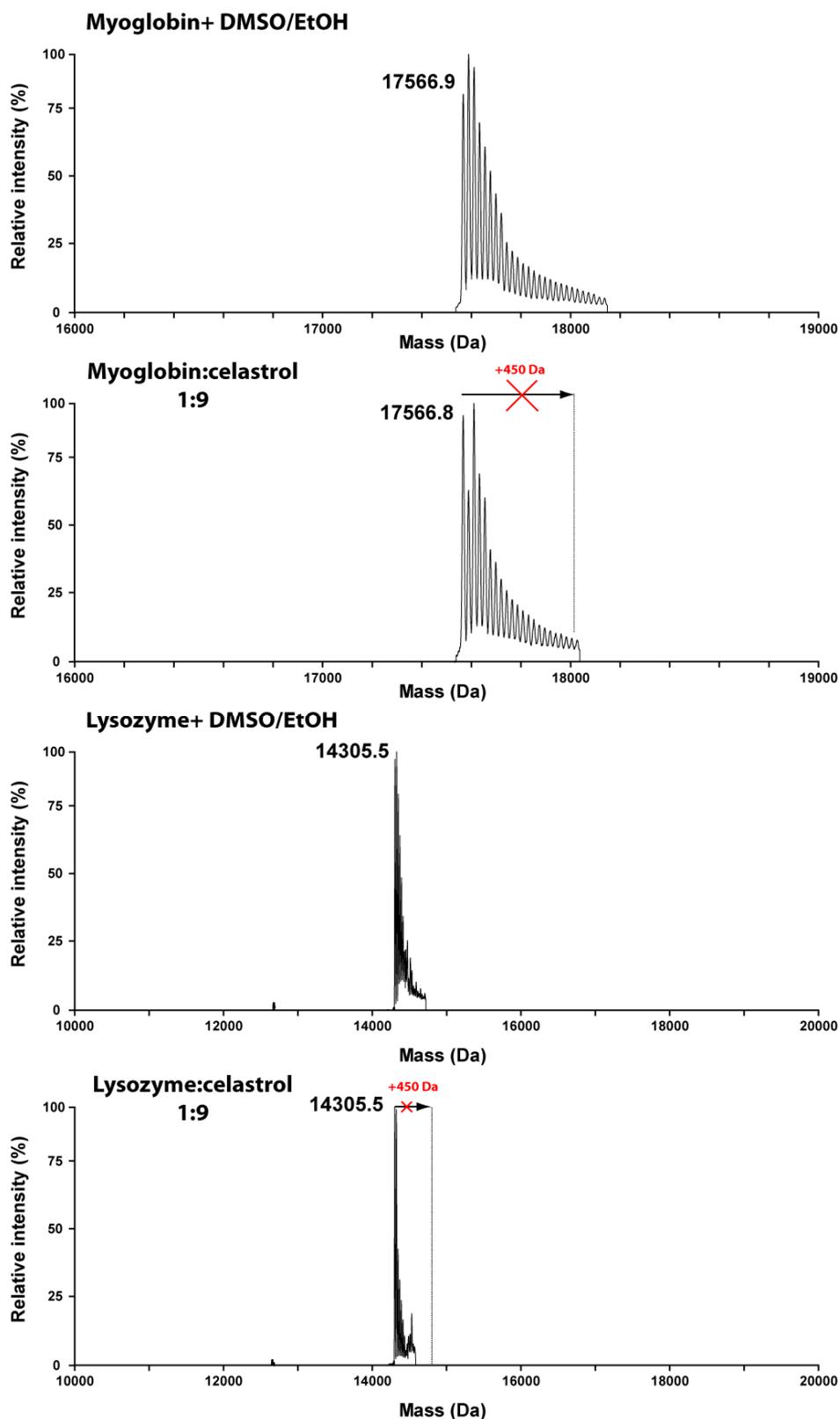


Figure 94. SM native sur l'apomyoglobine et le lysozyme en présence de celastrol
 Spectre déconvolués **a)** de l'apomyoglobine seule, **b)** de l'apomyoglobine incubée avec le celastrol (ratio 1:9), **c)** du lysozyme seul et **d)** du lysozyme incubé avec le celastrol (ratio 1:9).

En utilisant des formes tronquées de p47^{phox}, nous retrouvons ces adduits sur le domaine PX et non sur le tandem SH3s (Figure 95). Ceci est en désaccord avec le test initial qui avait isolé le celastrol pour sa capacité à inhiber l'interaction entre p22^{phox} et p47^{phox} (via le site d'interaction du tandem SH3s).

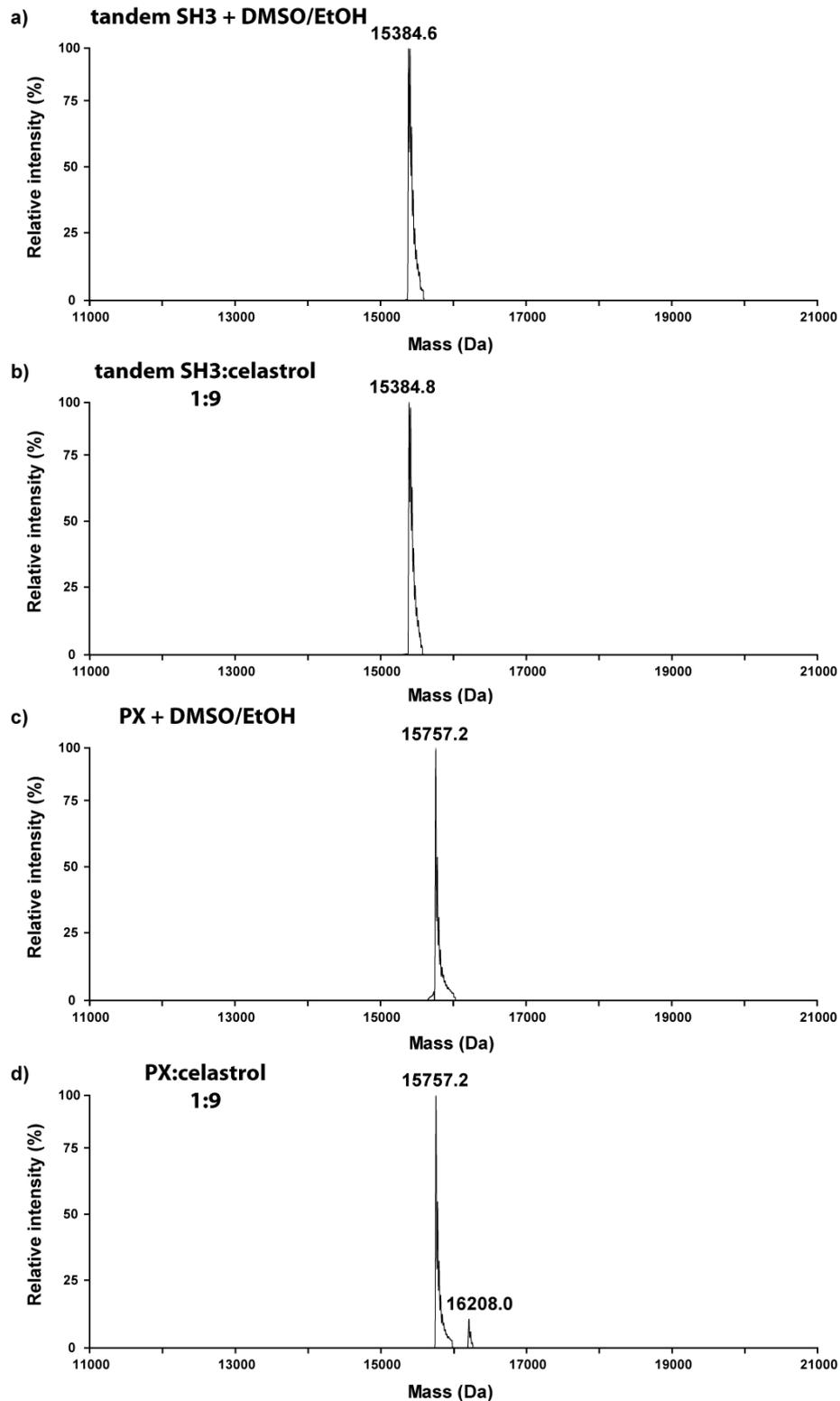


Figure 95. SM native sur des formes tronquées de p47^{phox}, en présence de celastrol
 Spectre déconvolués **a)** du tandem SH3s seule, **b)** du tandem SH3s incubé avec le celastrol (ratio 1:9), **c)** du domaine PX seul et **d)** du domaine PX incubé avec le celastrol (ratio 1:9).

III. Conclusion

Les résultats obtenus sur l'interaction potentielle de p47^{phox} avec le celastrol sont encourageants bien que contrastés. En effet, d'autres tests qui ne sont pas présentés ici n'ont pas permis de mettre en évidence cette interaction. L'effet du celastrol sur l'interaction p47^{phox}-p22^{phox} a par exemple été testé par BiacoreTM, sans voir de modifications. Des tests de titration calorimétrique isothermale (ITC), réalisés récemment en collaboration avec l'équipe de Remo Perozzo à Genève, semblent par ailleurs exclure toute interaction entre p47^{phox} et le celastrol.

D'un point de vue structural, aucune protection par le celastrol n'a pu être mise en évidence par protéolyse ménagée à la trypsine. De même, aucune fixation au niveau d'un site d'interaction putatif n'a pu être mise en évidence par une baisse de deutération, que ce soit au niveau des cinétiques globales ou locales de DXMS. L'ensemble de ces tests non concluants n'est pas représenté ici en détail.

Enfin, des tests de co-cristallisation du tandem SH3s de p47^{phox} avec le celastrol ont été réalisés (576 conditions). Les seuls cristaux obtenus se sont avérés être des cristaux de sel.

Cependant, une baisse de la fluorescence des tryptophanes de p47^{phox} en présence de celastrol est observée, suggérant l'existence de cette interaction spécifique. D'autre part, jusqu'à 3 adduits de celastrol sont détectés en SM native. La non-spécificité de ces adduits permet de conclure quant à la réelle existence de cette interaction. Les tests effectués sur des formes tronquées de p47^{phox} semblent suggérer que le domaine PX est capable de lier au moins une molécule de celastrol, contrairement au tandem SH3s. Les autres molécules sont vraisemblablement fixées au niveau des interfaces entre les modules, puisqu'elles reconnaissent la protéine entière uniquement.

Il semblerait donc que l'action du celastrol sur l'activité de la NADPH oxydase soit liée, en partie, à une interaction avec le facteur cytosolique p47^{phox}.

Chapitre IV : De nouvelles protéases acides pour l'échange H/D

I. Introduction

Une des limitations de l'approche par DXMS réside dans la résolution spatiale qui est aléatoire. En effet, celle-ci est directement tributaire de la cartographie obtenue après digestion avec les protéases acides. Pour certaines protéines, la couverture obtenue en utilisant uniquement la pepsine peut être faible. Ce peut être le cas notamment de certaines protéines membranaires possédant une partie hydrophobe peu accessible aux protéases, même en milieu acide et en dépit du fait que la pepsine semble cliver préférentiellement les régions hydrophobes (Tang 1963). Cette caractéristique de la pepsine explique par ailleurs les faibles digestions parfois observées sur des régions très basiques.

Il ressort de ce constat la nécessité d'utiliser d'autres protéases afin d'obtenir une meilleure couverture de séquence et ainsi une meilleure résolution spatiale. C'est le travail qui fut initié au Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines de l'IBS en 2003 avec l'identification de deux nouvelles protéases acides utilisables en DXMS : la protéase de type XIII issue d'*Aspergillus saitoi* et la protéase de type XVIII issue de *Rhizopus* (Cravello et al. 2003). Ces deux protéases sont désormais utilisées par d'autres groupes (Alverdi et al. 2008; Zhang et al. 2008) confirmant le besoin de nouveaux outils protéasiques pour obtenir plus d'informations par DXMS. Ainsi, conjointement à mon travail sur la NADPH oxydase, j'ai également évalué de nouveaux outils afin d'élargir la gamme des protéases acides compatibles avec l'approche DXMS et augmenter ainsi la résolution de cette méthode. C'est le but de ce chapitre qui est consacré à l'étude de nouvelles protéases acides issues du parasite *Plasmodium falciparum*, responsable de la malaria chez l'humain. Ce fléau mondial provoque de 1,7 à 2,5 millions de morts par an, ce qui explique le nombre très important d'études réalisées sur ce sujet.

Les plasmepsines sont des protéases aspartiques (tout comme la pepsine) ayant pour substrat principal l'hémoglobine humaine. Leur activité est responsable d'un grand nombre des symptômes du paludisme. On retrouve des plasmepsines dans les cinq espèces de *Plasmodium* infectant les globules rouges humains (*P. falciparum*, *ovale*, *vivax*, *malariae*, *knowlesi*). Celles de *P. falciparum* sont les mieux connues à ce jour puisqu'il s'agit de

l'espèce responsable de la forme la plus grave de la malaria (les autres espèces sont responsables de formes bénignes de la malaria). Dix isoformes sont recensées chez *P. falciparum* : les plasmepsines 1 à 7, 9 et 10 et la protéase HAP. La plasmepsine 2 est l'isoforme la mieux connue: parmi les 23 structures de plasmepsines de la PDB, 16 concernent la plasmepsine 2 de *P. falciparum*. Il existe par ailleurs trois structures de la protéase HAP et deux de la plasmepsine 4.

Les plasmepsines 2 et 4, sous forme non mature, possèdent un propeptide d'environ 120 acides aminés (Figure 96) qui est clivé lors de la phase de maturation, nécessaire à l'activation de ces enzymes (Dame et al. 1994). L'équipe du Pr. Ben Dunn, qui travaille depuis longtemps sur les plasmepsines nous a fourni des stocks glycérol contenant des souches d'*E. coli* capables de surexprimer des formes recombinantes tronquées des plasmepsines 2 et 4 de *P. falciparum* (Hill et al. 1994). Ces formes tronquées (résidus 77-453) possèdent environ la moitié du propeptide (Figure 96).

```

      10      20      30      40      50      60
MDITVREHDF KHGFIKSNST FDGLNIDNSK NKKKIQKGFQ ILYVLLFCSV MCGLFYYVYE
      70      80      90     100     110     120
NVWLQRDNEM NEILKNS77EHL TIGFKVENAH DRILKTKRTH KLKNIKESV NFLNSGLTRK
      130     140     150     160     170     180
NYLGSSNDNI ELVDFQIMIF YGDAEVDNQ QPFTFILL158TG SANLWVPSVK CTTAGCLTRK
      190     200     210     220     230     240
LYDSSKSRTY EKDGTKVEMN YVSGTVSGFF SKDLVTVGNI SLPYKFIEVI DTNGFEPTYT
      250     260     270     280     290     300
ASTFDGILGL GWKDLSIGSV DPIVVELKNQ NKIENALFTF YLPVHDKHTG FLTIGGIEER
      310     320     330     340     350     360
FYEGPLTYEK LNHDLYWQIT LDAHVGNI338ML EKANCIV158SG TSAITVPTDF LNKMLQNLDV
      370     380     390     400     410     420
IKVPFLPFYV TLCMNSKLPT FEFTSENGKY TLEPEYYLQH IEDVGPGLCM LNIIGLDFPV
      430     440     450
PTFILGDPFM RKYFTVFDYD NHSVGLALAK KNL

```

Figure 96. Séquence de la proplasmepsine 2 de Plasmodium falciparum

Le propeptide (1-124) est surligné en gris. Le premier résidu de notre construction (Ser77) est surligné en vert. Les Asp158 et 338 du site actif sont surlignés en bleu.

Nous verrons dans un premier temps comment ces protéines sont extraites à partir de corps d'inclusion exprimés chez *E. coli* (c.f II.1), puis nous reviendrons sur les tests préliminaires d'activité (c.f II.2) nous permettant d'obtenir les résultats publiés dans le *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* (c.f. III) (Marcoux et al. 2009b).

II. Résultats préliminaires

II.1 Expression et purification

Les cultures bactériennes sontensemencées à partir des stocks glycérol. L'induction et la purification des plasmepsines sont réalisées comme indiqué dans la partie Matériel et Méthodes. Celles-ci sont exprimées dans des corps d'inclusion qui sont purifiés par 4 centrifugations successives sur différents gradients de sucrose (Figure 97). Nous obtenons ainsi à partir de trois litres de cultures bactériennes, 830 mg et 770 mg de corps d'inclusion purifiés de plasmepsines 2 et 4, respectivement. Ceux-ci sont repris dans un tampon Tris-EDTA (fraction C4) avant d'être congelés et stockés à -80 °C.

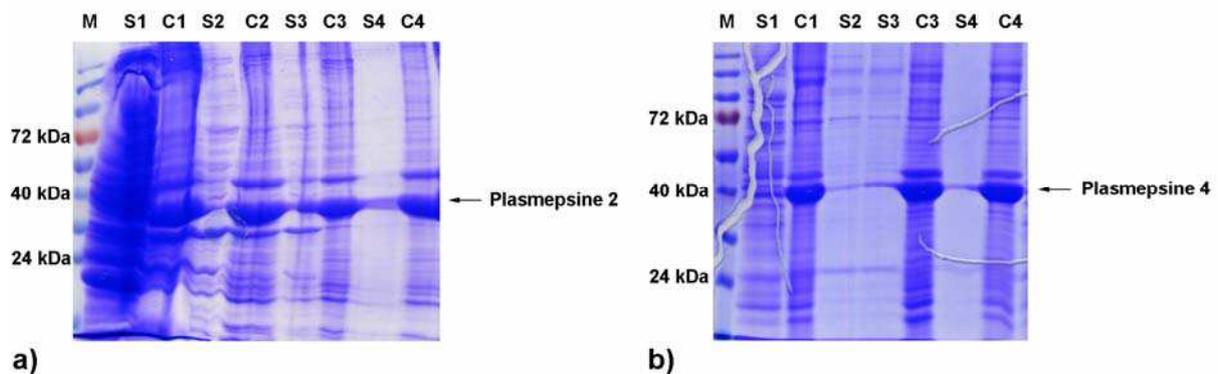
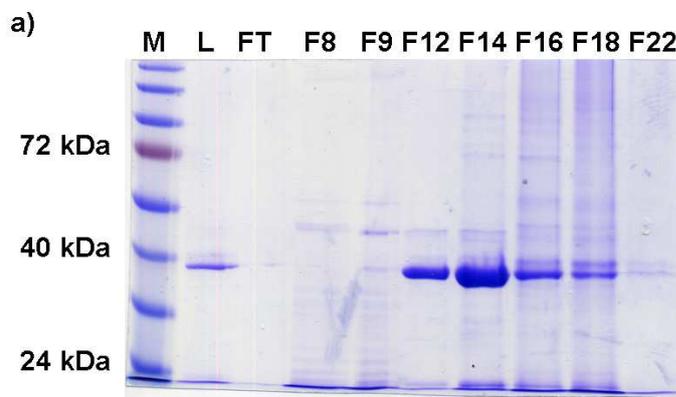
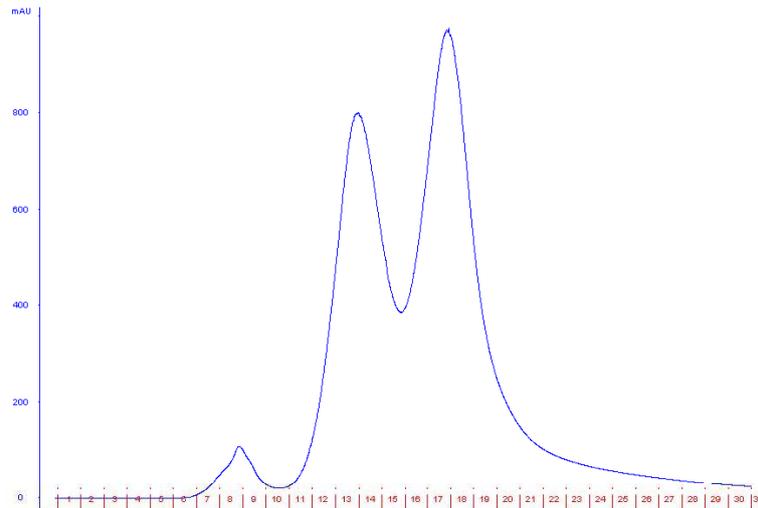


Figure 97. Purification des corps d'inclusion des plasmepsines 2 et 4

Les fractions correspondantes aux surnageants (S) et aux culots (C) des quatre centrifugations successives sur sucrose, lors des purifications de **a)** la plasmepsine 2 et de **b)** la plasmepsine 4 sont déposées sur gels SDS-PAGE à 12 %. M : marqueur de poids moléculaire.

Après trois cycles de dialyse, les plasmepsines correctement repliées sont purifiées par chromatographie d'échange d'ions sur colonne HiTrapTM Q sepharose HP. Nous obtenons trois pics d'élutions pour la plasmepsine 2 (Figure 98) et un seul pour la plasmepsine 4.

Ces différents pics d'élutions sont concentrés et stockés séparément, afin de tester ultérieurement leur activité respective. Nous obtenons ainsi 1 mg, 19,7 mg et 23,1 mg des pools 1 (F7 à F10), 2 (F11 à F15) et 3 (F16 à F20) de plasmepsine 2 ainsi que 31 mg de plasmepsine 4.



b)

Figure 98. Purification de la plasmepsine 2 par chromatographie d'échange d'ions
 a) Chromatogramme d'élution de la plasmepsine 2. Les fractions de 1 ml sont indiquées en rouge. b) Dépôt des fractions d'intérêt sur gel SDS-PAGE à 12 %. M : marqueur de poids moléculaire, L : protéine chargée sur la colonne, FT : perfusat.

II.2 Tests préliminaires d'activité

II.2.A Visualisation de l'activité protéolytique sur gel SDS-PAGE

Les premiers tests d'activité protéolytique des plasmepsines 2 et 4 ont été réalisés sur la protéine $p47^{\text{phox}}\Delta\text{Cter}$, afin de déterminer des conditions permettant une digestion satisfaisante, tout en limitant le phénomène de contre-échange.

Nous observons ainsi sur gel SDS-PAGE l'apparition de fragments protéolytiques issus de la digestion de $p47^{\text{phox}}\Delta\text{Cter}$ par la plasmepsine 2, dès 2 min d'incubation (Figure 99a). Bien que le nombre et l'intensité des bandes augmentent jusqu'à 30 min, nous décidons d'utiliser par la suite un temps de 2 min, afin de limiter le contre-échange. Par ailleurs, la digestion ne semble pas être plus efficace lorsque nous rajoutons d'avantage de protéase. La plasmepsine 2 est donc efficace à pH 2,2, 0 °C, dès 2 min et pour un ratio de 1/1 (w/w).

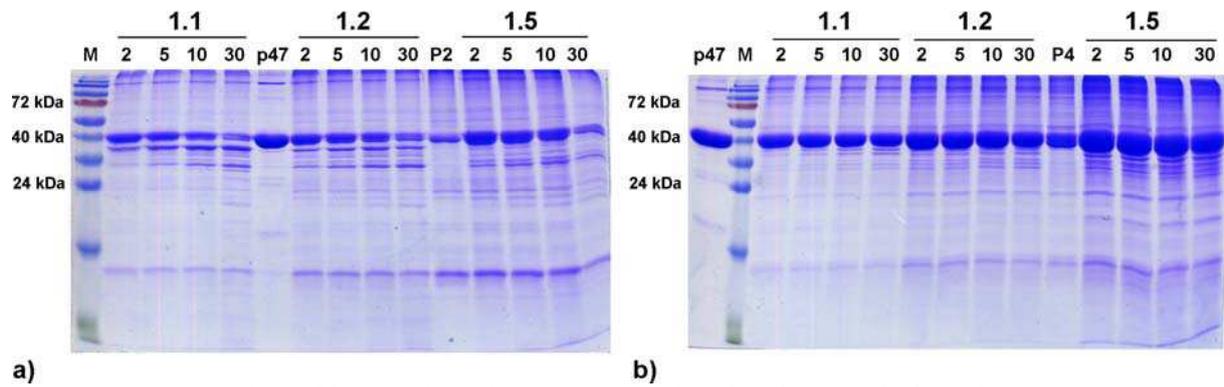


Figure 99. Test d'activité des plasmepsines 2 et 4 sur gel SDS-PAGE

Gels SDS-PAGE à 12 % des digestions à pH 2,2 et 0 °C de p47^{phox}ΔCter par **a)** la plasmepsine 2 et par **b)** la plasmepsine 4. Les différents ratios (w/w) ainsi que les temps de digestion (min) sont indiqués au dessus des puits. Les protéines p47^{phox}ΔCter (p47), ainsi que les plasmepsines 2 (P2) et 4 (P4) sont également déposées sur gel. M : marqueur de poids moléculaire.

Par contre, nous n'observons à ce stade aucune digestion de p47^{phox}ΔCter à la plasmepsine 4 (Figure 99b). Nous allons donc tester la maturation des plasmepsines et tester son effet sur leur activité.

II.2.B Activation des plasmepsines

Les plasmepsines sont connues pour subir une maturation à pH 4,5. Avant d'identifier les sites d'autoprotéolyse par ESI-TOF (c.f. III), nous avons suivi par gel SDS-PAGE les cinétiques de maturation à pH 4,5 des plasmepsines 2 et 4 (Figure 100). La maturation de la plasmepsine 2 est ainsi presque complète au bout de 10 min alors que celle de la plasmepsine 4 est incomplète même après 7h d'incubation à pH 4,5.

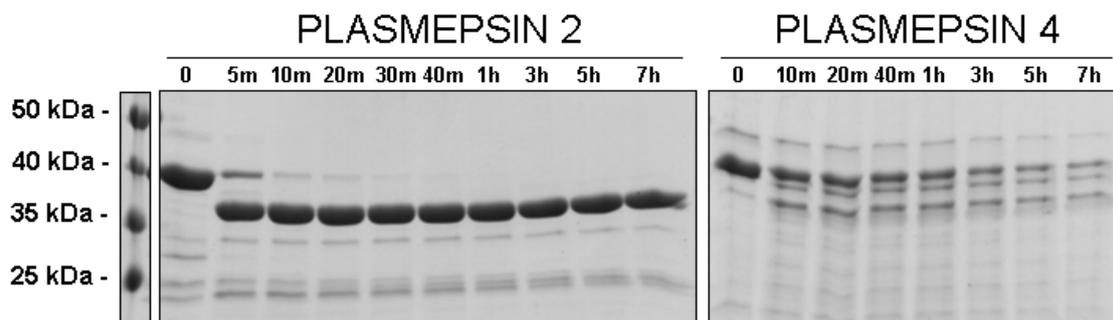


Figure 100. Cinétique de maturation des plasmepsines 2 et 4 dans 10 mM tampon citrate pH 4,5

II.2.C Test de l'activité protéolytique en spectrométrie de masse

Le test d'activité protéolytique par MALDI-TOF MS a l'avantage d'être facile à mettre en place et permet de cribler rapidement un grand nombre de conditions de digestions.

Nous avons ainsi pu comparer l'activité relative des différents « pools » de plasmepsine 2 purifiée (c.f. II.1). Il apparaît que les deux premiers « pools » ont une activité très proche alors que le troisième pic d'élution n'a que très peu ou pas d'activité (Figure 101). Nous décidons donc de rassembler les deux premières fractions et de les utiliser pour la suite des expériences, contrairement au « pool » 3.

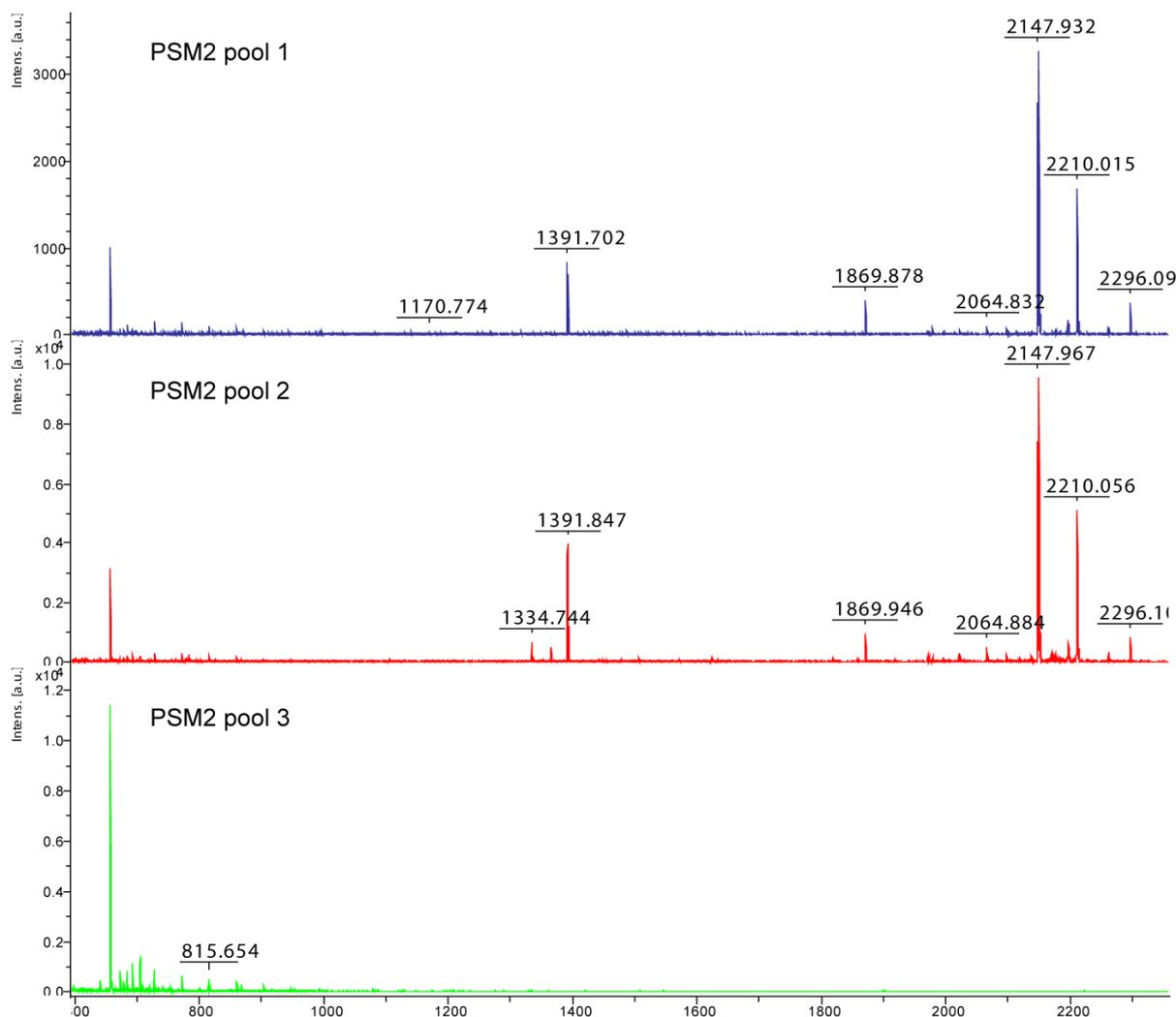


Figure 101. Spectres MALDI-TOF de p47^{phox}ΔCter digérée par différents « pools » de plasmepsine 2 p47^{phox}ΔCter est digérée 2 min à pH 2,5 et 0 °C avec un ratio de 1/1 (w/w)

Nous testons par MALDI-TOF MS différentes conditions de digestion. Il en ressort que la plasmepsine 2 est toujours active à pH 2,2 et 0 °C pour 2 min de digestion et des ratios de 1/1. La plasmepsine 4 est quant à elle très peu active à pH 2,2 et son activité est réduite à 0 °C, ce qui sera confirmé par les expériences d'ESI-Trap MS (c.f. III).

Remarquons à ce titre que si les expériences de MALDI-TOF MS sont reproductibles et donnent une précision en masse relativement bonne pour des petits peptides, celle-ci n'est

pas suffisante pour identifier les peptides générés. Si l'on considère le peptide de masse 2147,97 Da, une recherche sur le logiciel GPMAW avec une précision de 100 ppm, nous trouvons cinq peptides de masse comprise entre 2148,07 et 2148,09 Da, dont deux sont isobares (de masse exactement identique). Il est donc indispensable à ce stade d'utiliser la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) afin d'identifier la nature exacte de ces peptides.

Ces résultats préliminaires ont permis de mettre au point les conditions optimales de maturation des plasmepsines 2 et 4 de *P. falciparum* et d'initier les tests de digestion de p47^{phox}ΔCter. A ce stade il ressort de ces tests d'activité par MALDI-MS et sur gel SDS-PAGE que seule la plasmepsine 2 est active à pH 2,2 et à 0°C, pour un ratio 1/1 (w/w) et dès 2 minutes de digestion. Ces résultats nécessitent néanmoins un test qui permette de mieux caractériser l'activité protéolytique, tel que la cartographie par MS/MS. Cette approche permettra en outre de tester sur différentes protéines un grand nombre de conditions de digestion, dont les résultats ont été publiés récemment dans le *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*.

III. Publication : Étude de nouvelles protéases acides issues de *plasmodium falciparum* pour l'échange H/D couplé à la spectrométrie de masse

Investigating Alternative Acidic Proteases for H/D Exchange Coupled to Mass Spectrometry: Plasmepsin 2 but not Plasmepsin 4 Is Active Under Quenching Conditions

Julien Marcoux,^{a,b} Eric Thierry,^a Corinne Vivès,^b Luca Signor,^a Franck Fieschi,^b and Eric Forest^a

^a Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France

^b Laboratoire des Protéines Membranaires, Université Joseph Fourier, Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble, France

Structural studies of proteins by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry (DXMS) require the use of proteases working at acidic pH and low temperatures. The spatial resolution of this technique can be improved by combining several acidic proteases, each generating a set of different peptides. Three commercial aspartic proteases are used, namely, pepsin, and proteases XIII and XVIII. However, given their low purity, high enzyme/protein ratios have to be used with proteases XIII and XVIII. In the present work, we investigate the activity of two alternative acidic proteases from *Plasmodium falciparum* under different pH and temperature conditions. Peptide mapping of four different proteins after digestion with pepsin, plasmepsin 2 (PSM2), and plasmepsin 4 (PSM4) were compared. PSM4 is inactive at pH 2.2 and 0 °C, making it unusable for DXMS studies. However, PSM2 showed low but reproducible activity under DXMS conditions. It displayed no substrate specificity and, like pepsin, no strict sequence specificity. Altogether, these results show that PSM2 but not PSM4 is a potential new tool for DXMS studies. (J Am Soc Mass Spectrom 2010, 21, 76–79) © 2010 American Society for Mass Spectrometry

DXMS has recently been widely used to improve the structural knowledge of protein complexes that are too large for NMR [1] or too flexible for crystallographic [2] studies, and to obtain complementary information on ligand binding [3] or protein dynamics [4]. One of the main time-consuming steps of this method is the peptide mapping of the protein of interest, after digestion with a nonspecific protease. Acidic proteases are used since their proteolytic activity is maintained under hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (DXMS) experimental conditions, i.e., between pH 2 and 3 and at 0 °C where H/D back-exchange is minimal [5]. To reduce back-exchange, one must also work with proteases able to digest proteins within a few minutes. Recently, new insights in fragmentation techniques, limiting the intramolecular migration of hydrogens, have allowed reaching single-residue resolution. However, so far these techniques have been tested only with synthetic peptides or small proteins such as myoglobin [6]. The combined use of alternative acidic proteases with different specificities is

another way to improve the method's resolution. Our laboratory has developed the use of commercial-type XIII and XVIII fungal proteases [7, 8] that are now routinely used to improve the resolution of DXMS studies [9, 10]. However, the presence of impurities requires high enzyme/protein ratios (10.5:1 (wt/wt) for protease type XIII and 17:1 for protease type XVIII) [7]. Recently, we developed recombinant type XVIII protease with higher purity and activity [11].

In the present study, the use of two alternative recombinant aspartic proteases from the parasite *Plasmodium falciparum*, plasmepsins 2 (EC 3.4.23.39) and 4 (EC 3.4.23.B14), is evaluated with the goal of improving protein mapping and spatial resolution in DXMS experiments. Plasmepsins play an important role in the intra-erythrocytic digestion of hemoglobin responsible for the tropical disease malaria. Structural and enzymatic studies were previously reported [12, 13]. However, very little is known about their sequence and substrate specificities. This study shows for the first time that PSM2 can be used to digest nonerythrocytic proteins. We obtained peptide maps and were thus able to compare plasmepsin activity under DXMS conditions with other proteolytic results (pepsin), not only on their natural substrate (hemoglobin), but also on myoglobin

Address reprint requests to Dr. E. Forest, Institut de Biologie Structurale, Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines, 41 Avenue des Martyrs, 38027 Grenoble, France. E-mail: eric.forest@ibs.fr

and the PX domain of p47^{phox} (p47^{phox}-PX), a cytosolic factor of the neutrophil NADPH oxydase [4].

Experimental

Materials

All proteins were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The reversed-phase C18 column Jupiter (50 × 1.00 mm; 5 μm, 300 Å) was from Phenomenex (Torrance, CA, USA) and the protein MacroTrap C8 was from Michrom Bioresources (Auburn, CA, USA).

Protein Expression and Purification

PSM2 (residues 78–453) and PSM4 (residues 74–448) clones were the kind gifts of Professor Ben M. Dunn (University of Florida). Plasmepsin expression and purification were carried out according to Westling et al. [14]. p47^{phox}-PX was expressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified according to the protocol used for the entire p47^{phox} described in Durand et al. [15].

Protein Digestion and Protease Cleavage

A total of 338 pmol of protein were digested for 2 min at a 1:1 enzyme/protein ratio (wt/wt). Digestions were carried out in 10 mM glycine pH 2.2 or in 50 mM citrate pH 4.5. PSM4 was activated for 40 min in 50 mM citrate pH 4.5.

LC-MS and LC-MS/MS

Before MS analysis, peptides were desalted for 1 min on a MacroTrap column at a 400-μL/min flow rate with a 0.03% TFA water solution. Peptides were then eluted with an 8-min step gradient (0-10-15-20-25-30-35 and 45% of 95% acetonitrile, 0.03% TFA) for peptide mapping, which was performed on a quadrupole ion trap mass spectrometer (ESQUIRE 3000+; Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) equipped with an electrospray ionization source (ESI). For MS/MS experiments, the three most intense ions were fragmented and then excluded after two spectra had been obtained. Data processing was done using Bruker Data Analysis 3.0 software and Mascot server. MS/MS spectra were checked manually and confirmed by accurate mass measurement on an ESI-time-of-flight (TOF) mass spectrometer (6210; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The Agilent software MassHunter and MagTran were used for data processing. Peptide maps were made with scripts available at <http://ms.biomed.cas.cz/MSTools/>.

Results and Discussion

PSM2 and PSM4 are generally studied under physiological conditions (37 °C, pH 4.5). Maturation of the 43-kDa PSM2 precursor into the 38-kDa activated form

was achieved most often at 37 °C or room temperature for 40 min to 2 h and pH 4.5 to pH 5 [16–18]. Maturation of PSM4 was shown to be efficient after 5 min at pH 4.5 and 37 °C [19]. We determined the optimal time for plasmepsin maturation by following their auto-cleavage on ESI-TOF MS (Figure S1 available as supplementary material, which can be found in the electronic version of this article). PSM2 auto-cleavage after F112 was complete after 20 min in 10 mM citrate pH 4.5 (Figure S1 available as supplementary material, which can be found in the electronic version of this article). After 10 min at room temperature in 10 mM citrate pH 4.5, PSM4 was partly cleaved after Phe109 (38,218 Da), Phe110 (38,071 Da), or Phe81 (41,508 Da); however, cleavage was not complete, even after 7 h (data not shown). We finally used a 40-min maturation time for further experiments with PSM4. PSM2 and PSM4 activity on bovine hemoglobin was then tested before and after maturation at pH 4.5, at two different acidic pHs and two different temperatures (Figure 1a). Table S1 (available as supplementary material, which can be found in the electronic version of this article) lists the identified cleavage sites. Reproducibility of the digestion was confirmed by triplicate ESI-TOF MS accurate mass measurement. PSM2 was active in all tested conditions, but at pH 4.5, the number of cleavage sites was lower at 0 °C than at room temperature (13 versus 19 cleavage sites for the nonmature form). PSM2 produced more cleavage sites at pH 4.5 than at pH 2.2 (13 versus 10 cleavage sites, at 0 °C for the nonmature form). Interestingly, PSM2 was less active after maturation (19 versus 12 cleavage sites at room temperature). At pH 2.2, PSM2 activity was surprisingly observed only without maturation (intact plasmepsin was identified at the end of the LC-MS run). Contrary to PSM2, PSM4 was more active after maturation. It was able to digest bovine hemoglobin in different pH and temperature conditions, but its activity was considerably lowered at pH 2.2 (five cleavage sites at room temperature and only one at 0 °C), making it unusable for DXMS. Proteolytic activity was also tested on human hemoglobin with nonmature PSM2 at pH 2.2 and 0 °C. More than 70% of sequence coverage was obtained with 16 identified cleavage sites (Figure 1b). Similar results were obtained with mature PSM4 but at pH 4.5 and room temperature (11 identified cleavage sites). In conclusion, these first experiments using hemoglobin as substrate showed PSM2 as a candidate for DXMS experiments since it was active at pH 2.2 and 0 °C for 2 min of digestion time, at an 1:1 enzyme/protein (wt/wt) ratio, in contrast with PSM4.

To investigate the substrate specificity of PSM2 and PSM4, we tested their activity on nonerythrocytic proteins. Horse myoglobin was chosen because of its structural similarity with hemoglobin and p47^{phox}-PX because of its nonrelated structure. Horse myoglobin and p47^{phox}-PX were digested by pepsin and PSM2 (Figure 2) but not by PSM4, even at pH 4.5 and room

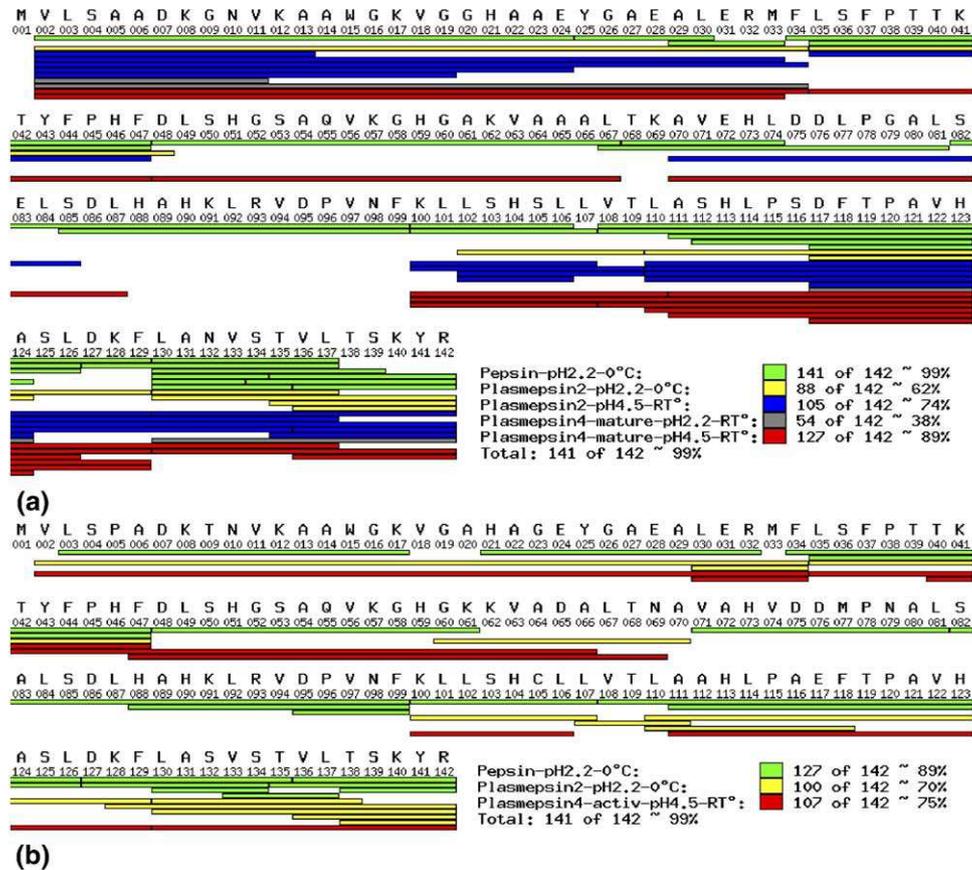


Figure 1. Peptide map of bovine (a) and human (b) hemoglobin α subunit after digestion with pepsin, non-mature PSM2, and mature PSM4. Different pH and temperature conditions and percentages of coverage are indicated in the insets.

temperature. These results confirm the broad substrate specificity of PSM2, which is able to digest proteins not only from erythrocyte cytoskeleton [18], but also from muscle cells and neutrophils. On the contrary, PSM4 seems to be only able to digest its physiologic substrate (human hemoglobin) or species homologues.

A broad-spectrum substrate does not exclude any sequence motif recognition or at least any preference for

certain amino acids. Acidic proteases used for H/D exchange such as pepsin and proteases type XIII and XVIII are not really specific even though pepsin was described to cleave preferentially on the C-terminal end of Met, Phe, and Leu [20]. Protease type XIII was recently shown to favor cleavage after basic amino acids [10]. Specific acidic proteases would considerably reduce the experimental and data analysis time by avoid-

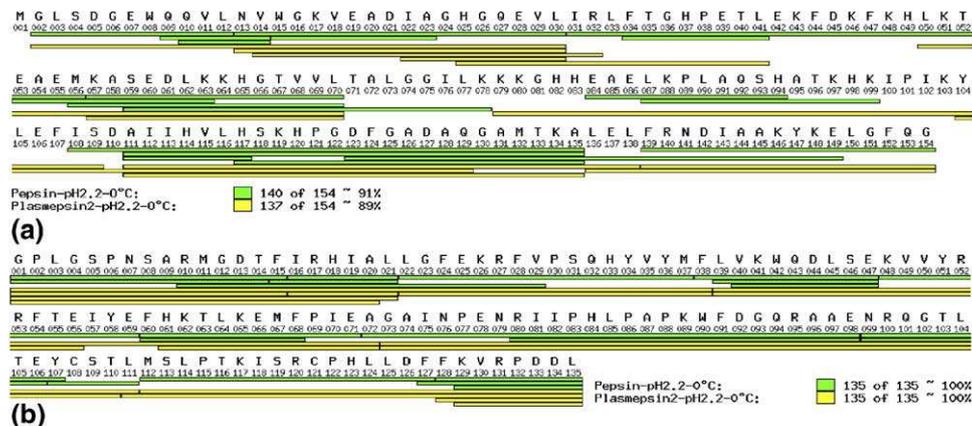


Figure 2. Peptide map of (a) horse myoglobin and (b) p47^{Phox}-PX after digestion with pepsin and PSM2 at pH 2.2 and 0 °C. Percentages of coverage are indicated in the insets.

ing the MS/MS peptide identification step. However, low specificity is generally considered to be an advantage for DXMS experiments because it leads to a large number of peptides [20], which increases the spatial resolution of the analysis. We identified here different cleavage sites on various proteins to evaluate plasmepsin specificity. Digestion of bovine hemoglobin α subunit, at pH 2.2 and 0 °C, with either pepsin or PSM2, generated peptides by cleavage after eight different types of residues. This large number of recognized residues seems to indicate low sequence specificity. The proportions of cleavage sites that are obtained with PSM2 but not with pepsin were 30%, 50%, 47% and 45% for bovine and human hemoglobin, myoglobin, and p47^{phox}-PX, respectively (Figures 1 and 2), showing the complementarities of both enzymes. Finally, the average size of peptides generated by digestion of the four proteins under DXMS conditions was 12 versus 15.5 for pepsin and PSM2, respectively.

Conclusions

Recombinant PSM2 and PSM4 from *Plasmodium falciparum* were studied for the first time as new tools for structural biology studies. PSM2 activity does not seem to be enhanced upon maturation. However, it was still active at pH 2.2 and 0 °C, contrary to PSM4, which therefore cannot be used for DXMS experiments. Moreover, in these conditions, PSM2 was able to digest not only bovine and human hemoglobin (its physiologic substrate), but also horse myoglobin and p47^{phox}-PX, chosen as representatives of nonerythrocytic and structurally different proteins. Despite close sequence specificity of PSM2 with pepsin, both proteases were able to generate unique cleavage sites, thus showing their complementarity. The ability of PSM2 to work under quenching conditions and its low substrate and sequence specificities positions it as a potential novel protease to increase DXMS resolution, even though it was less active than pepsin under quenching conditions. Further studies need to be conducted in this field to develop an increasing number of proteolytic tools for DXMS. Comparison of plasmepsin activity and specificity from different *Plasmodium* species could be interesting, since some of them have been described as more efficient in acidic conditions [19].

Acknowledgments

The authors are grateful to Professor Ben M. Dunn and Melissa Marzahn (University of Florida) for their kind gift of *Plasmodium falciparum* clones expressing PSM2 and PSM4. The authors also thank Daniel Kavan (Institute of Microbiology, Prague) for the development of scripts facilitating data processing and interpretation.

Appendix A. Supplementary Material

Supplementary material associated with this article may be found in the online version at doi:10.1016/j.jasms.2009.09.005.

References

- Suchanova, B.; Tuma, R. Folding and Assembly of Large Macromolecular Complexes Monitored by Hydrogen-Deuterium Exchange and Mass Spectrometry. *Microbiol. Cell Fact.* **2008**, *7*, 12.
- Li, J.; Lim, M. S.; Li, S.; Brock, M.; Pique, M. E.; Woods, V. L. Jr.; Craig, L. Vibrio Cholerae Toxin-Coregulated Pilus Structure Analyzed by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Structure* **2008**, *16*, 137–148.
- Brier, S.; Lemaire, D.; Debonis, S.; Forest, E.; Kozielski, F. Identification of the Protein Binding Region of S-Trityl-L-Cysteine, a New Potent Inhibitor of the Mitotic Kinesin Eg5. *Biochemistry* **2004**, *43*, 13072–13082.
- Marcoux, J.; Man, P.; Castellan, M.; Vives, C.; Forest, E.; Fieschi, F. Conformational Changes in p47(phox) Upon Activation Highlighted by Mass Spectrometry Coupled to Hydrogen/Deuterium Exchange and Limited Proteolysis. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 835–840.
- Bai, Y.; Milne, J. S.; Mayne, L.; Englander, S. W. Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen Exchange. *Proteins* **1993**, *17*, 75–86.
- Pan, J.; Han, J.; Borchers, C. H.; Konermann, L. Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry with Top-Down Electron Capture Dissociation for Characterizing Structural Transitions of a 17 kDa Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12801–12808.
- Cravello, L.; Lascoux, D.; Forest, E. Use of Different Proteases Working in Acidic Conditions to Improve Sequence Coverage and Resolution in Hydrogen/Deuterium Exchange of Large Proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 2387–2393.
- Man, P.; Montagner, C.; Vernier, G.; Dublet, B.; Chenal, A.; Forest, E.; Forge, V. Defining the Interacting Regions Between Apomyoglobin and Lipid Membrane by Hydrogen/Deuterium Exchange Coupled to Mass Spectrometry. *J. Mol. Biol.* **2007**, *368*, 464–472.
- Alverdi, V.; Mazon, H.; Versluis, C.; Hemrika, W.; Esposito, G.; van den Heuvel, R.; Scholten, A.; Heck, A. J. cGMP-Binding Prepares PKG for Substrate Binding by Disclosing the C-Terminal Domain. *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 1380–1393.
- Zhang, H. M.; Kazacic, S.; Schaub, T. M.; Tipton, J. D.; Emmett, M. R.; Marshall, A. G. Enhanced Digestion Efficiency, Peptide Ionization efficiency, and Sequence Resolution for Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9034–9041.
- Rey, M.; Man, P.; Brandolin, G.; Forest, E.; Pelosi, L. Recombinant Immobilized Rhizopus Pepsin as a New Tool for Protein Digestion in H/D Exchange Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 3431–3438.
- Madabushi, A.; Chakraborty, S.; Fisher, S. Z.; Clemente, J. C.; Yowell, C.; Agbandje-McKenna, M.; Dame, J. B.; Dunn, B. M.; McKenna, R. Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of the Aspartic Protease Plasmeprin 4 from the Malarial Parasite *Plasmodium malariae*. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2005**, *61*, 228–231.
- Silva, A. M.; Lee, A. Y.; Gulnik, S. V.; Maier, P.; Collins, J.; Bhat, T. N.; Collins, P. J.; Cachau, R. E.; Luker, K. E.; Gluzman, I. Y.; Francis, S. E.; Oksman, A.; Goldberg, D. E.; Erickson, J. W. Structure and Inhibition of Plasmeprin II, a Hemoglobin-Degrading Enzyme from *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 10034–10039.
- Westling, J.; Cipullo, P.; Hung, S. H.; Saft, H.; Dame, J. B.; Dunn, B. M. Active Site Specificity of Plasmeprin II. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2001–2009.
- Durand, D.; Cannella, D.; Dubosclard, V.; Pebay-Peyroula, E.; Vachette, P.; Fieschi, F. Small-Angle X-ray Scattering Reveals an Extended Organization for the Autoinhibitory Resting State of the p47(phox) Modular Protein. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7185–7193.
- Hill, J.; Tyas, L.; Phylip, L. H.; Kay, J.; Dunn, B. M.; Berry, C. High Level Expression and Characterization of Plasmeprin II, an Aspartic Proteinase from *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett.* **1994**, *352*, 155–158.
- Kim, Y. M.; Lee, M. H.; Piao, T. G.; Lee, J. W.; Kim, J. H.; Lee, S.; Choi, K. M.; Jiang, J. H.; Kim, T. U.; Park, H. Prodomain Processing of Recombinant Plasmeprin II and IV, the Aspartic Proteases of *Plasmodium falciparum*, is auto- and trans-catalytic. *J. Biochem.* **2006**, *139*, 189–195.
- Le Bonniec, S.; Deregnacourt, C.; Redeker, V.; Banerjee, R.; Grellier, P.; Goldberg, D. E.; Schrevel, J. Plasmeprin II, an Acidic Hemoglobinase from the *Plasmodium falciparum* food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 14218–14223.
- Li, T.; Yowell, C. A.; Beyer, B. B.; Hung, S. H.; Westling, J.; Lam, M. T.; Dunn, B. M.; Dame, J. B. Recombinant Expression and Enzymatic Subsite Characterization of Plasmeprin 4 from the four Plasmodium Species Infecting Man. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *135*, 101–109.
- Smith, D. L.; Deng, Y.; Zhang, Z. Probing the Noncovalent Structure of Proteins by Amide Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 135–146.

Supplementary Data

	PEPSIN	PLASMEPSIN 2						PLASMEPSIN 4					
	pH 2.2	pH 2.2		pH 4.5				pH 2.2		pH 4.5			
	0°C	0°C	RT	0°C		RT		0°C	RT	0°C		RT	
		N	N	N	M	N	M	M	M	N	M	N	M
L3											√		
N10					√								
V11				√					√				
K12							√						
A13				√		√							
A14				√									
G19				√		√	√						
E24	√					√					√		
E28	√												
A29			√										
L30	√												
M33	√			√		√							√
F34	√	√	√	√	√	√	√		√	√	√	√	√
F47	√					√					√	√	√
D48		√											
A66	√												
L67	√												√
T68										√		√	
K69						√						√	√
L74	√												
L81	√												
L84	√												
S85						√						√	
L87													√
R93										√		√	
F99	√			√		√	√				√	√	√
K101		√	√		√	√	√						
L106	√		√		√	√							
L107	√			√		√					√		√
T109		√	√		√	√	√						√
L110	√		√								√	√	√
S116	√	√	√	√	√	√	√		√			√	√
A124	√	√	√	√	√	√	√		√			√	√
L126	√												√
F129	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
V133	√												
S134	√	√	√		√	√	√						
T135	√	√	√	√		√	√						√
L137	√	√	√	√		√	√						√
S139	√												
# sites	24	10	12	13	9	19	12	1	5	4	8	11	16
# peptides	26	9	11	14	7	19	12	1	4	3	7	8	15

Table S1. Cleavage sites obtained after digestion of bovine hemoglobin alpha subunit by pepsin, PSM2 and PSM4 in different pH and temperature conditions. Check marks indicate cleavage sites on the C-terminal end of the corresponding amino acids. Cleavage sites specific only to plasmepsins are represented in light grey and specific pepsin cleavage sites are represented in dark grey. M: mature, N: nonmature.

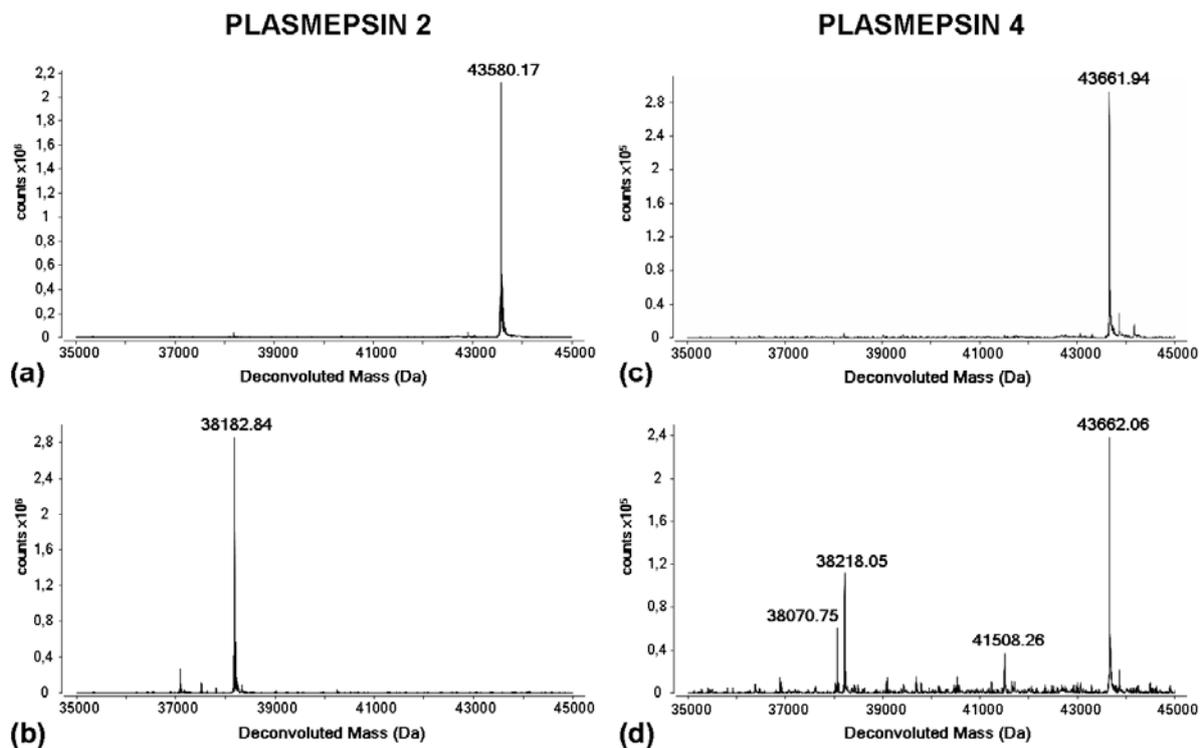


Figure S1. Deconvoluted ESI-TOF mass spectra of PSM2 before (a) and after (b) 20 min of maturation, and PSM4 before (c) and after (d) 40 min of maturation

IV. Conclusion

Le bilan de cette étude méthodologique est contrasté. Nous avons tout d'abord montré que la plasmepsine 4 n'était pas intéressante dans le cadre d'études de DXMS puisqu'elle n'était pas active à pH acide et à 0 °C. De plus, dans les conditions optimales de digestion (température ambiante et pH 4,5), la plasmepsine 4 ne semble pas capable de digérer d'autres protéines que son substrat physiologique, à savoir l'hémoglobine. Nous avons confirmé lors de cette étude que la maturation de la plasmepsine 4 augmentait considérablement son activité protéolytique sur l'hémoglobine humaine ou bovine.

Les résultats sur la plasmepsine 2 se sont avérés beaucoup plus encourageants. Nous avons montré tout d'abord que cette protéase était encore capable de digérer les hémoglobines humaine et bovine à pH acide et à 0 °C, même si son activité est optimale à pH 4,5 et à température ambiante.

L'activité de la plasmepsine 2 est certes plus faible que celle de la pepsine, dans des conditions similaires de digestion. Cependant, la taille des peptides générés par ces deux protéases est similaire et celles-ci ne reconnaissent pas tout à fait les mêmes résidus. En effet, nous avons pu identifier environ la moitié de sites de coupure communs, l'autre moitié étant spécifique de chacune des deux protéases. Ceci témoigne donc de la complémentarité de ces deux enzymes.

Par ailleurs, la plasmepsine 2 semble avoir une spécificité de substrat assez faible puisqu'elle est capable de digérer d'autres protéines non érythrocytaires, telles que la myoglobine de cheval et le domaine PX de p47^{phox}.

Enfin, la plasmepsine 2, tout comme la pepsine, ne semble pas avoir de réelle spécificité de séquence. Cette dernière caractéristique induit le fait que le séquençage par MS/MS sera toujours nécessaire avec la plasmepsine 2. D'un autre côté, cette absence de spécificité de séquence assure d'obtenir un grand nombre de peptides, puisque la protéase est capable de cliver à l'extrémité Cter de huit résidus différents, tout comme la pepsine.

Nous avons ainsi montré que la plasmepsine 2 était un outil enzymatique prometteur dans l'amélioration des expériences de DXMS. Il serait donc intéressant d'étudier d'autres protéases acides, et notamment les plasmepsines 4 issues de *Plasmodium ovale* et de *Plasmodium malariae* qui semblent plus actives à pH acide que celle de *Plasmodium falciparum* (Li et al. 2004).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le travail réalisé lors de cette thèse peut être divisé en trois grands axes ayant pour facteur commun l'étude du mécanisme moléculaire d'activation de p47^{phox}, facteur cytosolique de la NADPH oxydase des neutrophiles.

Ces trois parties ont nécessité la mise au point d'un grand nombre de tests et l'utilisation de diverses technologies disponibles à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. Cette optimisation des protocoles a permis l'utilisation complémentaire de méthodes d'investigations structurales et fonctionnelles à la fois précises et reproductibles.

L'étude d'un inhibiteur potentiel de p47^{phox} issu d'une plante médicinale chinoise (*Tripterygium wilfordii*) a ainsi bénéficié de tout ce travail réalisé en amont. Des tests spécifiques à cette partie de la thèse ont par ailleurs été développés, tels que les études d'interaction non covalentes par SM native. Les résultats obtenus pour le celastrol se sont cependant avérés décevants puisque l'interaction avec p47^{phox} n'a pu être démontrée de manière spécifique à ce jour. Le « quench » de fluorescence des tryptophanes de p47^{phox} ainsi que la présence d'adduits correspondants à un complexe p47^{phox}-celastrol vont dans le sens d'une interaction. Cependant, le fait que le celastrol puisse également se fixer à l'apomyoglobine et l'absence de résultats convaincants en ITC et SPR peuvent laisser penser que si cette interaction existe, elle est peu spécifique ou de faible affinité.

Une seconde partie du travail, plus méthodologique, a consisté en l'étude de nouveaux outils protéolytiques dans le but d'améliorer la méthodologie d'échange hydrogène/deutérium couplé à la SM. Cette étude répond à une demande réelle de protéases fonctionnant à pH acide et à 0°C, de la part de la communauté utilisant le DXMS. Elle s'est articulée dans la logique du LSMP qui contribue depuis 2003 à l'étude et à l'utilisation de ces protéases acides. Les résultats, faisant l'objet d'un article dans le *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* (Marcoux et al. 2009b), ont démontré que la plasmepsine 2, contrairement à la plasmepsine 4 était capable de digérer un grand nombre de protéines à pH 2,2 et 0°C. Cette étude est par ailleurs la première à notre connaissance faisant état de la digestion par ces protéases de protéines non érythrocytaires dont p47^{phox}.

Enfin, l'étude du mécanisme d'activation de p47^{phox} a permis de confirmer pour la première fois l'existence de changements conformationnels de ce facteur cytosolique lors de sa phosphorylation. Nous avons ainsi pu valider et approfondir le modèle proposé au début de ce travail.

Lors d'une première étape, nous avons validé les outils protéiques employés, à savoir les formes sauvage et triple mutante S303/304/328E de p47^{phox}ΔCter qui représentent les états auto-inhibé et activé, respectivement. Pour ce faire, nous avons adapté des tests fonctionnels permettant de mettre en évidence les éventuelles interactions avec la partie C-terminale de p22^{phox} d'une part, et des phospholipides spécifiques du domaine PX de p47^{phox}, d'autre part. Dans les deux cas, la forme triple mutante de p47^{phox} s'est révélée être un meilleur partenaire d'interaction. Il semble logique de traduire ces meilleures interactions par une plus grande disponibilité des sites d'interactions et donc par une plus grande accessibilité de la forme activée.

C'est ce que nous avons voulu vérifier dans un premier temps à l'aide des cinétiques globales de deutération. L'incorporation de deutérium, plus rapide chez le triple mutant nous a permis de confirmer que la forme active bénéficiait d'une conformation plus « ouverte » que la forme sauvage.

Afin d'approfondir ces résultats, l'accessibilité de ces deux constructions à des protéases spécifiques a été testée. Là encore, un comportement différent traduisant deux états conformationnels distincts a pu être détecté. En effet, dans des conditions de protéolyse ménagée à la trypsine, la région AIR de p47^{phox} est digérée uniquement dans la forme activée. Nous interprétons ceci comme un relargage de cette région auto-inhibitrice lors de l'activation de p47^{phox}. Cette première partie de l'étude du mécanisme d'activation a été publiée dans le journal *Febs Letters* (Marcoux et al. 2009a).

Le modèle d'inhibition du site d'interaction avec p22^{phox} par l'AIR, proposé dès 2003 par Groemping et al. (Groemping et al. 2003) est ainsi confirmé, pour la première fois d'un point de vue structural sur une forme entière de p47^{phox}. Cependant, les questions restées en suspens sont de savoir comment le domaine PX, site de reconnaissance des lipides, est inhibé chez la protéine sauvage et comment se fait le couplage entre les relargages de l'AIR et du PX. Les expériences de cinétiques locales de DXMS les formes sauvage et triple mutante de p47^{phox}ΔCter ont apporté des réponses à ces questionnements. D'une part, nous mettons en évidence le démasquage des boucles Src du tandem SH3s qui sont connues pour reconnaître la région riche en prolines de p22^{phox}. Les données de protéolyse ménagées sont ainsi complétées, en montrant que le relargage de l'AIR s'accompagne d'une meilleure exposition du site d'interaction avec p22^{phox}. D'autre part, d'autres peptides qui sont démasqués lors de l'activation de p47^{phox} sont identifiés. En regardant la structure du tandem SH3s, nous remarquons que tous ces peptides, qui appartiennent au module SH3A, forment une surface latérale. En plaçant les structures cristallographiques des modules isolés (domaine PX et

tandem SH3s inhibé par l’AIR) dans les diverses enveloppes SAXS de p47^{phox} (Durand et al. 2006), nous remarquons que cette surface latérale est disposée idéalement pour interagir avec le domaine PX. L’exposition de cette surface, couplée à l’exaltation de l’interaction avec les lipides suggère que cette région est responsable du masquage du site d’interaction du domaine PX avec les phospholipides spécifiques de la membrane. A ce stade, la surface complémentaire, probablement localisée dans le PX ou dans le « linker » le séparant du tandem SH3s, n’a pas pu être identifiée.

Pour confirmer le rôle de cette surface dans l’interaction avec le domaine PX, des résidus susceptibles d’intervenir dans cette interaction ont été mutés. Les résidus R162, D166, Q197, K199, R202 exposés à la surface du module SH3A ont ainsi été sélectionnés. Aucune des mutations réalisées n’a augmenté l’interaction avec la partie Cter de p22^{phox}. Cependant, le double mutant R162A/D166A montre une interaction beaucoup plus importante que la forme sauvage avec les liposomes enrichis en phospholipides spécifiques. Une conformation intermédiaire est ainsi isolée, dans laquelle le tandem SH3s est inhibé par l’AIR comme dans la forme sauvage, mais le domaine PX est capable d’interagir avec la membrane, comme dans la forme activée (Figure 102). Cette conformation intermédiaire a été confirmée par une étude de cinétique globale de DXMS. Il est donc possible d’affirmer à ce stade que les résidus R162 et D166 du module SH3A sont impliqués dans une interaction responsable du masquage du site de reconnaissance des lipides du domaine PX.

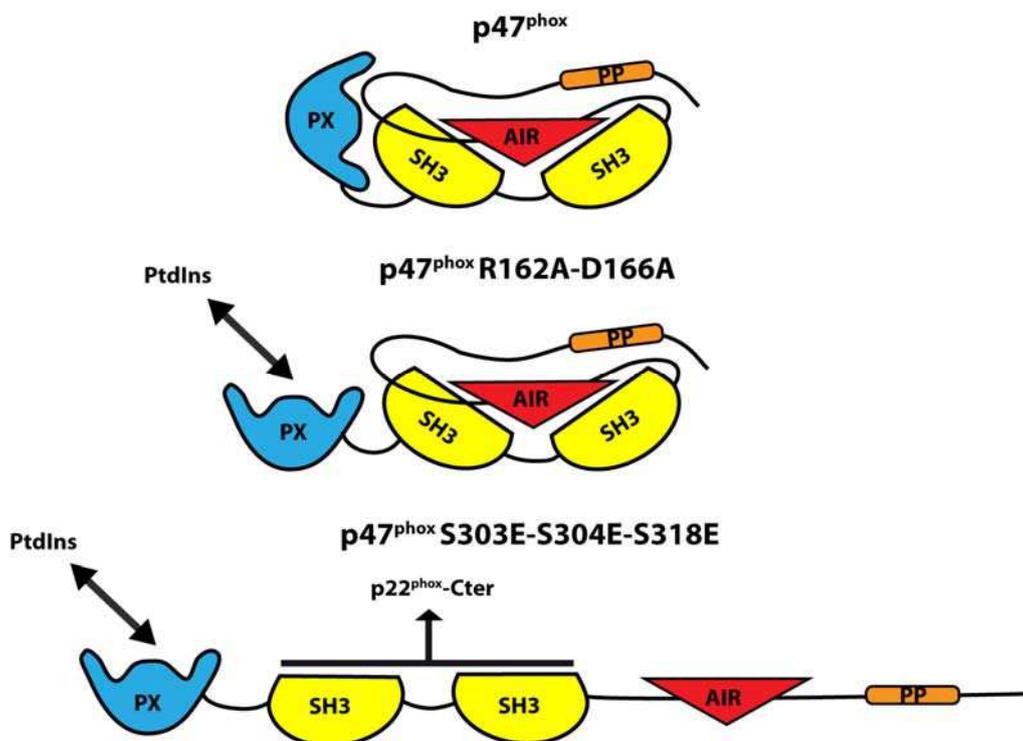


Figure 102. Représentation schématique de l'état conformationnel de p47^{phox} et des mutants R162A/D166A et S303E/S304E/S318E

En analysant la structure cristallographique du tandem SH3s autoinhibé, on se rend compte que ces deux résidus du module SH3A sont en réalité très probablement impliqués dans un réseau d'interactions couplant l'AIR et le PX. Ils pourraient donc avoir un rôle de senseur du relargage de l'AIR lors de la phosphorylation des sérines. Leur déstabilisation due à ce relargage pourrait ensuite entraîner l'ouverture du PX. Cette hypothèse permettrait d'expliquer comment l'information de l'activation est transmise d'un bout à l'autre de la molécule, via ces deux résidus.

Dès lors, pourquoi la mutation des résidus R162 et D166 n'entraîne pas le relargage de l'AIR comme dans le cas de la mutation W263R dans le SH3B (Karathanassis et al. 2002) ? L'interaction entre l'AIR et le tandem SH3s est très bien décrite et il ne fait aucun doute que les interactions impliquant ces deux résidus sont négligeables par rapport à l'ensemble des interactions polaires et hydrophobes du segment R₂₉₃GAPPRRSS₃₀₄ en amont de l'AIR qui interagit simultanément avec les deux modules SH3s (Groemping et al. 2003) (Figure 103). Par contre, il ne semble pas aberrant de penser que la rupture de ces deux interactions soit suffisante pour modifier la surface latérale du domaine SH3A et son affinité pour le PX.

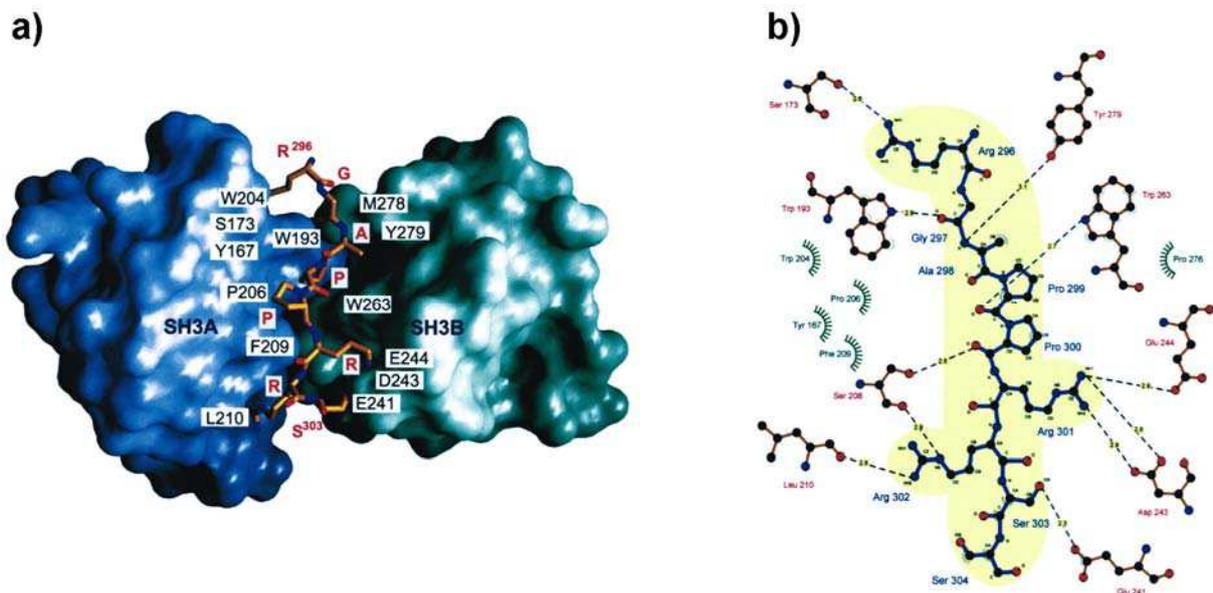


Figure 103. Interaction entre le tandem SH3s et l'AIR

a) Structure du tandem SH3s autoinhibé par la séquence R₂₉₆GAPPRRSS₃₀₃ de l'AIR. **b)** Réseau d'interactions polaires (noir) et hydrophobes (vert et bleu) entre le tandem SH3s et la séquence R₂₉₆GAPPRRSS₃₀₄ de l'AIR. (Groemping et al. 2003).

Remarquons pour terminer que, s'il nous a permis de déchiffrer le mécanisme d'activation, l'état conformationnel « semi-activé » de p47^{phox} représenté Figure 102 n'a vraisemblablement rien de physiologique. En effet, suite à la transduction du signal depuis l'espace extracellulaire vers le cytoplasme et la phosphorylation des sérines par les diverses kinases, la première étape dans le changement conformationnel de p47^{phox} consiste au

relargage de l'AIR. Si un état conformationel « semi-activé » de p47^{phox} existait, ne serait-ce qu'une milliseconde, cet état aurait les propriétés d'interaction opposées de celles du mutant R162A/D166A, à savoir une interaction forte avec p22^{phox} (tandem SH3s accessible) et faible avec les lipides (PX encore masqué) (Figure 86 c.f. RESULTATS Chapitre 2). On peut ainsi imaginer que, suite à la rupture des interactions, via les résidus R162 et D166, entre le module SH3A et la partie C-ter de l'AIR, le module SH3A perd de l'affinité pour le domaine PX qui se détache, rendant ses sites de reconnaissance des phospholipides accessibles et permettant la fixation de p47^{phox} à la membrane.

La prochaine étape de ce travail est désormais une étude de mutagenèse dirigée dans cette boucle de l'AIR. Le but serait de trouver des mutations dans l'AIR qui permettent de relarger le domaine PX via cette région relais du module SH3A que nous venons de découvrir. Dans ce cadre, l'étude du mutant p47^{phox}R162A/R306A-ΔCter sera particulièrement intéressante. Si ses propriétés d'interactions sont identiques à celles du mutant p47^{phox}R162A/D166A-ΔCter, alors :

- l'hypothèse de l'artefact cristallographique serait vérifiée (c.f. RESULTATS Chapitre 2)
- le rôle des résidus R162 et D166 dans la stabilisation de l'AIR et surtout du domaine PX serait confirmé
- le mécanisme de transmission de l'information d'activation serait élucidé

L'approche par pontage covalent avec l'EDC couplée à la SM, évoquée plus haut (c.f. RESULTATS Chapitre 2), permettrait également de confirmer cette hypothèse et sera très prochainement abordée.

Pour une complète description du fonctionnement de ce système, il restera dans l'avenir à déterminer quelle surface, et plus particulièrement quels résidus du PX sont impliqués dans cette interaction avec la surface d'auto-inhibition découverte par DXMS.

REFERENCES

- Abo A and Pick E (1991) "Purification and characterization of a third cytosolic component of the superoxide-generating NADPH oxidase of macrophages" *J Biol Chem* 266(35): 23577-85.
- Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG and Segal AW (1991) "Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1" *Nature* 353(6345): 668-70.
- Abo A, Webb MR, Grogan A and Segal AW (1994) "Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane" *Biochem J* 298 Pt 3: 585-91.
- Ago T, Kitazono T, Kuroda J, Kumai Y, Kamouchi M, Ooboshi H, Wakisaka M, Kawahara T, Rokutan K, Ibayashi S and Iida M (2005) "NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells" *Stroke* 36(5): 1040-6.
- 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(8): 4474-9.
- 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(47): 33644-53.
- Ago T, Takeya R, Hiroaki H, Kuribayashi F, Ito T, Kohda D and Sumimoto H (2001) "The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module" *Biochem Biophys Res Commun* 287(3): 733-8.
- Agostinelli E and Seiler N (2006) "Non-irradiation-derived reactive oxygen species (ROS) and cancer: therapeutic implications" *Amino Acids* 31(3): 341-55.
- Agwu DE, McPhail LC, Sozzani S, Bass DA and McCall CE (1991) "Phosphatidic acid as a second messenger in human polymorphonuclear leukocytes. Effects on activation of NADPH oxidase" *J Clin Invest* 88(2): 531-9.
- Alloul N, Gorzalczyk Y, Itan M, Sigal N and Pick E (2001) "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* 40(48): 14557-66.
- Alverdi V, Mazon H, Versluis C, Hemrika W, Esposito G, van den Heuvel R, Scholten A and Heck AJ (2008) "cGMP-binding prepares PKG for substrate binding by disclosing the C-terminal domain" *J Mol Biol* 375(5): 1380-93.
- 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 (2000) "Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation" *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4654-9.
- 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 (2005) "Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity" *J Biol Chem* 280(34): 30046-54.
- Ando S, Kaibuchi K, Sasaki T, Hiraoka K, Nishiyama T, Mizuno T, Asada M, Nunoi H, Matsuda I, Matsuura Y and et al. (1992) "Post-translational processing of rac p21s is important both for their interaction with the GDP/GTP exchange proteins and for their activation of NADPH oxidase" *J Biol Chem* 267(36): 25709-13.
- Arbiser JL, Petros J, Klafter R, Govindajaran B, McLaughlin ER, Brown LF, Cohen C, Moses M, Kilroy S, Arnold RS and Lambeth JD (2002) "Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch" *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2): 715-20.

- Arnold RS, Shi J, Murad E, Whalen AM, Sun CQ, Polavarapu R, Parthasarathy S, Petros JA and Lambeth JD (2001) "Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1" *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10): 5550-5.
- Azad MB, Chen Y and Gibson SB (2008) "Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment" *Antioxid Redox Signal*.
- Babior BM (1978a) "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts)" *N Engl J Med* 298(12): 659-68.
- Babior BM (1978b) "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (second of two parts)" *N Engl J Med* 298(13): 721-5.
- Bai Y, Milne JS, Mayne L and Englander SW (1993) "Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange" *Proteins* 17(1): 75-86.
- Bakri FG, Martel C, Khuri-Bulos N, Mahafzah A, El-Khateeb MS, Al-Wahadneh AM, Hayajneh WA, Hamamy HA, Maquet E, Molin M and Stasia MJ (2009) "First report of clinical, functional, and molecular investigation of chronic granulomatous disease in nine Jordanian families" *J Clin Immunol* 29(2): 215-30.
- Banfi B, Clark RA, Steger K and Krause KH (2003) "Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1" *J Biol Chem* 278(6): 3510-3.
- Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M and Krause KH (2004a) "NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear" *J Biol Chem* 279(44): 46065-72.
- Banfi B, Maturana A, Jaconi S, Arnaudeau S, Laforge T, Sinha B, Ligeti E, Demaurex N and Krause KH (2000) "A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1" *Science* 287(5450): 138-42.
- Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaurex N and Krause KH (2001) "A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes" *J Biol Chem* 276(40): 37594-601.
- Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnar GZ, Krause KH and Cox JA (2004b) "Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5)" *J Biol Chem* 279(18): 18583-91.
- Baniulis D, Burritt JB, Taylor RM, Dinauer MC, Heyworth PG, Parkos CA, Magnusson KE and Jesaitis AJ (2005a) "Monoclonal antibody CL5 recognizes the amino terminal domain of human phagocyte flavocytochrome b558 large subunit, gp91phox" *Eur J Haematol* 74(4): 337-47.
- Baniulis D, Nakano Y, Nauseef WM, Banfi B, Cheng G, Lambeth DJ, Burritt JB, Taylor RM and Jesaitis AJ (2005b) "Evaluation of two anti-gp91phox antibodies as immunoprobes for Nox family proteins: mAb 54.1 recognizes recombinant full-length Nox2, Nox3 and the C-terminal domains of Nox1-4 and cross-reacts with GRP 58" *Biochim Biophys Acta* 1752(2): 186-96.
- Baniulis D, Nauseef WM, Burritt JB, Taylor RM, Heyworth PG, Dinauer MC, Bumelis VA, Magnusson KE and Jesaitis AJ (2005c) "Unusual polyclonal anti-gp91 peptide antibody interactions with X-linked chronic granulomatous disease-derived human neutrophils are not from compensatory expression of Nox proteins 1, 3, or 4" *Eur J Haematol* 74(3): 241-9.
- Bantscheff M, Weiss V and Glocker MO (1999) "Identification of linker regions and domain borders of the transcription activator protein NtrC from *Escherichia coli* by limited proteolysis, in-gel digestion, and mass spectrometry" *Biochemistry* 38(34): 11012-20.
- Beavis RC and Chait BT (1989) "Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins" *Rapid Commun Mass Spectrom* 3(12): 432-5.

- Beavis RC, Chaudhary T and Chait BT (1992) "alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix assisted laser desorption mass spectrometry" *Org. Mass Spetrom.* 27(156-158).
- Bedard K and Krause KH (2007) "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology" *Physiol Rev* 87(1): 245-313.
- Behrens MM, Ali SS, Dao DN, Lucero J, Shekhtman G, Quick KL and Dugan LL (2007) "Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase" *Science* 318(5856): 1645-7.
- Belov ME, Gorshkov MV, Udseth HR, Anderson GA and Smith RD (2000) "Zeptomole-sensitivity electrospray ionization--Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of proteins" *Anal Chem* 72(10): 2271-9.
- Bengtsson SH, Gulluyan LM, Dusting GJ and Drummond GR (2003) "Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology" *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(11): 849-54.
- Benjamin DR, Robinson CV, Hendrick JP, Hartl FU and Dobson CM (1998) "Mass spectrometry of ribosomes and ribosomal subunits" *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7391-5.
- Benna JE, Dang PM, Gaudry M, Fay M, Morel F, Hakim J and Gougerot-Pocidal MA (1997) "Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways" *J Biol Chem* 272(27): 17204-8.
- Berendes H, Bridges RA and Good RA (1957) "A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome" *Minn Med* 40(5): 309-12.
- Berthier S, Pacllet MH, Lerouge S, Roux F, Vergnaud S, Coleman AW and Morel F (2003) "Changing the conformation state of cytochrome b558 initiates NADPH oxidase activation: MRP8/MRP14 regulation" *J Biol Chem* 278(28): 25499-508.
- Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM and Dinauer MC (2001) "Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox)" *J Biol Chem* 276(33): 31105-12.
- Bich C, Scott M, Panagiotidis A, Wenzel RJ, Nazabal A and Zenobi R (2008) "Characterization of antibody-antigen interactions: comparison between surface plasmon resonance measurements and high-mass matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry" *Anal Biochem* 375(1): 35-45.
- Bissonnette SA, Glazier CM, Stewart MQ, Brown GE, Ellson CD and Yaffe MB (2008) "Phosphatidylinositol 3-phosphate-dependent and -independent functions of p40phox in activation of the neutrophil NADPH oxidase" *J Biol Chem* 283(4): 2108-19.
- Bjorkman U and Ekholm R (1984) "Generation of H₂O₂ in isolated porcine thyroid follicles" *Endocrinology* 115(1): 392-8.
- Blander JM (2007) "Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence" *Cell Microbiol* 9(2): 290-9.
- Block K, Gorin Y and Abboud HE (2009) "Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes" *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34): 14385-90.
- Bogan MJ, Agnes GR, Pio F and Cornell RB (2005) "Interdomain and membrane interactions of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase revealed via limited proteolysis and mass spectrometry" *J Biol Chem* 280(20): 19613-24.
- Bohon J, Jennings LD, Phillips CM, Licht S and Chance MR (2008) "Synchrotron protein footprinting supports substrate translocation by ClpA via ATP-induced movements of the D2 loop" *Structure* 16(8): 1157-65.
- Bokoch GM, Bohl BP and Chuang TH (1994) "Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins" *J Biol Chem* 269(50): 31674-9.

- Bothner B, Dong XF, Bibbs L, Johnson JE and Siuzdak G (1998) "Evidence of viral capsid dynamics using limited proteolysis and mass spectrometry" *J Biol Chem* 273(2): 673-6.
- Botteaux A, Hoste C, Dumont JE, Van Sande J and Allaoui A (2009) "Potential role of Noxes in the protection of mucosae: H₂O₂ as a bacterial repellent" *Microbes Infect* 11(5): 537-44.
- Bouin AP, Grandvaux N, Vignais PV and Fuchs A (1998) "p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process" *J Biol Chem* 273(46): 30097-103.
- Bouzidi F and Doussiere J (2004) "Binding of arachidonic acid to myeloid-related proteins (S100A8/A9) enhances phagocytic NADPH oxidase activation" *Biochem Biophys Res Commun* 325(3): 1060-5.
- Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P and Kroemer G (2005) "Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis" *Mol Cell Biol* 25(3): 1025-40.
- Brandes RP and Kreuzer J (2005) "Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation" *Cardiovasc Res* 65(1): 16-27.
- Brar SS, Kennedy TP, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Whorton AR and Hoidal JR (2002) "An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells" *Am J Physiol Cell Physiol* 282(6): C1212-24.
- Bravo J, Karathanassis D, Pacold CM, Pacold ME, Ellson CD, Anderson KE, Butler PJ, Lavenir I, Perisic O, Hawkins PT, Stephens L and Williams RL (2001) "The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate" *Mol Cell* 8(4): 829-39.
- Brechar S, Melchior C, Plancon S, Schenten V and Tschirhart EJ (2008) "Store-operated Ca²⁺ channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orail and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes" *Cell Calcium* 44(5): 492-506.
- Brechar S, Salsmann A and Tschirhart EJ (2009) "OAG induces an additional PKC-, PI3K-, and Rac2-mediated signaling pathway up-regulating NOX2 activity, independently of Ca²⁺ entry" *J Leukoc Biol* 85(4): 638-47.
- Brechar S and Tschirhart EJ (2008) "Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx" *J Leukoc Biol* 84(5): 1223-37.
- Brier S, Lemaire D, DeBonis S, Kozielski F and Forest E (2006) "Use of hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and mutagenesis as a tool to identify the binding region of inhibitors targeting the human mitotic kinesin Eg5" *Rapid Commun Mass Spectrom* 20(3): 456-62.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y and Zychlinsky A (2004) "Neutrophil extracellular traps kill bacteria" *Science* 303(5663): 1532-5.
- Brockhoff SE, Edmonds CG and Davis TN (1992) "Structural analysis of wild-type and mutant yeast calmodulins by limited proteolysis and electrospray ionization mass spectrometry" *Protein Sci* 1(4): 504-16.
- Bromberg Y and Pick E (1984) "Unsaturated fatty acids stimulate NADPH-dependent superoxide production by cell-free system derived from macrophages" *Cell Immunol* 88(1): 213-21.
- Bromberg Y and Pick E (1985) "Activation of NADPH-dependent superoxide production in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate" *J Biol Chem* 260(25): 13539-45.

- Brymora A, Valova VA and Robinson PJ (2004) "Protein-protein interactions identified by pull-down experiments and mass spectrometry" *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 17: Unit 17 5.
- Buetler TM, Krauskopf A and Ruegg UT (2004) "Role of superoxide as a signaling molecule" *News Physiol Sci* 19: 120-3.
- Burritt JB, DeLeo FR, McDonald CL, Prigge JR, Dinauer MC, Nakamura M, Nauseef WM and Jesaitis AJ (2001) "Phage display epitope mapping of human neutrophil flavocytochrome b558. Identification of two juxtaposed extracellular domains" *J Biol Chem* 276(3): 2053-61.
- Burritt JB, Foubert TR, Baniulis D, Lord CI, Taylor RM, Mills JS, Baughan TD, Roos D, Parkos CA and Jesaitis AJ (2003) "Functional epitope on human neutrophil flavocytochrome b558" *J Immunol* 170(12): 6082-9.
- Burritt JB, Fritel GN, Dahan I, Pick E, Roos D and Jesaitis AJ (2000) "Epitope identification for human neutrophil flavocytochrome b monoclonals 48 and 449" *Eur J Haematol* 65(6): 407-13.
- Burritt JB, Quinn MT, Jutila MA, Bond CW and Jesaitis AJ (1995) "Topological mapping of neutrophil cytochrome b epitopes with phage-display libraries" *J Biol Chem* 270(28): 16974-80.
- Busch K (1995) "Desorption Ionization Mass Spectrometry" *J Mass Spectrom* 30: 233-240.
- Cameron AE and Eggers DF (1948) "An Ion "Velocitron"" *Rev. Sci. Instrum.* 19: 605-607.
- Campion Y, Paclet MH, Jesaitis AJ, Marques B, Grichine A, Berthier S, Lenormand JL, Lardy B, Stasia MJ and Morel F (2007) "New insights into the membrane topology of the phagocyte NADPH oxidase: characterization of an anti-gp91-phox conformational monoclonal antibody" *Biochimie* 89(9): 1145-58.
- Caprioli RM, Farmer TB and Gile J (1997) "Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS" *Anal Chem* 69(23): 4751-60.
- Carmona-Cuenca I, Herrera B, Ventura JJ, Roncero C, Fernandez M and Fabregat I (2006) "EGF blocks NADPH oxidase activation by TGF-beta in fetal rat hepatocytes, impairing oxidative stress, and cell death" *J Cell Physiol* 207(2): 322-30.
- Carmona-Cuenca I, Roncero C, Sancho P, Caja L, Fausto N, Fernandez M and Fabregat I (2008) "Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity" *J Hepatol* 49(6): 965-76.
- Casbon AJ, Allen LA, Dunn KW and Dinauer MC (2009) "Macrophage NADPH oxidase flavocytochrome B localizes to the plasma membrane and Rab11-positive recycling endosomes" *J Immunol* 182(4): 2325-39.
- Casimir CM, Bu-Ghanim HN, Rodaway AR, Bentley DL, Rowe P and Segal AW (1991) "Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by deletion at a dinucleotide repeat" *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7): 2753-7.
- Chamulitrat W, Stremmel W, Kawahara T, Rokutan K, Fujii H, Winkler K, Schmidt HH and Schmidt R (2004) "A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes" *J Invest Dermatol* 122(4): 1000-9.
- Chance MR (2001) "Unfolding of apomyoglobin examined by synchrotron footprinting" *Biochem Biophys Res Commun* 287(3): 614-21.
- Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S, Wang Y, Burris TP and Rastinejad F (2008) "Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA" *Nature*: 350-356.
- Charlebois JP, Patrie SM and Kelleher NL (2003) "Electron capture dissociation and ¹³C,¹⁵N depletion for deuterium localization in intact proteins after solution-phase exchange" *Anal Chem* 75(13): 3263-6.

- Chen Q, Powell DW, Rane MJ, Singh S, Butt W, Klein JB and McLeish KR (2003) "Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils" *J Immunol* 170(10): 5302-8.
- Chenevier-Gobeaux C, Simonneau C, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Poiraudau S, Ekindjian OG and Borderie D (2007) "Implication of cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in the regulation of human synoviocyte NADPH oxidase (Nox2) activity" *Life Sci* 81(13): 1050-8.
- Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG and Lambeth JD (2001) "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5" *Gene* 269(1-2): 131-40.
- Cheng KW, Wong CC, Wang M, He QY and Chen F (2009) "Identification and characterization of molecular targets of natural products by mass spectrometry" *Mass Spectrom Rev*.
- Chinery R, Brockman JA, Peeler MO, Shyr Y, Beauchamp RD and Coffey RJ (1997) "Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer: a p53-independent induction of p21WAF1/CIP1 via C/EBPbeta" *Nat Med* 3(11): 1233-41.
- Clark RA, Leidal KG, Pearson DW and Nauseef WM (1987) "NADPH oxidase of human neutrophils. Subcellular localization and characterization of an arachidonate-activatable superoxide-generating system" *J Biol Chem* 262(9): 4065-74.
- Colston JT, de la Rosa SD, Strader JR, Anderson MA and Freeman GL (2005) "H2O2 activates Nox4 through PLA2-dependent arachidonic acid production in adult cardiac fibroblasts" *FEBS Lett* 579(11): 2533-40.
- Comisarow MB and Marshall AG (1974) "Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy" *Chemical Physics Letters* 25(2).
- Cornish TJ and Cotter RJ (1993) "A curved-field reflectron for improved energy focusing of product ions in time-of-flight mass spectrometry" *Rapid Commun Mass Spectrom* 7(11): 1037-1040.
- Cravello L, Lascoux D and Forest E (2003) "Use of different proteases working in acidic conditions to improve sequence coverage and resolution in hydrogen/deuterium exchange of large proteins" *Rapid Commun Mass Spectrom* 17(21): 2387-93.
- Cross AR (2000) "p40(phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558)" *Biochem J* 349(Pt 1): 113-7.
- Cross AR, Heyworth PG, Rae J and Curnutte JT (1995) "A variant X-linked chronic granulomatous disease patient (X91+) with partially functional cytochrome b" *J Biol Chem* 270(14): 8194-200.
- Cross AR, Noack D, Rae J, Curnutte JT and Heyworth PG (2000) "Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (first update)" *Blood Cells Mol Dis* 26(5): 561-5.
- Cross AR and Segal AW (2004) "The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems" *Biochim Biophys Acta* 1657(1): 1-22.
- Cross AR, Yarchover JL and Curnutte JT (1994) "The superoxide-generating system of human neutrophils possesses a novel diaphorase activity. Evidence for distinct regulation of electron flow within NADPH oxidase by p67-phox and p47-phox" *J Biol Chem* 269(34): 21448-54.
- Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan PJ, Ariyan S, Dikalov S and Sorescu D (2005) "NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts" *Circ Res* 97(9): 900-7.
- Curnutte JT (1985) "Activation of human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced (triphosphopyridine nucleotide, reduced) oxidase by arachidonic acid in a cell-free system" *J Clin Invest* 75(5): 1740-3.

- Curnutte JT, Kuver R and Scott PJ (1987) "Activation of neutrophil NADPH oxidase in a cell-free system. Partial purification of components and characterization of the activation process" *J Biol Chem* 262(12): 5563-9.
- Dagher MC and Pick E (2007) "Opening the black box: lessons from cell-free systems on the phagocyte NADPH-oxidase" *Biochimie* 89(9): 1123-32.
- Dahan I, Issaeva I, Gorzalczyk Y, Sigal N, Hirshberg M and Pick E (2002) "Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by "peptide walking"" *J Biol Chem* 277(10): 8421-32.
- Daiyasu H and Toh H (2000) "Molecular evolution of the myeloperoxidase family" *J Mol Evol* 51(5): 433-45.
- Dalgarno DC, Botfield MC and Rickles RJ (1997) "SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function" *Biopolymers* 43(5): 383-400.
- Dame JB, Reddy GR, Yowell CA, Dunn BM, Kay J and Berry C (1994) "Sequence, expression and modeled structure of an aspartic proteinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*" *Mol Biochem Parasitol* 64(2): 177-90.
- Dana R, Leto TL, Malech HL and Levy R (1998) "Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the phagocyte NADPH oxidase" *J Biol Chem* 273(1): 441-5.
- Dang PM, Cross AR and 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(6): 3001-5.
- Dang PM, Cross AR, Quinn MT and Babior BM (2002) "Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558 II" *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4262-5.
- Dang PM, Morel F, Gougerot-Pocidallo MA and 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(15): 4520-6.
- Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidallo MA and El-Benna J (2006) "A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites" *J Clin Invest* 116(7): 2033-43.
- Daniels I, Lindsay MA, Keany CI, Burden RP, Fletcher J and Haynes AP (1998) "Role of arachidonic acid and its metabolites in the priming of NADPH oxidase in human polymorphonuclear leukocytes by peritoneal dialysis effluent" *Clin Diagn Lab Immunol* 5(5): 683-9.
- Davis AR, Mascolo PL, Bunker PL, Sipes KM and Quinn MT (1998) "Cloning and sequencing of the bovine flavocytochrome b subunit proteins, gp91-phox and p22-phox: comparison with other known flavocytochrome b sequences" *J Leukoc Biol* 64(1): 114-23.
- De Deken X, Wang D, Dumont JE and Miot F (2002) "Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system" *Exp Cell Res* 273(2): 187-96.
- De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE and Miot F (2000) "Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family" *J Biol Chem* 275(30): 23227-33.
- De Hoffmann E, Charette J and Strootbant V (1994) "Spectrométrie de masse" ed. Masson.
- De Leo FR, Ulman KV, Davis AR, Jutila KL and Quinn MT (1996) "Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67phox and flavocytochrome b to a common functional domain in p47phox" *J Biol Chem* 271(29): 17013-20.

- de Mendez I, Adams AG, Sokolic RA, Malech HL and Leto TL (1996) "Multiple SH3 domain interactions regulate NADPH oxidase assembly in whole cells" *Embo J* 15(6): 1211-20.
- de Mendez I, Garrett MC, Adams AG and Leto TL (1994) "Role of p67-phox SH3 domains in assembly of the NADPH oxidase system" *J Biol Chem* 269(23): 16326-32.
- DeCoursey TE (2003) "Interactions between NADPH oxidase and voltage-gated proton channels: why electron transport depends on proton transport" *FEBS Lett* 555(1): 57-61.
- DeCoursey TE, Cherny VV, Morgan D, Katz BZ and Dinauer MC (2001) "The gp91phox component of NADPH oxidase is not the voltage-gated proton channel in phagocytes, but it helps" *J Biol Chem* 276(39): 36063-6.
- DeCoursey TE, Morgan D and Cherny VV (2002) "The gp91phox component of NADPH oxidase is not a voltage-gated proton channel" *J Gen Physiol* 120(6): 773-9.
- DeCoursey TE, Morgan D and Cherny VV (2003) "The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels" *Nature* 422(6931): 531-4.
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gelin C, Fan Y, Nelson DA, Jin S and White E (2006) "Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis" *Cancer Cell* 10(1): 51-64.
- DeLeo FR, Burritt JB, Yu L, Jesaitis AJ, Dinauer MC and Nauseef WM (2000) "Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly" *J Biol Chem* 275(18): 13986-93.
- DeLeo FR, Nauseef WM, Jesaitis AJ, Burritt JB, Clark RA and Quinn MT (1995a) "A domain of p47phox that interacts with human neutrophil flavocytochrome b558" *J Biol Chem* 270(44): 26246-51.
- DeLeo FR, Yu L, Burritt JB, Loetterle LR, Bond CW, Jesaitis AJ and Quinn MT (1995b) "Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries" *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(15): 7110-4.
- Demmers JA, Rijkers DT, Haverkamp J, Killian JA and Heck AJ (2002) "Factors affecting gas-phase deuterium scrambling in peptide ions and their implications for protein structure determination" *J Am Chem Soc* 124(37): 11191-8.
- Desouki MM, Kulawiec M, Bansal S, Das GM and Singh KK (2005) "Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors" *Cancer Biol Ther* 4(12): 1367-73.
- Dhaunsi GS, Paintlia MK, Kaur J and Turner RB (2004) "NADPH oxidase in human lung fibroblasts" *J Biomed Sci* 11(5): 617-22.
- Di-Poi N, Faure J, Grizot S, Molnar G, Pick E and Dagher MC (2001) "Mechanism of NADPH oxidase activation by the Rac/Rho-GDI complex" *Biochemistry* 40(34): 10014-22.
- Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T and Snyderman R (1989) "rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates" *J Biol Chem* 264(28): 16378-82.
- Diebold BA and Bokoch GM (2001) "Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase" *Nat Immunol* 2(3): 211-5.
- Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW and Hall A (1994) "Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity" *Science* 265(5171): 531-3.
- Diekmann D, Nobes CD, Burbelo PD, Abo A and Hall A (1995) "Rac GTPase interacts with GAPs and target proteins through multiple effector sites" *Embo J* 14(21): 5297-305.

- Dinauer MC, Lekstrom-Himes JA and Dale DC (2000) "Inherited Neutrophil Disorders: Molecular Basis and New Therapies" *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 303-318.
- Dinauer MC, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ and Parkos CA (1987) "The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex" *Nature* 327(6124): 717-20.
- Dole M, Mack LL and Hines RL (1968) "Molecular Beams of Macroions" *J. Chem. Phys.* 49: 2240.
- Donko A, Peterfi Z, Sum A, Leto T and Geiszt M (2005) "Dual oxidases" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1464): 2301-8.
- Dorseuil O, Reibel L, Bokoch GM, Camonis J and Gacon G (1996) "The Rac target NADPH oxidase p67phox interacts preferentially with Rac2 rather than Rac1" *J Biol Chem* 271(1): 83-8.
- Doussiere J, Bouzidi F and Vignais PV (2002) "The S100A8/A9 protein as a partner for the cytosolic factors of NADPH oxidase activation in neutrophils" *Eur J Biochem* 269(13): 3246-55.
- Doussiere J, Gaillard J and Vignais PV (1996) "Electron transfer across the O₂- generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component" *Biochemistry* 35(41): 13400-10.
- Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, 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(52): 37265-9.
- Dupuy C, Pomerance M, Ohayon R, Noel-Hudson MS, Deme D, Chaaoui M, Francon J and Virion A (2000) "Thyroid oxidase (THOX2) gene expression in the rat thyroid cell line FRTL-5" *Biochem Biophys Res Commun* 277(2): 287-92.
- Dupuy C, Virion A, De Sandro V, Ohayon R, Kaniewski J, Pommier J and Deme D (1992) "Activation of the NADPH-dependent H₂O₂-generating system in pig thyroid particulate fraction by limited proteolysis and Zn²⁺ treatment" *Biochem J* 283 (Pt 2): 591-5.
- Durand D, Cannella D, Dubosclard V, Pebay-Peyroula E, Vachette P and Fieschi F (2006) "Small-angle X-ray scattering reveals an extended organization for the autoinhibitory resting state of the p47(phox) modular protein" *Biochemistry* 45(23): 7185-93.
- Durand D, Vives C, Cannella D, Perez J, Pebay-Peyroula E, Vachette P and Fieschi F (2009) "NADPH oxidase activator p67(phox) behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers" *J Struct Biol*.
- Dusi S, Donini M and Rossi F (1996) "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* 314 (Pt 2): 409-12.
- Dusi S, Nadalini KA, Donini M, Zentilin L, Wientjes FB, Roos D, Giacca M and Rossi F (1998) "Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly and activation in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines of normal and chronic granulomatous disease patients" *J Immunol* 161(9): 4968-74.
- Ebisu K, Nagasawa T, Watanabe K, Kakinuma K, Miyano K and Tamura M (2001) "Fused p47phox and p67phox truncations efficiently reconstitute NADPH oxidase with higher activity and stability than the individual components" *J Biol Chem* 276(27): 24498-505.
- 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 (2001) "Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox" *J Cell Biol* 154(4): 879-91.

- El-Benna J, Dang PM and Gougerot-Pocidal MA (2008) "Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane" *Semin Immunopathol* 30(3): 279-89.
- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA and Elbim C (2005) "Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses" *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53(3): 199-206.
- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA, Marie JC and Braut-Boucher F (2009) "p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases" *Exp Mol Med* 41(4): 217-25.
- El Benna J, Dang PM, Andrieu V, Vergnaud S, Dewas C, Cachia O, Fay M, Morel F, Chollet-Martin S, Hakim J and Gougerot-Pocidal MA (1999) "P40phox associates with the neutrophil Triton X-100-insoluble cytoskeletal fraction and PMA-activated membrane skeleton: a comparative study with P67phox and P47phox" *J Leukoc Biol* 66(6): 1014-20.
- el Benna J, Faust LP and 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(38): 23431-6.
- El Benna J, Faust RP, Johnson JL and Babior BM (1996) "Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase" *J Biol Chem* 271(11): 6374-8.
- El Benna J, Hayem G, Dang PM, Fay M, Chollet-Martin S, Elbim C, Meyer O and Gougerot-Pocidal MA (2002) "NADPH oxidase priming and p47phox phosphorylation in neutrophils from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondylarthropathy" *Inflammation* 26(6): 273-8.
- El Hassani RA, Benfares N, Caillou B, Talbot M, Sabourin JC, Belotte V, Morand S, Gnidehou S, Agnandji D, Ohayon R, Kaniewski J, Noel-Hudson MS, Bidart JM, Schlumberger M, Virion A and Dupuy C (2005) "Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract" *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(5): G933-42.
- Ellmark SH, Dusting GJ, Fui MN, Guzzo-Pernell N and Drummond GR (2005) "The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle" *Cardiovasc Res* 65(2): 495-504.
- Ellson C, Davidson K, Anderson K, Stephens LR and Hawkins PT (2006a) "PtdIns3P binding to the PX domain of p40phox is a physiological signal in NADPH oxidase activation" *Embo J* 25(19): 4468-78.
- Ellson CD, Anderson KE, Morgan G, Chilvers ER, Lipp P, Stephens LR and Hawkins PT (2001a) "Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes" *Curr Biol* 11(20): 1631-5.
- Ellson CD, Davidson K, Ferguson GJ, O'Connor R, Stephens LR and Hawkins PT (2006b) "Neutrophils from p40phox^{-/-} mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing" *J Exp Med* 203(8): 1927-37.
- 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 (2001b) "PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox)" *Nat Cell Biol* 3(7): 679-82.
- Esteban O, Bernal RA, Donohoe M, Videler H, Sharon M, Robinson CV and Stock D (2008) "Stoichiometry and localization of the stator subunits E and G in *Thermus thermophilus* H⁺-ATPase/synthase" *J Biol Chem* 283(5): 2595-603.

- Faust LR, el Benna J, Babior BM and Chanock SJ (1995) "The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis" *J Clin Invest* 96(3): 1499-505.
- Femling JK, Cherny VV, Morgan D, Rada B, Davis AP, Czirjak G, Enyedi P, England SK, Moreland JG, Ligeti E, Nauseef WM and DeCoursey TE (2006) "The antibacterial activity of human neutrophils and eosinophils requires proton channels but not BK channels" *J Gen Physiol* 127(6): 659-72.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF and Whitehouse CM (1989) "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules" *Science* 246(4926): 64-71.
- Ferguson PL, Pan J, Wilson DJ, Dempsey B, Lajoie G, Shilton B and Konermann L (2007) "Hydrogen/deuterium scrambling during quadrupole time-of-flight MS/MS analysis of a zinc-binding protein domain" *Anal Chem* 79(1): 153-60.
- Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA and El-Benna J (2002) "Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation" *Biochemistry* 41(24): 7743-50.
- Forteza R, Salathe M, Miot F, Forteza R and Conner GE (2005) "Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells" *Am J Respir Cell Mol Biol* 32(5): 462-9.
- Foubert TR, Bleazard JB, Burritt JB, Gripenrog JM, Baniulis D, Taylor RM and Jesaitis AJ (2001) "Identification of a spectrally stable proteolytic fragment of human neutrophil flavocytochrome b composed of the NH2-terminal regions of gp91(phox) and p22(phox)" *J Biol Chem* 276(42): 38852-61.
- Freeman JL, Abo A and Lambeth JD (1996) "Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65" *J Biol Chem* 271(33): 19794-801.
- Freeman JL, Kreck ML, Uhlinger DJ and Lambeth JD (1994) "Ras effector-homologue region on Rac regulates protein associations in the neutrophil respiratory burst oxidase complex" *Biochemistry* 33(45): 13431-5.
- Frey RS, Gao X, Javaid K, Siddiqui SS, Rahman A and Malik AB (2006) "Phosphatidylinositol 3-kinase gamma signaling through protein kinase C zeta induces NADPH oxidase-mediated oxidant generation and NF-kappaB activation in endothelial cells" *J Biol Chem* 281(23): 16128-38.
- Fuchs A, Dagher MC, Faure J and Vignais PV (1996) "Topological organization of the cytosolic activating complex of the superoxide-generating NADPH-oxidase. Pinpointing the sites of interaction between p47phox, p67phox and p40phox using the two-hybrid system" *Biochim Biophys Acta* 1312(1): 39-47.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V and Zychlinsky A (2007) "Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps" *J Cell Biol* 176(2): 231-41.
- Fuerstenau SD, Benner WH, Thomas JJ, Brugidou C, Bothner B and Siuzdak G (2001) "Mass Spectrometry of an Intact Virus" *Angew Chem Int Ed Engl* 40(3): 541-544.
- Fukuyama M, Rokutan K, Sano T, Miyake H, Shimada M and Tashiro S (2005) "Overexpression of a novel superoxide-producing enzyme, NADPH oxidase 1, in adenoma and well differentiated adenocarcinoma of the human colon" *Cancer Lett* 221(1): 97-104.
- Gabig TG, English D, Akard LP and Schell MJ (1987) "Regulation of neutrophil NADPH oxidase activation in a cell-free system by guanine nucleotides and fluoride. Evidence for participation of a pertussis and cholera toxin-insensitive G protein" *J Biol Chem* 262(4): 1685-90.
- Gao X, Bain K, Bonanno JB, Buchanan M, Henderson D, Lorimer D, Marsh C, Reynes JA, Sauder JM, Schwinn K, Thai C and Burley SK (2005) "High-throughput limited

- proteolysis/mass spectrometry for protein domain elucidation" *J Struct Funct Genomics* 6(2-3): 129-34.
- Geiszt M, Kopp JB, Varnai P and Leto TL (2000) "Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney" *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 8010-4.
- Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K and Leto TL (2003) "Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense" *Faseb J* 17(11): 1502-4.
- Gervasoni P, Staudenmann W, James P and Pluckthun A (1998) "Identification of the binding surface on beta-lactamase for GroEL by limited proteolysis and MALDI-mass spectrometry" *Biochemistry* 37(33): 11660-9.
- Gianni D, Diaz B, Taulet N, Fowler B, Courtneidge SA and Bokoch GM (2009) "Novel p47(phox)-related organizers regulate localized NADPH oxidase 1 (Nox1) activity" *Sci Signal* 2(88): ra54.
- Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, Gaullier JM, Parton RG and Stenmark H (2000) "Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells" *Embo J* 19(17): 4577-88.
- 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 (2003) "Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression" *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12(8): 755-62.
- Glocker MO, Borchers C, Fiedler W, Suckau D and Przybylski M (1994) "Molecular characterization of surface topology in protein tertiary structures by amino-acylation and mass spectrometric peptide mapping" *Bioconjug Chem* 5(6): 583-90.
- Gomez A and Tang K (1994) "Charge and fission of droplets in electrostatic sprays." *Phys. Fluids* 6(404-414).
- Gordiyenko Y and Robinson CV (2008) "The emerging role of MS in structure elucidation of protein-nucleic acid complexes" *Biochem Soc Trans* 36(Pt 4): 723-31.
- Gorin Y, Block K, Hernandez J, Bhandari B, Wagner B, Barnes JL and Abboud HE (2005) "Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney" *J Biol Chem* 280(47): 39616-26.
- Gorzalczany Y, Alloul N, Sigal N, Weinbaum C and Pick E (2002) "A prenylated p67phox-Rac1 chimera elicits NADPH-dependent superoxide production by phagocyte membranes in the absence of an activator and of p47phox: conversion of a pagan NADPH oxidase to monotheism" *J Biol Chem* 277(21): 18605-10.
- Gorzalczany Y, Sigal N, Itan M, Lotan O and Pick E (2000) "Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly" *J Biol Chem* 275(51): 40073-81.
- Grasberger H and Refetoff S (2006) "Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent" *J Biol Chem* 281(27): 18269-72.
- Grez M, Ott MG, Stein S, Siler U, Koehl U, Kunkel H, Schilz A, Kuehlcke K, Hoelzer D and Seger R (2005) "Correction of chronic granulomatous disease by gene therapy" *Mol Ther* 11: (Suppl 1): S130 DOI 10.1016/j.ymthe.2005.06.339.
- Griendling KK (2004) "Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system" *Heart* 90(5): 491-3.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD and Alexander RW (1994) "Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells" *Circ Res* 74(6): 1141-8.
- Grintsevich EE, Benchaar SA, Warshaviak D, Boontheung P, Halgand F, Whitelegge JP, Faull KF, Loo RR, Sept D, Loo JA and Reisler E (2008) "Mapping the cofilin binding site on yeast G-actin by chemical cross-linking" *J Mol Biol* 377(2): 395-409.

- Grizot S, Faure J, Fieschi F, Vignais PV, Dagher MC and Pebay-Peyroula E (2001a) "Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation" *Biochemistry* 40(34): 10007-13.
- Grizot S, Fieschi F, Dagher MC and Pebay-Peyroula E (2001b) "The active N-terminal region of p67phox. Structure at 1.8 Å resolution and biochemical characterizations of the A128V mutant implicated in chronic granulomatous disease" *J Biol Chem* 276(24): 21627-31.
- Grizot S, Grandvaux N, Fieschi F, Faure J, Massenet C, Andrieu JP, Fuchs A, Vignais PV, Timmins PA, Dagher MC and Pebay-Peyroula E (2001c) "Small angle neutron scattering and gel filtration analyses of neutrophil NADPH oxidase cytosolic factors highlight the role of the C-terminal end of p47phox in the association with p40phox" *Biochemistry* 40(10): 3127-33.
- Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ and Rittinger K (2003) "Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase" *Cell* 113(3): 343-55.
- Guo M, Huang BX and Kim HY (2009) "Conformational changes in Akt1 activation probed by amide hydrogen/deuterium exchange and nano-electrospray ionization mass spectrometry" *Rapid Commun Mass Spectrom* 23(13): 1885-91.
- Hager-Braun C and Tomer KB (2005) "Determination of protein-derived epitopes by mass spectrometry" *Expert Rev Proteomics* 2(5): 745-56.
- Hagman C, Tsybin YO and Hakansson P (2006) "Solution-phase deuterium/hydrogen exchange at a specific residue using nozzle-skimmer and electron capture dissociation mass spectrometry" *Rapid Commun Mass Spectrom* 20(4): 661-5.
- Hamuro Y, Anand GS, Kim JS, Juliano C, Stranz DD, Taylor SS and Woods VL, Jr. (2004) "Mapping intersubunit interactions of the regulatory subunit (RI α) in the type I holoenzyme of protein kinase A by amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (DXMS)" *J Mol Biol* 340(5): 1185-96.
- Han CH, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA and Lambeth JD (1998) "Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox)" *J Biol Chem* 273(27): 16663-8.
- Han CH, Nisimoto Y, Lee SH, Kim ET and Lambeth JD (2001) "Characterization of the flavoprotein domain of gp91phox which has NADPH diaphorase activity" *J Biochem* 129(4): 513-20.
- Hannken T, Schroeder R, Stahl RA and Wolf G (1998) "Angiotensin II-mediated expression of p27Kip1 and induction of cellular hypertrophy in renal tubular cells depend on the generation of oxygen radicals" *Kidney Int* 54(6): 1923-33.
- Harman D (1956) "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry" *J Gerontol* 11(3): 298-300.
- Hata K, Ito T, Takeshige K and Sumimoto H (1998) "Anionic amphiphile-independent activation of the phagocyte NADPH oxidase in a cell-free system by p47phox and p67phox, both in C terminally truncated forms. Implication for regulatory Src homology 3 domain-mediated interactions" *J Biol Chem* 273(7): 4232-6.
- Hata K, Takeshige K and Sumimoto H (1997) "Roles for proline-rich regions of p47phox and p67phox in the phagocyte NADPH oxidase activation in vitro" *Biochem Biophys Res Commun* 241(2): 226-31.
- Hazan-Halevy I, Levy T, Wolak T, Lubarsky I, Levy R and Paran E (2005) "Stimulation of NADPH oxidase by angiotensin II in human neutrophils is mediated by ERK, p38 MAP-kinase and cytosolic phospholipase A2" *J Hypertens* 23(6): 1183-90.
- He MF, Liu L, Ge W, Shaw PC, Jiang R, Wu LW and But PP (2009) "Antiangiogenic activity of *Tripterygium wilfordii* and its terpenoids" *J Ethnopharmacol* 121(1): 61-8.

- He R, Nanamori M, Sang H, Yin H, Dinauer MC and Ye RD (2004) "Reconstitution of chemotactic peptide-induced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced) oxidase activation in transgenic COS-phox cells" *J Immunol* 173(12): 7462-70.
- Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ and Thannickal VJ (2009) "NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury" *Nat Med* 15(9): 1077-81.
- Henderson LM and Chappel JB (1996) "NADPH oxidase of neutrophils" *Biochim Biophys Acta* 1273(2): 87-107.
- Henderson LM, Chappell JB and Jones OT (1987) "The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H⁺ channel" *Biochem J* 246(2): 325-9.
- Hernandez H, Dziembowski A, Taverner T, Seraphin B and Robinson CV (2006) "Subunit architecture of multimeric complexes isolated directly from cells" *EMBO Rep* 7(6): 605-10.
- Heyneman RA and Vercauteren RE (1984) "Activation of a NADPH oxidase from horse polymorphonuclear leukocytes in a cell-free system" *J Leukoc Biol* 36(6): 751-9.
- Heyworth PG, Bohl BP, Bokoch GM and Curnutte JT (1994) "Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558" *J Biol Chem* 269(49): 30749-52.
- Heyworth PG, Curnutte JT, Nauseef WM, Volpp BD, Pearson DW, Rosen H and Clark RA (1991) "Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558" *J Clin Invest* 87(1): 352-6.
- Heyworth PG, Curnutte JT, Rae J, Noack D, Roos D, van Koppen E and Cross AR (2001) "Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (second update)" *Blood Cells Mol Dis* 27(1): 16-26.
- Heyworth PG, Knaus UG, Settleman J, Curnutte JT and Bokoch GM (1993) "Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s)" *Mol Biol Cell* 4(11): 1217-23.
- Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, Hiroki J, Mukai Y, Morikawa K, Ichiki T, Takahashi S and Takeshita A (2003) "Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system" *Circ Res* 93(8): 767-75.
- Hill J, Tyas L, Phylip LH, Kay J, Dunn BM and Berry C (1994) "High level expression and characterisation of Plasmepsin II, an aspartic proteinase from *Plasmodium falciparum*" *FEBS Lett* 352(2): 155-8.
- Hill K and Welch HC (2006) "Purification of P-Rex1 from neutrophils and nucleotide exchange assay" *Methods Enzymol* 406: 26-41.
- Hillenkamp F and Karas M (1990) "Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization" *Methods Enzymol* 193: 280-95.
- Hiroaki H, Ago T, Ito T, Sumimoto H and Kohda D (2001) "Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain" *Nat Struct Biol* 8(6): 526-30.
- Hoidal JR, Brar SS, Sturrock AB, Sanders KA, Dinger B, Fidone S and Kennedy TP (2003) "The role of endogenous NADPH oxidases in airway and pulmonary vascular smooth muscle function" *Antioxid Redox Signal* 5(6): 751-8.
- Honbou K, Minakami R, Yuzawa S, Takeya R, Suzuki NN, Kamakura S, Sumimoto H and Inagaki F (2007) "Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding" *Embo J* 26(4): 1176-86.
- Houde D, Arndt J, Domeier W, Berkowitz S and Engen JR (2009) "Characterization of IgG1 Conformation and Conformational Dynamics by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry" *Anal Chem*.

- Hoyal CR, Gutierrez A, Young BM, Catz SD, Lin JH, Tschlis PN and Babior BM (2003) "Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase" *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5130-5.
- Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M and Graham Cooks R (2005a) "The Orbitrap: a new mass spectrometer" *J Mass Spectrom* 40(4): 430-43.
- Hu T, Ramachandrarao SP, Siva S, Valancius C, Zhu Y, Mahadev K, Toh I, Goldstein BJ, Woolkalis M and Sharma K (2005b) "Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF-beta-induced cytoskeletal alterations in endothelial cells" *Am J Physiol Renal Physiol* 289(4): F816-25.
- Huang S, Zou X, Guo P, Zhong L, Peng J and Jing G (2005) "Probing the subtle conformational state of N138ND2-Q106O hydrogen bonding deletion mutant (Asn138Asp) of staphylococcal nuclease using time of flight mass spectrometry with limited proteolysis" *Arch Biochem Biophys* 434(1): 86-92.
- Huang Y, Zhou Y, Fan Y and Zhou D (2008) "Celestrol inhibits the growth of human glioma xenografts in nude mice through suppressing VEGFR expression" *Cancer Lett* 264(1): 101-6.
- Hwang J, Ing MH, Salazar A, Lassegue B, Griendling K, Navab M, Sevanian A and Hsiai TK (2003) "Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation" *Circ Res* 93(12): 1225-32.
- Hwang J, Kleinhenz DJ, Lassegue B, Griendling KK, Dikalov S and Hart CM (2005) "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands regulate endothelial membrane superoxide production" *Am J Physiol Cell Physiol* 288(4): C899-905.
- Imajoh-Ohmi S, Tokita K, Ochiai H, Nakamura M and Kanegasaki S (1992) "Topology of cytochrome b558 in neutrophil membrane analyzed by anti-peptide antibodies and proteolysis" *J Biol Chem* 267(1): 180-4.
- Imanishi T, Hano T and Nishio I (2005) "Estrogen reduces angiotensin II-induced acceleration of senescence in endothelial progenitor cells" *Hypertens Res* 28(3): 263-71.
- Inanami O, Johnson JL, McAdara JK, Benna JE, Faust LR, Newburger PE and Babior BM (1998) "Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47PHOX on serine 303 or 304" *J Biol Chem* 273(16): 9539-43.
- Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H and Nawata H (2003) "Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase" *J Am Soc Nephrol* 14(8 Suppl 3): S227-32.
- Iribarne JV and Thomson BA (1976) "On the evaporation of small ions from charged droplets." *J. Chem. Phys.* 64: 2287.
- Ito T, Matsui Y, Ago T, Ota K and Sumimoto H (2001) "Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions" *Embo J* 20(15): 3938-46.
- Jancic C, Savina A, Wasmeier C, Tolmachova T, El-Benna J, Dang PM, Pascolo S, Gougerot-Pocidallo MA, Raposo G, Seabra MC and Amigorena S (2007) "Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes" *Nat Cell Biol* 9(4): 367-78.
- Janeway CA, Craig J, Davidson M, Downey W, Gitlin D and Sullivan JC (1954) "Hypergammaglobulinemia associated with severe, recurrent and chronic non-specific infection." *AM J Dis Child* 88: 388-392.
- Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX and Laurindo FR (2005) "Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells" *J Biol Chem* 280(49): 40813-9.

- Jankowski A and Grinstein S (1999) "A noninvasive fluorimetric procedure for measurement of membrane potential. Quantification of the NADPH oxidase-induced depolarization in activated neutrophils" *J Biol Chem* 274(37): 26098-104.
- Jaquet V, Scapozza L, Clark RA, Krause KH and Lambeth JD (2009) "Small-molecule NOX inhibitors: ROS-generating NADPH oxidases as therapeutic targets" *Antioxid Redox Signal* 11(10): 2535-52.
- Jawhari A, Boussert S, Lamour V, Atkinson RA, Kieffer B, Poch O, Potier N, van Dorsselaer A, Moras D and Poterszman A (2004) "Domain architecture of the p62 subunit from the human transcription/repair factor TFIIH deduced by limited proteolysis and mass spectrometry analysis" *Biochemistry* 43(45): 14420-30.
- Jesaitis AJ, Buescher ES, Harrison D, Quinn MT, Parkos CA, Livesey S and Linner J (1990) "Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes" *J Clin Invest* 85(3): 821-35.
- Jin Lee Y (2008) "Mass spectrometric analysis of cross-linking sites for the structure of proteins and protein complexes" *Mol Biosyst* 4(8): 816-23.
- Johnson JL, Park JW, Benna JE, Faust LP, Inanami O and Babior BM (1998) "Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity" *J Biol Chem* 273(52): 35147-52.
- Jones SA, Hancock JT, Jones OT, Neubauer A and Topley N (1995) "The expression of NADPH oxidase components in human glomerular mesangial cells: detection of protein and mRNA for p47phox, p67phox, and p22phox" *J Am Soc Nephrol* 5(7): 1483-91.
- Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ and Jones OT (1996) "Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells" *Am J Physiol* 271(4 Pt 2): H1626-34.
- Jorgensen TJ, Bache N, Roepstorff P, Gardsvoll H and Ploug M (2005a) "Collisional activation by MALDI tandem time-of-flight mass spectrometry induces intramolecular migration of amide hydrogens in protonated peptides" *Mol Cell Proteomics* 4(12): 1910-9.
- Jorgensen TJ, Gardsvoll H, Ploug M and Roepstorff P (2005b) "Intramolecular migration of amide hydrogens in protonated peptides upon collisional activation" *J Am Chem Soc* 127(8): 2785-93.
- Joseph G, Gorzalczyk Y, Koshkin V and Pick E (1994) "Inhibition of NADPH oxidase activation by synthetic peptides mapping within the carboxyl-terminal domain of small GTP-binding proteins. Lack of amino acid sequence specificity and importance of polybasic motif" *J Biol Chem* 269(46): 29024-31.
- Joseph G and Pick E (1995) "Peptide walking" is a novel method for mapping functional domains in proteins. Its application to the Rac1-dependent activation of NADPH oxidase" *J Biol Chem* 270(49): 29079-82.
- Kami K, Takeya R, Sumimoto H and Kohda D (2002) "Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p" *Embo J* 21(16): 4268-76.
- Kanai F, Liu H, Field SJ, Akbary H, Matsuo T, Brown GE, Cantley LC and Yaffe MB (2001) "The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K" *Nat Cell Biol* 3(7): 675-8.
- Karas M and Hillenkamp F (1988) "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons" *Anal Chem* 60(20): 2299-301.
- Karathanassis D, Stahelin RV, Bravo J, Perisic O, Pacold CM, Cho W and Williams RL (2002) "Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-

- bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction" *Embo J* 21(19): 5057-68.
- Kawahara T, Kohjima M, Kuwano Y, Mino H, Teshima-Kondo S, Takeya R, Tsunawaki S, Wada A, Sumimoto H and Rokutan K (2005a) "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* 288(2): C450-7.
- Kawahara T, Ritsick D, Cheng G and Lambeth JD (2005b) "Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation" *J Biol Chem* 280(36): 31859-69.
- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA and Lamb C (1998) "A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs" *Plant Cell* 10(2): 255-66.
- Kerkhoff C, Nacken W, Benedyk M, Dagher MC, Sopalla C and Doussiere J (2005) "The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2" *Faseb J* 19(3): 467-9.
- Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H and Fukumoto M (2000) "NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells" *Gene* 254(1-2): 237-43.
- Kjeldsen F, Silivra OA, Ivonin IA, Haselmann KF, Gorshkov M and Zubarev RA (2005) "C alpha-C backbone fragmentation dominates in electron detachment dissociation of gas-phase polypeptide polyanions" *Chemistry* 11(6): 1803-12.
- Kleinberg ME, Malech HL and Rotrosen D (1990) "The phagocyte 47-kilodalton cytosolic oxidase protein is an early reactant in activation of the respiratory burst" *J Biol Chem* 265(26): 15577-83.
- Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT and Bokoch GM (1991) "Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2" *Science* 254(5037): 1512-5.
- Knaus UG, Heyworth PG, Kinsella BT, Curnutte JT and Bokoch GM (1992) "Purification and characterization of Rac 2. A cytosolic GTP-binding protein that regulates human neutrophil NADPH oxidase" *J Biol Chem* 267(33): 23575-82.
- Kocher T, Engstrom A and Zubarev RA (2005) "Fragmentation of peptides in MALDI in-source decay mediated by hydrogen radicals" *Anal Chem* 77(1): 172-7.
- Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F and Sumimoto H (1999) "Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase" *J Biol Chem* 274(35): 25051-60.
- Konermann L and Simmons DA (2003) "Protein-folding kinetics and mechanisms studied by pulse-labeling and mass spectrometry" *Mass Spectrom Rev* 22(1): 1-26.
- Konermann L, Stocks BB, Pan Y and Tong X (2009) "Mass spectrometry combined with oxidative labeling for exploring protein structure and folding" *Mass Spectrom Rev*.
- 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(48): 30326-9.
- Koyama S, Yu H, Dalgarno DC, Shin TB, Zydowsky LD and Schreiber SL (1993) "Structure of the PI3K SH3 domain and analysis of the SH3 family" *Cell* 72(6): 945-52.
- Krause KH (2004) "Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases" *Jpn J Infect Dis* 57(5): S28-9.
- Krause KH (2007) "Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases" *Exp Gerontol* 42(4): 256-62.

- Kreck ML, Freeman JL, Abo A and Lambeth JD (1996) "Membrane association of Rac is required for high activity of the respiratory burst oxidase" *Biochemistry* 35(49): 15683-92.
- Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T and Sumimoto H (2002) "The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase" *Embo J* 21(23): 6312-20.
- Kuroda J, Nakagawa K, Yamasaki T, Nakamura K, Takeya R, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S, Igarashi K, Shibata Y, Sueishi K and Sumimoto H (2005) "The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells" *Genes Cells* 10(12): 1139-51.
- Kweon HK and Hakansson K (2006) "Site-specific amide hydrogen exchange in melittin probed by electron capture dissociation Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry" *Analyst* 131(2): 275-80.
- Lafaye A, Labarre J, Tabet JC, Ezan E and Junot C (2005) "Liquid chromatography-mass spectrometry and ¹⁵N metabolic labeling for quantitative metabolic profiling" *Anal Chem* 77(7): 2026-33.
- Laiko VV, Moyer SC and Cotter RJ (2000) "Atmospheric pressure MALDI/ion trap mass spectrometry" *Anal Chem* 72(21): 5239-43.
- Lam TT, Lanman JK, Emmett MR, Hendrickson CL, Marshall AG and Prevelige PE (2002) "Mapping of protein:protein contact surfaces by hydrogen/deuterium exchange, followed by on-line high-performance liquid chromatography-electrospray ionization Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass analysis" *J Chromatogr A* 982(1): 85-95.
- Lambeth JD (2004) "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen" *Nat Rev Immunol* 4(3): 181-9.
- Lambeth JD (2007) "Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy" *Free Radic Biol Med* 43(3): 332-47.
- Lambeth JD, Krause KH and Clark RA (2008) "NOX enzymes as novel targets for drug development" *Semin Immunopathol* 30(3): 339-63.
- Landing BH and Shirkey HS (1957) "A syndrome of recurrent infection and infiltration of viscera by pigmented lipid histiocytes" *Pediatrics* 20(3): 431-8.
- Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y and Rittinger K (2002) "Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox" *J Biol Chem* 277(12): 10121-8.
- Lapouge K, Smith SJ, Walker PA, Gamblin SJ, Smerdon SJ and Rittinger K (2000) "Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP" *Mol Cell* 6(4): 899-907.
- Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD and Griendling KK (2001) "Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways" *Circ Res* 88(9): 888-94.
- Leto TL, Adams AG and de Mendez I (1994) "Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets" *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22): 10650-4.
- Leusen JH, de Klein A, Hilarius PM, Ahlin A, Palmblad J, Smith CI, Diekmann D, Hall A, Verhoeven AJ and Roos D (1996) "Disturbed interaction of p21-rac with mutated p67-phox causes chronic granulomatous disease" *J Exp Med* 184(4): 1243-9.
- Levy ED, Boeri Erba E, Robinson CV and Teichmann SA (2008) "Assembly reflects evolution of protein complexes" *Nature* 453(7199): 1262-5.
- Li J and Guillory RJ (1997) "Purified leukocyte cytochrome b558 incorporated into liposomes catalyzes a cytosolic factor dependent diaphorase activity" *Biochemistry* 36(18): 5529-37.

- Li S, Tabar SS, Malec V, Eul BG, Klepetko W, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Rose F and Hanze J (2008) "NOX4 regulates ROS levels under normoxic and hypoxic conditions, triggers proliferation, and inhibits apoptosis in pulmonary artery adventitial fibroblasts" *Antioxid Redox Signal* 10(10): 1687-98.
- Li T, Yowell CA, Beyer BB, Hung SH, Westling J, Lam MT, Dunn BM and Dame JB (2004) "Recombinant expression and enzymatic subsite characterization of plasmepsin 4 from the four Plasmodium species infecting man" *Mol Biochem Parasitol* 135(1): 101-9.
- Li XJ, Fieschi F, Paclat MH, Grunwald D, Campion Y, Gaudin P, Morel F and Stasia MJ (2007) "Leu505 of Nox2 is crucial for optimal p67phox-dependent activation of the flavocytochrome b558 during phagocytic NADPH oxidase assembly" *J Leukoc Biol* 81(1): 238-49.
- Li XJ, Tian W, Stull ND, Grinstein S, Atkinson S and Dinauer MC (2009) "A fluorescently tagged C-terminal fragment of p47phox detects NADPH oxidase dynamics during phagocytosis" *Mol Biol Cell* 20(5): 1520-32.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H and Levine B (1999) "Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1" *Nature* 402(6762): 672-6.
- Lin HT, Bavro VN, Barrera NP, Frankish HM, Velamakanni S, van Veen HW, Robinson CV, Borges-Walmsley MI and Walmsley AR (2009) "MacB ABC transporter is a dimer whose ATPase activity and macrolide-binding capacity are regulated by the membrane fusion protein MacA" *J Biol Chem* 284(2): 1145-54.
- Little DP, Speir JP, Senko MW, O'Connor PB and McLafferty FW (1994) "Infrared multiphoton dissociation of large multiply charged ions for biomolecule sequencing" *Anal Chem* 66(18): 2809-15.
- Liu J and Konermann L (2009) "Irreversible thermal denaturation of cytochrome C studied by electrospray mass spectrometry" *J Am Soc Mass Spectrom* 20(5): 819-28.
- Lopes LR, Dagher MC, Gutierrez A, Young B, Bouin AP, Fuchs A and Babior BM (2004) "Phosphorylated p40PHOX as a negative regulator of NADPH oxidase" *Biochemistry* 43(12): 3723-30.
- Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T and Thompson CB (2005) "Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis" *Cell* 120(2): 237-48.
- Maehara Y, Miyano K and Sumimoto H (2009) "Role for the first SH3 domain of p67phox in activation of superoxide-producing NADPH oxidases" *Biochem Biophys Res Commun* 379(2): 589-93.
- Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD and Goldstein BJ (2004) "The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction" *Mol Cell Biol* 24(5): 1844-54.
- Maier CS, Schimerlik MI and Deinzer ML (1999) "Thermal denaturation of Escherichia coli thioredoxin studied by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionization mass spectrometry: monitoring a two-state protein unfolding transition" *Biochemistry* 38(3): 1136-43.
- Makarov A (2000) "Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis" *Anal Chem* 72(6): 1156-62.
- Mamyurin BA, Karataev VI, Shmikk DV and Zagulin VA (1973) "The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution" *Sov. Phys. JETP* 37: 45.
- Man P, Montagner C, Vernier G, Dublet B, Chenal A, Forest E and Forge V (2007) "Defining the interacting regions between apomyoglobin and lipid membrane by

- hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry" *J Mol Biol* 368(2): 464-72.
- Mantegazza AR, Savina A, Vermeulen M, Perez L, Geffner J, Hermine O, Rosenzweig SD, Faure F and Amigorena S (2008) "NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells" *Blood* 112(12): 4712-22.
- Marcoux J, Man P, Castellani M, Vives C, Forest E and Fieschi F (2009a) "Conformational changes in p47(phox) upon activation highlighted by mass spectrometry coupled to hydrogen/deuterium exchange and limited proteolysis" *FEBS Lett* 583(4): 835-40.
- Marcoux J, Thierry E, Vives C, Signor L, Fieschi F and Forest E (2009b) "Investigating Alternative Acidic Proteases for H/D Exchange Coupled to Mass Spectrometry: Plasmepsin 2 but not Plasmepsin 4 Is Active Under Quenching Conditions" *J Am Soc Mass Spectrom.*
- Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC and Knaus UG (2006) "Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases" *Cell Signal* 18(1): 69-82.
- Martyn KD, Kim MJ, Quinn MT, Dinauer MC and Knaus UG (2005) "p21-activated kinase (Pak) regulates NADPH oxidase activation in human neutrophils" *Blood* 106(12): 3962-9.
- Massenet C, Chenavas S, Cohen-Addad C, Dagher MC, Brandolin G, Pebay-Peyroula E and Fieschi F (2005) "Effects of p47phox C terminus phosphorylations on binding interactions with p40phox and p67phox. Structural and functional comparison of p40phox and p67phox SH3 domains" *J Biol Chem* 280(14): 13752-61.
- Matsubara T and Ziff M (1986) "Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines" *J Immunol* 137(10): 3295-8.
- Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamanishi K, Miyazaki M, Matsubara H and Yabe-Nishimura C (2005) "Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice" *Circulation* 112(17): 2677-85.
- Mattauch J and Herzog R (1934) "Uber einen neuen Massenspektrographen" *Zeitschrift fur Physik* 89: 786.
- Maturana A, Arnaudeau S, Ryser S, Banfi B, Hossle JP, Schlegel W, Krause KH and Demaurex N (2001) "Heme histidine ligands within gp91(phox) modulate proton conduction by the phagocyte NADPH oxidase" *J Biol Chem* 276(32): 30277-84.
- Mayer BJ (2001) "SH3 domains: complexity in moderation" *J Cell Sci* 114(Pt 7): 1253-63.
- Mazon H, Marcillat O, Forest E and Vial C (2005a) "Denaturant sensitive regions in creatine kinase identified by hydrogen/deuterium exchange" *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(11): 1461-8.
- Mazon H, Marcillat O, Forest E and Vial C (2005b) "Local dynamics measured by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry of creatine kinase digested by two proteases" *Biochimie* 87(12): 1101-10.
- McLafferty FW (1981) "Tandem mass spectrometry" *Science* 214(4518): 280-7.
- McPhail LC, Shirley PS, Clayton CC and Snyderman R (1985) "Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free system. Evidence for a soluble cofactor" *J Clin Invest* 75(5): 1735-9.
- Medzihradzky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML and Burlingame AL (2000) "The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer" *Anal Chem* 72(3): 552-8.
- Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K and Habermehl GG (1989) "Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha" *Biochem J* 263(2): 539-45.

- Meitzler JL and Ortiz de Montellano PR (2009) "Caenorhabditis elegans and human dual oxidase 1 (DUOX1) "peroxidase" domains: insights into heme binding and catalytic activity" *J Biol Chem* 284(28): 18634-43.
- Miyano K, Fukuda H, Ebisu K and Tamura M (2003) "Remarkable stabilization of neutrophil NADPH oxidase using RacQ61L and a p67phox-p47phox fusion protein" *Biochemistry* 42(1): 184-90.
- Miyano K, Koga H, Minakami R and Sumimoto H (2009) "The insert region of the Rac GTPases is dispensable for activation of superoxide-producing NADPH oxidases" *Biochem J* 422(2): 373-82.
- Miyano K, Ogasawara S, Han CH, Fukuda H and Tamura M (2001) "A fusion protein between rac and p67phox (1-210) reconstitutes NADPH oxidase with higher activity and stability than the individual components" *Biochemistry* 40(46): 14089-97.
- Mizrahi A, Molshanski-Mor S, Weinbaum C, Zheng Y, Hirshberg M and Pick E (2005) "Activation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac Guanine nucleotide exchange factors in conjunction with ATP and nucleoside diphosphate kinase" *J Biol Chem* 280(5): 3802-11.
- Mizuki K, Takeya R, Kuribayashi F, Nobuhisa I, Kohda D, Nunoi H, Takeshige K and Sumimoto H (2005) "A region C-terminal to the proline-rich core of p47phox regulates activation of the phagocyte NADPH oxidase by interacting with the C-terminal SH3 domain of p67phox" *Arch Biochem Biophys* 444(2): 185-94.
- Moe KT, Aulia S, Jiang F, Chua YL, Koh TH, Wong MC and Dusing GJ (2006) "Differential upregulation of Nox homologues of NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha in human aortic smooth muscle and embryonic kidney cells" *J Cell Mol Med* 10(1): 231-9.
- Molshanski-Mor S, Mizrahi A, Ugolev Y, Dahan I, Berdichevsky Y and Pick E (2007) "Cell-free assays: the reductionist approach to the study of NADPH oxidase assembly, or "all you wanted to know about cell-free assays but did not dare to ask"" *Methods Mol Biol* 412: 385-428.
- Morand S, Ueyama T, Tsujibe S, Saito N, Korzeniowska A and Leto TL (2009) "Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation" *Faseb J* 23(4): 1205-18.
- Morozov I, Lotan O, Joseph G, Gorzalczyk Y and Pick E (1998) "Mapping of functional domains in p47(phox) involved in the activation of NADPH oxidase by "peptide walking"" *J Biol Chem* 273(25): 15435-44.
- Morris HR, Paxton T, Dell A, Langhorne J, Berg M, Bordoli RS, Hoyes J and Bateman RH (1996) "High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer" *Rapid Commun Mass Spectrom* 10(8): 889-96.
- Morton VL, Stockley PG, Stonehouse NJ and Ashcroft AE (2008) "Insights into virus capsid assembly from non-covalent mass spectrometry" *Mass Spectrom Rev* 27(6): 575-95.
- Mouche S, Mkaddem SB, Wang W, Katic M, Tseng YH, Carnesecchi S, Steger K, Foti M, Meier CA, Muzzin P, Kahn CR, Ogier-Denis E and Szanto I (2007) "Reduced expression of the NADPH oxidase NOX4 is a hallmark of adipocyte differentiation" *Biochim Biophys Acta* 1773(7): 1015-27.
- Musset B, Cherny VV, Morgan D and DeCoursey TE (2009) "The intimate and mysterious relationship between proton channels and NADPH oxidase" *FEBS Lett* 583(1): 7-12.
- Musset B, Morgan D, Cherny VV, MacGlashan DW, Jr., Thomas LL, Rios E and DeCoursey TE (2008) "A pH-stabilizing role of voltage-gated proton channels in IgE-mediated activation of human basophils" *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(31): 11020-5.

- Nagasawa T, Ebisu K, Inoue Y, Miyano K and Tamura M (2003) "A new role of Pro-73 of p47phox in the activation of neutrophil NADPH oxidase" *Arch Biochem Biophys* 416(1): 92-100.
- Nakamura R, Sumimoto H, Mizuki K, Hata K, Ago T, Kitajima S, Takeshige K, Sakaki Y and Ito T (1998) "The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40phox and p67phox, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase" *Eur J Biochem* 251(3): 583-9.
- Nakanishi A, Imajoh-Ohmi S, Fujinawa T, Kikuchi H and Kanegasaki S (1992) "Direct evidence for interaction between COOH-terminal regions of cytochrome b558 subunits and cytosolic 47-kDa protein during activation of an O(2⁻)-generating system in neutrophils" *J Biol Chem* 267(27): 19072-4.
- Nappi M, Weil C, Cleven CD, Horn LA, Wollik H and Cooks RG (1997) "Visual representations of stimulated three-dimensional ion trajectories in an ion trap mass spectrometer." *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 161: 77-85.
- Nauseef WM (2001) "Contributions of myeloperoxidase to proinflammatory events: more than an antimicrobial system" *Int J Hematol* 74(2): 125-33.
- Nauseef WM (2004) "Assembly of the phagocyte NADPH oxidase" *Histochem Cell Biol* 122(4): 277-91.
- Nauseef WM (2008) "Biological roles for the NOX family NADPH oxidases" *J Biol Chem* 283(25): 16961-5.
- Nauseef WM, McCormick S, Renee J, Leidal KG and Clark RA (1993) "Functional domain in an arginine-rich carboxyl-terminal region of p47phox" *J Biol Chem* 268(31): 23646-51.
- Nisimoto Y, Freeman JL, Motalebi SA, Hirshberg M and Lambeth JD (1997) "Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase" *J Biol Chem* 272(30): 18834-41.
- Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH and Lambeth JD (1999) "The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558)" *J Biol Chem* 274(33): 22999-3005.
- Nisimoto Y, Ogawa H, Miyano K and Tamura M (2004) "Activation of the flavoprotein domain of gp91phox upon interaction with N-terminal p67phox (1-210) and the Rac complex" *Biochemistry* 43(29): 9567-75.
- Noack D, Heyworth PG, Curnutte JT, Rae J and Cross AR (1999) "A novel mutation in the CYBB gene resulting in an unexpected pattern of exon skipping and chronic granulomatous disease" *Biochim Biophys Acta* 1454(3): 270-4.
- Nobuhisa I, Takeya R, Ogura K, Ueno N, Kohda D, Inagaki F and Sumimoto H (2006) "Activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase requires co-operation between the tandem SH3 domains of p47phox in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent alpha-helix of p22phox" *Biochem J* 396(1): 183-92.
- Noda Y, Kohjima M, Izaki T, Ota K, Yoshinaga S, Inagaki F, Ito T and Sumimoto H (2003) "Molecular recognition in dimerization between PB1 domains" *J Biol Chem* 278(44): 43516-24.
- Novak P and Giannakopoulos AE (2007) "Chemical cross-linking and mass spectrometry as structure determination tools" *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* 13(2): 105-13.
- Nunoi H, Rotrosen D, Gallin JI and Malech HL (1988) "Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors" *Science* 242(4883): 1298-301.

- Ogura K, Nobuhisa I, Yuzawa S, Takeya R, Torikai S, Saikawa K, Sumimoto H and Inagaki F (2006) "NMR solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox complexed with a p22phox-derived proline-rich peptide" *J Biol Chem* 281(6): 3660-8.
- Onisko B, Dynin I, Requena JR, Silva CJ, Erickson M and Carter JM (2007) "Mass spectrometric detection of attomole amounts of the prion protein by nanoLC/MS/MS" *J Am Soc Mass Spectrom* 18(6): 1070-9.
- Paclet MH, Henderson LM, Campion Y, Morel F and Dagher MC (2004) "Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies" *Biochem J* 382(Pt 3): 981-6.
- 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 (2004) "Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase" *Genes Dev* 18(5): 486-91.
- Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM and Quinn MT (1997) "Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II" *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(26): 14483-8.
- Palmblad M, Buijs J and Hakansson P (2001) "Automatic analysis of hydrogen/deuterium exchange mass spectra of peptides and proteins using calculations of isotopic distributions" *J Am Soc Mass Spectrom* 12(11): 1153-62.
- Pan J, Han J, Borchers CH and Konermann L (2008) "Electron capture dissociation of electrosprayed protein ions for spatially resolved hydrogen exchange measurements" *J Am Chem Soc* 130(35): 11574-5.
- Pan J, Han J, Borchers CH and Konermann L (2009a) "Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry with top-down electron capture dissociation for characterizing structural transitions of a 17 kDa protein" *J Am Chem Soc* 131(35): 12801-8.
- Pan Y, Stocks BB, Brown L and Konermann L (2009b) "Structural characterization of an integral membrane protein in its natural lipid environment by oxidative methionine labeling and mass spectrometry" *Anal Chem* 81(1): 28-35.
- Paramelle D, Cantel S, Enjalbal C, Amblard M, Forest E, Heymann M, Geourjon C, Martinez J and Subra G (2009) "A new generation of cross-linkers for selective detection by MALDI MS" *Proteomics*.
- Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ and Bae YS (2004a) "Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B" *J Immunol* 173(6): 3589-93.
- Park HS, Lee SH, Park D, Lee JS, Ryu SH, Lee WJ, Rhee SG and Bae YS (2004b) "Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase, beta Pix, Rac1, and Nox1 in growth factor-induced production of H2O2" *Mol Cell Biol* 24(10): 4384-94.
- Park JW and Babior BM (1997) "Activation of the leukocyte NADPH oxidase subunit p47phox by protein kinase C. A phosphorylation-dependent change in the conformation of the C-terminal end of p47phox" *Biochemistry* 36(24): 7474-80.
- Park L, Zhou P, Pitstick R, Capone C, Anrather J, Norris EH, Younkin L, Younkin S, Carlson G, McEwen BS and Iadecola C (2008) "Nox2-derived radicals contribute to neurovascular and behavioral dysfunction in mice overexpressing the amyloid precursor protein" *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(4): 1347-52.
- Park MY, Imajoh-Ohmi S, Nunoi H and Kanegasaki S (1994) "Peptides corresponding to the region adjacent to His-94 in the small subunit of cytochrome b558 inhibit superoxide generation in a cell-free system from human neutrophils" *Biochem Biophys Res Commun* 204(2): 924-9.

- Park SM and Chatterjee VK (2005) "Genetics of congenital hypothyroidism" *J Med Genet* 42(5): 379-89.
- Parkos CA, Dinauer MC, Jesaitis AJ, Orkin SH and Curnutte JT (1989) "Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease" *Blood* 73(6): 1416-20.
- Patel M, Li QY, Chang LY, Crapo J and Liang LP (2005) "Activation of NADPH oxidase and extracellular superoxide production in seizure-induced hippocampal damage" *J Neurochem* 92(1): 123-31.
- Paul W and Steinwedel H (1953) "Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld" *Zeitschrift für Naturforschung* 8(7): 448-450.
- Paul W and Steinwedel H (1960) "Apparatus for separating charged particles of different specific charges." German Patent 944,900; US Patent 2,944,952.
- Pawson T and Gish GD (1992) "SH2 and SH3 domains: from structure to function" *Cell* 71(3): 359-62.
- 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 (2004) "NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells" *Mol Cell Biol* 24(24): 10703-17.
- Peng G, Huang J, Boyd M and Kleinberg ME (2003) "Properties of phagocyte NADPH oxidase p47-phox mutants with unmasked SH3 (Src homology 3) domains: full reconstitution of oxidase activity in a semi-recombinant cell-free system lacking arachidonic acid" *Biochem J* 373(Pt 1): 221-9.
- Petry A, Djordjevic T, Weitnauer M, Kietzmann T, Hess J and Gohlke A (2006) "NOX2 and NOX4 mediate proliferative response in endothelial cells" *Antioxid Redox Signal* 8(9-10): 1473-84.
- Piccoli C, Ria R, Scrima R, Cela O, D'Aprile A, Boffoli D, Falzetti F, Tabilio A and Capitanio N (2005) "Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity" *J Biol Chem* 280(28): 26467-76.
- Piirila H, Valiaho J and Vihinen M (2006) "Immunodeficiency mutation databases (IDbases)" *Hum Mutat* 27(12): 1200-8.
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F and Chiarotto E (2004) "Oxidative stress and cell signalling" *Curr Med Chem* 11(9): 1163-82.
- Poliakov A, Jardine P and Prevelige PE (2008) "Hydrogen/deuterium exchange on protein solutions containing nucleic acids: utility of protamine sulfate" *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(16): 2423-8.
- Ponting CP (1996) "Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains?" *Protein Sci* 5(11): 2353-7.
- Qin B, Cartier L, Dubois-Dauphin M, Li B, Serrander L and Krause KH (2006) "A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons" *Neurobiol Aging* 27(11): 1577-87.
- Quie PG, White JG, Holmes B and Good RA (1967) "In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood" *J Clin Invest* 46(4): 668-79.
- Raad H, Paclat MH, Boussetta T, Kroviarski Y, Morel F, Quinn MT, Gougerot-Pocidallo MA, Dang PM 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(4): 1011-22.

- Rand KD, Adams CM, Zubarev RA and Jorgensen TJ (2008) "Electron capture dissociation proceeds with a low degree of intramolecular migration of peptide amide hydrogens" *J Am Chem Soc* 130(4): 1341-9.
- Rand KD, Zehl M, Jensen ON and Jorgensen TJ (2009) "Protein hydrogen exchange measured at single-residue resolution by electron transfer dissociation mass spectrometry" *Anal Chem* 81(14): 5577-84.
- Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J and Segal AW (2002) "Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux" *Nature* 416(6878): 291-7.
- Regier DS, Greene DG, Sergeant S, Jesaitis AJ and McPhail LC (2000) "Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation" *J Biol Chem* 275(37): 28406-12.
- Rekas A, Adda CG, Andrew Aquilina J, Barnham KJ, Sunde M, Galatis D, Williamson NA, Masters CL, Anders RF, Robinson CV, Cappai R and Carver JA (2004) "Interaction of the molecular chaperone alphaB-crystallin with alpha-synuclein: effects on amyloid fibril formation and chaperone activity" *J Mol Biol* 340(5): 1167-83.
- Renwick J, Reeves EP, Wientjes FB and Kavanagh K (2007) "Translocation of proteins homologous to human neutrophil p47phox and p67phox to the cell membrane in activated hemocytes of *Galleria mellonella*" *Dev Comp Immunol* 31(4): 347-59.
- Rey M, Man P, Brandolin G, Forest E and Pelosi L (2009) "Recombinant immobilized rhizopuspepsin as a new tool for protein digestion in H/D exchange mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrom* in press.
- Robinson CV (2005) "Watching and weighting--chaperone complexes in action" *Nat Methods* 2(5): 331-2.
- Robinson CV, Gross M, Eyles SJ, Ewbank JJ, Mayhew M, Hartl FU, Dobson CM and Radford SE (1994) "Conformation of GroEL-bound alpha-lactalbumin probed by mass spectrometry" *Nature* 372(6507): 646-51.
- Robinson CV, Sali A and Baumeister W (2007) "The molecular sociology of the cell" *Nature* 450(7172): 973-82.
- Rodaway AR, Teahan CG, Casimir CM, Segal AW and Bentley DL (1990) "Characterization of the 47-kilodalton autosomal chronic granulomatous disease protein: tissue-specific expression and transcriptional control by retinoic acid" *Mol Cell Biol* 10(10): 5388-96.
- Roepstorff P and Fohlman J (1984) "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides" *Biomed Mass Spectrom* 11(11): 601.
- 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(9-10): 1573-82.
- Rubin BB, Downey GP, Koh A, Degousee N, Ghomashchi F, Nallan L, Stefanski E, Harkin DW, Sun C, Smart BP, Lindsay TF, Cherepanov V, Vachon E, Kelvin D, Sadilek M, Brown GE, Yaffe MB, Plumb J, Grinstein S, Glogauer M and Gelb MH (2005) "Cytosolic phospholipase A2-alpha is necessary for platelet-activating factor biosynthesis, efficient neutrophil-mediated bacterial killing, and the innate immune response to pulmonary infection: cPLA2-alpha does not regulate neutrophil NADPH oxidase activity" *J Biol Chem* 280(9): 7519-29.
- Ruotolo BT, Giles K, Campuzano I, Sandercock AM, Bateman RH and Robinson CV (2005) "Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water" *Science* 310(5754): 1658-61.
- Salles N, Szanto I, Herrmann F, Armenian B, Stumm M, Stauffer E, Michel JP and Krause KH (2005) "Expression of mRNA for ROS-generating NADPH oxidases in the aging stomach" *Exp Gerontol* 40(4): 353-7.

- Sancho P, Bertran E, Caja L, Carmona-Cuenca I, Murillo MM and Fabregat I (2009) "The inhibition of the epidermal growth factor (EGF) pathway enhances TGF-beta-induced apoptosis in rat hepatoma cells through inducing oxidative stress coincident with a change in the expression pattern of the NADPH oxidases (NOX) isoforms" *Biochim Biophys Acta* 1793(2): 253-63.
- Sathyamoorthy M, de Mendez I, Adams AG and Leto TL (1997) "p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain" *J Biol Chem* 272(14): 9141-6.
- Sauer H, Rahimi G, Hescheler J and Wartenberg M (2000) "Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells" *FEBS Lett* 476(3): 218-23.
- Sauer H and Wartenberg M (2005) "Reactive oxygen species as signaling molecules in cardiovascular differentiation of embryonic stem cells and tumor-induced angiogenesis" *Antioxid Redox Signal* 7(11-12): 1423-34.
- Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, Lennon-Dumenil AM, Seabra MC, Raposo G and Amigorena S (2006) "NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells" *Cell* 126(1): 205-18.
- Savina A, Peres A, Cebrian I, Carmo N, Moita C, Hacohen N, Moita LF and Amigorena S (2009) "The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalinization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells" *Immunity* 30(4): 544-55.
- Schappi MG, Jaquet V, Belli DC and Krause KH (2008) "Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase" *Semin Immunopathol* 30(3): 255-71.
- Scheffzek K, Stephan I, Jensen ON, Illenberger D and Gierschik P (2000) "The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI" *Nat Struct Biol* 7(2): 122-6.
- Schwarzer C, Machen TE, Illek B and Fischer H (2004) "NADPH oxidase-dependent acid production in airway epithelial cells" *J Biol Chem* 279(35): 36454-61.
- Seeley EH and Caprioli RM (2008) "Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry" *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(47): 18126-31.
- Segal AW (1996) "The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease" *Mol Med Today* 2(3): 129-35.
- Segal AW, Cross AR, Garcia RC, Borregaard N, Valerius NH, Soothill JF and Jones OT (1983) "Absence of cytochrome b-245 in chronic granulomatous disease. A multicenter European evaluation of its incidence and relevance" *N Engl J Med* 308(5): 245-51.
- Segal AW, Heyworth PG, Cockcroft S and Barrowman MM (1985) "Stimulated neutrophils from patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease fail to phosphorylate a Mr-44,000 protein" *Nature* 316(6028): 547-9.
- Segal AW and Jones OT (1978) "Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes" *Nature* 276(5687): 515-7.
- Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL and Holland SM (2000) "Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease" *Medicine (Baltimore)* 79(3): 170-200.
- Sethi G, Ahn KS, Pandey MK and Aggarwal BB (2007) "Celastrol, a novel triterpene, potentiates TNF-induced apoptosis and suppresses invasion of tumor cells by inhibiting NF-kappaB-regulated gene products and TAK1-mediated NF-kappaB activation" *Blood* 109(7): 2727-35.
- Seyfried NT, Atwood JA, 3rd, Yongye A, Almond A, Day AJ, Orlando R and Woods RJ (2007) "Fourier transform mass spectrometry to monitor hyaluronan-protein

- interactions: use of hydrogen/deuterium amide exchange" *Rapid Commun Mass Spectrom* 21(2): 121-31.
- Shen K, Sergeant S, Hantgan RR, McPhail LC and Horita DA (2008) "Mutations in the PX-SH3A linker of p47phox decouple PI(3,4)P2 binding from NADPH oxidase activation" *Biochemistry* 47(34): 8855-65.
- Shen Z, Thomas JJ, Averbuj C, Broo KM, Engelhard M, Crowell JE, Finn MG and Siuzdak G (2001) "Porous silicon as a versatile platform for laser desorption/ionization mass spectrometry" *Anal Chem* 73(3): 612-9.
- Sheshberadaran H and Payne LG (1988) "Protein antigen-monoclonal antibody contact sites investigated by limited proteolysis of monoclonal antibody-bound antigen: protein "footprinting"" *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(1): 1-5.
- Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hiraata 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(2): 1417-23.
- Shiose A and Sumimoto H (2000) "Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase" *J Biol Chem* 275(18): 13793-801.
- Sigal N, Gorzalczany Y and Pick E (2003) "Two pathways of activation of the superoxide-generating NADPH oxidase of phagocytes in vitro--distinctive effects of inhibitors" *Inflammation* 27(3): 147-59.
- Siler U, Ott MG, Stein S, Karaus E, Rutishauser M, Wenk C, Hoelzer D, Grez M and Seger R (2005) "Chronic granulomatous disease gene therapy functionally corrects the phenotype of polymorphonuclear leukocytes (PMN)" *Mol Ther* 11: (Suppl 1) S129 DOI 10.1016/j.ymthe.2005.06.335.
- Simmons DA, Dunn SD and Konermann L (2003) "Conformational dynamics of partially denatured myoglobin studied by time-resolved electrospray mass spectrometry with online hydrogen-deuterium exchange" *Biochemistry* 42(19): 5896-905.
- Sinz A (2003) "Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes" *J Mass Spectrom* 38(12): 1225-37.
- Sinz A and Wang K (2001) "Mapping protein interfaces with a fluorogenic cross-linker and mass spectrometry: application to nebulin-calmodulin complexes" *Biochemistry* 40(26): 7903-13.
- Stahelin RV, Burian A, Bruzik KS, Murray D and Cho W (2003) "Membrane binding mechanisms of the PX domains of NADPH oxidase p40phox and p47phox" *J Biol Chem* 278(16): 14469-79.
- Stasia MJ (2007) "[The X+ chronic granulomatous disease as a fabulous model to study the NADPH oxidase complex activation]" *Med Sci (Paris)* 23(5): 526-32.
- Stasia MJ, Bordigoni P, Floret D, Brion JP, Bost-Bru C, Michel G, Gatel P, Durant-Vital D, Voelckel MA, Li XJ, Guillot M, Maquet E, Martel C and Morel F (2005) "Characterization of six novel mutations in the CYBB gene leading to different subtypes of X-linked chronic granulomatous disease" *Hum Genet* 116(1-2): 72-82.
- Stasia MJ and Li XJ (2008) "Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease" *Semin Immunopathol* 30(3): 209-35.
- Stefanowicz P, Petry-Podgorska I, Kowalewska K, Jaremko L, Jaremko M and Szewczuk Z (2009) "Electrospray mass spectrometry as a method for studying the high pressure denaturation of proteins" *Biosci Rep*.
- Stein S, Siler U, Ott MG, Seger R and Grez M (2006) "Gene therapy for chronic granulomatous disease" *Curr Opin Mol Ther* 8(5): 415-22.
- Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M and Cooper DN (2003) "Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update" *Hum Mutat* 21(6): 577-81.

- Stephen WE (1946) "A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion" *Phys. Rev.* 69: 691.
- Stocks BB and Konermann L (2009) "Structural characterization of short-lived protein unfolding intermediates by laser-induced oxidative labeling and mass spectrometry" *Anal Chem* 81(1): 20-7.
- Strupat K, Karas M and Hillenkamp F (1991) "2,5-Dihydroxybenzoic acid : a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry" *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 111: 89-102.
- Sturrock A, Cahill B, Norman K, Huecksteadt TP, Hill K, Sanders K, Karwande SV, Stringham JC, Bull DA, Gleich M, Kennedy TP and Hoidal JR (2006) "Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells" *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(4): L661-L673.
- Suckau D, Kohl J, Karwath G, Schneider K, Casaretto M, Bitter-Suermann D and Przybylski M (1990) "Molecular epitope identification by limited proteolysis of an immobilized antigen-antibody complex and mass spectrometric peptide mapping" *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 9848-52.
- Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J and Holle A (2003) "A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics" *Anal Bioanal Chem* 376(7): 952-65.
- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK and Lambeth JD (1999) "Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1" *Nature* 401(6748): 79-82.
- Suliman HB, Ali M and Piantadosi CA (2004) "Superoxide dismutase-3 promotes full expression of the EPO response to hypoxia" *Blood* 104(1): 43-50.
- Sumimoto H (2008) "Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species" *Febs J* 275(13): 3249-77.
- Sumimoto H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, Fukumaki Y, Nakamura M and Takeshige K (1996) "Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase" *J Biol Chem* 271(36): 22152-8.
- Sumimoto H, Kage Y, Nunoi H, Sasaki H, Nose T, Fukumaki Y, Ohno M, Minakami S and Takeshige K (1994) "Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase" *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12): 5345-9.
- Sumimoto H, Kamakura S and Ito T (2007) "Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants" *Sci STKE* 2007(401): re6.
- Sumimoto H, Miyano K and Takeya R (2005) "Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases" *Biochem Biophys Res Commun* 338(1): 677-86.
- Swain SD, Helgerson SL, Davis AR, Nelson LK and Quinn MT (1997) "Analysis of activation-induced conformational changes in p47phox using tryptophan fluorescence spectroscopy" *J Biol Chem* 272(47): 29502-10.
- Sweet SM and Cooper HJ (2007) "Electron capture dissociation in the analysis of protein phosphorylation" *Expert Rev Proteomics* 4(2): 149-59.
- Syka JE, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J and Hunt DF (2004) "Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry" *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26): 9528-33.
- Szanto I, Rubbia-Brandt L, Kiss P, Steger K, Banfi B, Kovari E, Herrmann F, Hadengue A and Krause KH (2005) "Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease" *J Pathol* 207(2): 164-76.

- Szaszi K, Korda A, Wolfl J, Paclet MH, Morel F and Ligeti E (1999) "Possible role of RAC-GTPase-activating protein in the termination of superoxide production in phagocytic cells" *Free Radic Biol Med* 27(7-8): 764-72.
- Szocs K, Lassegue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, Wilcox JN, Quinn MT, Lambeth JD and Griending KK (2002) "Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(1): 21-7.
- Takamoto K and Chance MR (2006) "Radiolytic protein footprinting with mass spectrometry to probe the structure of macromolecular complexes" *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35: 251-76.
- 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(27): 25234-46.
- Tang J (1963) "Specificity of Pepsin and Its Dependence on a Possible 'Hydrophobicbinding Site'" *Nature* 199: 1094-5.
- Taura M, Miyano K, Minakami R, Kamakura S, Takeya R and Sumimoto H (2009) "A region N-terminal to the tandem SH3 domain of p47phox plays a crucial role in the activation of the phagocyte NADPH oxidase" *Biochem J* 419(2): 329-38.
- Taylor RM, Baniulis D, Burritt JB, Gripenrog JM, Lord CI, Riesselman MH, Maaty WS, Bothner BP, Angel TE, Dratz EA, Linton GF, Malech HL and Jesaitis AJ (2006) "Analysis of human phagocyte flavocytochrome b(558) by mass spectrometry" *J Biol Chem* 281(48): 37045-56.
- Taylor RM, Burritt JB, Baniulis D, Foubert TR, Lord CI, Dinauer MC, Parkos CA and Jesaitis AJ (2004) "Site-specific inhibitors of NADPH oxidase activity and structural probes of flavocytochrome b: characterization of six monoclonal antibodies to the p22phox subunit" *J Immunol* 173(12): 7349-57.
- Taylor RM, Lord CI, Riesselman MH, Gripenrog JM, Leto TL, McPhail LC, Berdichevsky Y, Pick E and Jesaitis AJ (2007) "Characterization of surface structure and p47phox SH3 domain-mediated conformational changes for human neutrophil flavocytochrome b" *Biochemistry* 46(49): 14291-304.
- Taylor WR, Jones DT and Segal AW (1993) "A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain" *Protein Sci* 2(10): 1675-85.
- Thomson JJ (1913) "On the Appearance of Helium and Neon in Vacuum Tubes" *Science* 37(949): 360-364.
- Tobler SA, Holmes BW, Cromwell ME and Fernandez EJ (2004) "Benzyl alcohol-induced destabilization of interferon-gamma: a study by hydrogen-deuterium isotope exchange" *J Pharm Sci* 93(6): 1605-17.
- Toporik A, Gorzalczany Y, Hirshberg M, Pick E and Lotan O (1998) "Mutational analysis of novel effector domains in Rac1 involved in the activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced) oxidase" *Biochemistry* 37(20): 7147-56.
- Trester-Zedlitz M, Kamada K, Burley SK, Fenyo D, Chait BT and Muir TW (2003) "A modular cross-linking approach for exploring protein interactions" *J Am Chem Soc* 125(9): 2416-25.
- Tsunawaki S, Kagara S, Yoshikawa K, Yoshida LS, Kuratsuji T and Namiki H (1996) "Involvement of p40phox in activation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, but not its amino-terminal, with p67phox" *J Exp Med* 184(3): 893-902.
- Tullius TD and Dombroski BA (1986) "Hydroxyl radical "footprinting": high-resolution information about DNA-protein contacts and application to lambda repressor and Cro protein" *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(15): 5469-73.

- Tuma R, Coward LU, Kirk MC, Barnes S and Prevelige PE, Jr. (2001) "Hydrogen-deuterium exchange as a probe of folding and assembly in viral capsids" *J Mol Biol* 306(3): 389-96.
- Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H and Sumimoto H (2005) "The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators" *J Biol Chem* 280(24): 23328-39.
- Ueyama T, Geiszt M and Leto TL (2006) "Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases" *Mol Cell Biol* 26(6): 2160-74.
- Ueyama T, Kusakabe T, Karasawa S, Kawasaki T, Shimizu A, Son J, Leto TL, Miyawaki A and Saito N (2008) "Sequential binding of cytosolic Phox complex to phagosomes through regulated adaptor proteins: evaluation using the novel monomeric Kusabira-Green System and live imaging of phagocytosis" *J Immunol* 181(1): 629-40.
- Ueyama T, Tatsuno T, Kawasaki T, Tsujibe S, Shirai Y, Sumimoto H, Leto TL and Saito N (2007) "A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox" *Mol Biol Cell* 18(2): 441-54.
- Ugolev Y, Berdichevsky Y, Weinbaum C and Pick E (2008) "Dissociation of Rac1(GDP).RhoGDI complexes by the cooperative action of anionic liposomes containing phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, Rac guanine nucleotide exchange factor, and GTP" *J Biol Chem* 283(32): 22257-71.
- Ugolev Y, Molshanski-Mor S, Weinbaum C and Pick E (2006) "Liposomes comprising anionic but not neutral phospholipids cause dissociation of Rac(1 or 2) x RhoGDI complexes and support amphiphile-independent NADPH oxidase activation by such complexes" *J Biol Chem* 281(28): 19204-19.
- Uhlinger DJ, Burnham DN and Lambeth JD (1991) "Nucleoside triphosphate requirements for superoxide generation and phosphorylation in a cell-free system from human neutrophils. Sodium dodecyl sulfate and diacylglycerol activate independently of protein kinase C" *J Biol Chem* 266(31): 20990-7.
- Umei T, Takeshige K and Minakami S (1987) "NADPH-binding component of the superoxide-generating oxidase in unstimulated neutrophils and the neutrophils from the patients with chronic granulomatous disease" *Biochem J* 243(2): 467-72.
- Ushio-Fukai M (2007) "VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS" *Antioxid Redox Signal* 9(6): 731-9.
- Ushio-Fukai M and Alexander RW (2004) "Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase" *Mol Cell Biochem* 264(1-2): 85-97.
- Ushio-Fukai M and Nakamura Y (2008) "Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy" *Cancer Lett* 266(1): 37-52.
- Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C and Alexander RW (2002) "Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis" *Circ Res* 91(12): 1160-7.
- Valaskovic GA, Kelleher NL and McLafferty FW (1996) "Attomole protein characterization by capillary electrophoresis-mass spectrometry" *Science* 273(5279): 1199-202.
- Vallet P, Charnay Y, Steger K, Ogier-Denis E, Kovari E, Herrmann F, Michel JP and Szanto I (2005) "Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia" *Neuroscience* 132(2): 233-8.
- Van Buul JD, Fernandez-Borja M, Anthony EC and Hordijk PL (2005) "Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells" *Antioxid Redox Signal* 7(3-4): 308-17.

- van der Vliet A (2008) "NADPH oxidases in lung biology and pathology: host defense enzymes, and more" *Free Radic Biol Med* 44(6): 938-55.
- van Duijn E, Simmons DA, van den Heuvel RH, Bakkes PJ, van Heerikhuizen H, Heeren RM, Robinson CV, van der Vies SM and Heck AJ (2006) "Tandem mass spectrometry of intact GroEL-substrate complexes reveals substrate-specific conformational changes in the trans ring" *J Am Chem Soc* 128(14): 4694-702.
- Vasilescu J and Figeys D (2006) "Mapping protein-protein interactions by mass spectrometry" *Curr Opin Biotechnol* 17(4): 394-9.
- Vergnaud S, Pacllet MH, El Benna J, Pocardalo MA and Morel F (2000) "Complementation of NADPH oxidase in p67-phox-deficient CGD patients p67-phox/p40-phox interaction" *Eur J Biochem* 267(4): 1059-67.
- Vestal ML, Juhasz P and Martin SA (1995) "Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry" *Rapid Commun Mass Spectrom* 9(11): 1044-1050.
- Videler H, Ilag LL, McKay AR, Hanson CL and Robinson CV (2005) "Mass spectrometry of intact ribosomes" *FEBS Lett* 579(4): 943-7.
- Vieira OV, Botelho RJ and Grinstein S (2002) "Phagosome maturation: aging gracefully" *Biochem J* 366(Pt 3): 689-704.
- Vignais PV (2002) "The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism" *Cell Mol Life Sci* 59(9): 1428-59.
- Vigone MC, Fugazzola L, Zamproni I, Passoni A, Di Candia S, Chiumello G, Persani L and Weber G (2005) "Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings" *Hum Mutat* 26(4): 395.
- Vilhardt F, Plastre O, Sawada M, Suzuki K, Wiznerowicz M, Kiyokawa E, Trono D and Krause KH (2002) "The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation" *J Biol Chem* 277(44): 42136-43.
- Volpp BD, Nauseef WM and Clark RA (1988) "Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease" *Science* 242(4883): 1295-7.
- Walder CE, Green SP, Darbonne WC, Mathias J, Rae J, Dinauer MC, Curnutte JT and Thomas GR (1997) "Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase" *Stroke* 28(11): 2252-8.
- Wallach TM and Segal AW (1997) "Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro" *Biochem J* 321 (Pt 3): 583-5.
- Wang D, De Deken X, Milenkovic M, Song Y, Pirson I, Dumont JE and Miot F (2005) "Identification of a novel partner of duox: EFP1, a thioredoxin-related protein" *J Biol Chem* 280(4): 3096-103.
- Wang F, Scapin G, Blanchard JS and Angeletti RH (1998). Substrate binding and conformational changes of *Clostridium glutamicum* diaminopimelate dehydrogenase revealed by hydrogen/deuterium exchange and electrospray mass spectrometry. *Protein Sci.* 7: 293-9.
- Welch HC, Coadwell WJ, Ellson CD, Ferguson GJ, Andrews SR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hawkins PT and Stephens LR (2002) "P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac" *Cell* 108(6): 809-21.
- Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF and Segal AW (1993) "p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains" *Biochem J* 296 (Pt 3): 557-61.

- Wientjes FB, Panayotou G, Reeves E and Segal AW (1996) "Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox" *Biochem J* 317 (Pt 3): 919-24.
- Wiley WC and McLaren IH (1955) "Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution" *Rev. Sci. Instrum.* 26: 1150.
- Williams DA, Tao W, Yang F, Kim C, Gu Y, Mansfield P, Levine JE, Petryniak B, Dorrow CW, Harris C, Jia B, Zheng Y, Ambruso DR, Lowe JB, Atkinson SJ, Dinauer MC and Boxer L (2000) "Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency" *Blood* 96(5): 1646-54.
- Williams HC and Griendling KK (2007) "NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents?" *J Cardiovasc Pharmacol* 50(1): 9-16.
- Williams JG, Tomer KB, Hioe CE, Zolla-Pazner S and Norris PJ (2006) "The antigenic determinants on HIV p24 for CD4+ T cell inhibiting antibodies as determined by limited proteolysis, chemical modification, and mass spectrometry" *J Am Soc Mass Spectrom* 17(11): 1560-9.
- Wilm M and Mann M (1996) "Analytical properties of the nanoelectrospray ion source" *Anal Chem* 68(1): 1-8.
- Wilson L, Butcher C, Finan P and Kellie S (1997) "SH3 domain-mediated interactions involving the phox components of the NADPH oxidase" *Inflamm Res* 46(7): 265-71.
- Wilson MI, Gill DJ, Perisic O, Quinn MT and Williams RL (2003) "PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62" *Mol Cell* 12(1): 39-50.
- Wingler K, Wunsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M and Schmidt HH (2001) "Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo" *Free Radic Biol Med* 31(11): 1456-64.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P and Halbwachs-Mecarelli L (2000) "Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects" *Lab Invest* 80(5): 617-53.
- Wu DC, Re DB, Nagai M, Ischiropoulos H and Przedborski S (2006) "The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice" *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32): 12132-7.
- Wu F, Han M and Wilson JX (2009) "Tripterine prevents endothelial barrier dysfunction by inhibiting endogenous peroxynitrite formation" *Br J Pharmacol* 157(6): 1014-23.
- Yamagishi S, Nakamura K, Ueda S, Kato S and Imaizumi T (2005) "Pigment epithelium-derived factor (PEDF) blocks angiotensin II signaling in endothelial cells via suppression of NADPH oxidase: a novel anti-oxidative mechanism of PEDF" *Cell Tissue Res* 320(3): 437-45.
- Yamaura M, Mitsushita J, Furuta S, Kiniwa Y, Ashida A, Goto Y, Shang WH, Kubodera M, Kato M, Takata M, Saida T and Kamata T (2009) "NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression" *Cancer Res* 69(6): 2647-54.
- Yang H, Chen D, Cui QC, Yuan X and Dou QP (2006) "Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese "Thunder of God Vine," is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice" *Cancer Res* 66(9): 4758-65.
- Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W and Key L (2001) "A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts" *J Biol Chem* 276(8): 5452-8.
- Yang S, Zhang Y, Ries W and Key L (2004) "Expression of Nox4 in osteoclasts" *J Cell Biochem* 92(2): 238-48.

- Yi J and Skalka AM (2000) "Mapping epitopes of monoclonal antibodies against HIV-1 integrase with limited proteolysis and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry" *Biopolymers* 55(4): 308-18.
- Yost RA (1978) "Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer" *J Am Chem Soc* 100(7): 2274-2275.
- Yu L, Quinn MT, Cross AR and Dinauer MC (1998) "Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase" *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 7993-8.
- Yu L, Zhen L and Dinauer MC (1997) "Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits" *J Biol Chem* 272(43): 27288-94.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ and Heintz N (2003) "Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor" *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 15077-82.
- Yuzawa S, Ogura K, Horiuchi M, Suzuki NN, Fujioka Y, Kataoka M, Sumimoto H and Inagaki F (2004a) "Solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox in an autoinhibited form" *J Biol Chem* 279(28): 29752-60.
- Yuzawa S, Suzuki NN, Fujioka Y, Ogura K, Sumimoto H and Inagaki F (2004b) "A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase" *Genes Cells* 9(5): 443-56.
- Zekry D, Epperson TK and Krause KH (2003) "A role for NOX NADPH oxidases in Alzheimer's disease and other types of dementia?" *IUBMB Life* 55(6): 307-13.
- Zhan Y, Virbasius JV, Song X, Pomerleau DP and Zhou GW (2002) "The p40phox and p47phox PX domains of NADPH oxidase target cell membranes via direct and indirect recruitment by phosphoinositides" *J Biol Chem* 277(6): 4512-8.
- Zhang HM, Kazazic S, Schaub TM, Tipton JD, Emmett MR and Marshall AG (2008) "Enhanced Digestion Efficiency, Peptide Ionization Efficiency, and Sequence Resolution for Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry" *Anal Chem*.
- Zhang W, Wang T, Qin L, Gao HM, Wilson B, Ali SF, Zhang W, Hong JS and Liu B (2004) "Neuroprotective effect of dextromethorphan in the MPTP Parkinson's disease model: role of NADPH oxidase" *Faseb J* 18(3): 589-91.
- Zhang Z and Marshall AG (1998) "A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra" *J Am Soc Mass Spectrom* 9(3): 225-33.
- Zhang Z and Smith DL (1993) "Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation" *Protein Sci* 2(4): 522-31.
- Zhao X, Bey EA, Wientjes FB and Cathcart MK (2002) "Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) regulation of human monocyte NADPH oxidase activity. cPLA2 affects translocation but not phosphorylation of p67(phox) and p47(phox)" *J Biol Chem* 277(28): 25385-92.
- Zhao X, Carnevale KA and Cathcart MK (2003) "Human monocytes use Rac1, not Rac2, in the NADPH oxidase complex" *J Biol Chem* 278(42): 40788-92.
- Zhen L, Yu L and Dinauer MC (1998) "Probing the role of the carboxyl terminus of the gp91phox subunit of neutrophil flavocytochrome b558 using site-directed mutagenesis" *J Biol Chem* 273(11): 6575-81.
- Zhou B, Zhang J, Liu S, Reddy S, Wang F and Zhang ZY (2006) "Mapping ERK2-MKP3 binding interfaces by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry" *J Biol Chem* 281(50): 38834-44.

- Zhou M, Sandercock AM, Fraser CS, Ridlova G, Stephens E, Schenauer MR, Yokoi-Fong T, Barsky D, Leary JA, Hershey JW, Doudna JA and Robinson CV (2008) "Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3" *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(47): 18139-44.
- Zhou YX and Huang YL (2009) "Antiangiogenic effect of celastrol on the growth of human glioma: an in vitro and in vivo study" *Chin Med J (Engl)* 122(14): 1666-73.
- Zubarev RA (2004) "Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry" *Curr Opin Biotechnol* 15(1): 12-6.
- Zubarev RA, Kelleher NL and McLafferty FW (1998) "Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Non-ergodic Process " *J Am Chem Soc* 120: 3265-3266.

ANNEXES

GST-p47^{phox}FL



Longueur : 633 acides aminés

Masse moléculaire moyenne : MW = 72718,49 Da

Point isoélectrique : Pi = 7,72

Coefficient d'extinction : $\epsilon = 101355$

Description :

Contient les résidus 1-226 de l'étiquette GST (jaune) suivie de 10 résidus du plasmide pGex-6P (gris) et des résidus 1-397 de p47^{phox}.

Séquence :

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
YIDGDVKL TQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERA EISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDF
ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCL
DAFPKLVCFKKRIE AIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLFGQP
LGSPNSARMGDTFIRHIALLGFEKRFVPSQH YVYMFLVKWQDLSEKVVYRRFTEICEF
HKTLKEMFPIEAGAINPENRIIPHLPAK WFDGQRAAENRQGLTEYCSTLMSLPTKIS
RCPHLLDFFKVRPDDLKLPTDNQTK EPETYLMPKDGKSTATDITGPILQTYRAIADYE
KTSGSEMALSTGDVVEVVEKSESGWWFCQM KAKRGWIPASFLEPLDSPDETEDPEPN
YAGEPYVAIKAYTAVEGDEVSLLEGEAVEVIHKLLDGWWVIRKDDVTGYFPSMYLQ
KSGQDVSQAQRQIKRGAPRRSSIRNAHSI HQRSRKRLSQDAYRRNSVRFLQQRRRQ
ARPGPQSPGSPLEERQTQRSKPQPAVPPRPSADLILNRCSESTKRK LASAVCGRIVTD

Plasmide : pGEX-6P-3

p47^{phox}FL



Longueur : 407 acides aminés

Masse moléculaire moyenne : MW = 46364,8 Da

Point isoélectrique : Pi = 9,38

Coefficient d'extinction : $\epsilon = 59610$

Description :

Contient 10 résidus du plasmide pGex-6P (gris) suivis des résidus 1-397 de p47^{phox}.

Séquence :

GPLGSPNSARMGDTFIRHIALLGFEKRFVPSQHYVYMFLVKWQDLSEKVVYRRFTEI
CEFHKTLKEMFPIEAGAINPENRIIHPAPK WFDGQRAAENRQGTLTEYCSTLMSLPT
KISRCPHLLDFFKVRPDDLKLPDNTQKPEPTYLMPKDGKSTATDITGPILQTYRAIA
DYEKTSGSEMALSTGDVVEVVEKSESGWWFCQMKAKRGWIPASFLEPLDSPDETED
PEPNYAGEPYVAIKAYTAVEGDEVSLLEGEAVEVIHKLLDGWWVIRKDDVTGYFPS
MYLQKSGQDVSQAQRQIKRGAPPRSSIRNAHSIHQRSRKRLSQDAYRRNSVRFLQQ
RRRQARPGPQSPGSPLEERQTQRSKPQPAVPPRPSADLILNRCSESTKRKLASAVCGR
IVTD

Mutants :

Nom	Résidus	M.W	Longueur	Pi	ϵ
p47 ^{phox} C48 E135-FL	1-397	46305,71	407	9,02	58245
p47 ^{phox} S303E/S304E/S328E-FL	1-397	46490,91	407	8,98	59610

Plasmide : pGEX-6P-3

p47^{phox}ΔCTer



Longueur : 352 acides aminés

Masse moléculaire moyenne : MW = 40399,02 Da

Point isoélectrique : Pi = 9,27

Coefficient d'extinction : $\epsilon = 59485$

Description :

Contient 10 résidus du plasmide pGex-6P (gris) suivis des résidus 1-342 de p47^{phox}.

Séquence :

GPLGSPNSARMGDTFIRHIALLGFEKRFVPSQHYVYMFLVKWQDLSEKVVYRRFTEI
CEFHKTLKEMFPIEAGAINPENRIIPLPAPKWFDGQRAAENRQGTLTEYCSLMSLPT
KISRCPHLLDFFKVRPDDLKLPDNTQTKPETYLMPKDGKSTATDITGPIILQTYRAIA
DYEKTSGSEMALSTGDVVEVVEKSESGWWFCQMKAKRGWIPASFLEPLDSPDETED
PEPNYAGEPYVAIKAYTAVEGDEVSLLEGEAVEVIHKLLDGWWVIRKDDVTGYFPS
MYLQKSGQDVSQAQRQIKRGAPRRSSIRNAHSIHQRSRKRLSQDAYRRNSVRFLQQ
RRRQARPG

Mutants :

Nom	Résidus	M.W	Longueur	Pi	ϵ
p47 ^{phox} S303E/S304E/S328E-ΔCTer	1-342	40525,13	352	8,67	59485
p47 ^{phox} D82A-ΔCTer	1-342	40355,01	352	9,39	59485
p47 ^{phox} R314A-ΔCTer	1-342	40313,92	352	9,11	59485
p47 ^{phox} D82A/R314A-ΔCTer	1-342	40269,91	352	9,27	59485
p47 ^{phox} R162A/D166A-ΔCTer	1-342	40269,91	352	9,27	59485
p47 ^{phox} R162A-ΔCTer	1-342	40313,92	352	9,11	59485
p47 ^{phox} D166A-ΔCTer	1-342	40355,01	352	9,39	59485
p47 ^{phox} Q197A-ΔCTer	1-342	40341,97	352	9,27	59485
p47 ^{phox} K199E-ΔCTer	1-342	40399,97	352	8,93	59485
p47 ^{phox} R202A-ΔCTer	1-342	40313,92	352	9,11	59485

Plasmide : pGEX-6P-3

p47^{phox} tandem SH3s + AIR



Longueur : 203 acides aminés

Masse moléculaire moyenne : MW = 23014,92 Da

Point isoélectrique : Pi = 9,01

Coefficient d'extinction : $\epsilon = 39420$

Description :

Contient les résidus 140-342 de p47^{phox}.

Séquence :

LMPKDGKSTATDITGPILQTYRAIADYEKTSGSEMALSTGDVVEVVEKSESGWWFC
QMKAKRGWIPASFLEPLDSPDETEDPEPNYAGEPYVAIKAYTAVEGDEVSLLEGEAV
EVIHKLLDGWWVIRKDDVTGYFPSMYLQKSGQDVSQAQRQIKRGAPPRSSIRNAHS
IHQRSRKRLSQDAYRRNSVRFLQQRRRQARPG

Plasmide : pGEX-6P-3

p47^{phox} tandem SH3s



Longueur : 138 acides aminés

Masse moléculaire moyenne : MW = 15384,25 Da

Point isoélectrique : Pi = 4,12

Coefficient d'extinction : $\epsilon = 37930$

Description :

Contient 8 résidus du plasmide pGex-6P (gris) suivis des résidus 156-285 de p47^{phox}.

Séquence :

GPLGSPEFIILQTYRAIADYEKTSGSEMALSTGDVVEVVEKSESGWWFCQMKAARG
WIPASFLEPLDSPDETEDPEPNYAGEPYVAIKAYTAVEGDEVSLLEGEAVEVIHKLLD
GWWVIRKDDVTGYFPSMYLQKSGQ

Plasmide : pGEX-6P-1

GST



Longueur : 226 acides aminés

Masse moléculaire moyenne : MW = 26430,8 Da

Point isoélectrique : Pi = 5,68

Coefficient d'extinction : $\epsilon = 43110$

Description :

Contient les résidus 1-226 de l'étiquette GST.

Séquence :

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
YIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDF
ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCL
DAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLVLFQ

Plasmide : pGEX-6P-3

GST-p22^{phox} Cter



Longueur : 295 acides aminés

Masse moléculaire moyenne : MW = 33428,69 Da

Point isoélectrique : Pi = 5,79

Coefficient d'extinction : $\epsilon = 42860$

Description :

Contient les résidus 1-226 de l'étiquette GST (jaune) suivis de 5 résidus du plasmide pGex-6P (gris) suivis des résidus 131-195 de p22^{phox}.

Séquence :

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
YIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDF
ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCL
DAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLFGQP
LGSTPIEPKPRERPQIGGTIKQPPSNPPRPPAEARKKPSEEEAAAAAGGPPGGPQVNPI
PVTDEVV

Plasmide : pGEX-6P-3

Plasmepsine 2

77

453

PSM2

Longueur : 389 acides aminés

Masse moléculaire moyenne : MW = 43583,68 Da

Point isoélectrique : $P_i = 5,12$

Coefficient d'extinction : $\epsilon = 43570$

Description :

Contient 13 résidus du plasmide pET-3a (étiquette T7 en gris) suivis des résidus 78-453 de la plasmepsine 2.

Séquence :

ASMTGGQQMGRGSEHLTIGFKVENAHDRILKTIKTHKLKNYIKESVNFLNSGLTKTN
YLGSSNDNIELVDFQNIMFYGDAEVGDNQQPFTFILDGTGSANLWVPSVKCTTAGCLT
KHLVDSSKSRTYEKDGTKVEMNYVSGTVSGFFSKDLVTVGNLSLPYKFIEVIDTNGFE
PTYTASTFDGILGLGWKDLSIGSDPIVVELKNQNKIENALFTFYLPVHDKHTGFLTIG
GIEERFYEGPLTYEKLNHDLYWQITLDAHVG NIMLEKANCIVDSGTSAITVPTDFLNK
MLQNLDVIKVPFLPFYVTLCNNSKLPTEFEFTSENGKYTLEPEYYLQHIEDVGPGLCML
NIIGLDFPVPTFILGDPFMRKYFTVFDYDNHNSVGIALAKKNL

Plasmide : pET-3a

Plasmepsine 4

74

448

PSM4

Longueur : 389 acides aminés

Masse moléculaire moyenne : MW = 43680,48 Da

Point isoélectrique : Pi = 4,68

Coefficient d'extinction : $\varepsilon = 49530$

Description :

Contient 13 résidus du plasmide pET-3a (étiquette T7 en gris) suivis des résidus 74-448 de la plasmepsine 4.

Séquence :

ASMTGGQQMGRGSTKHTTIGFKIDRPHDKVLSSVLKNKLSTYVKESFKFFKSGYAQK
GYLGSENDSIELDDVANLMFYGEGQIGTNKQPFMFIFDTGSANLWPSVNCDSIGCST
KHLVDASASKSYEKDGTKVEISYSGSTVRGYFSKDVISLGDLSLPYKFIEVTDADDLE
PIYSGSEFDGILGLGWKDLSIGSIDPVVVELKKQNKIDNALFTFYLPVHDKHVGYLTI
GIESDFYEGPLTYEKLNHDLYWQIDLDIHFGKYVMQKANAVVDSGTSTITAPTSFLNK
FFRDMNVIKVPFLPLYVTTCDNDDLPTLEFHSRNNKYTLEPEFYMDPLSDIDPALCML
YILPVDIDDNTFILGDPFMRKYFTVFDYEKESVGFVAVAKNL

Plasmide : pET-3a

Nter	Cter	MW	1+	2+	3+	4+	5+	PEPS	P XIII	P XVIII
1	15	1505,69	1506,69	753,85	502,90	377,42	302,14	Red	Green	Yellow
1	17	1774,88	1775,88	888,44	592,63	444,72	355,98		Green	
4	15	1238,53	1239,53	620,27	413,84	310,63	248,71			Yellow
6	15	1094,48	1095,48	548,24	365,83	274,62	219,90			Yellow
15	21	868,53	869,53	435,27	290,51	218,13	174,71	Red		
16	20	608,38	609,38	305,19	203,79	153,10	122,68			Yellow
16	21	721,46	722,46	361,73	241,49	181,37	145,29	Red		Yellow
16	23	891,57	892,57	446,79	298,19	223,89	179,31	Red		
16	24	1038,63	1039,63	520,32	347,21	260,66	208,73		Green	
16	26	1295,77	1296,77	648,89	432,92	324,94	260,15		Green	Yellow
16	27	1451,87	1452,87	726,94	484,96	363,97	291,37			Yellow
21	26	705,41	706,41	353,71	236,14	177,35	142,08		Green	Yellow
22	26	592,32	593,32	297,16	198,44	149,08	119,46		Green	Yellow
22	36	1868,96	1869,96	935,48	623,99	468,24	374,79	Red		
22	37	2000,00	2001,00	1001,00	667,67	501,00	401,00	Red		
24	37	1829,89	1830,89	915,95	610,96	458,47	366,98	Red		
25	36	1551,78	1552,78	776,89	518,26	388,95	311,36		Green	
25	37	1682,82	1683,82	842,41	561,94	421,71	337,56	Red		
27	36	1294,65	1295,65	648,33	432,55	324,66	259,93			Yellow
27	38	1572,75	1573,75	787,38	525,25	394,19	315,55		Green	Yellow
28	36	1138,54	1139,54	570,27	380,51	285,64	228,71		Green	
38	41	505,33	506,33	253,67	169,44	127,33	102,07		Green	
38	45	1047,58	1048,58	524,79	350,19	262,90	210,52	Red	Green	
38	47	1263,65	1264,65	632,83	422,22	316,91	253,73	Red		
39	47	1116,58	1117,58	559,29	373,19	280,15	224,32	Red		
39	48	1244,68	1245,68	623,34	415,89	312,17	249,94			Yellow
40	45	787,42	788,42	394,71	263,47	197,86	158,48		Green	
40	47	1003,50	1004,50	502,75	335,50	251,88	201,70	Red		
40	56	2182,15	2183,15	1092,08	728,38	546,54	437,43	Red		
48	56	1196,67	1197,67	599,34	399,89	300,17	240,33			
48	59	1541,80	1542,80	771,90	514,93	386,45	309,36	Red		
54	60	887,37	888,37	444,69	296,79	222,84	178,47			Yellow
55	59	592,24	593,24	297,12	198,41	149,06	119,45		Green	
60	64	644,36	645,36	323,18	215,79	162,09	129,87		Green	
60	68	1179,61	1180,61	590,81	394,20	295,90	236,92	Red		
60	71	1518,79	1519,79	760,40	507,26	380,70	304,76	Red		
60	98	4468,33	4469,33	2235,17	1490,44	1118,08	894,67	Red		
65	71	892,44	893,44	447,22	298,48	224,11	179,49		Green	
65	90	2967,58	2968,58	1484,79	990,19	742,90	594,52		Green	
68	90	2579,40	2580,40	1290,70	860,80	645,85	516,88		Green	
68	93	2898,52	2899,52	1450,26	967,17	725,63	580,70			Yellow
69	98	3306,73	3307,73	1654,37	1103,24	827,68	662,35	Red		
69	106	4206,17	4207,17	2104,09	1403,06	1052,54	842,23	Red		
72	90	2093,15	2094,15	1047,58	698,72	524,29	419,63		Green	
72	98	2967,55	2968,55	1484,78	990,18	742,89	594,51	Red		
72	106	3866,99	3867,99	1934,50	1290,00	967,75	774,40	Red	Green	
75	90	1894,06	1895,06	948,03	632,35	474,52	379,81		Green	
80	98	2201,19	2202,19	1101,60	734,73	551,30	441,24	Red		
80	106	3100,63	3101,63	1551,32	1034,54	776,16	621,13	Red		
91	107	1954,91	1955,91	978,46	652,64	489,73	391,98		Green	
99	104	687,37	688,37	344,69	230,12	172,84	138,47	Red		
107	111	585,25	586,25	293,63	196,08	147,31	118,05		Green	
108	117	1079,54	1080,54	540,77	360,85	270,89	216,91			Yellow
108	127	2261,14	2262,14	1131,57	754,71	566,29	453,23			Yellow
111	127	1970,05	1971,05	986,03	657,68	493,51	395,01	Red		
112	127	1856,96	1857,96	929,48	619,99	465,24	372,39			Yellow
112	117	675,36	676,36	338,68	226,12	169,84	136,07		Green	
112	126	1709,90	1710,90	855,95	570,97	428,48	342,98	Red		
112	127	1856,96	1857,96	929,48	619,99	465,24	372,39	Red		
115	127	1525,81	1526,81	763,91	509,60	382,45	306,16	Red		
118	126	1052,51	1053,51	527,26	351,84	264,13	211,50		Green	Yellow
118	127	1199,61	1200,61	600,81	400,87	300,90	240,92			Yellow
121	126	696,33	697,33	349,17	233,11	175,08	140,27		Green	
127	134	1022,52	1023,52	512,26	341,84	256,63	205,50		Green	
127	142	1932,01	1933,01	967,01	645,00	484,00	387,40		Green	
128	140	1542,84	1543,84	772,42	515,28	386,71	309,57		Green	
128	142	1784,94	1785,94	893,47	595,98	447,24	357,99			Yellow
128	148	2470,27	2471,27	1236,14	824,42	618,57	495,05	Red		Yellow

128	164	4149,09	4150,09	2075,55	1384,03	1038,27	830,82	
134	140	800,43	801,43	401,22	267,81	201,11	161,09	
134	142	1042,53	1043,53	522,27	348,51	261,63	209,51	
141	161	2353,11	2354,11	1177,56	785,37	589,28	471,62	
141	173	3679,88	3680,88	1840,94	1227,63	920,97	736,98	
142	147	730,40	731,40	366,20	244,47	183,60	147,08	
143	173	3437,78	3438,78	1719,89	1146,93	860,45	688,56	
149	168	2133,14	2134,14	1067,57	712,05	534,29	427,63	
149	170	2362,25	2363,25	1182,13	788,42	591,56	473,45	
161	170	1069,60	1070,60	535,80	357,53	268,40	214,92	
162	168	725,47	726,47	363,74	242,82	182,37	146,09	
162	170	954,57	955,57	478,29	319,19	239,64	191,91	
163	174	1344,78	1345,78	673,39	449,26	337,20	269,96	
165	170	683,42	684,42	342,71	228,81	171,86	137,68	
169	176	936,47	937,47	469,24	313,16	235,12	188,29	
171	176	707,36	708,36	354,68	236,79	177,84	142,47	
171	184	1588,74	1589,74	795,37	530,58	398,18	318,75	
177	184	899,39	900,39	450,70	300,80	225,85	180,88	
177	194	1901,86	1902,86	951,93	634,95	476,47	381,37	
178	184	736,32	737,32	369,16	246,44	185,08	148,26	
179	184	607,28	608,28	304,64	203,43	152,82	122,46	
178	194	1738,79	1739,79	870,40	580,60	435,70	348,76	
185	194	1020,48	1021,48	511,24	341,16	256,12	205,10	
186	194	889,44	890,44	445,72	297,48	223,36	178,89	
187	194	818,40	819,40	410,20	273,80	205,60	164,68	
188	197	1032,50	1033,50	517,25	345,17	259,13	207,50	
195	204	1205,57	1206,57	603,79	402,86	302,39	242,11	
196	204	1106,50	1107,50	554,25	369,83	277,63	222,30	
197	204	1007,43	1008,43	504,72	336,81	252,86	202,49	
199	203	564,22	565,22	283,11	189,07	142,06	113,84	
204	207	582,23	583,23	292,12	195,08	146,56	117,45	
204	208	713,27	714,27	357,64	238,76	179,32	143,65	
205	218	1621,82	1622,82	811,91	541,61	406,46	325,36	
205	219	1768,89	1769,89	885,45	590,63	443,22	354,78	
206	219	1621,82	1622,82	811,91	541,61	406,46	325,36	
208	243	4018,89	4019,89	2010,45	1340,63	1005,72	804,78	
208	245	4260,07	4261,07	2131,04	1421,02	1066,02	853,01	
209	219	1259,71	1260,71	630,86	420,90	315,93	252,94	
210	243	3759,76	3760,76	1880,88	1254,25	940,94	752,95	
210	245	4000,94	4001,94	2001,47	1334,65	1001,24	801,19	
219	243	2793,22	2794,22	1397,61	932,07	699,31	559,64	
220	236	1958,83	1959,83	980,42	653,94	490,71	392,77	
220	243	2646,15	2647,15	1324,08	883,05	662,54	530,23	
220	246	2958,37	2959,37	1480,19	987,12	740,59	592,67	
246	257	1252,58	1253,58	627,29	418,53	314,15	251,52	
247	254	882,36	883,36	442,18	295,12	221,59	177,47	
247	257	1181,55	1182,55	591,78	394,85	296,39	237,31	
249	254	618,25	619,25	310,13	207,08	155,56	124,65	
255	262	816,42	817,42	409,21	273,14	205,11	164,28	
258	262	517,24	518,24	259,62	173,41	130,31	104,45	
258	273	1806,95	1807,95	904,48	603,32	452,74	362,39	
263	273	1307,72	1308,72	654,86	436,91	327,93	262,54	
265	273	1079,61	1080,61	540,81	360,87	270,90	216,92	
274	277	572,34	573,34	287,17	191,78	144,09	115,47	
274	279	815,47	816,47	408,74	272,82	204,87	164,09	
274	285	1497,76	1498,76	749,88	500,25	375,44	300,55	
274	288	1812,89	1813,89	907,45	605,30	454,22	363,58	
274	289	1975,95	1976,95	988,98	659,65	494,99	396,19	
280	288	1015,40	1016,40	508,70	339,47	254,85	204,08	
280	289	1178,50	1179,50	590,25	393,83	295,63	236,70	
280	290	1291,58	1292,58	646,79	431,53	323,90	259,32	
281	288	900,41	901,41	451,21	301,14	226,10	181,08	
281	290	1176,55	1177,55	589,28	393,18	295,14	236,31	
289	296	937,45	938,45	469,73	313,48	235,36	188,49	
289	299	1251,61	1252,61	626,80	418,20	313,90	251,32	
289	333	5194,80	5195,81	2598,41	1732,61	1299,71	1039,97	
289	341	6273,38	6274,38	3137,69	2092,13	1569,35	1255,68	
315	324	1230,67	1231,67	616,34	411,22	308,67	247,13	
317	324	961,48	962,48	481,74	321,49	241,37	193,30	
315	333	2272,24	2273,24	1137,12	758,41	569,06	455,45	
330	354	3069,63	3070,63	1535,82	1024,21	768,41	614,93	

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Articles:

Marcoux J, Man P, Castellan M, Vives C, Forest E and Fieschi F (2009) "Conformational changes in p47(phox) upon activation highlighted by mass spectrometry coupled to hydrogen/deuterium exchange and limited proteolysis" FEBS Lett 583(4): 835-40.

Marcoux J, Thierry E, Vives C, Signor L, Fieschi F and Forest E (2009) "Investigating Alternative Acidic Proteases for H/D Exchange Coupled to Mass Spectrometry: Plasmepsin 2 but not Plasmepsin 4 Is Active Under Quenching Conditions" J Am Soc Mass Spectrom. 21, 76-79

Marcoux J, Man P, Petit-Haertlein I, Vives C, Forest E and Fieschi F (2010) "p47phox molecular activation for assembly of the neutrophils NADPH oxidase complex" in preparation.

Communications orales:

- Club Oxydase, Grenoble 05/2007
- Congrès Société Française de Spectrométrie de Masse, Grenoble 09/2008
- Club Oxydase, Paris 05/2009
- 18^{èmes} International Mass Spectrometry Conference, Brême 09/2009

Posters:

- Club Oxydase, Grenoble 05/2007
- Congrès Société Française de Spectrométrie de Masse, Pau 09/2007 : Prix du meilleur poster du Club Jeune de Spectrométrie de Masse
- European Bioalpine Convention, Turin 11/2007
- 56th American Society for Mass Spectrometry Conference, Denver 06/2008
- Congrès Société Française de Spectrométrie de Masse, Grenoble 09/2008
- Gordon Research Conference on phagocytes, Boston 06/2009

Structural and functional study of p47^{phox} by H/D exchange coupled to mass spectrometry

Julien Marcoux^{1,2}, Petr Man², Corinne Vivès¹, Eric Forest², Franck Fieschi¹

¹Laboratoire des Protéines Membranaires (LPM)

²Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines (LSMP)

Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble - FRANCE

julien.marcoux@ibs.fr Tel : +33 4 387 839 60 / Fax : +33 4 387 854 94

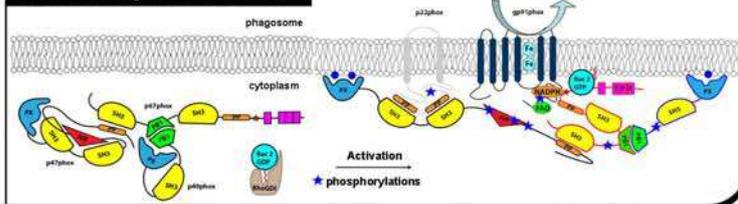


Objectives :

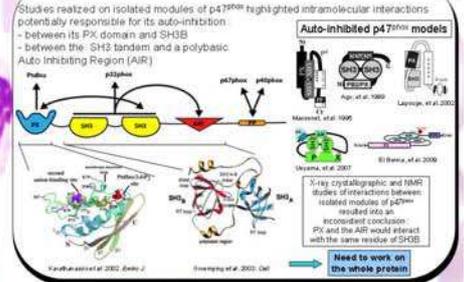
- 1) To highlight conformational changes between the wild type (WT) form of p47^{phox} and a triple mutant (TM) mimicking the phosphorylated (active) form of p47^{phox} (S303E S304E S328E).
- 2) To confirm or redraw existing models from studies on isolated modules.
- 3) To obtain a low resolution structure of the whole protein.

Activation of the NADPH oxidase of neutrophils

NADPH oxidase enzymatic complexes are expressed in many different cell types. In innate immunity, namely in the neutrophils, NADPH oxidase plays a crucial role by reducing the molecular oxygen into peroxide anion O₂^{-•}, reactive oxygen species (ROS), responsible for the formation of hypochlorous acid (microbicide).

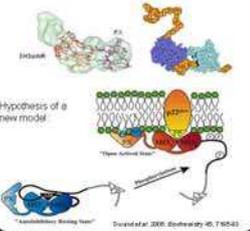


p47^{phox} : a central role in the assembly

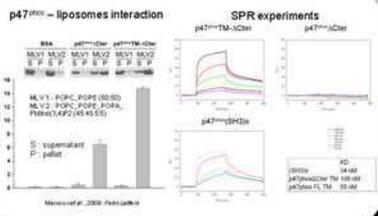


SAXS

Small Angle X-ray Scattering (SAXS) realized on the whole protein suggests a rather elongated conformation with a very flexible PX.

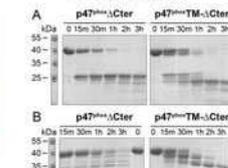


Functional Studies

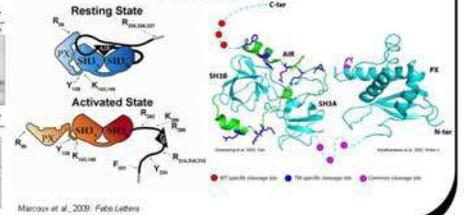


Limited proteolysis

We obtained different proteolytic patterns on SDS-PAGE after 3h of digestion with 0.5% chymotrypsin (A) or trypsin (B) due to differences in surface accessibility.

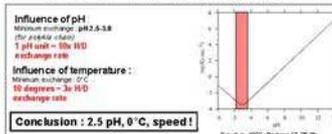


Specific cleavage sites were determined by LC-ESI-TOF-MS. In addition to the 4 common cleavage sites, we identified 8 specific cleavage sites for the TM situated in the AIR region, confirming the AIR release upon activation.



H/D exchange

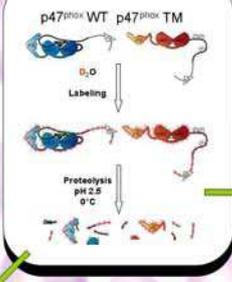
Principle : amide hydrogens of peptide bonds undergo isotopic exchange in a deuterated solvent (D₂O). The rate of exchange depends on the accessibility to the solvent and also on the implication of hydrogens in the stabilization of secondary structures.



Conclusion : 2.5 pH, 0°C, speed!

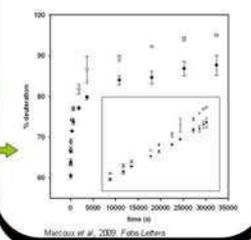
Side chains : very rapid exchange rate
C-H : no exchange
CONH : exchange rate depends on structure and accessibility

General protocol



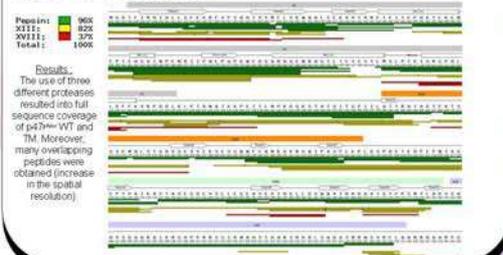
Global kinetic

We observe a significant difference between the auto-inhibited form and the activated form. The TM is deuterated faster and to higher level than the WT, which suggests a conformation more open for the activated form. The next step is to locate the regions responsible for these differences → local kinetics of deuteration

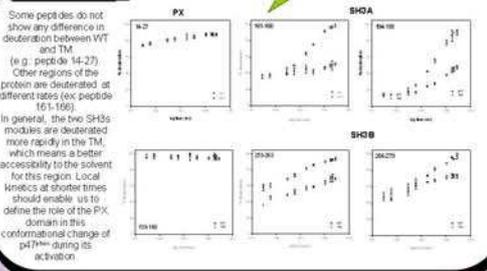


Results : mapping of p47^{phox} WT

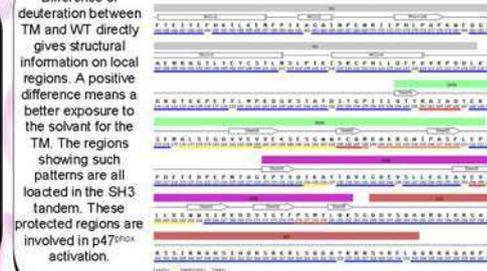
Protein digestion has to be done at minimum exchange conditions : pH 2.5 and at 0°C. Proteases working in such environment are : pepsin, protease XIII and protease XVIII. The digestion is highly reproducible but the cleavage sites are not predictable → Need to determine those cleavage sites and to sequence the peptides by MS/MS. This allows to draw a peptide map.



Local kinetics 1

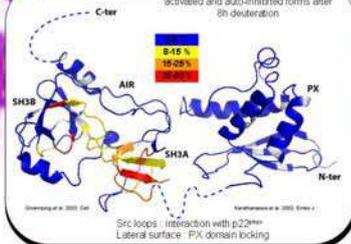


Local kinetics 2



Difference of deuteration between TM and WT directly gives structural information on local regions. A positive difference means a better exposure to the solvent for the TM. The regions showing such patterns are all located in the SH3 tandem. These protected regions are involved in p47^{phox} activation.

Local kinetics 3



Conclusions :

- 1) Global kinetic confirmed the difference of surface accessibility between the two constructs.
- 2) We identified a lateral surface in SH3A involved in the locking mechanism.
- 3) Different cleavage sites by trypsin and chymotrypsin were observed in the AIR of the TM, confirming its release upon activation.

RESUME

La NADPH oxydase (NOX) est un complexe multienzymatique responsable de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) que l'on retrouve dans un grand nombre de types cellulaires. La NOX des neutrophiles est composée de deux protéines transmembranaires (gp91^{phox} et p22^{phox}), qui constituent le site catalytique, et de trois facteurs cytosoliques (p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox}). Lors de son activation, p47^{phox} subit des changements conformationnels que nous tâchons de définir, afin de mieux comprendre la régulation de ce complexe impliqué dans un grand nombre de pathologies. Dans les neutrophiles, les ROS sont responsables de la destruction de pathogènes phagocytés. Il paraît donc primordial de bien comprendre les bases moléculaires du mécanisme d'activation de la NOX pour envisager sa régulation future.

Au cours de ce travail, des changements conformationnels ont été identifiés sur p47^{phox} par protéolyse ménagée et échange H/D couplés à la spectrométrie de masse (DXMS). Le relargage de l'AIR, entraînant une meilleure accessibilité du site d'interaction avec p22^{phox}, a été confirmé et caractérisé d'un point de vue structural et fonctionnel sur protéine entière. De plus, une surface inédite contrôlant l'état autoinhibé a été mise en évidence. La mutagenèse dirigée au sein de cette surface a permis de confirmer cette hypothèse en identifiant deux résidus clés (R162 et D166) responsables de cette autoinhibition et donc susceptibles d'être de futurs candidats de cibles thérapeutiques. Les propriétés d'interactions relatives des divers mutants avec GST-p22^{phox}Cter et des liposomes ont été testées par BiacoreTM et cosédimentation, respectivement. L'identification de ces résidus a permis de mieux comprendre le mécanisme d'activation de p47^{phox}, et notamment comment le démasquage de l'AIR phosphorylée entraîne celui du domaine PX. Enfin, une étude méthodologique a montré que la plasmepsine 2 de *P. falciparum* était un nouvel outil susceptible d'améliorer la résolution du DXMS.

ABSTRACT

NADPH oxidase (NOX) is a multienzymatic complex found in many cellular types, responsible for reactive oxygen species (ROS) production. The neutrophilic NOX is composed of two transmembrane proteins (gp91^{phox} and p22^{phox}) that make up the catalytic core and three cytosolic factors (p47^{phox}, p67^{phox} and p40^{phox}). Upon activation, p47^{phox} undergoes conformational changes that this study attempts to define in order to better understand the regulation of this complex involved in many diseases. In neutrophils, ROS are responsible for phagocytosed pathogen destruction. It therefore appears essential to better understand the molecular bases of the NOX activation mechanism to consider its future regulation. This study has identified a number of conformational changes on p47^{phox} by limited proteolysis and Deuterium eXchange coupled to Mass Spectrometry (DXMS). The AIR release, providing better accessibility to the p22^{phox} binding site was confirmed and characterized from both structural and functional points of view, on the entire protein. Furthermore, a novel surface controlling p47^{phox} auto-inhibited state has been discovered. Site-directed mutagenesis within this surface confirmed this hypothesis by identifying two key residues (R162 and D166) responsible for this auto-inhibition and therefore possible future candidates for therapeutic targets. The relative binding properties of these mutants with GST-p22^{phox}Cter and liposomes were investigated using BiacoreTM and pull-down assays, respectively. The identification of these residues provided a better understanding of the p47^{phox} activation mechanism, and in particular of how AIR unmasking leads to PX domain release. Finally, a methodological study showed that plasmepsin 2 from *Plasmodium falciparum* was a new tool that may improve DXMS.