



HAL
open science

Modulation de l'activité du flavocytochrome b : étude fonctionnelle

Hager Souabni

► **To cite this version:**

Hager Souabni. Modulation de l'activité du flavocytochrome b : étude fonctionnelle. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112036 . tel-01730289

HAL Id: tel-01730289

<https://theses.hal.science/tel-01730289>

Submitted on 13 Mar 2018

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 PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE: *Ecole doctorale de Chimie ED470*
Laboratoire de *Chimie Physique*

DISCIPLINE Chimie

THÈSE DE DOCTORAT

Par

Hager SOUABNI

Modulation de l'activité du flavocytochrome b_{558} : Etude fonctionnelle

Directeur de thèse:

Laura BACIOU

Chargée de Recherche CNRS (LCP)

Composition du jury:

Président du jury:

Marc LE MAIRE

Professeur (Université Paris Sud)

Rapporteurs:

Marie-Hélène PACLET

MCU-PH (Institut de Biologie et Pathologie)

Bruno MIROUX

DR INSERM (Institut de Biologie Physico-chimie)

Examineurs:

Mariano OSTUNI

Professeur (Université Paris Diderot – Paris 7)

« Tout pouvoir humain est composé de patience et de temps. »

Honoré de Balzac

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au laboratoire de Chimie Physique d'Orsay au sein de l'équipe Biochimie des flavohémoprotéines. Je remercie sincèrement le Pr. Mehran MOSTAFAVI pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je tiens tout d'abord à remercier Dr. Marie-Hélène PACLET et DR. Bruno MIROUX pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse, et pour leur lecture très attentive du manuscrit. Je souhaite également remercier les autres membres du jury Pr. Marc LE MAIRE et Mariano OSTUNI pour avoir accepté d'être examinateurs du travail ici présenté.

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse Dr. Laura BACIOU, qui s'est toujours montrée abordable et soucieuse de mon travail et de mon moral. Je la remercie pour nos nombreuses discussions scientifiques. Au travers de ces échanges, elle m'a permis une compréhension approfondie des divers aspects du sujet et m'a appris à travailler avec rigueur et pertinence. Je la remercie aussi de m'avoir fait confiance et de m'avoir appris à être plus autonome pour mener à bien ce travail de recherche. Ces trois années et demie n'ont fait qu'accentuer mon intérêt pour la recherche. J'ai vraiment apprécié de travailler avec elle dans une ambiance très amicale mais aussi très constructive. Au-delà d'une relation professionnelle efficace, 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 également à remercier Dr. Tania BIZOUARN, Dr. Florence LEDERER et Pr. Chantal HOUEE LEVIN pour les échanges que j'ai pu avoir avec elles tant sur le plan scientifique que humain.

Enfin, je remercie tout particulièrement docteurs, anciens docteurs et autres pour ces 3-4 années passées à vos côtés. Vous êtes bien trop nombreux pour que je vous cite tous ici, mais je ne vous oublie pas et sans vous je n'aurais pas pu passer cette période de ma vie de façon si agréable. Merci Yasmina pour ton soutien moral, pour ta bonne humeur et pour ton sourire du matin. Merci également à mes collègues de bureau Myriam et Aymen, merci pour tous les moments passés ensemble.

D'un point de vue plus personnel je voudrais remercier tout mon entourage pour m'avoir soutenu, encouragé voire supporté pendant cette thèse :

La première personne que j'aimerais remercier du fond du cœur est mon cher et tendre époux Mohamed pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Merci de m'avoir encouragée à me dépasser chaque jour, et d'avoir supporté mes horaires aussi chargés au labo et les soirées si courtes ensemble. Merci à mes beaux-parents de ne pas m'avoir reproché de ne

pas m'être assez occupé de leur fils. Et merci à mon petit chaton Adam qui a contribué à ma réussite dans la dernière ligne droite.

J'aimerai aussi remercier tout particulièrement ma mère, même si elle est loin, ses encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.

Je remercie aussi ma sœur Leila, que j'adore et qui n'a cessé de me soutenir malgré les milliers de kilomètres qui nous séparent.

J'aimerai enfin remercier infiniment mon père ma source de patience qui n'a pas cessé de m'encourager et de me pousser à continuer, je remercie également mes chers frères ainsi que le reste de la famille, pour m'avoir encouragé, soutenu et supporté pendant ces trois ans et demi de thèse.

SOMMAIRE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	16
I. Historique de la NADPH oxydase	17
II. Famille NADPH oxydase	18
1. Fonction et distribution tissulaire.....	18
2. Les espèces réactives de l'oxygène :	21
III. Le complexe NADPH oxydase phagocytaire et son activation	22
1. Activation du complexe NADPH oxydase	22
2. Présentation des différentes protéines constituant le complexe NADPH oxydase phagocytaire	24
IV. Le flavocytochrome <i>b</i> ₅₅₈ : une flavohémoprotéine	24
1. Généralités sur les cytochromes.....	24
2. Généralités sur les flavines	26
3. Généralités sur les protéines membranaires.....	27
4. Le flavocytochrome <i>b</i> ₅₅₈	28
i. La protéine gp91 ^{phox}	28
ii. La protéine p22 ^{phox}	32
V. Les protéines cytosoliques	34
1. La protéine p47 ^{phox}	34
2. La protéine p67 ^{phox}	35
3. La protéine p40 ^{phox}	36
4. La protéine G monomérique Rac	37
VI. Mécanisme réactionnel et assemblage du complexe NADPH oxydase phagocytaire ..	38
1. Description de l'assemblage du complexe actif de la NADPH oxydase	38
2. Mécanismes réactionnels au sein du Cyt <i>b</i> ₅₅₈	39
3. Régulation du transfert d'électron.....	41
4. Les limites actuelles de l'étude du Flavocytochrome <i>b</i> ₅₅₈	41
VII. Les systèmes d'expression hétérologues utilisés pour produire le Cyt <i>b</i> ₅₅₈	42
1. Système d'expression procaryote: <i>Escherichia coli</i>	42
2. Les systèmes d'expressions eucaryotes	42
i. Les cellules de mammifères	42
ii. Les cellules d'insectes.....	43
iii. Le système d'expression <i>in vitro</i>	43

iv.	Le système d'expression en levure	44
VIII.	Le flavocytochrome <i>b₅₅₈</i> et les membranes.....	45
1.	Les Lipides membranaires	46
i.	Les phospholipides.....	46
ii.	Les sphingolipides	47
iii.	Les glycolipides	47
iv.	Les stérols	48
2.	Rappel sur l'organisation des membranes biologiques et modèles structuraux ...	49
3.	La NADPH oxydase et les lipides	51
	LES OBJECTIFS DU TRAVAIL	55
	MATERIELS & METHODES	58
I.	Préparations biologiques	59
1.	Expression et purification des protéines cytosoliques bovines dans <i>E. coli</i>	59
i.	Culture des bactéries exprimant les protéines cytosoliques recombinantes	59
ii.	Purification des protéines p47 ^{phox} et p67 ^{phox} bovines	60
iii.	Purification de la protéine Rac1 mutée humaine	61
2.	Préparation des membranes de <i>P. pastoris</i>	61
i.	Mise en culture de la levure <i>P. pastoris</i>	61
ii.	Lyse des cellules et récupération des FMT de levure	62
II.	Méthodes biochimiques.....	63
1.	Fractionnement subcellulaire de <i>P.pastoris</i> sur gradient de sucrose	63
2.	Extraction de l'ergostérol des membranes plasmiques	63
3.	Solubilisation et relipidation du flavocytochrome <i>b₅₅₈</i>	63
i.	Généralités sur la solubilisation des protéines membranaires avec les détergents	63
ii.	Solubilisation du Cyt _{b₅₅₈} des membranes de <i>P. pastoris</i>	65
4.	Reconstitution des protéines purifiés en vésicules de phospholipides.....	66
i.	Membrane artificielle ou liposomes.....	66
ii.	Reconstitution en liposomes	66
III.	Techniques de chromatographie:	67
1.	Chromatographie d'affinité anti-Flag	67
2.	Chromatographie d'adsorption sur Héparine Sepharose	68
3.	Chromatographie échangeuse d'anions	68
4.	Chromatographie d'exclusion	68
IV.	Techniques analytiques	69

1.	Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes ..	69
2.	Immunoblots	69
V.	Techniques spectroscopiques	72
1.	Spectroscopie d'absorption stationnaire	72
2.	Spectroscopie d'absorption résolue en temps	72
VI.	Méthodes de Biologie moléculaire.....	74
1.	Extraction de l'ADN génomique de levure.....	74
2.	Amplification d'ADN par la méthode polymérase chain réaction (PCR)	75
	RESULTATS& DISCUSSION	76
	CHAPITRE I : CARACTERISATION GENOMIQUE ET FONCTIONNELLE DU CYTB₅₅₈ EXPRIME DANS LA MEMBRANE DE LA LEVURE	77
1.	Introduction.....	78
2.	Analyse génomique et phénotypique	78
i.	Vérification de la présence du gène <i>CYBB</i> codant pour gp91 ^{phox} dans le génome de <i>P. pastoris</i>	80
ii.	Phénotype de la souche transgénique de <i>P. pastoris</i> :	82
3.	Activité NADPH oxydase des membranes de <i>P. pastoris</i> exprimant <i>Cytb₅₅₈</i>	83
i.	Production d'anion superoxyde	83
ii.	Activation par les facteurs cytosoliques	85
iii.	Activation par l'acide arachidonique : effet dose-réponse.....	86
4.	Conclusion	88
	CHAPITRE II: PURIFICATION CYTB₅₅₈ RECOMBINANT.....	89
I.	Optimisation des conditions de culture	90
II.	Lyse cellulaire mécanique manuelle et automatique.....	91
III.	Solubilisation du <i>Cytb₅₅₈</i> membranaire.....	95
1.	Choix du détergent	95
2.	Optimisation de la concentration en DDM pour la solubilisation du <i>Cytb₅₅₈</i>	98
IV.	Les différentes étapes de chromatographie	101
1.	Critère de l'étiquette Flag : chromatographie d'affinité	101
2.	Critère du potentiel isoélectrique (Pi)	104
i.	Analyse par western blot des profils d'élution de la chromatographie DEAE	106
ii.	Analyse par western blot des profils d'élution de la chromatographie Héparine Sepharose	108
3.	Critère de glycosylation	109
4.	En conclusion : protocole de purification du <i>Cytb₅₅₈</i>	112

V. Conclusions	116
CHAPITRE III: EFFET DE L'ENVIRONNEMENT MEMBRANAIRE SUR L'ACTIVITE NADPH OXYDASE	118
1. Introduction.....	119
2. Séparation et analyse des fractions membranaires subcellulaires de <i>P. pastoris</i> .	119
3. Caractérisation de l'activité NADPH oxydase dans les fractions membranaires du RE et Pmb.....	123
i. Analyse spectrale des fractions membranaires subcellulaires	123
ii. Activation du complexe NADPH oxydase par l'acide arachidonique.....	125
4. Dépendance en température de l'activité NADPH oxydase en RE et Pmb	130
5. Conséquence de l'extraction de l'ergostérol des membranes plasmiques	133
6. Reconstitution du Cyt _{b558} recombinant en membrane artificielle	137
i. Activation des protéoliposomes par l'acide arachidonique	138
ii. Activation des protéoliposomes par les facteurs cytosoliques.....	139
iii. Dépendance en température de l'activité NADPH oxydase du Cyt _{b558} reconstitué en liposomes	140
7. Conclusion	144
CHAPITRE IV: EFFET DES ISOMERES DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE SUR LE COMPLEXE NADPH OXYDASE	148
1. Introduction.....	149
2. L'acide arachidonique.....	149
3. Géométrie <i>cis-trans</i> de l'AA et activation du complexe NADPH oxydase.....	151
4. Effet inhibiteur du <i>trans</i> -AA sur l'activité NADPH oxydase.....	152
5. Identification des protéines ciblées par le <i>trans</i> -AA.....	153
6. Effet du <i>trans</i> acide arachidonique sur le Cyt _{b558}	155
7. Effet du <i>trans</i> -AA sur la translocation des fractions cytosoliques à la membrane	157
8. Conclusion	159
CONCLUSIONSET PERSPECTIVES	162
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	166
ANNEXES.....	187

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Classification des membres de la famille de la NADPH oxydase.....	19
Figure 2: Schéma représentatif des structures conservées dans la famille NADPH oxydase..	20
Figure 3 :L'arsenal microbicide des phagocytes.	22
Figure 4: Le complexe NADPH oxydase au repos et activé.....	23
Figure 5 : Noyaux porphyrines des cytochromes.....	25
Figure 6: Spectre de différence d'absorption du cytochrome b_{558}	26
Figure 7 : Différents états redox de la flavine.	26
Figure 8: Différents types de protéines membranaires.....	27
Figure 9 : Les domaines hémiques de la protéine gp91 ^{phox} humaine.....	30
Figure 10: Représentation du modèle structurelle de la partie cytosolique C-ter du gp91 ^{phox} ..	32
Figure 11 : Modèles de topologie de p22 ^{phox}	33
Figure 12 : Structure secondaire et cristallographique des différents domaines de p47 ^{phox}	34
Figure 13 : Organisation modulaire et structure cristallographique des modules de p67 ^{phox} ...	35
Figure 14 : Organisation des modules constituant p40 ^{phox} humain et sa structure 3D.....	36
Figure 15: NADPH oxydase phagocytaire.....	39
Figure 16 : Cascade de transfert d'électron dans le Cytb ₅₅₈	40
Figure 17 : Observation au microscope électronique de la morphologie de <i>P. pastoris</i>	44
Figure 18 : Casette d'expression pour la production hétérologue du Cytb ₅₅₈ dans <i>P. pastoris</i>	45
Figure 19 : Structure de phospholipide.....	46
Figure 20 : Les sphingolipides et Les glycolipides.	47
Figure 21: Structure des principaux stérols des eucaryotes.	48
Figure 22 : Les premiers modèles membranaires.....	49
Figure 23 : Evolution du modèle membranaire.....	50
Figure 24: Le métabolisme des lipides.....	53
Figure 25 : Culture de <i>P. pastoris</i> sur milieu YPD agar.	61
Figure 26 : Schéma représentant l'appareil de Bead Beater.	62
Figure 27 : Représentation schématique des différentes phases de la solubilisation.....	65
Figure 28: Mesure de l'activité de la NADPH oxydase.....	73
Figure 29: Spectres d'absorption d'AA.....	74
Figure 30 : Intégration de la cassette d'expression dans le génome de <i>P. pastoris</i>	79
Figure 31 : Analyse sur gel agarose.....	80
Figure 32 : Séquence nucléotidique codante de gp91 ^{phox} d'origine bovine avec les deux couples d'amorces spécifiques.	81
Figure 33 : Culture de <i>P. pastoris</i> sur milieu gélosé en boîte de pétri à 30 °C.....	82
Figure 34 : Mesure de la production d'O ₂ ⁻ avec la FMt de <i>P. pastoris</i> exprimant le Cytb ₅₅₈ . 84	
Figure 35 : Tests d'activité NADPH oxydase des FMt exprimant le Cytb ₅₅₈ et celles de levures transformées avec le vecteur vide (PAO815).	85
Figure 36 : Activation du Cytb ₅₅₈ par les protéines cytosolique et par l'acide arachidonique. 86	
Figure 37 : Activation du complexe NADPH oxydase par l'acide arachidonique.	87
Figure 38 : Courbe de croissance de <i>P. pastoris</i> en milieu BYMM.	91
Figure 39 : Spectres de différence d'absorption différence réduit-oxydé du Cytb ₅₅₈	93
Figure 40 : Spectres d'absorption de la FM de <i>P. pastoris</i> solubilisée avec différents détergents.....	97
Figure 41: Spectre de différence d'absorption réduit-oxydé de la FM de levure solubilisée avec 1,5% DDM.....	99
Figure 42 : Analyse qualitative des fractions de purification sur colonne anti-Flag.....	102

Figure 43 : Analyse qualitative des différentes étapes de purification sur colonne anti-Flag « maison »	103
Figure 44 : Profil d'élution du Cyt _{b558} sur DEAE Sepharose.....	105
Figure 45 : Spectres de différence d'absorption (réduit-oxydé) des fractions purifiées sur DEAE Sepharose.....	105
Figure 46 : Analyse des fractions de purification sur DEAE Sepharose.....	107
Figure 47 : Les différentes étapes de purification du Cyt _{b558}	108
Figure 48 : Analyse des fractions de purification de l'héparine Sepharose des fractions 300 et 500 mM NaCl.....	109
Figure 49 :Profil d'élution à travers la colonne héparine Sepharose	110
Figure 50 : Analyse qualitative des étapes de purification sur colonne Héparine Sepharose par Western Blot.....	111
Figure 51 : Profil d'élution de la chromatographie d'affinité suivi à 280 nm.	112
Figure 52 : Spectres de différence d'absorption (réduit-oxydé) de FMs et de F300.	113
Figure 53 : Analyse qualitative des fractions purifiées sur héparine Sepharose sur gel SDS.....	113
Figure 54 : Profil d'élution de la chromatographie d'exclusion.	114
Figure 55 : Analyse qualitative des fractions purifiées sur gel filtration.	115
Figure 56: Séparation des fractions membranaires totales de <i>P. pastoris</i> sur gradient de sucrose.....	120
Figure 57 : Analyse par Western blot des fractions subcellulaires de <i>P. pastoris</i>	121
Figure 58: Quantification des niveaux d'expression des protéines et des niveaux des glycosylation dans les fractions subcellulaires de <i>P.pastoris</i>	123
Figure 59 : Spectres de différence d'absorption réduit-oxydé du RE et Pmb.....	124
Figure 60 :Activation du complexe NADPH-oxydase par l'AA en utilisant les membranes du RE et de Pmb	125
Figure 61 : Diagramme représentant l'activité NADPH oxydase mesurée en différentes conditions d'activation.	126
Figure 62 : Représentation de Michaelis–Menten.....	128
Figure 63: Profil énergétique.....	131
Figure 64 : Mesure de l'activité NADPH oxydase de la membrane du RE et de la Pmb en fonction de la température.....	132
Figure 65 : Structure chimique de l'ergostérol et du cholestérol.	134
Figure 66 : Structure chimique diméthyle-β- cyclodextrine.	134
Figure 67 : Mesure de l'activité NADPH oxydase de la membrane plasmique traitée avec la MβCD.....	135
Figure 68 : Mesure de l'activité NADPH oxydase de la membrane du RE additionné d'ergostérol.....	136
Figure 69 : Activation du complexe NADPH-oxydase par l'AA en utilisant les DOPC-PL et DMPC-PL.....	139
Figure 70 : Mesure de l'activité NADPH oxydase des DMPC-PL(A) et de DOPC-PL(B) dans différentes conditions expérimentales en système acellulaire.....	140
Figure 71 : Mesure de l'activité NADPH oxydase avec les PL-DOPC et PL-DMPC en fonction de la température.....	141
Figure 72 : Mesure de l'activité NADPH oxydase de DMPC-PL additionné d'ergostérol en fonction de la température.....	142
Figure 73: La composition en acides gras des membranes de la levure <i>P. pastoris</i> et de neutrophiles.	145
Figure 74 : Structures chimiques des deux isomères d'AA et du méthyl-ester arachidonate	150
Figure 75 : Activation du complexe NADPH oxydase par différents isomères d'AA.	151

Figure 76 : Inhibition de l'activité NADPH oxydase par l'isomère <i>trans</i> de l'AA en utilisant les membranes de levure.	152
Figure 77 : Inhibition de l'activité NADPH oxydase par l'isomère <i>trans</i> de l'acide arachidonique en utilisant les membranes de levure.	153
Figure 78 : Activité NADPH oxydase en système acellulaire avec différentes conditions de pré-incubation.....	154
Figure 79 : Activité NADPH oxydase en système acellulaire avec différentes conditions de pré-incubation.....	155
Figure 80 : Structure du <i>ter</i> -butyl-isocyanide	156
Figure 81 : Spectres de différence d'absorption du Cyt _{b558} recombinant en présence de différents isomères d'AA et de l'inhibiteur de l'hème.....	156
Figure 82 : L'effet des isomères de l'AA et le <i>ter</i> -butyl-isocyanide sur le spectre de différence d'absorption du Cyt _{b558} recombinant.	157
Figure 83: Effet des isomères d'AA sur l'assemblage du complexe NADPH oxydase.	159

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Distribution tissulaire des différentes NOX	20
Tableau 2: Classification des cytochromes en fonction de leur spectre d'absorption	24
Tableau 3: Liste des constructions de différentes protéines cytosoliques recombinantes	59
Tableau 4 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les Western-blot	69
Tableau 5: Les deux couples d'amorce spécifiques de gp91 ^{phox}	80
Tableau 5 : Liste des détergents utilisés pour la solubilisation du Cytb ₅₅₈ recombinant	95
Tableau 7: Liste des formes possibles du Cytb ₅₅₈ recombinant exprimé dans <i>P. pastoris</i>	99
Tableau 8: Tableau récapitulatif du bilan de la purification	115
Tableau 9 : Composition lipidique des membranes des organelles de <i>S. cerevisiae</i>	128
Tableau 10: Structures et propriétés des deux phospholipides utilisés	136
Tableau 11: Tableau récapitulatif des énergies d'activation et des V _M à 30 °C des FM	142

LISTE DES ABREVIATIONS

AA :	A cide A rachidonique
ADN_c:	A cide D ésoxyribonucléique C omplémentaire
AND:	A cide D ésoxyribonucléique
ARN:	A cide R ibonucléique
BCA:	B icinchoninic A cid
BMGY:	B uffered G lycerol complex M edium
BMMY:	B uffered M ethanol complex M edium
C:	C arbone
Ca⁺:	C alcium
CGD:	C hronic G ranulomatous D iseases
CHAPS:	3-[(3- C holamidopropyl) dimethylammonio]-1- p ropanesulfonate
Cl⁻:	C hlore
CMC:	C oncentration M icellaire C ritique
C-ter:	C -terminal
Cyt_b:	C ytochrome <i>b</i>
DDM:	n- D odecyl β- D -malto s ide
DMPC:	1,2- d imyristoyl-sn-glycero-3- p hosphocholine
DMP:	D iméthyl p imelimidate
DNase:	d ésoxyribonucléase
DOPC:	1,2- d i-(9Z- o ctadecenoyl)-sn-glycero-3- p hosphocholine
DO:	D ensité O ptique
DTT:	D ithiothréitol
DUOX:	D ual o xydase
e⁻:	électron
<i>E.coli</i>:	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	A cide E thylène D iamine T étraacétique
ERO:	E spèces R éactives de l' O xygène
FAD:	F lavin A denine D inucleotide
Fe:	F er
FM:	F raction M embranaire
fMLF:	N -formyl- l - m ethionyl- l -leucyl- p henylalanine
FMt:	F raction M embranaire t otale

FNR:	F errédoxine- NADP ⁺
GDP:	G uanosine d iphosphate
Gln:	G lutamine
GST:	G luthatione- S -transférase
GTP:	G uanosine T ri P hosphate
GPx:	G lutathion P eroxydase
h:	h eure
HEPES:	acide 4-(2- h ydroxyéthyl)-1- p ipérazine éthane sulfonique
HIS:	H istidine
H₂O:	eau
IC₅₀ :	Concentration inhibitrice médiane
INT :	I odonitrotetrazolium
IPTG:	I sopropyl-beta- D thiogalactopyranoside
kDa:	kilo D alton
K_M:	Constante de Michaelis
L:	L itre
LB:	L uria B ertoni
LDAO :	L auryl d iméthylamine N -oxide
Leu:	L eucine
MβCD :	M éthyl- β -cyclodextrine
MD :	M inimal D extrose
min:	m inute
MM :	M inimal M éthanol
mM:	m illi m olaire
MPO :	M yélo p eroxydase
Na⁺:	S odium
NADP:	N icotinamide A dénine D inucléotide P hosphate
NADPH:	N icotinamide A dénine D inucléotide P hosphate H ydrogène
NBT :	N itroblue T etrazolium
nm:	n anomètres
NOS :	N O S ynthase
NOX:	NADPH O xydase
N-ter :	N -terminal
O₂ :	O xygène

O₂⁻ :	anion superoxyde
OG:	O ctyl β -D- g lucopyranoside
PAGE :	p olyacrylamide g el e lectrophoresis
PB1:	P hox B em1 p
PMA:	P horbol M yristate a cétate
Pmb:	P lasma m embrane
PMSF:	F lurorure de p henyl m éthanesulfonyle
PL:	P rotéoliposome
PRR:	p roline r ich r egion
PX:	P hox homology
Phox:	p hagocyte o xydase
Rpm:	R otation p ar m inute
RE:	R éticulum E ndoplasmique
ROS:	R eactive O xygen S pecies
RPE:	R ésonance P aramagnétique E lectronique
PBS :	P hosphate S alin B uffer
s:	seconde
SDS:	S odium D odecyl S ulfate
SH3:	S rc H omology 3
STE:	S ucrose T ris E DTA
SOD :	S uperoxyde D ismutase
TB:	T errific B roth
T_m:	Température de transition
TPR:	T etratrico P eptide R epeat
Tris:	T rishydroxyméthylaminométhane
U :	unité enzymatique
YPD:	Y east extract P eptone D extrose
°C:	degrés celcius

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Historique de la NADPH oxydase

La NADPH oxydase est un enzyme qui produit de l'anion superoxyde. Elle a été découverte au niveau des cellules immunitaires professionnelles appelées cellules phagocytaires comme les neutrophiles (1), les éosinophiles, les monocytes et les macrophages (2). Le fonctionnement de ces cellules est accompagné par une consommation très importante d'oxygène: c'est l'explosion respiratoire.

Bien que la NADPH oxydase n'ait pas été encore identifiée, le phénomène d'explosion respiratoire avait déjà été décrit pour la première fois au début du 20^{ème} siècle. Ces premières observations ont été faites dans les ovocytes d'oursins(3), les phagocytes en 1933 (4), et les spermatozoïdes en 1943 (5-6).

Au début des années trente, la corrélation entre la phagocytose, processus utilisé par de nombreuses cellules pour détruire les éléments pathogènes, et le métabolisme de l'oxygène a été faite par Baldrige et Gérard (4), qui ont constaté que la phagocytose est accompagnée par une forte augmentation de la consommation d'oxygène, l'explosion respiratoire. Ce phénomène a été initialement attribué à la respiration mitochondriale. En 1959, Sbarra et Karnovsky (7) ont contredit cela en observant que l'explosion respiratoire n'est pas affectée par les inhibiteurs de la respiration mitochondriale (comme le cyanure). Par la suite, c'est en 1961, que Iyer et coll.(8) ont montré que l'explosion respiratoire phagocytaire conduit à la production du peroxyde d'hydrogène. C'est en 1964, que les travaux de Rossi et Zatti (9) ont proposé que la NADPH oxydase est responsable de cette explosion respiratoire. En 1970, Klebanoff (10) a montré la contribution de la myéloperoxydase (MPO) à l'explosion respiratoire. En 1973, Babior et coll.(11) ont signalé que le produit initial de l'explosion respiratoire était l'anion superoxyde et non pas le peroxyde d'hydrogène.

Une deuxième étude importante qui a mené à la découverte de la NADPH oxydase phagocytaire est venue de la recherche clinique. En effet, en 1957, Berendes et coll.(12) ont observé un nouveau syndrome rare chez les jeunes garçons qui souffrent d'infections récurrentes et récidives. Cette maladie est désignée comme la maladie granulomateuse septique chronique (CGD). En 1967, il a été prouvé que l'explosion respiratoire était absente dans les phagocytes de patients atteints de CGD (13-15).

Une caractérisation plus précise de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) par les phagocytes a révélé que la NADPH oxydase produit se distingue du fonctionnement des mitochondries et de la MPO. Cette fonction est insensible au cyanure, et est sélective pour le NADPH par rapport au NADH d'un facteur 100 (16).

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

L'identification des protéines responsables de la production de ROS dans les phagocytes était le prochain défi. Un progrès s'est produit en 1978, quand Segal, Jones et ses collègues (17-18) ont identifié le cytochrome b_{558} membranaire, qui était absent dans les leucocytes de nombreux patients atteints de CGD. À la fin des années 1980, le gène codant pour la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase phagocytaire, communément appelé $gp91^{phox}$ (gp pour glycoprotéine), a été cloné par Royer-Pokora et coll.(19) et Teahan et coll.(20). Dans la nouvelle terminologie de la famille NADPH oxydase (NOX), $gp91^{phox}$ est appelé NOX2.

Cependant, il a été rapidement entendu que $gp91^{phox}$ n'était pas le seul composant de l'enzyme des phagocytes. En 1987, la protéine transmembranaire $p22^{phox}$ a été découverte comme la sous-unité associée au $gp91^{phox}$ (21-23).Le développement d'un système acellulaire *in vitro* a permis l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire en utilisant le cytosol et les fractions membranaires purifiées (24-25). Ce système a aidé à la découverte des sous-unités cytosoliques $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$ (26-27) et à définir le rôle des petites protéines fixant le GTP Rac1 et Rac2 (28-29). En 1993, Wientjes et coll.(30) ont décrit une troisième sous-unité cytosolique, $p40^{phox}$.

En parallèle avec les progrès vers la compréhension de la NADPH oxydase phagocytaire, durant les années 90, l'amélioration de la sensibilité des méthodes de détection des ROS a permis leur identification en faibles quantités dans différents types cellulaires et dans des tissus autres que les cellules phagocytaires (épithéliales, musculaires, endothéliales, neuronales...) (31). En 1999, le premier homologue de $gp91^{phox}$ a été identifié: NOX1 (32).

Par la suite, les sept membres de la famille NOX ont été identifiés (33-37), en se basant sur l'homologie de séquence avec $gp91^{phox}$. Ils sont répertoriés en deux sous-familles : NOX 1-5 (pour NADPH oxydase) et DUOX 1-2 (pour Dual Oxydase) (38). En outre, de nouvelles sous-unités régulatrices appelées NOXO1 (NOX organisateur 1) et NOXA1 (NOX activateur 1) homologues de $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$ ont été identifiées (39-41).

II. Famille NADPH oxydase

1. Fonction et distribution tissulaire

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique qui transfère des électrons à travers des membranes biologiques. En général, l'accepteur d'électrons est l'oxygène et le produit de la réaction de transfert d'électrons est l'anion superoxyde. Leur fonction biologique est de générer des ROS (42).

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

L'oxydase catalyse le transfert d'électron depuis une molécule de NADPH vers une molécule d'oxygène réduite en anion superoxyde:



Le donneur d'électron, le NADPH, dérive de la voie des pentoses phosphates par l'oxydation du glucose-6-phosphate(43).

Les membres de la famille NOX sont capables de produire soit l'anion superoxyde (NOX1-2-3-5) soit le peroxyde d'hydrogène (NOX4, DUOX 1 et 2) (Figure 1) (44-45).

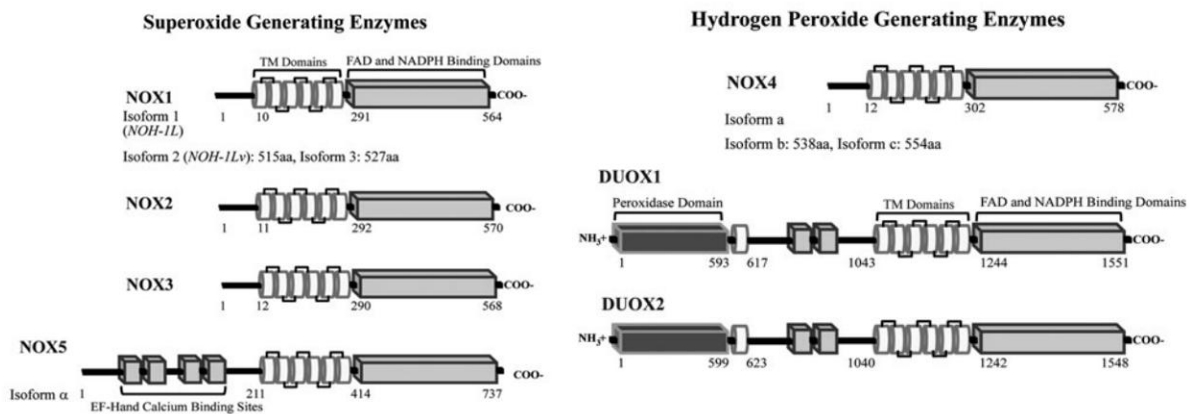


Figure 1: Classification des membres de la famille de la NADPH oxydase.

Illustration de motifs structuraux de chaque protéine NOX / DUOX classifiés selon la fonction de production de l'anion superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène (46).

D'après leur séquence, tous les membres de la famille NOX (NOX1-5 et DUOX 1-2) possèderaient six hélices transmembranaires avec quatre résidus histidines impliqués dans la coordination des deux hèmes, et une région C-terminale cytosolique contenant des sites de fixation hautement conservés pour la FAD et le NADPH.

Les membres NOX 1, 3 et 4 ont une taille assez proche à celle de gp91^{phox}: NOX1 et NOX3 présentent 60 % d'homologie de séquence avec gp91^{phox} alors que NOX4 n'en possède que 39 %. Quand aux NOX5 et DUOX, ils diffèrent beaucoup plus de gp91^{phox}. NOX5 possède une séquence N-terminale supplémentaire contenant quatre sites de liaison du calcium (motif EF-hand). La production de ROS par NOX5 est calcium-dépendante *via* ces motifs EF-hand (Figure 2) (37).

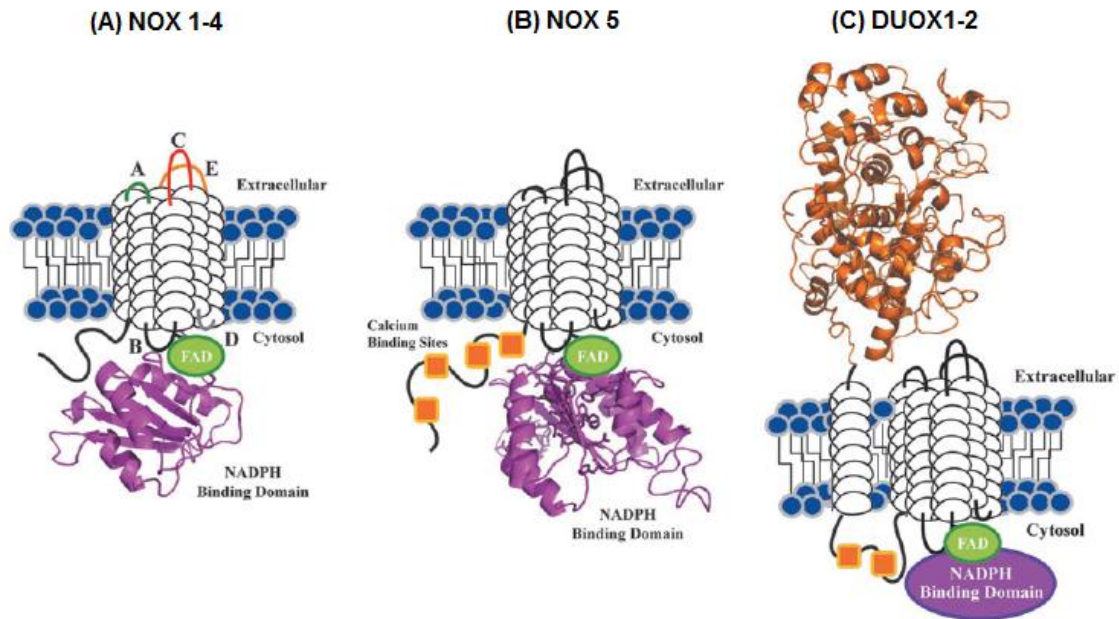


Figure 2: Schéma représentatif des structures conservées dans la famille NADPH oxydase. Chacune des isoformes NOX/DUOX contient six domaines transmembranaires putatifs et un domaine de fixation de FAD et un domaine pour NADPH en C-terminal (46).

Deux homologues de grande taille ont été identifiés dans la thyroïde DUOX1 et DUOX2. Ils possèdent une partie N-terminale formée de deux motifs EF-hand suivie d'une hélice transmembranaire supplémentaire. Ils présentent une double homologie : l'une avec la gp91^{phox} et l'autre avec la peroxydase, d'où l'appellation DUOX pour «Dual-oxydase». Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit par DUOX2 est essentiel dans la synthèse des hormones thyroïdiennes (47). DUOX1 est exprimée dans l'épithélium du poumon (48) alors que DUOX2 est exprimée le long du tractus digestif (49). Cela laisse suggérer que les DUOXs pourraient aussi être impliquées dans la défense anti-infectieuse de l'hôte au niveau de la muqueuse, et en plus seraient des protéines essentielles dans la pathogenèse allergiques des voies respiratoires (50).

Les membres de la famille NOX ont une distribution tissulaire très variée et ont des partenaires d'activation différents (Tableau 1).

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Enzyme	Partenaires essentiels d'interaction	Distribution cellulaire
NOX1	p22 ^{phox} , NOXA1/p67 ^{phox} , Rac	Colon, utérus, prostate, estomac
Gp91^{phox}/NOX2	p22 ^{phox} , p67 ^{phox} , p47 ^{phox} , Rac	Phagocytes, endothélium, cardiomyocyte, poumon
NOX3	p22 ^{phox} , NOXA1/p67 ^{phox} , NOXO1/p47 ^{phox} , Rac	Oreille interne, rein, foie, poumon et rate
NOX4	p22 ^{phox}	Rein, ovaire, cerveau, cardiomyocyte, endothélium, placenta, muscle
NOX5		Les testicules, ganglions lymphatiques, prostate, sein, cerveau
DUOX1	DUOXA1	thyroïde, poumon, prostate, testicule
DUOX2	DUOXA2	La thyroïde, les glandes salivaires, Le côlon, le pancréas

Tableau 1: Distribution tissulaire des différentes NOX.
(46, 51)

2. Les espèces réactives de l'oxygène :

Un des mécanismes des neutrophiles pour éliminer les pathogènes consiste à produire des ROS à partir des anions superoxydes (précurseur des ROS).

Les ROS sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques car elles peuvent avoir des effets à la fois bénéfiques et délétères dans les organismes vivants (52). C'est pourquoi les phagocytes doivent contrôler avec précision le lieu ainsi que le moment de l'activité de la NADPH oxydase (53). La production des ROS lors de la phagocytose est une fonction essentielle dans les mécanismes de défense contre les pathogènes et dans l'induction des réponses cellulaires. Par contre, une production excessive de ROS peut entraîner d'importants dommages dans les structures cellulaires et notamment, au niveau des membranes biologiques, des lipides, des protéines et des acides nucléiques (54).

Plusieurs sources génératrices d'anions O₂^{•-} ont été rapportées comme par exemple la chaîne respiratoire mitochondriale mais certaines restent modestes par rapport à la NADPH

oxydase. Ce complexe enzymatique produit la majeure partie des anions superoxyde $O_2^{\cdot-}$ dans la cellule (Figure 3).

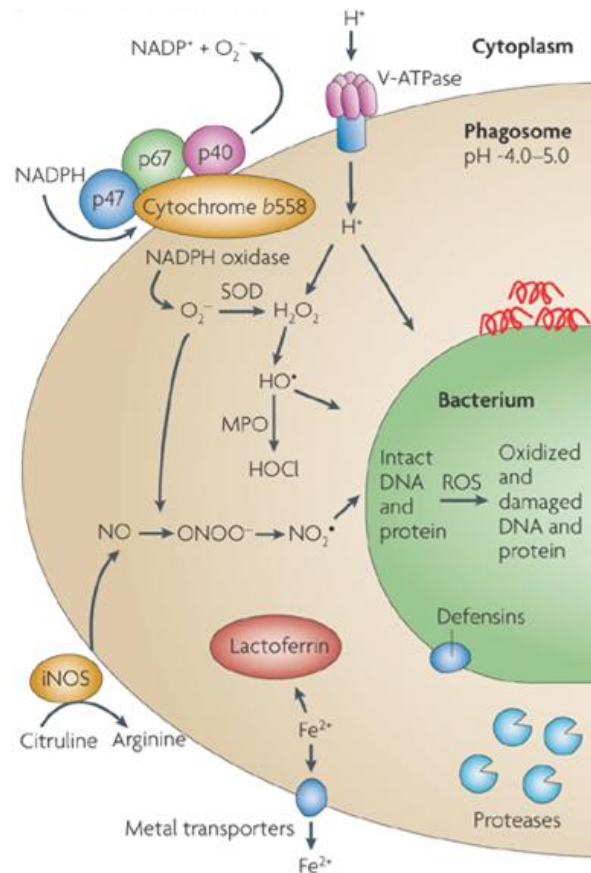


Figure 3 :L'arsenal microbicide des phagocytes.

Les mécanismes microbicides de l'hôte comprennent NOX2, la NO synthase inducible (iNOS), piègeurs de fer et exportateurs, ainsi que des peptides antimicrobiens et des protéines qui perméabilisent et dégradent les bactéries (55).

III. Le complexe NADPH oxydase phagocytaire et son activation

1. Activation du complexe NADPH oxydase

La NADPH oxydase phagocytaire est une machinerie protéique complexe où des protéines solubles cytosoliques ($p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, et une petite protéine G Rac) et membranaires (**flavocytochrome b_{558}** ou **Cy***t*** b_{558}**) interagissent pour conduire à un complexe actif capable de produire massivement de l'anion superoxyde dans l'espace extracellulaire ou dans le phagosome (Figure 4)(56-58). Dans la mesure où une production excessive et inappropriée d'espèces réactives de l'oxygène par les phagocytes provoquerait des dommages aux cellules voisines et une inflammation sévère, l'activité de la NADPH oxydase doit être spatialement et temporellement régulée dans les cellules (59). Afin de contrôler finement

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

l'activité de l'oxydase, les différentes composantes de l'oxydase sont dispersées dans la cellule au repos. Lors de l'activation de l'enzyme, une cascade de signalisation cellulaire impliquant des événements de phosphorylation et de production d'acide arachidonique conduit à la translocation des protéines cytosoliques vers la membrane (60-64).

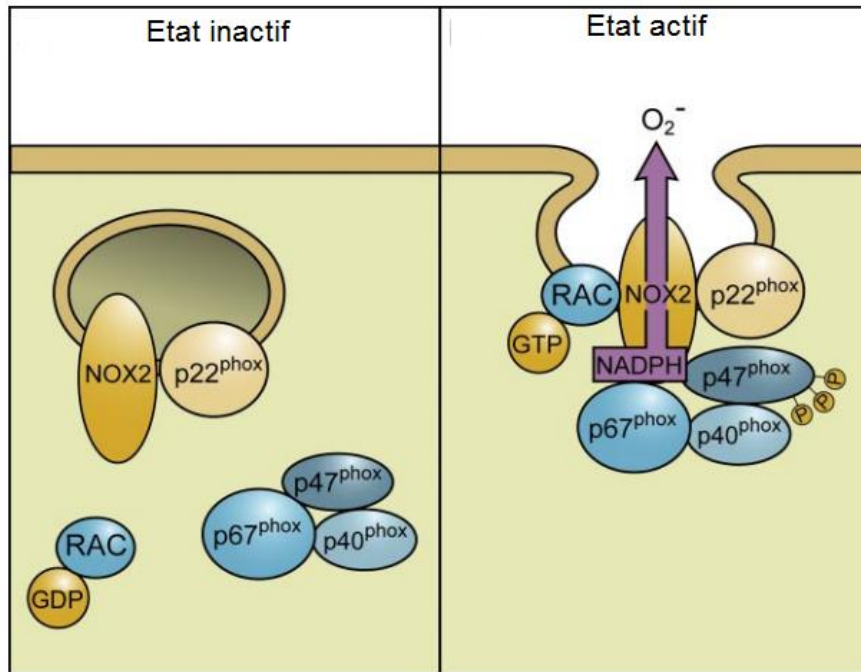


Figure 4: Le complexe NADPH oxydase au repos et activé.

L'assemblage de la NADPH oxydase phagocytaire NOX2. Elle est fortement exprimée dans les granulocytes et les monocytes / macrophages et elle contribue à la destruction des microbes. Dans les neutrophiles au repos, NOX2 et p22^{phox} se trouvent principalement dans la membrane des vésicules intracellulaires. Suite à l'activation, il y a un échange de GDP en GTP sur le RAC conduisant à son activation. La phosphorylation de la sous-unité cytosolique p47^{phox} entraîne des changements conformationnelles qui permettent l'interaction avec p22^{phox}. Le mouvement de p47^{phox} apporte avec lui les autres sous-unités cytoplasmiques p67^{phox} et p40^{phox}, pour former le complexe enzymatique actif. Une fois activé, il existe une fusion de vésicules contenant Nox2 avec la membrane plasmique ou la membrane phagosome. Le complexe enzymatique actif transporte des électrons de part et d'autre de la membrane(42).

Le processus de translocation et d'assemblage du complexe NADPH oxydase nécessite l'activation de la protéine Rac et des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations réversibles d'acides aminés sérine et thréonine des facteurs cytosoliques (p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox}), ainsi que de p22^{phox} et gp91^{phox} (65-66). Ces événements sont induits par divers stimuli *via* différentes voies de signalisation qui peuvent se recouper ou agir en synergie. L'intensité et la durée de l'activité NADPH oxydase dépendent des stimuli présents et de leur quantité.

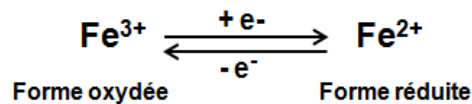
2. Présentation des différentes protéines constituant le complexe NADPH oxydase phagocytaire

Les protéines cytosoliques sont situées dans le cytosol dans les phagocytes au repos et jouent des rôles régulateurs. Le $\text{Cyt}_{b_{558}}$ est situé dans la membrane des neutrophiles et constitue le cœur catalytique du complexe NADPH oxydase en présentant à la fois les propriétés des cytochromes, des flavoprotéines et des protéines membranaires.

IV. Le flavocytochrome b_{558} : une flavohémoprotéine

1. Généralités sur les cytochromes

Les cytochromes dont le rôle fut élucidé en 1925 par David Keilin, sont des protéines redox que l'on trouve chez tous les organismes sauf chez quelques anaérobies obligatoires. Ces protéines contiennent des groupes prosthétiques hémiques dont l'état d'oxydation alterne d'un état ferreux (Fe^{2+}) à un état ferrique (Fe^{3+}):



Les hèmes réduits des cytochromes (Fe^{2+}) ont des spectres caractéristiques dans le visible avec trois pics d'absorption : les bandes α , β et δ (bande de Soret). La longueur d'onde d'absorption de la bande α varie selon le cytochrome. Elle est absente si les cytochromes sont oxydés et elle est utile pour distinguer les différents types de cytochromes. Il existe 3 types de cytochrome selon le groupe porphyrine qu'il contient: a , b et c (Figure 5) (67).

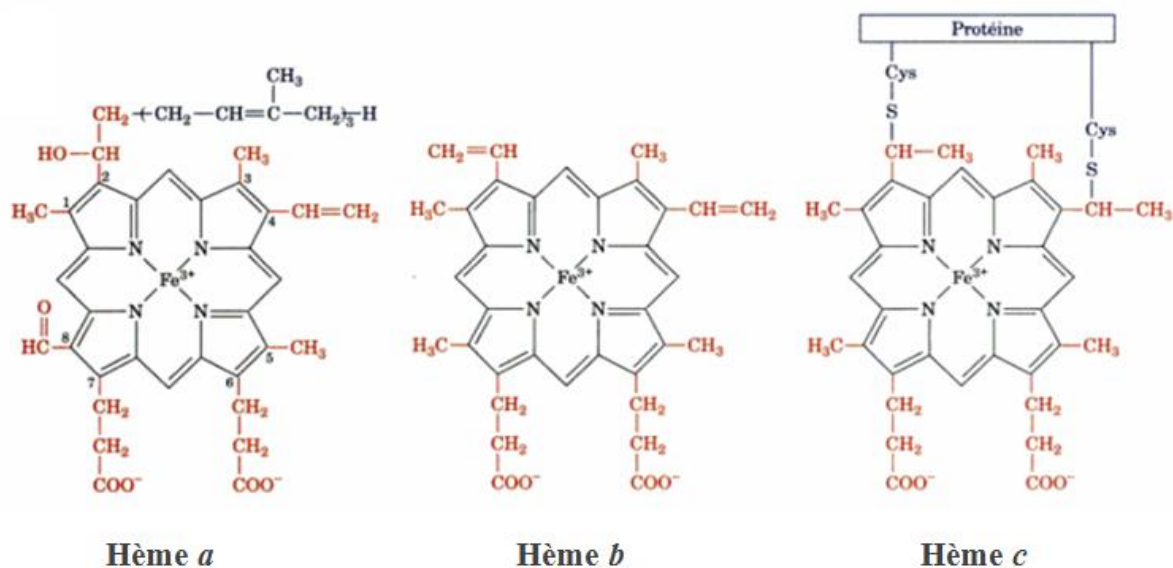


Figure 5 : Noyaux porphyrines des cytochromes (67).

Dans chaque groupe cytochrome, de légères différences des pics d'absorption des bandes α , β et γ permettent de distinguer des environnements différents du noyau hémique, voir tableau 2ci-dessous :

Cytochrome	Réduit			Oxydé
	α	β	γ	γ
<i>a</i>	590-604	520-565	442-444	415-426
<i>b</i>	556-563	556-563	423-430	413-414
<i>c</i>	550-555	521-526	416-420	410-415

Tableau 2: Classification des cytochromes en fonction de leur spectre d'absorption

D'après D.keilin (68) En règle générale, un cytochrome possède un pic majeur d'absorption appelé bande de Soret (ou bande γ) dans son état redox oxydé, alors que le cytochrome réduit en possède trois pics d'absorption nommés respectivement : α , β et γ (ou bande de Soret).

Le cytochrome b_{558} qui constitue le cœur catalytique de la NADPH oxydase contient deux hèmes de type *b* et présente un pic d'absorption à 414 nm dans son état oxydé et à 558 nm dans son état redox réduit (60). Cela lui confère un spectre de différence d'absorption spécifique avec des pics caractéristiques aux longueurs d'onde 427 nm et 558 nm (d'où sa dénomination; Figure6).

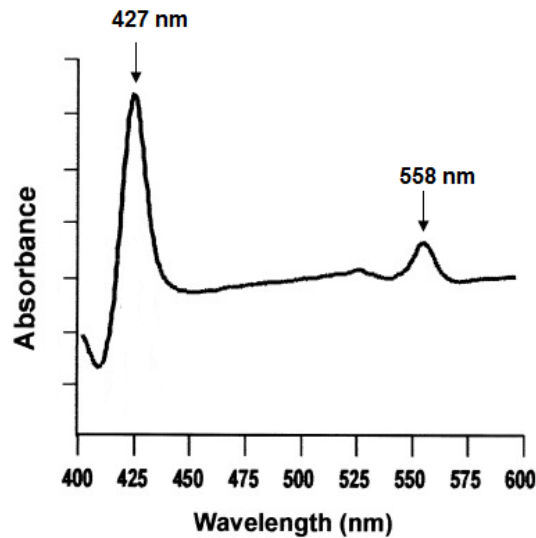


Figure 6:Spectre de différence d'absorption du cytochrome b_{558} .

Spectre de différence d'absorption (réduit-oxydé) du cytochrome b_{558} solubilisé des neutrophiles humain (69).

Les deux hèmes prédits du cytochrome b_{558} sont liés de façon non covalente à la protéine (70).

2. Généralités sur les flavines

Le cytochrome b_{558} est aussi une flavoprotéine puisqu'il possède un site de fixation pour une molécule de flavine adénine dinucléotide (FAD).

Les flavines sont des molécules organiques dérivées de la vitamine B2, également connue sous le nom de riboflavine. Elles sont, à ce titre, impliquées dans un grand nombre de processus biologiques et en particulier dans les réactions d'oxydation où elles jouent un rôle essentiel en catalysant l'activation de l'oxygène au sein des flavoprotéines (71). Les flavines peuvent exister sous trois états rédox différents illustrés sur la figure7(72): la forme oxydée (flavoquinone), la forme réduite à un électron (flavosemiquinone) et la forme réduite à deux électrons (flavoquinone).

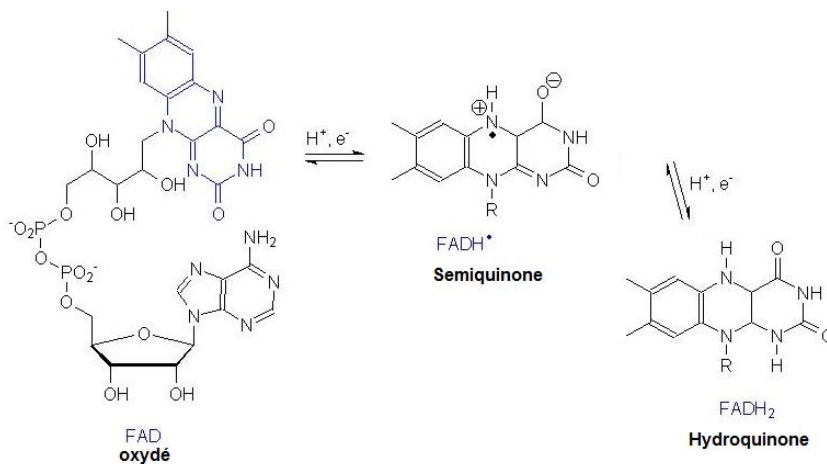


Figure 7 :Différents états redox de la flavine.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Les flavines réduites sont très réactives vis-à-vis de l'oxygène. Elles ont le pouvoir de le réduire à 1 ou 2 électrons, produisant respectivement l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

La reconstitution de l'activité NADPH oxydase *in vitro* avec du cytochrome b_{558} purifié ou en membrane nécessite parfois l'addition de FAD exogène pour que le transfert d'électron aura lieu (73) indiquant que la flavine peut être facilement perdue en cours de purification.

3. Généralités sur les protéines membranaires

Le flavocytochrome b_{558} est un complexe membranaire. Il s'agit d'un hétérodimère constitué d'une petite protéine $p22^{phox}$ (ou sous unité α et de taille 22 kDa) et la glycoprotéine $gp91^{phox}$ (ou sous unité β et d'une taille d'environ 91 kDa en fonction de son degré de glycosylation) (57). Dans les membranes biologiques, les protéines membranaires présentent une très grande diversité structurale et fonctionnelle. Selon la nature de leur structure et leur mode d'interaction avec la membrane, les protéines membranaires sont appelées extrinsèques (ou périphériques) ou intrinsèques (transmembranaires ou intégrales) en fonction des différents modes d'association avec la bicouche lipidique (Figure 8).

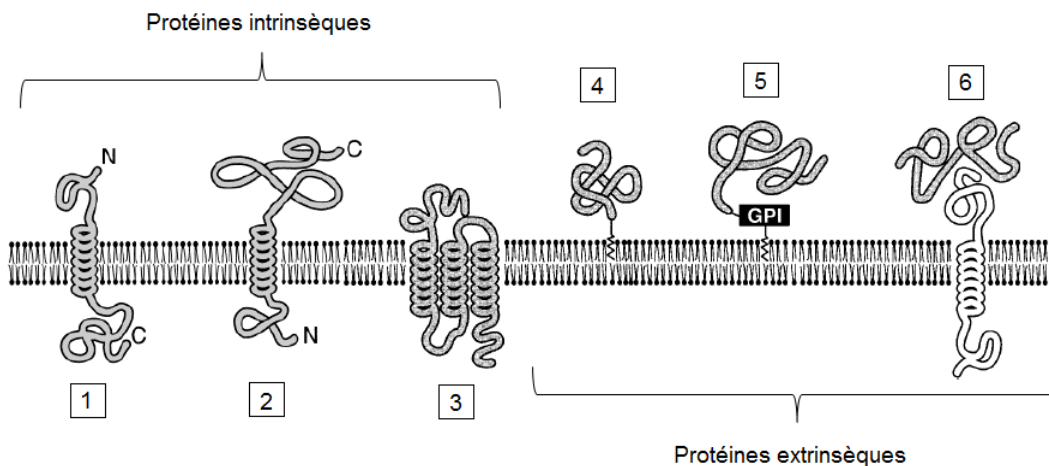


Figure 8: Différents types de protéines membranaires.

Classification selon leur structure et leur association avec la membrane(74). (1) et (2) des une protéine transmembranaire de type I et II respectivement avec un seul passage transmembranaire. La différence entre le type I et le type II est au niveau de l'emplacement de la région C-terminale et la région N-terminale soit extracellulaire soit intracellulaire, (3) protéine transmembranaires avec multi passages à travers la membrane, (4) protéine liée à la membrane avec une chaîne lipidique, (5) protéine fixée à la membrane via un GPI et (6) protéine membranaire périphérique.

Les protéines **intrinsèques**, comme cela est le cas pour le flavocytochrome b_{558} sont des molécules amphiphiles comportant des régions hydrophiles et hydrophobes qui traversent

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

une ou plusieurs fois la membrane (Figure 8 ; exemples 1, 2 et 3). Les régions hydrophobes sont majoritairement constituées d'acides aminés portant des chaînes latérales de nature hydrophobe (leucine, valine,...) qui sont repliées sous la forme d'hélices α et de tonneaux β .

Les protéines **extrinsèques** correspondent aux protéines associées en surface à la bicouche lipidique sans la traverser, soit par liaison covalente avec des lipides membranaires situés dans la monocouche externe de la membrane (Figure 8 ; exemple 4), soit par des liaisons faibles interactions électrostatiques ou liaisons hydrogène avec les extrémités hydrophiles des phospholipides ou de protéines intégrées à la membrane (Figure 8 ; exemples 5 et 6). Ces protéines peuvent facilement être détachées de la membrane par extraction en utilisant des conditions opératoires modérées avec des solutions à force ionique et pH modulables.

Les protéines membranaires participent à un grand nombre de processus essentiels de la vie cellulaire tels que : les échanges transmembranaires d'ions, de solutés et de signaux métaboliques, la transduction de signaux extracellulaires, l'association des cellules en tissus et la multi-résistance aux drogues. Cependant, contrairement à leurs homologues solubles, leurs fonctions sont encore mal connues en raison en partie du manque encore important d'information structurale.

Cela est le cas effectivement du flavocytochrome b_{558} pour lequel il n'y a pas, à l'heure actuelle, de données structurales. Les informations concernant sa topologie découlent de données prédictives et expérimentales.

4. Le flavocytochrome b_{558}

i. La protéine gp91^{phox}

La protéine gp91^{phox} codée par le gène *CYBB* localisé sur le chromosome X est composée de 570 acides aminés. La protéine gp91^{phox} des phagocytes est la première à avoir été étudiée. Cette protéine constitue l'architecture protéique commune à toutes les autres protéines de la famille des NADPH oxydases non phagocytaires. Elle contient tous les groupements redox nécessaires à sa fonction : deux hèmes, FAD et le site de fixation du cofacteur NADPH.

Cette protéine est synthétisée dans le réticulum endoplasmique sous forme d'un précurseur gp65 (de taille 65 kDa) contenant des chaînes latérales riches en mannose (75). Le corps peptidique de gp91^{phox} déglycosylé a une masse molaire apparente d'environ 50 kDa (76-77). La forme mature de gp91^{phox} présente une forte N-glycosylation (~ 85 - 100 kDa) (60). Il

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

a été montré que sa maturation complète requiert la présence de $p22^{phox}$ qui facilite la glycosylation et la stabilisation de l'hétérodimère (75, 78-79).

Le $gp91^{phox}$ mature porte une majorité de N-acétyl glucosamine et galactose, et une minorité de sucres mannose, glucose, fructose et xylose (80). Des expériences réalisées avec le cytochrome b_{558} natif purifié à partir des neutrophiles ont montré que la glycosylation de $gp91^{phox}$ n'est pas nécessaire à la fonction catalytique de l'oxydase mais semble protéger la protéine de la dégradation protéolytique (81).

Un autre type de modification post-traductionnelle a été mis en évidence au niveau de $gp91^{phox}$ dans le neutrophile humain. Lors d'une activation des neutrophiles par des stimuli tels que le phorbol myristate acétate (PMA) et le N-formyl-L-méthionyl-L-leucyl-phenylalanine (fMLF), une phosphorylation de $gp91^{phox}$ a été mise en évidence (66) qui favorise l'interaction avec $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et Rac2. La phosphorylation a lieu dans sa région cytosolique C-terminale au niveau des séquences 321-405 et 466-570. Ces séquences contiennent trois sites potentiels de phosphorylation par la protéine Kinase c : Ser333, Thr309 et Ser550.

La séquence de $gp91^{phox}$ peut être divisée en deux parties de taille similaire. La région N-terminale membranaire fixe deux hèmes b et la région C-terminale, homologue à la ferrédoxine-NADP⁺ (FNR) présente les sites de fixation du NADPH et du FAD (73, 82-83). L'utilisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre le peptide N-terminal du $gp91^{phox}$ sur des neutrophiles (84), a permis d'identifier la localisation du N-terminal de $gp91^{phox}$. Ces travaux ont montré que le domaine N-terminal est localisé dans la face cytoplasmique de la membrane.

a. Le domaine membranaire N-terminal de $gp91^{phox}$

C'est le domaine hydrophobe de la sous unité $gp91^{phox}$ qui contient les hèmes. Selon son profil d'hydrophobicité, ce domaine contient six hélices transmembranaires α (I - VI) (Figure 9 ; C) (85). $Gp91^{phox}$ possède au total sept résidus histidines (101, 111, 115, 119, 209, 210, 222) localisés dans le domaine transmembranaire III et V. L'étude des mutations au niveau de ces résidus a montré que les His 101, His 115, His 209, et His 222 sont nécessaires pour coordonner les deux hèmes dans le flavocytochrome b_{558} des phagocytes (86). Ces résidus histidines sont conservés parmi tous les membres de la famille NADPH oxydase. Des mutations dans l'un de ces résidus (His 101, His 115, His 209 et His 222) sont associées à un

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

certain nombre de cas de CGD (87). Ceci suggère que l'incorporation des hèmes est associée à la maturation et/ou la stabilité de gp91^{phox} dans les neutrophiles.

La séquence de la région N-terminale de gp91^{phox} a été comparée à celui de Fre1 (Figure 9, A), la ferrique réductase de la levure (88-89). Par analogie, un modèle de coordination des deux hèmes de gp91^{phox} a été proposé (Figure 9, B).

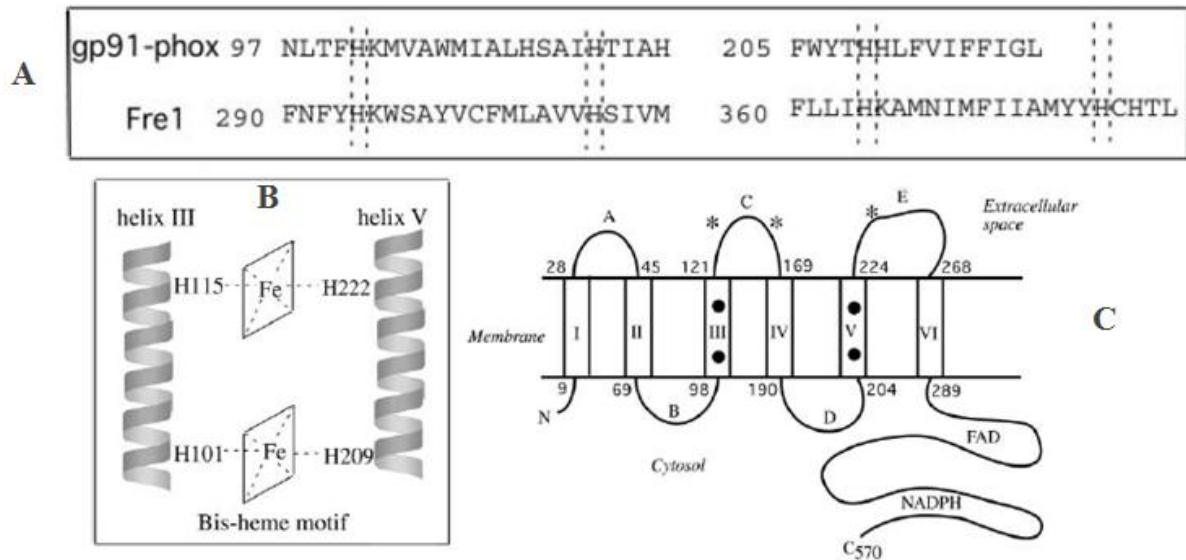


Figure 9 : Les domaines hémiques de la protéine gp91^{phox} humaine

(60). La localisation des résidus histidines qui lient les deux hèmes de gp91^{phox} sont déduits de la comparaison de séquence polypeptidique de gp91^{phox} avec la Fre 1 de levure. (B) la figure montre une organisation prédictive avec les deux atomes de Fer de gp91^{phox} avec les résidus His 101 et His 209, His 115 et His 222. (C) présentation de la topologie de gp91^{phox} : la position des résidus Asn 132, Asn 149 et Asn 240 sur les loupes C et D est représentée avec une *.

Le positionnement prédit des groupes hémiques (un dirigé vers la face interne et un dirigé vers la face externe) était cohérent avec leur fonction de transporteur d'électrons. En effet, le transfert d'électron se fait à travers la membrane (57, 60).

Des analyses de résonance paramagnétique électronique (RPE)(90-92) suggèrent que les deux hèmes ont une configuration de type low spin (hexacoordonnée) ce qui impliquerait que le transfert d'électrons à l'oxygène se ferait par le bord de l'hème plutôt que par une coordination directe avec le fer hémique. Le fait que les inhibiteurs classiques des hèmes (CO, azide...) n'aient pas d'effet sur les hèmes, soutient cette hypothèse (93-94).

Néanmoins, une autre hypothèse impliquant une interaction directe de l'O₂ avec un des deux hèmes est aussi avancée. Il a ainsi été suggéré que l'un des deux hèmes (ou éventuellement les deux) peut subir une transition de bas spin à haut spin lors de l'activation de l'oxydase qui pourrait permettre à l'oxygène de se fixer au Fer de l'hème (61, 70).

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Il a été démontré que les boucles intracytoplasmiques sont importantes dans le fonctionnement du *cytb*₅₅₈. En effet, la boucle B est impliquée dans l'assemblage de la NADPH oxydase lors de l'activation (95). Un peptide chargé mimant une partie de la boucle B a été démontré comme étant inhibiteur spécifique de gp91^{phox} montrant que cette boucle est importante dans le maintien de l'activité de l'oxydase (96). La boucle D qui est localisée près du 5^{ème} passage transmembranaire, participe probablement au transfert des électrons du FAD à l'O₂ indépendamment de la translocation des protéines cytosoliques (97). Ces boucles contiennent aussi les sites de glycosylation de gp91^{phox} (77).

b. Le domaine C-terminal cytosolique de gp91^{phox}

Le domaine C-terminal de gp91^{phox} contient les sites de fixation de FAD et du NADPH (73, 83, 98-99). Il faut mentionner que cette région C-ter de gp91^{phox} présente une forte homologie de séquence avec les protéines de la famille des ferrédoxines NADP réductase (83). L'analyse des séquences protéiques montre que ce domaine reste conservé chez l'ensemble des membres de la famille NOX.

L'affinité du FAD a été déterminée en *Cytb*₅₅₈ purifié et reconstitué en protéoliposomes avec une valeur de K_d d'environ 20-70 nM (100-104). Cette étude a montré que l'affinité de FAD est modulée selon l'environnement lipidique.

Le substrat de l'oxydase, le NADPH possède une affinité faible pour son site enzymatique avec une valeur de K_M d'environ 25-30 µM (105). Bien qu'une petite partie du site de fixation du NADPH ait pu être résolue par cristallographie aux rayons X (pdb : 3AF), il reste difficile de prédire le mode d'amarrage du NADPH dans son site de reconnaissance. Un certain nombre de mutations identifiées chez des patients atteints de CGD se situent au niveau des sites de fixation du FAD et du NADPH. La mutation localisée dans la région du site putatif de fixation de NADPH provoque la suppression de l'activité oxydase (106). Deux types de mutation ont été observés, la première mutation dans le site de fixation du FAD provoque une instabilité partielle de la synthèse du *Cytb*₅₅₈ (107) alors qu'une double mutation au niveau du C-ter cytosolique de gp91^{phox}, proche du site de fixation du FAD provoque des problèmes d'assemblage du complexe et de transfert d'électrons mais n'intervient pas au niveau de la fixation du FAD dans son site (108). Selon un modèle structural de la région C-terminale cytosolique de gp91^{phox} (109), il a été constaté que la plupart des mutations du gène *CYBB* étaient situées dans/ou à proximité des régions de fixation du FAD et NADPH. Ceci peut

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

avoir un impact sur l'activité oxydase, l'assemblage du complexe, l'intégrité du site actif, le transfert d'électrons et l'incorporation du FAD et du NADPH (110).

Ce modèle 3D de la partie C-terminale de gp91^{phox} a été construit à partir de la structure atomique de la ferrédoxine réductase (109) et a permis l'étude des interactions du C-terminal de gp91^{phox} avec les sous unités cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox} (Figure 10) (111-112).

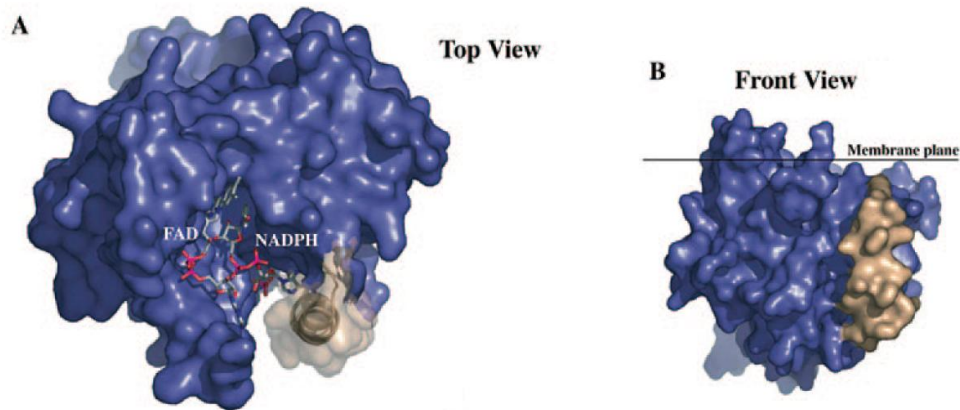


Figure 10: Représentation du modèle structurelle de la partie cytosolique C-ter du gp91^{phox} (112). La partie dessinée en bleu est une vue de dessus à partir de l'intérieur de la membrane. La FAD et le NADPH sont représentés comme des bâtons à l'aide du code couleur CPK. La surface de l'hélice supplémentaire (résidu 483 à 507), fermant l'accès pour le site de fixation du NADPH, est de couleur sable

ii. La protéine p22^{phox}

La protéine p22^{phox} du Cytb₅₅₈ codée par le gène *CYBA* est composée de 194 acides aminés et possède une masse moléculaire apparente d'environ 22 kDa. D'après le profil d'hydrophobicité déduit de sa composition en acides aminés, elle serait constituée de 2, 3 ou 4 hélices α transmembranaires (113-115).

Cette protéine peut interagir *via* sa région riche en proline (résidu 155-160) située sur la partie C-terminale de p22^{phox} avec la protéine cytosolique p47^{phox} au cours de l'activation (116-117). En plus cette région riche en proline (PRR) de p22^{phox} semble être critique pour l'assemblage du complexe NADPH oxydase puisque l'activité oxydase est perdue après délétion de ce domaine (113, 118-121).

La protéine p22^{phox} servirait aussi de point d'ancrage de la protéine cytosolique p67^{phox}. L'affinité de p67^{phox} pour p22^{phox} est toutefois moins importante que celle de p47^{phox} (113). Certains travaux ont suggéré que le p22^{phox} joue un rôle crucial dans l'incorporation et la coordination des hèmes (122-123). La région N-terminale du p22^{phox} joue un rôle important dans l'assemblage de l'hétérodimère du flavocytochrome *b*₅₅₈ (124). En outre, la stabilité de

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

l'hétérodimère est tributaire de la co-expression des deux sous-unités membranaires gp91^{phox} et p22^{phox} (75, 125).

Des anticorps monoclonaux ont été produits contre le cytochrome *b*₅₅₈ de neutrophile humain purifié, ce qui a permis la caractérisation de la topologie de p22^{phox} et l'étude du changement de conformation du Cyt*b*₅₅₈. L'étude faite avec ces anticorps a identifié les épitopes nécessaires dans la maturation et l'activation de NOX2. Suite à cette analyse faite avec ces anticorps, un modèle à deux hélices transmembranaires a suggéré (Figure 11, A)(126).

Récemment, un modèle 3D de p22^{phox} humain a été construit en se basant sur la séquence en acides aminés. La structure prédite de p22^{phox} est constituée de deux domaines : un domaine transmembranaire en N-terminal et un domaine cytosolique en C-terminal. Contrairement à ce qui était avancé dans la littérature proposant 2/4 hélices transmembranaires avec les C- et N-terminales intracellulaires, cette modélisation prédit que la forme la plus stable de p22^{phox} est celle qui contient 3 hélices transmembranaires menant une extrémité N-terminale extracellulaire et une boucle extracellulaire entre les hélice II et III (Figure 11)(115).

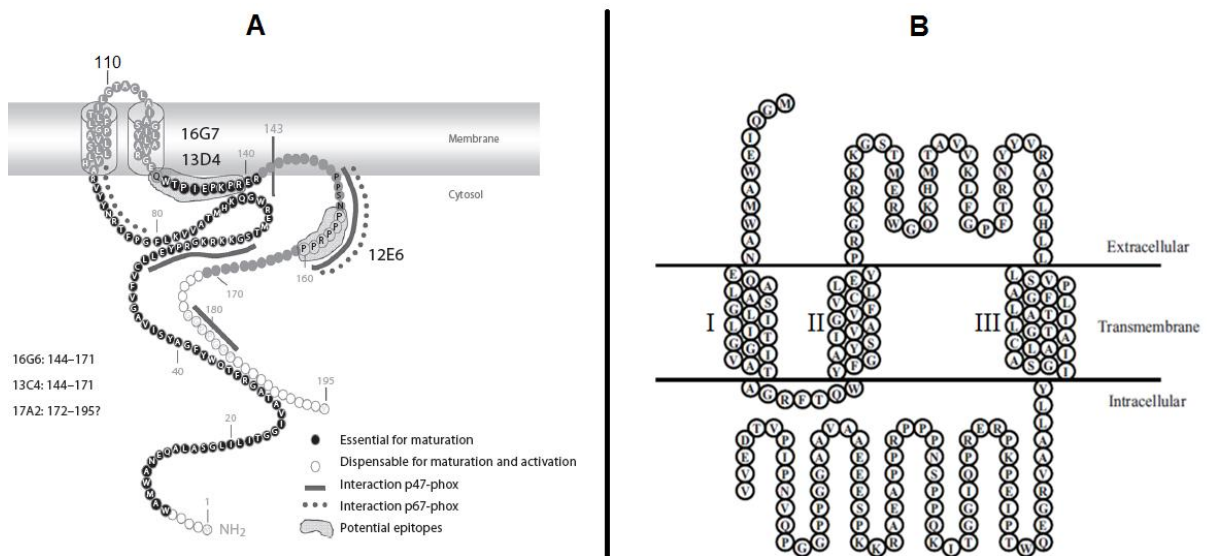


Figure 11 : Modèles de topologie de p22^{phox}

(A) Modèle de topologie de p22^{phox} : il propose deux domaines transmembranaires et les régions contenant les acides aminés essentiels ou indispensables à la maturation et l'activation du Cyt*b*₅₅₈ (126). (B) Modèle récent prédit *in silico* de p22^{phox} (115).

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Comme gp91^{phox}, la protéine p22^{phox} subit aussi des modifications post-traductionnelles. Contrairement à gp91^{phox}, elle n'est pas glycosylée mais présente des phosphorylations dans les neutrophiles qui semblent être corrélées avec l'activité NADPH oxydase (127).

V. Les protéines cytosoliques

L'analyse de séquences protéiques et les quelques données structurales disponibles sur des protéines cytosoliques (128-132) ont permis de montrer que p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} contiennent des séquences typiques de domaines structuraux (motifs SH3, PX, PolyProline, TPR...) présents dans les protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. Ces protéines cytosoliques sont des protéines « modulaires » capables d'interagir entre elles et avec le cytb₅₅₈ lors de l'activation des phagocytes pour former le complexe actif de la NADPH oxydase. Les protéines sont structurellement beaucoup mieux connues que les protéines membranaires. Néanmoins, leurs structures 3D n'ont été déterminées que module par module puisque les tentatives de cristalliser les protéines cytosoliques dans leur totalité ont échoué en raison très probablement de la grande flexibilité de ces protéines.

1. La protéine p47^{phox}

La protéine cytosolique p47^{phox} est codée par le gène *NCF1* (Neutrophile Cytosolic Factor 1) localisé sur le chromosome 7(7q11.23). Cette protéine a une taille de 47 kDa, elle est constituée de 390 acides aminés. Elle se compose de plusieurs modules (Figure 12) : un domaine PX (Phox homology) en N-ter, deux domaines SH3 (Src Homology 3) en tandem, une région riche en résidus arginine et lysine (région polybasique) et une région riche en proline (PRR : proline rich region) (65, 133).

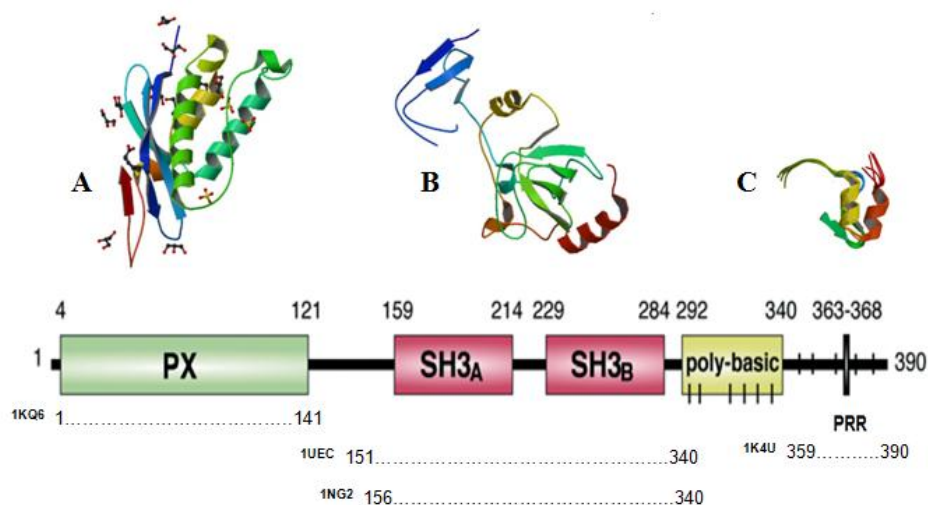


Figure 12 : Structure secondaire et cristallographique des différents domaines de p47^{phox}

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Structures 3D de la région N-ter (domaine PX) (A) (d'après Wahl et coll.), des domaines conservés SH3 et la région polybasique (B)(134-135) et de la partie riche en proline (C)(136).

Dans les cellules au repos, la protéine $p47^{phox}$ est repliée sur elle-même dans une conformation dite « auto-inhibitrice » (137). Lors de l'activation de la NADPH oxydase, la protéine $p47^{phox}$ fait l'objet, en premier lieu, d'une série de phosphorylations induites par des protéines kinases activées par la cascade cellulaire telle que la protéine kinase c (138-139). Elle possède 10 sites de phosphorylation actuellement identifiés, situés dans la région C-terminale (62, 139-141).

Il a été démontré in vitro, que $p47^{phox}$ n'était pas indispensable à l'activation de la NADPH oxydase et donc à la production d'anions superoxyde (142-143) Son absence peut être compensée par l'augmentation de la concentration protéique de $p67^{phox}$. La protéine $p47^{phox}$ apparaît comme une protéine organisatrice, sa principale fonction est de permettre la translocation de l'hétérotrimère $p40^{phox}$ - $p67^{phox}$ - $p47^{phox}$ à la membrane et de le positionner correctement au niveau du cytochrome b_{558} (144-146). Ceci a notamment été confirmé dans une expérience de reconstitution de l'activité NADPH oxydase en milieu acellulaire dans laquelle il a été observé que $p47^{phox}$ augmentait l'affinité de $p67^{phox}$ pour le cytochrome b_{558} (81).

2. La protéine $p67^{phox}$

La protéine cytosolique $p67^{phox}$, dont le gène NCF2 est localisé sur le chromosome 1 (1q25), est constituée de 526 acides aminés (65). Elle est formée par 4 modules différents (Figure 13): une répétition de 4 domaines : TPR (Tetratricopeptide Repeat), deux domaines SH3, une région riche en proline et un domaine PB1 (Phox Bem1p) (133).

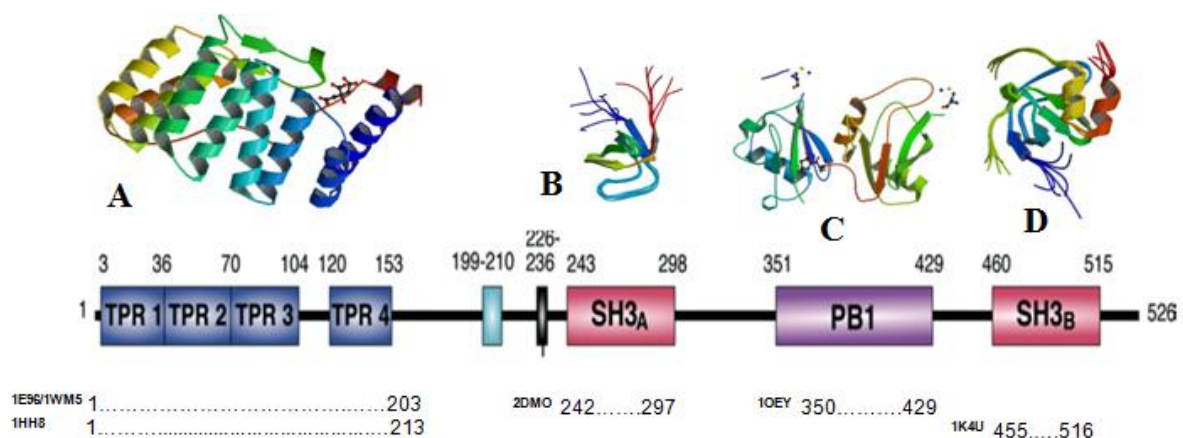


Figure 13 : Organisation modulaire et structure cristallographique des modules de $p67^{phox}$. Structures 3D de la région TPR en N-ter (A)(129, 132), du premier domaine SH3 (B) (d'après Tochio et coll.), du domaine PB1(C) (131) et du dernier domaine SH3 en C-ter de $p67^{phox}$ (D)(136).

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Lors de l'activation de la NADPH oxydase, la protéine cytosoliques p67^{phox} subit aussi quelques phosphorylations mais leurs rôles ne sont pas encore clairement établis (147-149). Contrairement à p47^{phox}, la reconstitution de l'activité oxydase *in vitro* requiert la présence de p67^{phox} (150-151). La protéine cytosoliques p67^{phox} est considérée comme l'activateur du complexe oxydase. Son association au cytochrome b₅₅₈ est essentielle à l'activation de ce complexe enzymatique (81).

La protéine p67^{phox} interagit avec la protéine Rac au niveau des domaines TPR (152) situés dans la région N-terminale de la protéine, et peut interagir également avec p40^{phox} (153). La plupart des cas de CGD liés à une déficience de p67^{phox} ont révélé des mutations au niveau de cette région N-terminale (154).

3. La protéine p40^{phox}

La protéine cytosolique p40^{phox} est codée par le gène *NCF4* situé sur le chromosome 22 (22q13.1). Cette protéine contient 339 acides aminés, elle est constituée de trois modules fonctionnels (Figure 14) : un domaine PX en N-ter, une région SH3 et un domaine PB1 en C-ter. Le domaine PB1 est susceptible de lier les régions SH3 de p67^{phox} (155). Le domaine SH3 (acides aminés 237-228) est susceptible de lier le domaine PRR de p22^{phox} (156).

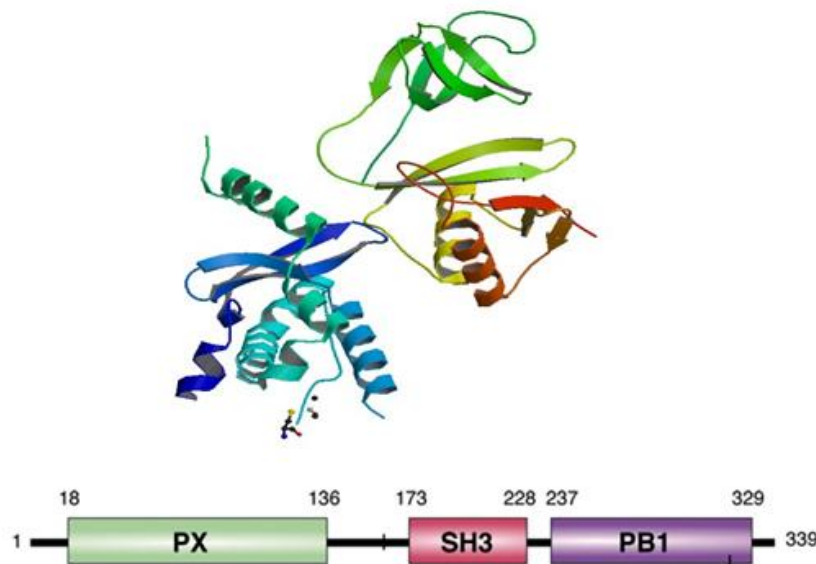


Figure 14 : Organisation des modules constituant p40^{phox} humain et sa structure 3D
(pdb: 2DYB)(157).

Par rapport à d'autres protéines cytosoliques, le rôle du p40^{phox} est le plus controversé à l'heure actuelle. Il a été démontré qu'elle interagissait avec p67^{phox} (158-159) et aurait une affinité pour le motif PRR de p47^{phox} (130). En effet, après phosphorylation de cette protéine

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

cytosolique, il a été suggéré qu'elle pouvait jouer un rôle significatif au cours de l'activation du complexe (130, 160-162). Elle joue probablement un rôle de stabilisation du complexe p47^{phox} / p67^{phox} dans le cytosol et facilite leur recrutement à la membrane lors de l'activation de la NADPH oxydase (133). Comme les autres protéines cytosoliques, p40^{phox} subit des phosphorylations lors de la stimulation de l'oxydase, ces événements se produisant en corrélation avec la production d'O₂⁻ (160).

4. La protéine G monomérique Rac

La protéine Rac est une petite protéine G monomérique, à activité GTPase. Les trois isoenzymes Rac1, Rac2 et Rac3 appartiennent à la sous-famille Rho. La protéine Rac3 est exprimée, chez l'homme, dans le cœur, le placenta et le pancréas ainsi que dans les lignées cellulaires de leucémie myéloïde et de carcinome mammaire (163). L'expression de Rac1 est ubiquitaire alors que celle de Rac2 est restreinte à la lignée myéloïde. Ces 2 isoformes présentent 92% d'homologie (164). Dans le neutrophile humain, la protéine Rac2 est la forme prédominante permettant d'activer la NADPH oxydase. Rac2 est codée par le gène *RAC2* situé au niveau du chromosome 22q13.1 et est constituée de 192 acides aminés et (28). *In vivo* et *in vitro*, Rac1 ou Rac2 sont essentielles pour l'activation du complexe oxydase (28-29, 165).

Du côté N-terminal, il existe deux domaines d'amorçage dont la conformation dépend de la liaison au GDP ou au GTP. L'association avec la protéine cytosolique RhoGDI (« Rho GDP dissociation inhibitor ») permet le maintien de Rac2 sous une forme inactive liée au GDP. Après la dissociation de RhoGDI (166), Rac2 peut lier et hydrolyser le GTP. Le changement de conformation qui s'ensuit permet à Rac de se lier à p67^{phox} (167). La translocation de Rac à la membrane plasmique est réalisée de manière indépendante de p47^{phox} et p67^{phox} (168). Rac joue un rôle important dans l'assemblage de la NADPH oxydase ainsi qu'au niveau de la régulation de son activité.

Pour l'étude de l'activité NADPH oxydase en système reconstitué *in vitro*, nous utilisons un mutant de Rac : « Rac1Q61L », dans lequel le résidu, Glutamine 61, est substitué par un Leucine. La mutation Q61L conduit à une forme de Rac constitutivement active. L'étude de ce mutant a montré qu'il est plus stable que Rac1 et qu'il a une affinité plus importante pour p67^{phox} et le complexe que Rac1 natif (169).

VI. Mécanisme réactionnel et assemblage du complexe NADPH oxydase phagocytaire

1. Description de l'assemblage du complexe actif de la NADPH oxydase

L'ensemble des interactions qui ont lieu lors de l'activation est résumé sur la figure 15. Dans les cellules au repos (trait pointillé bleu), les interactions entre protéines solubles impliquent les domaines SH3, riche en proline et les domaines PX de p47^{phox} et p67^{phox} (66, 170-172). Suite à un signal d'infection, l'assemblage du complexe enzymatique a lieu pour pouvoir produire l'anion superoxyde. Les données structurales sur les interactions intermoléculaires mises en jeu ne sont pas assez poussées donc les connaissances actuelles concernant son assemblage découlent de données indirectes. Lors du processus d'assemblage (pointillé rouge), le domaine SH3 de p67^{phox} interagit avec la région C-terminale riche en proline de p47^{phox} et le complexe ainsi formé migrent ensemble vers la membrane (173-176), alors que Rac est recruté à la membrane de manière indépendante (177).

Au niveau de la membrane, p67^{phox} forme un complexe avec Rac (132, 152) et ce complexe induit un changement conformationnel au niveau de gp91^{phox} qui permet le transfert d'électron du NADPH à l'oxygène (178-180).

Plusieurs travaux ont montré que les domaines SH3 de p47^{phox} interagissent avec la région C-terminale de p22^{phox} (116-117, 134, 137, 145, 181-184). L'interaction de p47^{phox} et p22^{phox} est essentielle à la fois pour le recrutement à la membrane et à l'activation du complexe NADPH oxydase (117, 120, 137, 145, 170, 181-182).

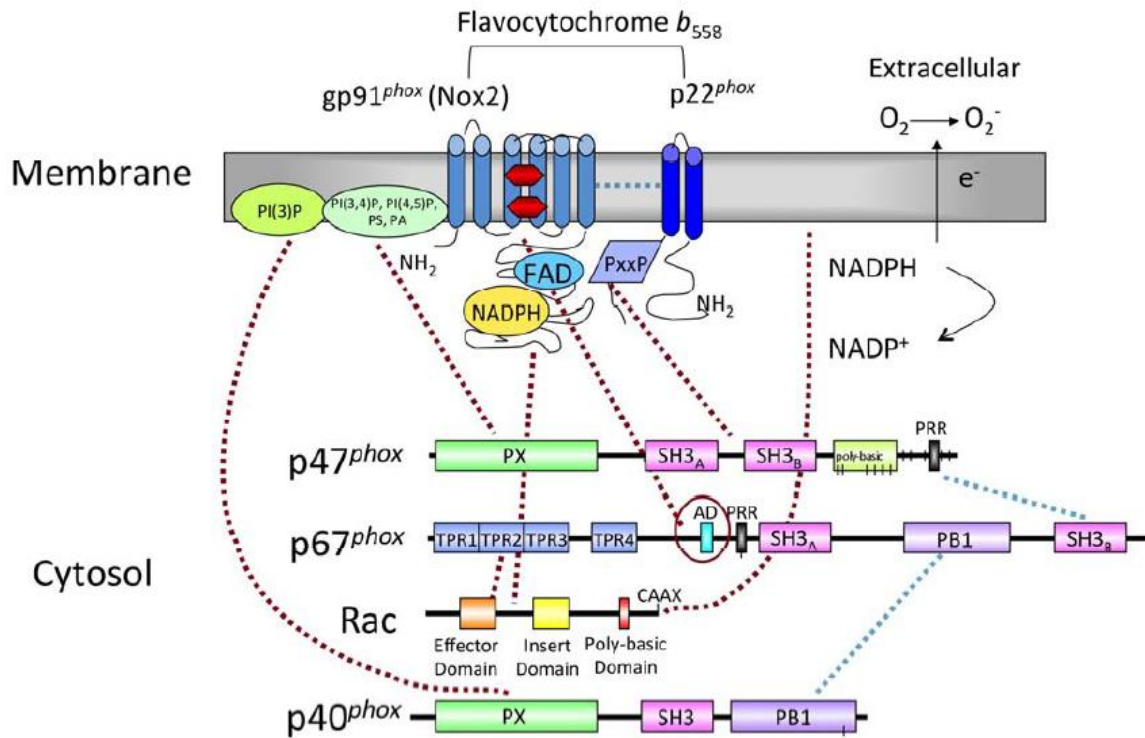


Figure 15: NADPH oxydase phagocytaire.

La structure des sous unités de la NADPH oxydase est présentée schématiquement. Les pointillés bleus présentent les interactions entre les sous-unités *phox* avant l'activation. Pointillés rouges présentent les interactions supplémentaires qui interviennent dans l'assemblage de la NADPH oxydase et de l'activité (53).

Bien que $gp91^{phox}$ et $p22^{phox}$ (185-186), $p67^{phox}$ (148-149) et $p40^{phox}$ (161-162) semblent subir des phosphorylations, $p47^{phox}$ est la sous unité qui subit le plus grand nombre de phosphorylations. Ces phosphorylations induisent vraisemblablement les modifications structurales de la protéine permettant $p47^{phox}$ d'interagir avec le complexe. D'autres interactions ont été montrées entre $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$ avec $gp91^{phox}$, en particulier dans la région avoisinant le site de fixation du NADPH (109). Le $p47^{phox}$ est ainsi décrit comme « adaptateur » et $p67^{phox}$ comme « activateur » du complexe. Le $p40^{phox}$ n'est pas nécessaire à l'activité de l'enzyme mais semble moduler son activité en favorisant la fixation des autres sous-unités (187).

2. Mécanismes réactionnels au sein du *Cytb*₅₅₈

Tous les groupes prosthétiques nécessaires à la production de l'anion superoxyde par le complexe NADPH oxydase sont localisés dans la protéine $gp91^{phox}$. Au sein de cette dernière, il y a les transferts d'électrons du substrat NADPH à l'oxygène moléculaire O_2 de part et d'autre de la membrane, par l'intermédiaire de la flavine FAD et des hèmes.

Le mécanisme réactionnel tenant compte des différents intermédiaires redox à un ou deux électrons est illustré sur la figure 16.

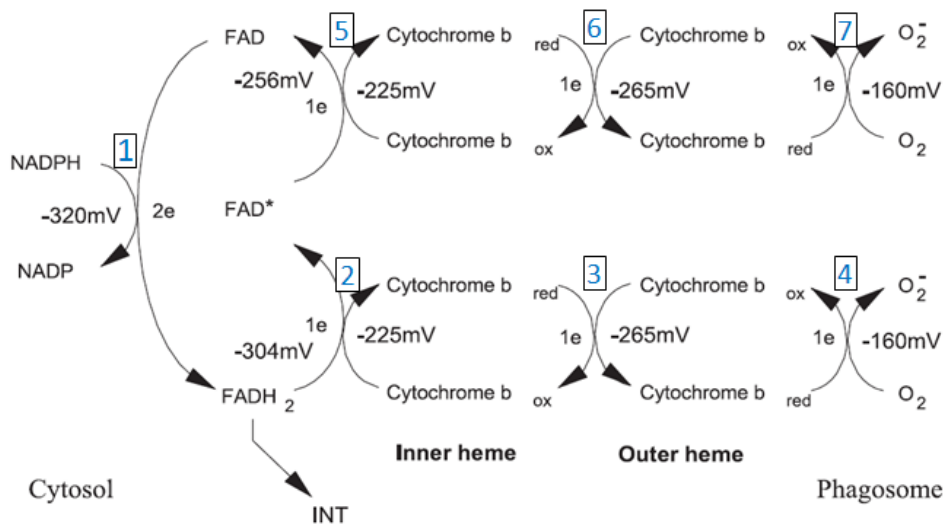


Figure 16 : Cascade de transfert d'électron dans le Cyt_b558.

Sept étapes de transferts d'électron sont proposées (105). Les potentiels redox identifiés pour chaque couple redox sont indiqués

La première étape de ces réactions consiste en un transfert de deux électrons du NADPH au FAD (1). Puis un électron est transféré depuis FADH₂ réduit jusqu'à l'hème interne. Il y a formation d'un composé radicalaire FAD* (2). Sachant que l'hème ne peut accepter qu'un seul électron à la fois, l'hème interne réduit d'abord l'hème externe (3) avant de recevoir le deuxième électron du FAD* (5). L'hème externe réduit transfère ensuite un électron à une molécule d'oxygène, conduisant à la génération d'un anion superoxyde (4). Le second électron suit alors le même cheminement de l'hème interne vers l'hème externe (6) et enfin vers l'oxygène (7) (60, 105).

La réaction globale mise en jeu ($\text{NADPH} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2 \text{O}_2^-$) montre qu'un proton est libéré du côté cytosolique, créant rapidement une acidification.

L'étape limitante principale de cette réaction semble être la réduction du FAD (101, 178, 188-191). Relativement peu de semiquinones sont décelées au cours de l'activité de l'enzyme bien que des quantités mesurables mais très variables de FADH₂ aient pu être mesurées (102, 192). Cela suggère que les réactions impliquant les hèmes sont plus rapides que celles impliquant le FAD. Les hèmes sont capables de réagir très rapidement avec l'oxygène et leur vitesse de réduction est fortement ralentie (1/1000 x) en absence d'oxygène (94, 101, 103, 178, 190-192).

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Néanmoins, il faut mentionner que le transfert d'électron de hème1 à hème2 est énergétiquement défavorable (potentiels redox de l'hème2 plus bas que celui de l'hème1).

En fait, il n'est pas encore clarifié comment cette enzyme peut transférer des électrons d'un côté à l'autre de la membrane. Les modifications structurales associées aux réactions de transfert d'électron ainsi que l'influence du microenvironnement de l'oxydase pourraient jouer un rôle crucial dans le contrôle de ces réactions.

3. Régulation du transfert d'électron

Il est connu que dans les cellules et le système acellulaire, après activation du complexe, il existe un délai avant que l'activité de l'oxydase apparaisse. En exploitant ce phénomène et les niveaux de l'état stationnaire de la réduction de l'hème et la flavine, plusieurs laboratoires ont obtenu la preuve que les facteurs cytosoliques ont des rôles différents dans la régulation du transfert d'électrons au sein du *Cytb₅₅₈*(178-179, 193-195). Le flux de transfert d'électron peut être contrôlé à plusieurs niveaux : la liaison du NADPH à l'enzyme, le transfert d'électrons de NADPH au FAD, le transfert d'électrons du FAD à l'hème interne, le transfert d'électrons entre les hèmes et le transfert d'électrons à l'oxygène.

En fait, il semble qu'il y ait un contrôle du transfert d'électrons en deux points distincts: entre NADPH et FAD, et entre FAD et hème (179, 188, 195). Il en résulte une situation dans laquelle le *Cytb₅₅₈* existe dans au moins trois états cinétiques : état inactif, intermédiaire et complètement actif. Dans l'état intermédiaire, un transfert d'électrons peut se produire à partir du NADPH à la FAD du flavocytochrome *b₅₅₈* mais pas de l'hème à l'oxygène.

4. Les limites actuelles de l'étude du Flavocytochrome *b₅₅₈*

Comme peu d'éléments structuraux ont été élucidés au niveau des parties membranaires, la façon dont les interactions protéine - protéine activent ou désactivent le *Cytb₅₅₈* doit être clarifiée pour mieux comprendre comment fonctionne cet enzyme. Une connaissance plus approfondie de la structure du *Cytb₅₅₈* et une compréhension plus détaillée des interactions entre les sous-unités du complexe NADPH oxydase sont limitées par la faible disponibilité du *Cytb₅₅₈* natif purifié. Bien que les neutrophiles soient les cellules les plus riches en *Cytb₅₅₈*, il est difficile d'utiliser des méthodes traditionnelles pour le purifier en quantité suffisante pour des analyses fonctionnelles plus approfondies ou pour des essais de cristallisation (196-197). C'est pourquoi plusieurs tentatives d'expression du *Cytb₅₅₈* ont été réalisées dans différents systèmes d'expression de protéines recombinantes.

VII. Les systèmes d'expression hétérologues utilisés pour produire le Cytb₅₅₈

1. Système d'expression procaryote: *Escherichia coli*

La bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) a été beaucoup utilisée pour l'expression hétérologue des protéines compte tenu des nombreux avantages qu'elle présente. Les principaux atouts sont un temps de génération faible (20 minutes), et une manipulation génétique bien connue (198).

Par contre, *E. coli* est un procaryote. Cela peut être une limite au repliement correct de certaines protéines eucaryotes et à la réalisation de modifications post-traductionnelles.

Plusieurs tentatives pour exprimer l'ensemble du Cytb₅₅₈ dans un système de *E. coli* ont échoué, seule la production de l'extrémité C-terminale cytosolique tronquée de gp91^{phox} a été possible (199-200). Dans ce cas, le domaine hydrophobe transmembranaire contenant les hèmes a été éliminé et remplacé par une région soluble de thiorédoxine bactérienne. Le domaine C-terminal de gp91^{phox} couplé à la thiorédoxine produit une faible activité diaphorase. L'activité diaphorase correspond au transfert d'électron du NADPH jusqu'au centre redox FAD et qui est suivi spectroscopiquement à l'aide d'un accepteur d'électron comme le nitrobleu tetrazolium (NBT) ou l'iodonitrotetrazolium (INT) qui prend l'électron directement au FAD (201).

2. Les systèmes d'expressions eucaryotes

i. Les cellules de mammifères

Un des avantages majeurs de l'utilisation des cellules de mammifères pour des expressions hétérologues est que la protéine d'eucaryote d'intérêt se trouve dans un environnement proche de son milieu naturel, notamment en termes de composition lipidique des membranes ou de modifications post traductionnelles. Toutefois, de nombreuses limites à leur utilisation pour des expressions à grande échelle sont à signaler : le temps de génération des cellules de mammifères est long et leur culture délicate nécessite en plus des milieux complexes et chers.

Des efforts importants ont été faits pour améliorer en premier la culture de cellules de mammifères exprimant le Cytb₅₅₈(202) et par la suite les stratégies de purification (197). Cependant le Cytb₅₅₈ recombinant purifié reste en quantité insuffisante. Toutefois, l'expression du Cytb₅₅₈ en cellules de mammifères a permis d'apporter des informations importantes sur le fonctionnement de l'oxydase, mais aussi sur la biosynthèse des protéines membranaires (120, 124).

ii. Les cellules d'insectes

Les cellules d'insectes possèdent les systèmes enzymatiques leur permettant d'effectuer les modifications post-traductionnelles semblables à celles des vertébrés, même si une analyse détaillée de glycoprotéines exprimées dans les cellules d'insectes a montré des différences dans la taille et la structure des oligosaccharides par rapport à celle des glycoprotéines de mammifères. Le temps de doublement des populations de cellules est de 16 à 24 heures (203).

Plusieurs tentatives d'expression du *Cytb*₅₅₈ dans des cellules d'insectes ont été précédemment réalisées(204). Certains travaux ont permis d'obtenir les deux sous-unités de gp91^{phox} dans les cellules d'insecte mais ne présentent pas d'activité oxydase. Par la suite, des modifications des vecteurs de clonage (205) ont permis d'exprimer une quantité réduite du *Cytb*₅₅₈ faiblement glycosylé et ne possédant pas une activité importante.

En collaboration avec Marie-Claire Dagher, notre équipe a tenté d'améliorer le rendement d'expression du *Cytb*₅₅₈ actif en cellules d'insectes(206). Le *Cytb*₅₅₈ exprimé présente un spectre typique et une activité oxydase significative mais la manipulation des cellules d'insectes est fastidieuse et le rendement est resté assez faible.

iii. Le système d'expression *in vitro*

Le principe de l'expression *in vitro* des protéines est d'introduire l'ADN codant pour la protéine d'intérêt dans un milieu réactionnel contenant tous les éléments nécessaires pour que la transcription et la traduction de la protéine aient lieu. Les systèmes d'expression acellulaires ont été utilisés avec succès pour les productions de protéines membranaires (207-208).

Des formes tronquées de gp91^{phox} ont été surexprimées dans ce système en présence de lipides ou de détergents. Ces protéines tronquées ont été au départ clonées dans des vecteurs pour une expression en système procaryote et ensuite elles ont été synthétisées *in vitro* dans un milieu contenant toute la machinerie responsable de la transcription et la traduction des protéines. Ces formes tronquées de gp91^{phox} contiennent soit le domaine cytosolique présentant une activité diaphorase en présence de protéines cytosoliques et de l'acide arachidonique (209), soit le domaine membranaire sans activité oxydase détectable(210). L'expression du gp91^{phox} tronqué *in vitro* en présence des lipides a permis la production des protéoliposomes, ces derniers ont une activité similaire à celle de leurs homologues en cellule(209).

iv. Le système d'expression en levure

Différentes levures sont utilisées pour l'expression hétérologue de protéines membranaires : la plus courante est *Saccharomyces (S.) cerevisiae* mais on trouve aussi des exemples d'expression chez *Schizosaccharomyces pombe* et chez *Pichia (P.) pastoris* (211-212).

La levure présente un temps de génération relativement court (2 h), pousse dans des milieux très simples et sa manipulation est aisée et peu coûteuse. Les levures sont capables de réaliser des modifications post traductionnelles comme les phosphorylations, des additions d'acide gras ou encore la glycosylation. Cependant les phénomènes de glycosylation chez la levure sont différents de ceux des cellules d'eucaryote supérieures. La composition lipidique des membranes des levures est également différente de celle des mammifères. Ainsi la levure ne synthétise pas de cholestérol comme les cellules de mammifères mais de l'ergostérol et cette différence peut probablement changer le fonctionnement des protéines membranaires recombinantes (213). Finalement, la levure est entourée d'une paroi cellulaire qui doit être rompue pour extraire les membranes et les protéines intracellulaires par lyse mécanique (en utilisant des billes de verres par exemple) ou enzymatique (telle que la zymolyase).

Dans notre équipe, nous avons fait le choix d'exprimer le *Cytb₅₅₈* dans le système d'expression hétérologue dans la levure *P. pastoris*.

➤ ***Pichia pastoris***

La levure *P. pastoris* (Figure 17) est une levure méthylotrophe qui est largement utilisée pour l'expression hétérologue de nombreuses protéines membranaires(214).

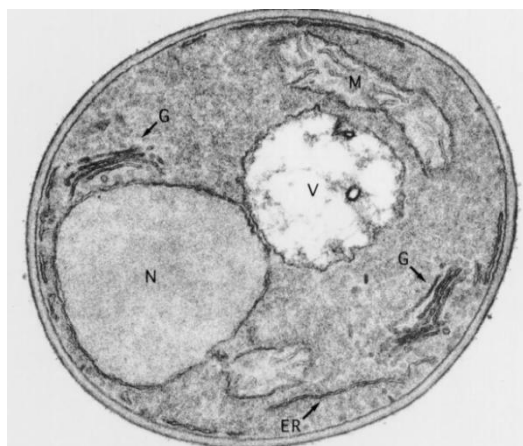


Figure 17 : Observation au microscope électronique de la morphologie de *P. pastoris*.
V : vacuole, N : noyau, G : appareil de Golgi, M : mitochondrie, ER : réticulum endoplasmique (215).

La particularité de ces levures réside dans leur capacité à utiliser le méthanol comme source de carbone. Comme le méthanol joue un rôle central dans le métabolisme de ces

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

levures, les enzymes clés impliquées dans l'assimilation du méthanol sont fortement exprimées et peuvent représenter jusqu'à 80% des protéines membranaires totales. Ainsi l'utilisation du promoteur fort et inductible par le méthanol qui contrôle l'expression de ces enzymes a permis la production d'un grand nombre de protéines recombinantes. Ces levures sont très intéressantes car elles poussent rapidement et peuvent atteindre de fortes densités cellulaires en fermentation (216).

Les techniques de manipulation génétique de *P. pastoris* sont bien connues. Elle possède également une machinerie d'excrétion très efficace et une simple purification des protéines recombinantes sécrétées est possible grâce aux faibles taux de protéines natives excrétées (217). Comme les autres levures, *P. pastoris* est également capable de réaliser des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation, la formation de ponts disulfures et le clivage protéolytique (218). Chez *P. pastoris*, la glycosylation des protéines recombinantes est semblable à celle de *S. cerevisiae* puisqu'elle met en jeu des résidus N- et O-mannoses. Cependant, *P. pastoris* présente un avantage par rapport à *S. cerevisiae*: c'est que l'hyperglycosylation est beaucoup moins importante. En effet, le nombre de résidus mannose ajouté aux protéines est de 50 à 150 par chaîne pour *S. cerevisiae* alors qu'il n'est que de 8 à 14 chez *P. pastoris* (219-220)

Les deux ADNc codant pour les protéines gp91^{phox} et p22^{phox} ont été clonés (Figure 18) dans un même vecteur d'expression de *P. pastoris* (pAO815) avec une étiquette Flag insérée en position N-terminale de gp91^{phox} (221).



Figure 18 : Cassette d'expression pour la production hétérologue du Cytb₅₅₈ dans *P. pastoris*.

AOX1, promoteur de l'alcool oxydase ; α -F, région codante pour le pré-propeptide du facteur α de *S. cerevisiae* ; Flag, région codante de l'étiquette Flag ; Kex2, région codante pour le site de clivage de la protéase Kex2(221).

VIII. Le flavocytochrome *b*₅₅₈ et les membranes

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude du flavocytochrome *b*₅₅₈ en tant que protéine membranaire. Il nous faut donc considérer les membranes en tant qu'un environnement susceptible d'avoir une influence sur son fonctionnement. Les membranes sont constituées majoritairement de deux types de molécules : les lipides et les protéines.

1. Les Lipides membranaires

Les lipides membranaires font essentiellement partie de la classe des lipides polaires, c'est-à-dire qu'ils possèdent tous un ou plusieurs groupements polaires leur conférant leur double affinité pour l'eau et pour l'huile (Figure 19).

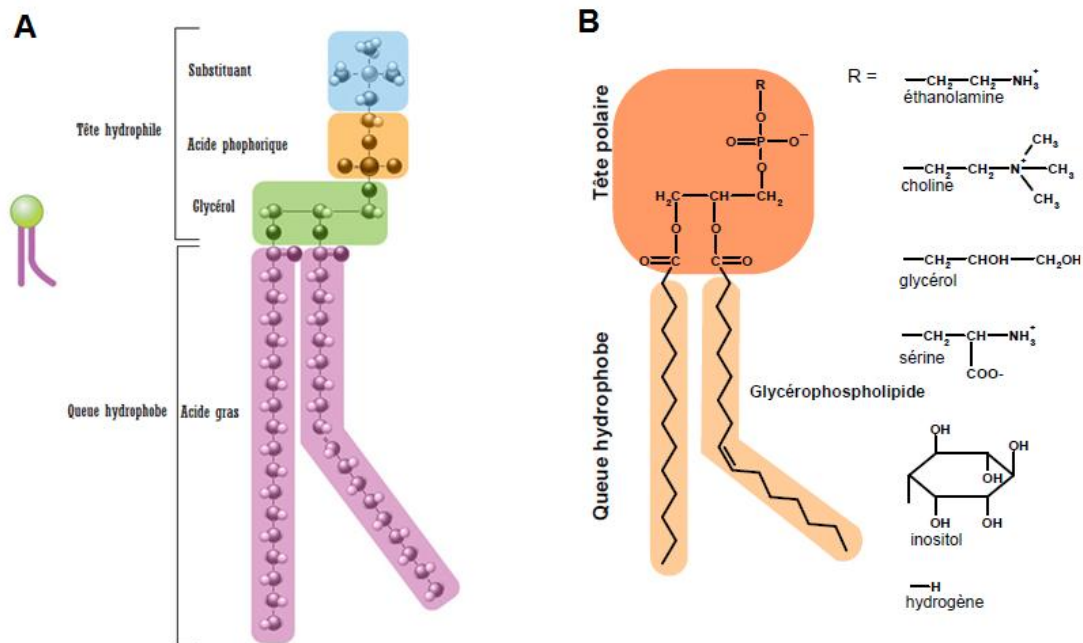


Figure 19 : Structure de phospholipide

(A) Une molécule de glycérophospholipide composée de deux grandes régions: une tête hydrophile et une queue hydrophobe ©2010 Nature Education All rights reserved ; (B) Les phospholipides (222).

Ces lipides présentent généralement une très faible solubilité dans l'eau et leur caractère amphiphile les conduit à s'auto-associer spontanément dans les milieux aqueux pour former des bicouches, forme supramoléculaire la plus stable compte tenu des aires respectives (comparable) de la partie polaire et des deux queues hydrophobes. Pour cela, les chaînes hydrophobes sont dirigées vers l'intérieur de la bicouche tandis que les têtes hydrophiles sont orientées vers les milieux extra et intracellulaire aqueux.

Les lipides peuvent se classer en 3 catégories principales : les diacylphosphoglycérides (phospholipides), les sphingolipides, les stérols et leurs dérivés(223).

i. Les phospholipides

Les phospholipides représentent l'espèce lipidique majoritaire des membranes biologiques. Il existe une grande variabilité de lipides membranaires. Ce sont des triesters de glycérol (Figure 19). Le glycérol est estérifié en position 3 par de l'acide phosphorique sur lequel est fixé un substituant qui définit la nature du phospholipide. En positions 1 et 2, sont greffées par estérification des chaînes hydrocarbonées d'acides gras. Les deux acides gras

peuvent différer par leur taille, leur degré d'insaturation et leur configuration spatiale. La grande variété des parties polaires et apolaires est à l'origine de la forte diversité des phospholipides et explique leurs différences de propriétés physiques. (223).

ii. Les sphingolipides

Les sphingolipides ont une base lipidique commune, appelée céramide, constituée d'une longue chaîne amino-alcool (2-amino-1,3-dihydroxy-octadéc-4-ène dont le nom trivial est sphingosine) connectée à un acide gras par une liaison amide (Figure 20)(223).

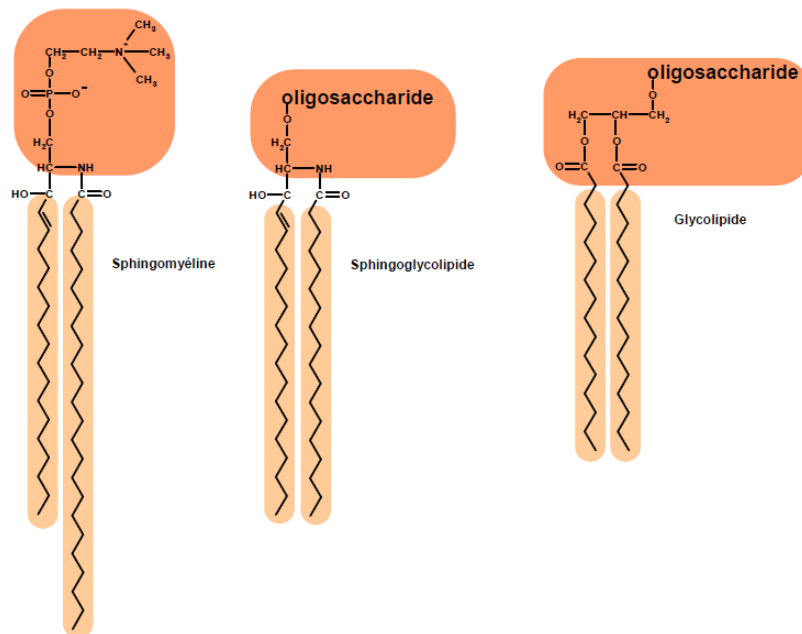


Figure 20 : Les sphingolipides et Les glycolipides.
(222)

La particularité de cette classe de lipides est de posséder à la fois un groupement hydroxyle et amide qui peuvent être donneur aussi bien qu'accepteur de liaisons hydrogène, et un groupement carboxyle (comme tous les glycérophospholipides) qui peut être accepteur de liaisons hydrogène(224).

iii. Les glycolipides

Les glycolipides comme les phospholipides dérivent du glycérol par estérification en position 1 et 2 du glycérol par un acide gras. Par contre, en position 3 du glycérol ils sont associés par une liaison glycosidique à des carbohydrates. Ils sont très abondants dans les membranes photosynthétiques des algues et des plantes alors qu'on trouve beaucoup plus rarement ces lipides dans le monde animal. La partie glycosidique confère à ces lipides amphiphiles un caractère d'autant plus polaire qu'elle est importante (223).

iv. Les stérols

Les stérols sont une famille de lipides dérivés du noyau stérol. Ils sont caractéristiques des cellules eucaryotes et ils sont différents selon les organismes. Ils peuvent être regroupés en trois familles : stérols fongiques, stérols animaux et stérols végétaux (225). Ces trois familles de stérols sont illustrées sur la Figure 21 par leurs principaux représentants. Le stérol majeur des levures est l'ergostérol. Les membranes animales contiennent un stérol prépondérant: le cholestérol (226). Les végétaux contiennent un mélange complexe de stérols (227). Les stérols ont une forme conique. Cependant ils sont quasiment insolubles dans l'eau et forment des agrégats plutôt que des bicouches ou encore des micelles.

Le cholestérol est le stérol le plus connu. Il comprend quatre cycles carbonés avec un groupement hydroxyle sur le carbone 3, une chaîne aliphatique (6-méthyl heptan-2-yl) sur le carbone 17 et deux groupements méthyles sur les carbones 10 et 13. La tête polaire (hydroxyle) a une taille réduite par rapport au reste de la molécule, entièrement hydrophobe, ce qui est néanmoins suffisant pour qu'elle s'insère dans les membranes : le long axe de la molécule est perpendiculaire au plan de la membrane avec l'hydroxyle orienté vers le milieu aqueux (228). La particularité de l'ergostérol par rapport au cholestérol est la présence de deux liaisons alcènes conjuguées.

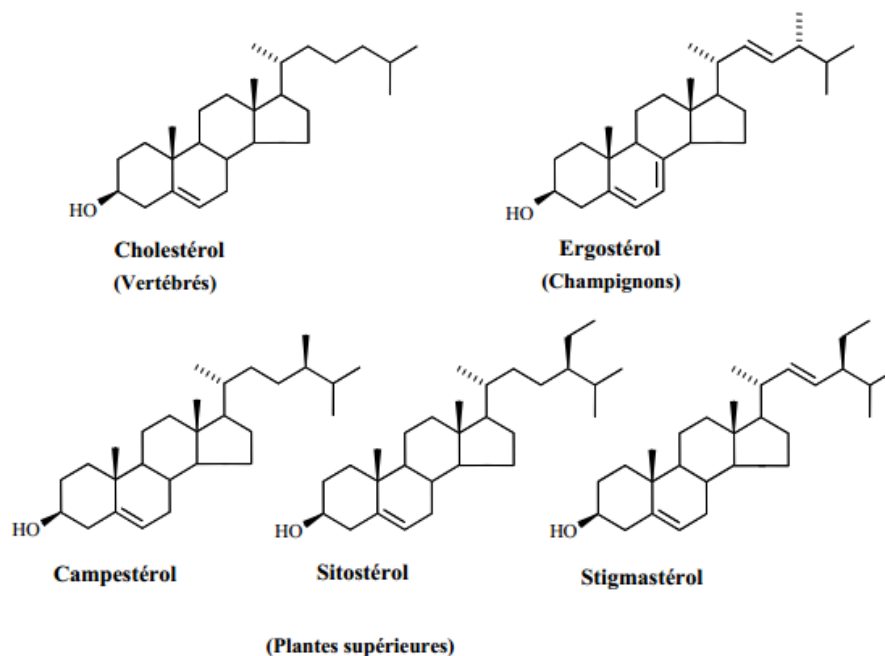


Figure 21: Structure des principaux stérols des eucaryotes.

Les stérols fongiques ont été très étudiés chez la levure. En fait, les stérols permettent de réguler très efficacement la fluidité et la viscosité de la membrane (229). A basse température, en s'intercalant entre les acides gras des phospholipides empêchant la membrane

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

de se rigidifier et de passer à une phase de type « cristal liquide » ; en augmentant la fluidité membranaire, ils ont un effet liquéfiant sur la membrane. A plus haute température, par leur encombrement stérique important, les stérols limitent les mouvements erratiques des acides gras des phospholipides, en diminuant de cette manière la fluidité membranaire, ils ont un effet condensant. La fluidité membranaire compatible avec le fonctionnement des protéines intégrées ou associées à la membrane (transporteurs, canaux...) est ainsi assurée dans un éventail de température plus grand grâce aux stérols (230).

2. Rappel sur l'organisation des membranes biologiques et modèles structuraux

Les membranes biologiques jouent un rôle essentiel dans la protection cellulaire ainsi que dans le contrôle et le transport des éléments nutritifs. Elles sont le lieu de nombreux mécanismes biologiques tels que la reconnaissance moléculaire, la catalyse enzymatique, l'adhésion cellulaire ou encore la fusion membranaire. L'organisation détaillée de ces membranes au niveau moléculaire n'est actuellement pas encore complètement déterminée, même si de nombreuses expériences ont été menées au cours du siècle dernier pour atteindre un tel objectif (231).

L'organisation en bicouche des lipides a été révélée pour la première fois en 1925 par Gorter et Grendel qui étudiaient les extraits lipidiques issus de membranes d'érythrocytes (Figure 22 ; A)(232).

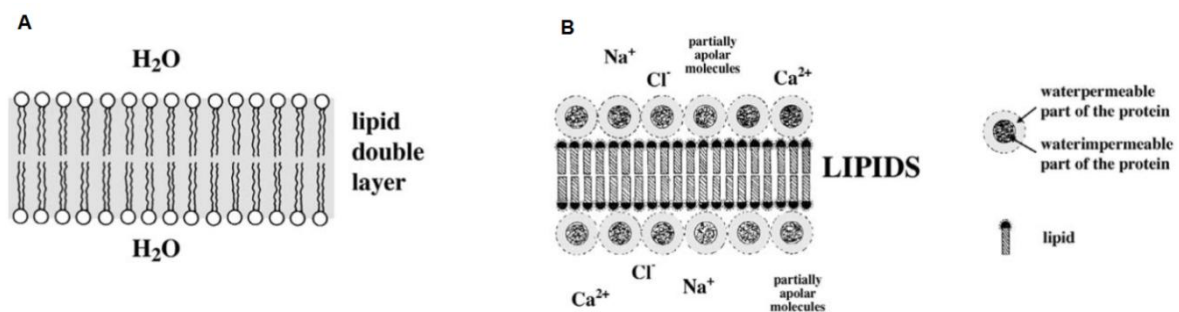


Figure 22 : Les premiers modèles membranaires

(A) La membrane cellulaire selon Gorter and Grendel (1925), ils proposent une structure en double couche ; (B) Danielli and Davson (1935) proposent un modèle en intégrant les protéines au niveau de la membrane (233).

Après une décennie, le modèle de Danielli met en évidence une bicouche purement lipidique avec des protéines en interaction avec leurs têtes polaires (Figure 22 ; B) (231).

Il a fallu attendre plus de trente ans pour que l'organisation en bicouche des lipides soit admise par l'ensemble de la communauté scientifique et généralisée à toutes les membranes biologiques. C'est également à cette époque, que les premières mesures de fluidité membranaire sont réalisées, montrant les mouvements latéraux et rotationnels des lipides. Une

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

telle découverte a conduit à la mise en place du modèle membranaire en mosaïque fluide par Singer *et coll.* en 1972 (Figure 23 ; A). Selon ce modèle, chaque feuillet de la bicouche est formé par un ensemble homogène de lipides dans un état fluide incorporant des protéines et des glycoprotéines assemblées d'une manière globulaire. Singer *et coll.* également supposaient que la composition lipidique dans les bicouches est parfaitement asymétrique (234).

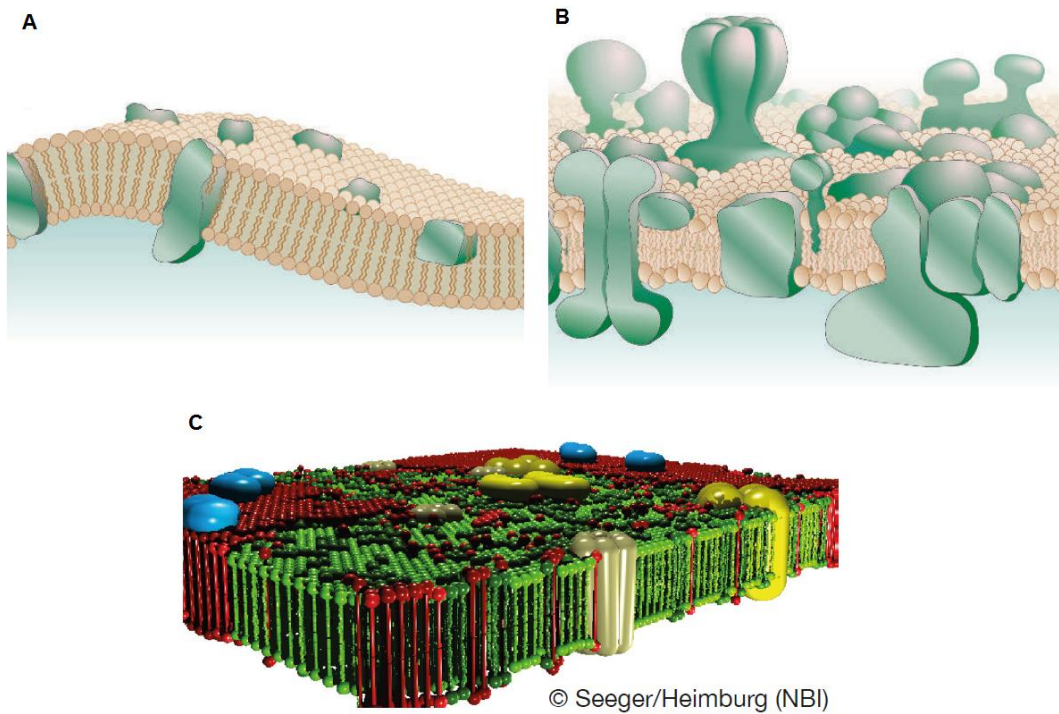


Figure 23 : Evolution du modèle membranaire

(A) Le modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicholson (1972) ; (B) une version contemporaine revisitée (235); (C) Vue actuelle des membranes biologiques (figure générée par H. Seeger à partir de simulations Monte Carlo et aimablement fournie par T. Heimburg, NBI Copenhagen)(231).

Depuis l'apparition de ce modèle, des améliorations lui ont été apportées notamment en termes de composition et d'organisation moléculaire. L'évolution la plus importante de ce modèle a été obtenue en 1997 avec les travaux de Simons *et coll.* et de Brown *et coll.* Ces auteurs ont montré que les membranes biologiques ne forment pas une phase lipidique fluide homogène comme prédit par Singer *et coll.* En revanche, ils ont suggéré que les lipides membranaires sont organisés en phases séparées de microdomaines, appelés radeaux lipidiques, avec à la fois une composition spécifique (riches en cholestérol et sphingolipides) et une dynamique moléculaire qui sont différentes de celles de la phase cristalline liquide environnante (Figure 23 C). La découverte d'une telle séparation de phase dans le plan de la membrane a induit dans la dernière décennie une explosion dans les efforts de recherche liés à la biologie de la membrane cellulaire ainsi que dans le développement de nouvelles

technologies pour détecter les hétérogénéités latérales dans les membranes biologiques. Les dernières évolutions de la compréhension des membranes et des structures des protéines membranaires font que l'étude des interactions protéines-lipides est actuellement en plein développement(231).

3. La NADPH oxydase et les lipides

La régulation de la NADPH oxydase phagocytaire n'est pas totalement comprise, les lipides présentent un des éléments modulateurs de ce complexe enzymatique. Cette modulation est due principalement à l'interaction protéine – lipide, à l'activation par l'acide arachidonique et à la présence de la NADPH oxydase au niveau des radeaux lipidiques.

Beaucoup d'études se sont intéressées pour comprendre les mécanismes des interactions lipide - protéine et des interactions protéine - protéine induites par les lipides et qui sont impliquées dans l'activation de la NADPH oxydase. L'interaction protéine - lipide est un mécanisme important qui régule le recrutement de protéines cytosoliques à la membrane et l'activation des protéines (236).

Les 3'-phosphoinositides (PI) sont considérés comme des régulateurs pivots de l'activation de la NADPH oxydase en servant comme site de signal spécifique de la membrane ou modulateur de la localisation des protéines cytosoliques. L'interaction directe ou indirecte des PI avec les protéines p40^{phox} et p47^{phox} régule l'assemblage de la NADPH oxydase. Les deux protéines contiennent un domaine de liaison de lipide, en particulier le domaine PX qui lie PI avec une forte spécificité (237). Le domaine PX de p47^{phox} a deux poches distinctes fixant les lipides: l'une avec une affinité préférentielle pour le phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate (PI (3,4) P2) et le phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PI (3,4,5) P3) , tandis que l'autre poche se lie de manière non spécifique aux phospholipides anioniques tels que le PA et la phosphatidylsérine (PS) (238-239). L'occupation simultanée des deux poches est possible et améliore l'affinité de p47^{phox} pour les membranes (240). La fixation de p47^{phox} à ces lipides est indispensable pour sa translocation et pour une production d'anions superoxydes correctes (41). La région PX de p40^{phox} est capable de se lier spécifiquement et fortement au phosphatidylinositol-3-phosphate [PI(3)P] et la membrane phagosomale étant très enrichie en ce lipide (241-242) ce qui facilite le recrutement de cette protéine à la membrane. Les phosphatidylinositides et les phospholipides PA et PS peuvent à eux seuls stimuler la NADPH oxydase (243-244).

La fixation des phospholipides anioniques (phosphatidylsérine et acide phosphatidique) ou des phosphatidylinositides membranaires par le domaine PX de p47^{phox} et p40^{phox}, permet de

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

stabiliser la liaison avec le cytochrome b_{558} . Le domaine C-terminal polybasique de Rac développe des liaisons avec les phospholipides anioniques (245).

La phospholipase D (PLD), qui clive les phospholipides pour former l'acide phosphatidique (PA), est également un important modulateur de l'activité de la NADPH oxydase. Regier et *col.*(246) ont suggéré que la phosphorylation de $p22^{phox}$ est régulée par des mécanismes dépendants et indépendants de PLD.

La figure 24 résume le rôle des lipides sur la NADPH oxydase. La stimulation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) conduit à une signalisation en aval des phospholipides inositols. Il phosphoryle le PI(4,5)P2 pour produire le phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate (PI(3,4,5)P3), qui est déphosphorylé par la SHIP-1 en phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate (PI(3,4)P2), tandis que l'inositol polyphosphate 4-phosphatase (4-Pase) hydrolyse le PI(3,4)P2 pour former PI(3)P. Les produits de signalisation des phospholipides inositols fixent le domaine PX de $p47^{phox}$ et $p40^{phox}$, une condition préalable à l'activation de la NADPH oxydase. En outre, PI(3,4,5)P3 active la protéine Rac. En parallèle, la phospholipase C (PLC), la phospholipase D (PLD), et la PLA2 sont également activées. Les produits qui en résultent, le diacylglycérol (DAG) et l'acide phosphatidique (PA), peuvent activer différents types de kinases, en participant à la régulation de l'activité de la NADPH oxydase. Le niveau de DAG et PA dépend de l'activité de diacylglycérol kinase (DAGK) et transférase (DAGT). Le rôle activateur d'AA de la NADPH oxydase reste non identifié (237).

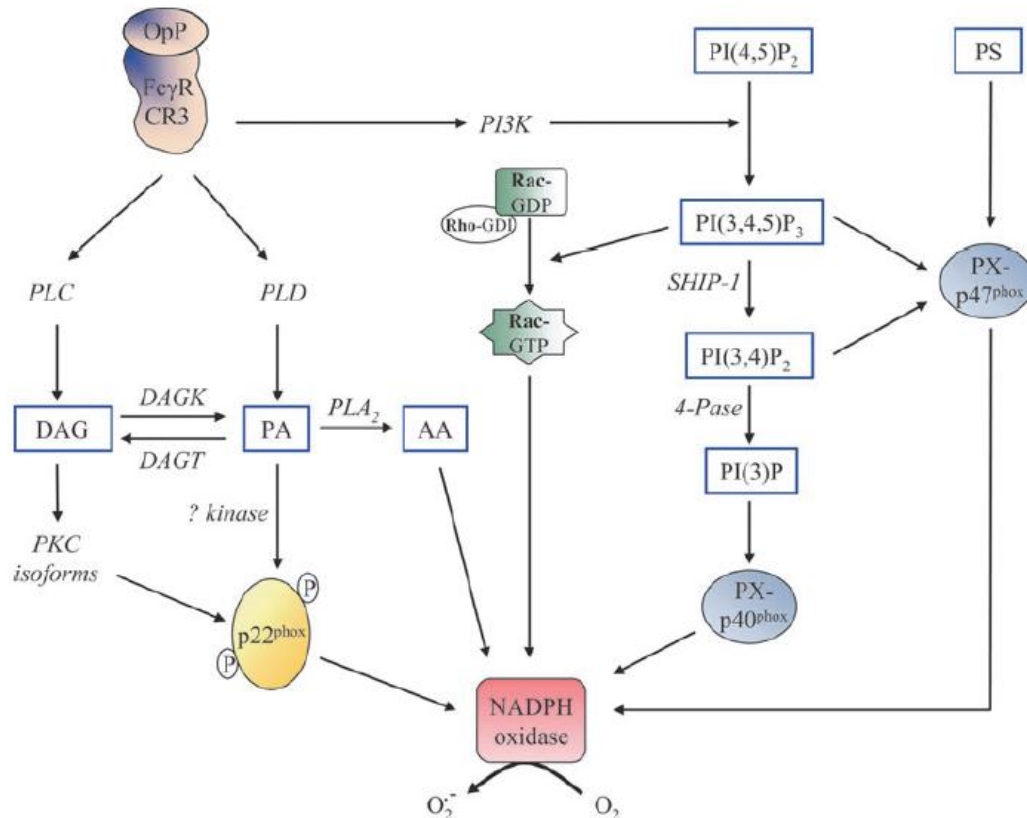


Figure 24:Le métabolisme des lipides.

La fixation des particules opsonisées (OpP) au récepteurs FcγRf ou CR3 déclenche l'activation de plusieurs voies de signalisation (237).

Les lipides modulent aussi la NADPH oxydase dû à sa présence au niveau des domaines lipidiques appelés des radeaux lipidiques. Des études effectuées sur la NADPH oxydase en cellule ont montré que le Cytb₅₅₈ coexiste au niveau de microdomaines lipidiques appelés des « plateformes redox » (247-248). Ces plateformes sont connues pour être fortement impliquées dans les mécanismes immunitaires, pour jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose et pour former des réseaux de signalisation cellulaire (249). Il a été suggéré que les protéines cytosoliques interagissent favorablement avec ces domaines riches en cholestérol. Le mécanisme de l'activation/désactivation de l'activité NOX pourrait ainsi impliquer les radeaux lipidiques mais peu de données sont disponibles pour le moment. En particulier, cette formation de radeaux lipidiques fournit une force motrice importante pour l'assemblage des sous-unités de la NADPH oxydase et le recrutement d'autres récepteurs apparentés, effecteurs et des composants de régulation. La pré-incubation des cellules par la cyclodextrine a entraîné une perte d'association de gp91^{phox} avec les rafts lipidiques, confirmant que gp91^{phox} est localisée dans les rafts lipidiques membranaires. Il a été suggéré que dans les neutrophiles au

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

repos, le Cyt b_{558} est présent dans les radeaux lipidiques et la distribution des protéines cytosoliques, p40^{phox} et p67^{phox} est très faible au niveau de ces domaines membranaires (250).

La composante membranaire de la NADPH oxydase est présente dans les rafts lipidiques, et les composantes cytosoliques sont recrutées vers les sous-unités associées aux radeaux lors de l'activation et l'assemblage du complexe actif probablement via des interactions protéine-protéine (247, 251-252). En analogie avec le rôle largement accepté des radeaux lipidiques comme plates-formes de signalisation, nos données indiquent que les microdomaines enrichis en cholestérol agissent pour recruter et / ou organiser les facteurs de NADPH oxydase cytosolique dans l'assemblage de la NADPH oxydase active (249).

La NADPH oxydase phagocytaire représente un des premiers complexes enzymatiques qui dépend des rafts biologiques pour l'assemblage dynamique et la fonction enzymatique (248).

Des preuves ont été rapportées sur la production de diacylglycérol par la PLC qui entraîne l'activation des isoformes de la PKC (253), ces dernières induisent la phosphorylation de p47^{phox} (62, 141). L'activation de la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2) est également nécessaire pour l'activité de la NADPH oxydase, mais son rôle n'est pas encore totalement clarifié. La cPLA2 peut être transloquée vers les fractions de membrane (254) et elle catalyse l'acide arachidonique (AA) dans la production de neutrophiles humains stimulés (255). La cPLA2 est transloquée du cytosol et elle vise la membrane du phagosome lors de la phagocytose par les macrophages de souris (256). Il est probable que l'AA généré par la cPLA2 généré n'est pas nécessaire pour la translocation des facteurs cytosoliques à la membrane de la NADPH oxydase (257). En fait, cPLA2 est ancrée à la membrane plasmique par la NADPH oxydase assemblée et libère AA, ce qui induit l'activité NADPH oxydase (257). Il apparaît que le site ciblé par l'AA est situé dans le domaine N-terminal gp91^{phox} où il joue un rôle dans l'activation du transfert d'électrons à travers le FAD de la NADPH oxydase (258). L'étude de la NADPH oxydase en système acellulaire ou bien dans les neutrophiles intacts par plusieurs techniques différentes (par exemple, RPE, microscopie à force atomique) (259-261) suggère que l'AA peut affecter le domaine N-ter gp91^{phox} en induisant des changements conformationnels du cytochrome b_{558} . Plusieurs études dans des systèmes acellulaires suggèrent que l'AA favorise la translocation de p47^{phox} (145) ou des changements de conformation au niveau de p47^{phox} et de p67^{phox} (183, 262) augmentant ainsi l'activité de la NADPH oxydase.

LES OBJECTIFS DU TRAVAIL

LES OBJECTIFS DU TRAVAIL

La NADPH oxydase (NOX) est un complexe enzymatique présent dans une grande variété de cellules. Il a pour fonction de produire des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), précurseur des formes réactives de l'oxygène (ROS) destinées à détruire les agents infectieux.

Le dysfonctionnement des NOX est relié à de nombreuses pathologies sévères. L'unité catalytique des NOX est le « flavocytochrome b_{558} » (*Cytb₅₅₈*) qui fixe tous les cofacteurs redox impliqués dans les différentes étapes de transfert d'électrons conduisant à la production de l'anion superoxyde. La structure du *Cytb₅₅₈* n'étant pas encore résolue, les données concernant sa topologie découlent de données prédictives et expérimentales. Par des techniques d'ingénierie des protéines, notre équipe a pu lever récemment un verrou technologique qui a permis de produire le *Cytb₅₅₈* intègre et fonctionnel dans la membrane de la levure *P. pastoris*(206).

L'objectif de la thèse est d'avancer vers la caractérisation structurale et fonctionnelle du *Cytb₅₅₈* afin de mieux comprendre les mécanismes capables de réguler l'activité de la NADPH oxydase.

Le premier objectif de la thèse a été de confirmer que la protéine recombinante issue de l'expression hétérologue dans la levure est satisfaisante au niveau génomique et phénotypique dans un premier temps, puis de vérifier que les caractéristiques spectrales et fonctionnelles du *Cytb₅₅₈* recombinant sont similaires à celles connues du *Cytb₅₅₈* issue des membranes de neutrophiles (**Chapitre I**). L'enjeu de cette partie du travail a été d'obtenir la protéine recombinante en quantité et qualité suffisante pour avancer vers des études biophysiques (voire structurales). Cela a conduit à revisiter le protocole de purification précédemment établi du *Cytb₅₅₈* produit à partir de cultures sur petits volumes(206) et de l'adapter à la purification de *Cytb₅₅₈* produit dans *P. pastoris* à grande échelle. Plusieurs combinaisons de techniques de chromatographie ont dues être utilisées et nous avons été amenés à contourner plusieurs difficultés liées à la complexité du système (**Chapitre II**).

Le deuxième objectif de la thèse a été de mieux comprendre comment l'activité de l'enzyme peut être régulée par son environnement membranaire, mais aussi par la fixation de petites molécules amphiphiles telles que l'acide arachidonique considéré dans le système NADPH oxydase des molécules « activatrices ».

Dans un premier temps, nous avons voulu corréler la localisation cellulaire du *Cytb₅₅₈* au cours de sa biosynthèse à sa capacité à produire l'anion superoxyde. Dans la mesure où la nature de l'environnement lipidique est apparue au cours de ce travail jouer un rôle important sur

LES OBJECTIFS DU TRAVAIL

le fonctionnement de la NADPH oxydase, nous nous sommes par la suite intéressés plus précisément à l'influence de la composition lipidique de la membrane sur le fonctionnement de l'enzyme et nous avons déterminé les propriétés cinétiques et thermodynamiques de l'activité oxydase (**Chapitre III**).

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'importance de la conformation *cis-trans* de l'acide arachidonique dans l'activation de la NADPH oxydase. Etant donné que les acides gras *trans* ne sont pas naturellement présents dans les cellules mais sont issus de phénomènes anormaux, nous avons comparé leur pouvoir activateur sur le complexe NADPH oxydase avec celui de l'acide arachidonique *cis* (**Chapitre IV**).

MATERIELS & METHODES

I. Préparations biologiques

Dans ce travail, l'étude fonctionnelle du complexe NADPH oxydase est effectuée *in vitro*. Cela nécessite de pouvoir mélanger les différentes protéines solubles et membranaires du complexe enzymatique. Pour cela, les différentes protéines qui constituent le complexe doivent être produites et purifiées séparément au préalable.

Ce chapitre est donc consacré à la description des différents protocoles nécessaires à la purification de chaque protéine cytosolique recombinante de l'oxydase. En revanche, la description de la purification du Cyt_{b558}bovin recombinant fera l'objet du **chapitre II** de ce mémoire puisque son optimisation constitue une grande partie de mon travail.

1. Expression et purification des protéines cytosoliques bovines dans *E. coli*

i. Culture des bactéries exprimant les protéines cytosoliques recombinantes

Les protocoles d'expression et de purification des protéines cytosoliques recombinantes ont été précédemment établis au laboratoire (263). Les ADNc codant pour les protéines, p67^{phox}, p47^{phox} et Rac1Q61L sont clonés respectivement dans les vecteurs pet42A-2T (p67^{phox}bovin), pET15a (p47^{phox} bovin) et pGEX-2T (Rac1Q61L humain) (Tableau 3). Une séquence d'ADN codant soit pour une étiquette Histidine (His-tag) ou soit pour la Glutathion-S-Transférase (GST-tag) est présente en N-terminal des gènes permettant par la suite de faciliter la purification des protéines par chromatographie d'affinité.

Une colonie de bactérie *E.coli* de souche BL21 transformée avec le vecteur considéré est repiquée dans 60 mL du milieu Luria Bertoni (LB) en présence de l'antibiotique approprié. Les précultures sont mises sous agitation 180 rpm à 37°C durant 16 h puis utilisées pour ensemencher 1,5 L de milieu Terrific Broth (TB) contenant l'antibiotique adapté. La culture se poursuit sous agitation 180 rpm à 37 °C. La croissance de la masse cellulaire bactérienne est suivie par spectrophotométrie à 600 nm, lorsque la densité optique (DO) à 600 nm atteint 0.7, 0,5 mM d'isopropyl-beta-dithiogalactopyranoside (IPTG) est ajouté pour induire l'expression des protéines d'intérêt. La culture est poursuivie durant 16 h à 30 °C pour les bactéries exprimant la protéine Rac1Q61L et à 25 °C pour celles exprimant les protéines p47^{phox} et p67^{phox} sous agitation de 180 rpm. Le culot bactérien est récupéré puis congelé à -80°C.

MATERIELS & METHODES

Nom du gène	protéine	Organisme d'origine	Vecteur	Gène de résistance	Étiquette	Taille de la protéine (kDa)
<i>NCF1</i>	p47 ^{phox}	<i>Bos taurus</i>	pET15a	Kanamycine	HIS	47
<i>NCF2</i>	p67 ^{phox}	<i>Bos taurus</i>	pET42a	Kanamycine	GST/HIS	88
<i>RAC1</i>	Rac1Q61L	Homo sapiens	pGex2T	Ampicilline	GST	48

Tableau 3: Liste des constructions de différentes protéines cytosoliques recombinantes.

ii. Purification des protéines p47^{phox} et p67^{phox} bovines

10 g de cellules sont décongelées puis suspendues dans 15 ml de tampon contenant 50 mM HEPES à pH 7,5, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, une pointe de spatule de DNaseI, 1 mM de fluorure de phénylméthanesulfonyle (PMSF) qui est un inhibiteur des protéases à sérine et 2 mM dithiothréitol (DTT) qui est un agent réducteur fort et qui hydrolyse les ponts disulfure. La suspension est ensuite homogénéisée à l'aide d'un Potter. Les cellules sont cassées par quatre cycles de sonication/repos de 2 min puis les débris cellulaires et les membranes sont séparés par centrifugation à 165 000 x g pendant 90 min à 4°C. Le surnageant obtenu est filtré à l'aide d'un filtre pour seringue (taille du pore 0.45 µm) et ensuite chargé sur une colonne de chromatographie choisie selon l'étiquette que la protéine d'intérêt possède en extrémité N-terminale.

En effet, les protéines p47^{phox} et le p67^{phox} possédant une étiquette 6 x Histidine en N-terminal ont été purifiées sur une colonne His Select[®] Nickel Affinity Gel (*Sigma Aldrich*) préalablement équilibrées avec du tampon contenant 30 mM Na₂HPO₄ à pH 7,5, 0,7 M NaCl et 30 mM imidazole. L'échantillon est passé plusieurs fois en boucle à travers la colonne. Les protéines non fixées sont éliminées par une étape de lavage avec du tampon 30 mM Na₂HPO₄ pH 7,5, 0,1 M NaCl et 10 mM imidazole. L'élution de la protéine d'intérêt a été faite avec du tampon Na₂HPO₄ 30 mM pH 7,5, 0,1 M NaCl, 150 mM imidazole. Les fractions de protéines purifiées ont été analysées sur gel SDS-PAGE pour une analyse qualitative de l'état de pureté des protéines. Les fractions à haut degré de pureté ont été regroupées puis une dialyse est effectuée contre du tampon 50 mM Tris pH 7,5, 120 mM NaCl et 1 mM PMSF pour éliminer l'imidazole avant que les protéines purifiées soient aliquotées et stockées à - 80 °C.

MATERIELS & METHODES

iii. Purification de la protéine Rac1 mutée humaine

L'étiquette GST en N-terminal de la protéine Rac1Q61L humaine permet sa purification sur une colonne Glutathion Sepharose. Le cytosol obtenu après lyse des cellules est déposé sur une colonne Glutathion Sepharose™ 4 Fast Flow (GE healthcare) préalablement équilibrée avec du tampon phosphate salin(PBS) à pH 7,3. L'échantillon est passé plusieurs fois à travers la colonne. Le lavage de la résine a été réalisé avec le même tampon d'équilibration et l'élution de la protéine s'est faite avec le tampon 50 mM Tris-HCl à pH 8 et 10 mM de Glutathion réduit. Le glutathion est éliminé par une étape de dialyse. La protéine purifiée est aliquotée et stockée à -80°C , après détermination de leur concentration et l'évaluation sur gel SDS de leur niveau de pureté.

2. Préparation des membranes de *P. pastoris*

i. Mise en culture de la levure *P. pastoris*

Contrairement aux protéines recombinantes cytosoliques produites dans *E.coli*, le Cytb₅₅₈ est exprimé dans la levure *P. pastoris*. Les compositions de chaque milieu et tampon utilisées sont données en annexe n° 1.

Une colonie de *P. pastoris*, (clone N11 précédemment identifié par (206)) poussée sur milieu solide YPD agar (Figure 25), est repiquée sur 50 mL de milieu YPD et en présence de 0,05mg/ml ampicilline. L'ajout de l'antibiotique dans le milieu de culture ne sera pas un critère de sélection des levures recombinantes mais plutôt pour s'assurer qu'il n'y aura pas de contamination.



Figure 25 : Culture de *P. pastoris* sur milieu YPD agar.

La culture a été faite pendant 72 h à 30°C .

Le milieu YPD est un milieu riche en nutriments essentiels pour la croissance de la biomasse. La préculture est mise sous agitation 250 rpm pendant 48 h à 30°C . Cette préculture est utilisée pour ensemer 500 mL de milieu BMGY contenant du glycérol comme source de carbone et 0,05 mg/mL ampicilline puis mise en agitation à 30°C pendant environ 24 h pour augmenter la biomasse cellulaire jusqu'à une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ entre 2 à 6. Les

MATERIELS & METHODES

cellules sont récoltées par centrifugation 15 min à 2500 x g pour être utilisées pour réensemencer la suite des cultures. Les levures sont resuspendues dans 1 L de milieu BMMY (0,05 mg/ml ampicilline ; 1 % méthanol) jusqu'à une DO_{600nm} d'environ 1. Le glycérol y est remplacé par le méthanol comme source de carbone pour BMMY qui est le milieu de culture pour l'expression des protéines (le méthanol induit le gène AOX contrôlant l'expression des protéines d'intérêt). La présence du méthanol induit alors la production de protéines recombinantes. Les cultures sont poursuivies pendant 72 h à 28°C sous agitation 270 rpm en ajoutant 1% méthanol toutes les 24 h pour maintenir l'induction et la production de la protéine d'intérêt.

En fin de culture, les levures sont collectées par centrifugation à 2500 x g pendant 15 min et les culots sont congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

ii. Lyse des cellules et récupération des FMt de levure

Le culot des cellules est décongelé doucement sur glace, puis est repris dans du tampon de Lyse en présence de 1 mM PMSF jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 50 et 100. La méthode de lyse mécanique faisant intervenir des microbilles de verre est la plus fréquemment utilisée pour les levures. Un volume équivalent de billes de verre (*BIOSEP Product*; 0,5 mm de diamètre) est ajouté à la suspension cellulaire. L'étape de cassage se fait dans la glace soit manuellement avec le Vortex soit à l'aide d'un Bead Beater (*BIOSEP Product*, Figure 26) suivant 8 cycles de 30 secondes de lyse et 90 secondes repos dans la glace. Les échantillons sont centrifugés à 1600 x g durant 10 min deux fois de suite pour éliminer les débris cellulaires ainsi que les billes de verre.

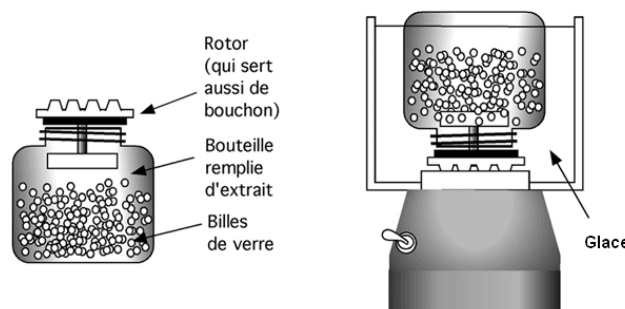


Figure 26 : Schéma représentant l'appareil de Bead Beater.

Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé à 100 000 x g pendant 90 min à 4°C. Le surnageant (cytosol) est éliminé et le culot contenant la fraction membranaire totale (FMt) de *P. pastoris* est repris dans du tampon de resuspension en présence de 1 mM PMSF ou dans le tampon STE 10% selon l'expérience qui suit.

II. Méthodes biochimiques

1. Fractionnement subcellulaire de *P. pastoris* sur gradient de sucrose

La fraction membranaire totale préalablement préparée et mise en suspension dans le tampon STE 10 % est déposée sur un gradient de sucrose afin de séparer les différentes organelles des cellules. Les gradients de sucrose sont préparés 4h avant le fractionnement afin de les laisser se stabiliser à 4°C. Les différentes solutions de sucrose sont préparées comme indiqué dans l'annexe n° 1, en présence d'un inhibiteur de protéases (PMSF). Dans un tube de centrifugation, trois couches de concentration différente de sucrose sont déposées successivement: 60 % STE (au fond)/ STE 40 % (au milieu) / STE 20 % (en haut). Les membranes à séparer sont délicatement déposées sur le gradient puis la séparation se fait par centrifugation à 110 000 x g pendant 17 h à 4°C (rotor SW32). Après centrifugation, des fractions de 0,7 mL sont prélevées du haut vers le bas du tube. Les fractions sont aussitôt congelées à - 80 °C pour des caractérisations ultérieures.

2. Extraction de l'ergostérol des membranes plasmiques

Le méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) est un composant soluble, son cœur hydrophobe lui confère la capacité à solubiliser des substances apolaires. Ce composant a été utilisé pour extraire le stérol (ergostérol chez la levure) de la membrane plasmique de la levure selon un protocole modifié de Lagane et *coll.*(213).

Les fractions membranaires (6 mg de protéines membranaires totales /ml) sont incubées en présence de 20 mM M β CD pendant 30 min à température ambiante sous agitation douce. Le mélange est ensuite centrifugé à 130,000 x g pendant 90 min. Le culot de membrane obtenu est mise en suspension dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl à pH 8, 120 mM NaCl, 10% glycérol et 1 mM PMSF.

3. Solubilisation et relipidation du flavocytochrome *b*₅₅₈

i. Généralités sur la solubilisation des protéines membranaires avec les détergents

Les détergents aliphatiques les plus utilisés en biochimie sont, tout comme les lipides aliphatiques polaires, des molécules qui possèdent un groupement chimique hydrophile relié à une chaîne carbonée hydrophobe. De par leur nature amphiphile, les détergents s'organisent spontanément dans l'eau en assemblages supramoléculaires dont l'organisation dépend des conditions de pH, de concentration et de force ionique. Les assemblages formés par les détergents sont typiquement des micelles, des phases hexagonales ou des phases lamellaires. Ce sont les micelles qui intéressent tant les biochimistes des protéines membranaires. En effet,

MATERIELS & METHODES

ces tous petits agrégats solubles se forment spontanément en solution quand leur concentration totale a atteint ou dépasse la concentration micellaire critique (CMC) du détergent (Figure 27) (264-267). Ces micelles sont des agrégats de petites tailles (quelques nm) en équilibre dynamique avec le détergent sous forme de monomères en solution. Ces petits objets sont souvent représentés comme des agrégats plus ou moins sphériques. Ces micelles présentent la capacité, bien utile pour les biochimistes, d'accueillir en leur sein tout type de molécules amphiphiles (protéines membranaires et lipides polaires en particulier), plus ou moins insolubles dans l'eau.

Quand ces détergents sont mis en présence de membranes, leur action solubilisante s'effectue en plusieurs étapes. A faible concentration, les molécules de détergent s'intègrent à la membrane. A plus forte concentration, quand les membranes sont saturées en détergent, les membranes se désintègrent pour former des micelles mixtes avec les molécules de détergent. En fin de solubilisation, il y a donc formation de micelles mixtes composées de lipides et de détergents contenant les protéines. Les détergents les plus utilisés pour extraire les protéines membranaires sont les détergents non ioniques et parfois de type zwitterion. Ils sont plus adaptés pour rompre les interactions lipide-lipide ou bien lipide-protéine que les interactions protéine-protéine. Les détergents ioniques sont peu employés car ils peuvent plus facilement dénaturer les protéines en modifiant leur structure par les forces électrostatiques exercées par leur répartition de charge. Leur utilisation en présence de membranes biologiques permet l'extraction des protéines en créant un environnement favorable de type lipidique. Les détergents imitent les lipides membranaires en interagissant avec les régions transmembranaires hydrophobes des protéines, et génèrent ainsi un complexe protéine-détergent manipulable par les techniques classiques de biochimie (chromatographie, électrophorèse)

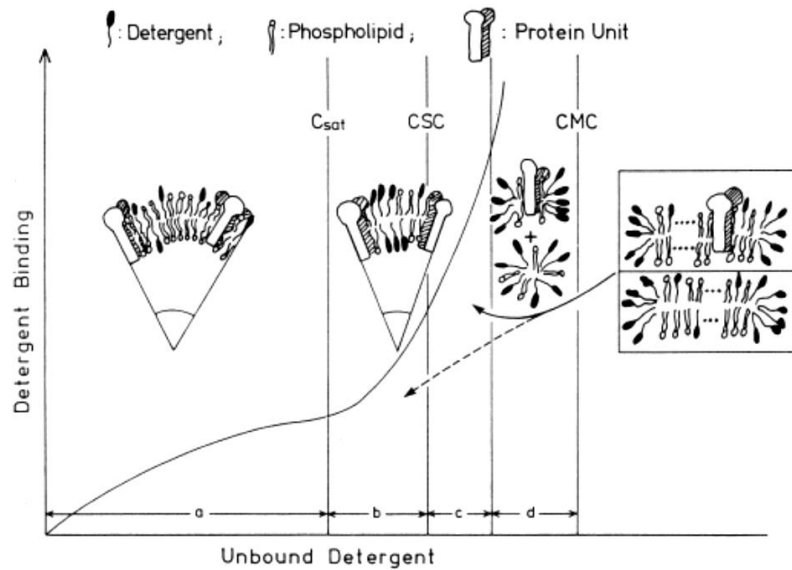


Figure 27 : Représentation schématique des différentes phases de la solubilisation d'une protéine membranaire en fonction de la concentration en détergent (264, 268).

Le choix des détergents est très important et est fortement lié aux propriétés physico-chimiques de ceux-ci mais aussi aux propriétés physicochimiques des protéines et des lipides que l'on cherche à solubiliser. Les détergents se caractérisent par la capacité à former des micelles en solution à partir d'une concentration définie par la concentration micellaire critique (CMC). Il est cependant toujours aussi difficile d'élaborer un chemin de solubilisation standard des protéines membranaires puisque la CMC est très sensible à des facteurs tels que le pH, la force ionique et la température (267, 269). Les paramètres les plus importants au cours de cette étape sont le rendement d'extraction et la stabilité structurale et fonctionnelle de la protéine d'intérêt.

ii. Solubilisation du *Cytb₅₅₈* des membranes de *P. pastoris*

La solubilisation du *Cytb₅₅₈* membranaires a été effectuée à partir de la fraction membranaire totale de *P. pastoris*. La concentration protéique mesurée par la méthode BCA a été ajustée entre 5 et 6 mg/mL avec du tampon de resuspension (voir annexe n° 1). Un rapport optimal détergents/protéines membranaires totales égale à 3 (w/w) a été utilisé. La solubilisation se fait à température ambiante pendant 1 h sous faible agitation et elle est suivie par diminution de l'absorption à 400 nm. Le *Cytb₅₅₈* solubilisé est séparé des protéines non solubilisées par centrifugation à 130 000 x g pendant 90 min.

La solubilisation du *Cytb₅₅₈* est observée par la présence de son spectre de différence d'absorption caractéristique dans le surnageant de la centrifugation (Figure 6).

4. Reconstitution des protéines purifiés en vésicules de phospholipides

i. Membrane artificielle ou liposomes

Les lipides sont caractérisés par leur faible solubilité dans l'eau (hydrophobicité), due principalement au fait qu'ils ne forment pas de liaisons hydrogène avec ce solvant. Les mélanges lipidiques s'assemblent pour former ce qu'on appelle des phases lamellaires, correspondant à des superpositions de bicouches lipidiques séparées par des couches d'eau. Leurs têtes polaires peuvent échanger des liaisons hydrogènes avec le milieu aqueux (hydratation), alors que les parties hydrophobes vont s'organiser de manière à minimiser au maximum le contact avec l'eau: c'est l'effet hydrophobe (270).

Ces structures en bicouches ne peuvent être ouvertes aux extrémités, mais se referment sur elles-mêmes pour former des vésicules uni- ou multilamellaires. Au sein d'une membrane, une espèce lipidique donnée peut adopter collectivement une conformation particulière, dépendante principalement de sa nature et de la température.

ii. Reconstitution en liposomes

La reconstitution d'une protéine membranaire dans une bicouche lipidique qui est la démarche inverse de la solubilisation des protéines consiste à remplacer le détergent dans lequel la protéine a été solubilisée par un environnement lipidique. Pour cela, des Bio-Beads, petites billes de polystyrène, ont été utilisées. Les Bio-Beads fixent préférentiellement les molécules les plus hydrophobes en solution (c'est-à-dire les molécules de détergent) et diminuent ainsi progressivement la concentration en détergent. La couronne de détergent localisée au niveau de la région hydrophobe de la protéine membranaire purifiée sera progressivement remplacée par une couronne de lipides sous forme de bicouche.

Les phospholipides utilisés sont préparés dans du tampon PBS pH 7,4. La solution de lipides, s'organisant en vésicules multilamellaires, devient opaque. Par de brefs pulses de sonication, la solution devient translucide et contenant majoritairement des vésicules unilamellaires ou liposomes. La solution de liposome est ajoutée à la protéine purifiée en détergent avec un rapport variable protéine / lipide (w/w). Le mélange est agité durant 30 min à une température où les lipides sont en phase gel liquide. Des Bio-Beads sont ajoutées à la fraction membranaire solubilisée. Les Bio-Beads sont ajoutées à raison de 1 g Bio-Bead par 100 mg détergent, pendant 30 min et sous agitation à température adéquate pour garder les lipides en phase gel liquide. Pour enlever la totalité du détergent, un deuxième traitement aux Bio-Bead est effectué pendant 30 minutes. La formation des protéoliposomes (formation d'agrégat protéine-liposome) est suivie par mesure de la turbidité à 400 nm. Les Bio-Bead

sont éliminées par une brève centrifugation (1 min à 10 000 rpm) et la solution contenant les protéoliposomes (PL) est conservée à -20°C.

III. Techniques de chromatographie:

Les différentes colonnes de chromatographie sont coulées à l'aide de la résine souhaitée puis montées sur un système AKTA^{prime}. La composition des différents tampons est indiquée en annexe n° 1.

1. Chromatographie d'affinité anti-Flag

Ce type de chromatographie sépare les protéines qui portent une étiquette Flag en N-terminal (8 acides aminés DYKDDDDK) grâce à leur interaction par affinité à l'anticorps anti-Flag fixé sur une résine Sepharose.

Deux types de résine anti-Flag/Sepharose ont été utilisées, une résine prête à l'emploi (ANTI-FLAG[®] M2 affinity gel; *Sigma Aldrich*) et une résine préparée au laboratoire dont le protocole de préparation est le suivant:

❖ Préparation de la résine anti-Flag

La matrice (Affi-Prep[®] Protein A Matrix BIO-RAD) de la résine préparée est une protéine A purifiée et couplée à un polymère. 300 µL de cette matrice est lavée avec 2 mL de triéthanolamine (0,2 M dans du tampon PBS pH 9), puis le mélange est centrifugé 1 min à 500 rpm. Le support est resuspendu dans 10 mL triéthanolamine sont ajoutés ensuite 10–20µg d'anticorps Flag et 52 mg du Diméthylpimelimidate « DMP » (préalablement mis à température ambiante pour éviter son inactivation). La suspension est mise sous agitation douce pendant 1 h. La matrice est lavée 2 X avec 10 mL triéthanolamine pour éliminer l'anticorps non fixé. La résine ainsi préparée est équilibrée avec le tampon contenant 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF et 0,025 % DDM.

Les résines anti-Flag commerciale ou bien préparée au laboratoire ont été équilibrées à l'aide d'un tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 120 mM NaCl et 0,025% DDM. L'échantillon solubilisé est incubé avec la résine durant la nuit à 4°C sous agitation douce. Après deux étapes successives de lavage avec le même tampon, la protéine fixée à la résine est éluée avec 100 µg/ml de peptide Flag (3X FLAG[®] Peptide; *Sigma Aldrich* ; préparé dans du tampon à 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 120 mM NaCl et 0,025% DDM) pendant 1 heure à 4°C. Le peptide décroche ainsi la protéine par compétition d'affinité. A chaque étape, on récupère le surnageant après une brève centrifugation (< 1 min à 10 000 rpm) pour des études analytiques ultérieures.

2. Chromatographie d'adsorption sur Héparine Sepharose

L'héparine Sepharose est une résine d'adsorption qui permet de purifier une large gamme de protéines (sérum, facteurs de coagulation, lipases, lipoprotéines, récepteur d'hormone...).

La colonne de chromatographie Héparine Sepharose™ 6 Fast Flow (*GE Healthcare*) est équilibrée avec 20 X le volume de la colonne avec du tampon 20 mM Tris-HCl à pH 8, 1 mM EDTA et 0,025% DDM. L'échantillon est passé plusieurs fois au travers de la colonne avec un débit lent de 0,3 mL/min. Une fois le dépôt terminé, la résine est lavée avec 5 X le volume de la colonne avec le tampon mais en présence de 1mM PMSF. L'élution des protéines est réalisée par gradient discontinu de 0,1 à 1,5 M de NaCl avec un débit de 0,5 mL/min.

3. Chromatographie échangeuse d'anions

Nous avons utilisé comme résine la DEAE Sepharose (DEAE–Sepharose® CL-6B *Sigma Aldrich*) comme résine échangeuse d'anion. De la même manière que précédemment décrite, la colonne est équilibrée avec le tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 1 mM, 1 mM PMSF et 0,025 % DDM. La colonne est lavée avec 10 X le volume de la colonne avec le même tampon. Les protéines fixées sont éluées avec un gradient discontinu de 0,05 et 2 M NaCl avec un débit de 0,4 mL/min.

4. Chromatographie d'exclusion

Ce type de chromatographie est utilisé pour la séparation des protéines selon leur masse moléculaire. Elle sert généralement comme une étape finale de purification après avoir passé par un autre type de chromatographies (affinité ou d'échange d'ions). Le flavocytochrome_{b₅₅₈} recombinant faisant entre 100 et 120 kDa, nous avons choisi comme résine la Superdex™ 200 prep grade (*GE Healthcare*). La solution protéique est généralement concentrée préalablement à l'aide de concentrateurs VIVASPIN 20 (10000 molecular weight cut off value (MWCO)) puis chargée sur la colonne de chromatographie de gel filtration équilibrée avec du tampon contenant 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 120 mM NaCl, 1 mM PMSF et 0,025 % DDM. La protéine est éluée avec un débit de 0,1 mL/min et récupérée dans des fractions de 0,1 mL.

IV. Techniques analytiques

1. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Cette technique en condition dénaturantes permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire apparent. L'analyse électrophorétique se fait en utilisant des gels SDS 10% précoulés (*VWR International*) qui permettent une bonne séparation des bandes pour des protéines ayant une masse moléculaire entre 20 et 100 kDa. Le tampon d'électrode contient du tampon Tris – Tricine/SDS Run Buffer with Bisulfite (Tris – Tricine/SDS Run Buffer with Bisulfite - *VWR International*). Les échantillons (1 à 15 µg de protéines totales) dénaturés à 70 °C sont préparés par l'ajout de 5 µL de tampon dodécylsulfate de lithium (LDS 4 X) en présence de 2 µL DTT(0,5 M) (qsp 20 µL). Les échantillons sont déposés dans les puits, le gel est ensuite placé dans la cuve d'électrophorèse et la migration se fait pendant 60 min à 165 Volts.

Les bandes de migration de protéines sont révélées par coloration des gels SDS soit au Bleu de Coomassie ou soit au Nitrate d'argent.

2. Immunoblots

Afin d'identifier les protéines séparées par électrophorèse SDS-PAGE (à l'aide d'anticorps spécifiques), des Western blots ont été effectués. Par le même principe que précédemment décrit, les protéines sont tout d'abord séparées par gel SDS-PAGE puis transférées du gel SDS sur une membrane de nitrocellulose (*GE Healthcare*). Pour cela, le gel est déposé sur la membrane de nitrocellulose « en sandwich » entre six papiers Whatman, l'ensemble étant préalablement imprégné dans le tampon de transfert (Tris-Glycine SDS Transfer Buffer C.B.S SCIENTIFIC-VWR International). L'ensemble est placé dans une cuve d'électrophorèse. Ainsi, les protéines étant chargées négativement migrent de la cathode vers l'anode et s'adsorbent sur la membrane. Le transfert s'effectue pendant 30 min à 45V ou 1 h à 30V.

Après transfert, la membrane est lavée deux fois pendant 15 min dans le tampon TBS-Tween 0,1%. Les sites libres de la membrane de nitrocellulose sont saturés par incubation sous faible agitation avec un tampon TBS-Tween 0,1% contenant 5% d'albumine de sérum bovin (BSA) pendant la nuit à 4°C. Après blocage des sites non spécifiques, la membrane est lavée deux fois avec du TBS-Tween 0,1% puis incubée avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt (Tableau 4) sous faible agitation pendant 3h à température ambiante.

MATERIELS & METHODES

Anticorps	Marque	Type	Origine	Dirigé contre	Dilution recommandée en WB
Anti-gp91 ^{phox}	---	Polyclonal	Lapin	la protéine entière	1/1000
Anti-p22 ^{phox}	---	Polyclonal	Lapin	la protéine entière	1/2000
Anti-gp91 ^{phox}	Santa Cruz Ref: SC-130543	Monoclonal	Souris	les acides aminés (383-390) la région C-terminale	1/1000
Anti-p22 ^{phox}	Santa Cruz Ref : SC-20781	Polyclonal	Lapin	La protéine entière (les acides aminés 1-195)	1/2000
Anti- Flag	cell signaling	Monoclonal	Lapin	Les protéines DYKDDDDK	1/1000
Anti Pma1 (Anti-membrane plasmique)	Abcam Ref : Ab4645	Monoclonal	Souris	la protéine Plasma membrane ATPase 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1/5000
Anti-Ribophorin 1 (anti- réticulum endoplasmique)	Abcam	Monoclonal	Souris	la région C-terminale de la Ribophorin I humaine (acides aminés 419-607)	1/1000
Anti-p47 ^{phox}	---	Polyclonal	Lapin	La protéine entière d'origine humaine	1/1000
Anti-p67 ^{phox}	---	Polyclonal	Lapin	La protéine entière d'origine humaine	1/5000

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les Western-blot

Afin d'enlever les anticorps non liés, la membrane est lavée deux fois avec du TBS-Tween 0,1% pendant 15 min avant d'être incubée avec l'anticorps secondaire pendant 45

MATERIELS & METHODES

minutes. L'anticorps secondaire, dirigé contre une portion espèce-spécifique de l'anticorps primaire, anti-souris ou anti-lapin liée à la peroxydase, est ensuite utilisé en conjonction avec un agent luminescent ECL (*enhanced chemiluminescent*; Kit ECL plus, *GE Healthcare*). Le produit de la réaction émet une luminescence proportionnelle à la concentration en protéine. Un film photographique sensible est placé contre la membrane et, sous l'exposition de la lumière due à la réaction, crée une image des anticorps liés à la membrane.

Il est possible de réutiliser la même membrane pour révéler les protéines avec un autre anticorps primaire. Pour cela, les anticorps de la membrane sont « déshybridés » en incubant la membrane 30 minutes dans du tampon de déshybridation (62,5 mM Tris-HCl pH 6,7, 2% SDS, 100 mM β -mercaptoéthanol) sous agitation à 50°C. Puis la membrane est rincée avec du TBS-Tween 0,1% pendant 15 min et toutes les étapes de révélation sont répétées en utilisant un autre anticorps primaire.

V. Techniques spectroscopiques

1. Spectroscopie d'absorption stationnaire

Le spectre d'absorption caractéristique d'une solution protéique contenant par exemple un cytochrome permet de l'identifier et de le quantifier. L'élément absorbant la lumière dans les cytochromes est le groupement hémique. Les spectres d'absorption du *Cytb*₅₅₈ sont réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau (UVIKON). La quantité en *Cytb*₅₅₈ d'une fraction membranaire est déterminée le plus facilement à partir du spectre de différence entre l'état oxydé de la protéine et son état réduit obtenu par l'ajout de quelques grains de dithionite dans la suspension. Les spectres de différence d'absorption de la fraction réduite et de la fraction oxydée sont mesurés entre 350 et 650 nm.

L'hème du *Cytb*₅₅₈ est quantifié par la mesure de la différence d'absorption entre le pic à 427 nm et le creux à 411 nm en utilisant la différence du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon_{427-411}=200 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (271).

2. Spectroscopie d'absorption résolue en temps

Cette technique nous permet de mesurer l'activité NADPH oxydase de l'échantillon considéré en déterminant la quantité d'anion superoxyde produite en système acellulaire. Cette mesure est dite « acellulaire » ou « *in vitro* » puisqu'il s'agit de reconstituer le complexe NADPH oxydase fonctionnel à partir des fractions membranaires contenant le *Cytb*₅₅₈, d'une part et des protéines cytosoliques recombinantes purifiées d'autre part.

Dans le mélange réactionnel, 200 nM de chaque protéine cytosolique purifiée (p67^{phox} bovine, p47^{phox} bovine et RacQ61L humain) et 1 à 5 nM de *Cytb*₅₅₈ inséré dans la membrane sont incubés durant 5 min à 25 °C en présence d'une concentration optimale d'activateur qui est l'acide arachidonique. Le volume réactionnel est ajusté à 500 µL avec le tampon d'activité (voir composition en annexe n° 1).

Après incubation, le substrat (200 µM NADPH) de la réaction est ajouté au milieu réactionnel avec 100 µM cytochrome *c* oxydé.

Les ions superoxydes produits par le *Cytb*₅₅₈ (équation 1) sont détectés grâce à leur capacité à réduire le cytochrome *c* en solution (équation 2). La réduction est suivie à 550 nm, longueur d'onde à laquelle le coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* réduit est égal à 21 mM⁻¹.cm⁻¹(272).

MATERIELS & METHODES



La réduction du Cyt *c* est suivie à 550 nm pendant 2 min. Cependant, comme le Cyt *c* peut être réduit par d'autres réducteurs que l'anion superoxyde, la même expérience est répétée en présence de 70 µg de superoxyde dismutase (SOD). La SOD va transformer $\text{O}_2^{\cdot-}$ en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 ; équation 3) incapable de réduire le cytochrome *c*.

La quantité de Cyt *c* réduite uniquement par l'anion superoxyde est alors déduite de la différence de pentes de réduction du cytochrome *c* en absence et en présence de SOD (Figure 28). On en déduit la vitesse de production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ (1 Cyt *c* / 1 anion superoxyde).

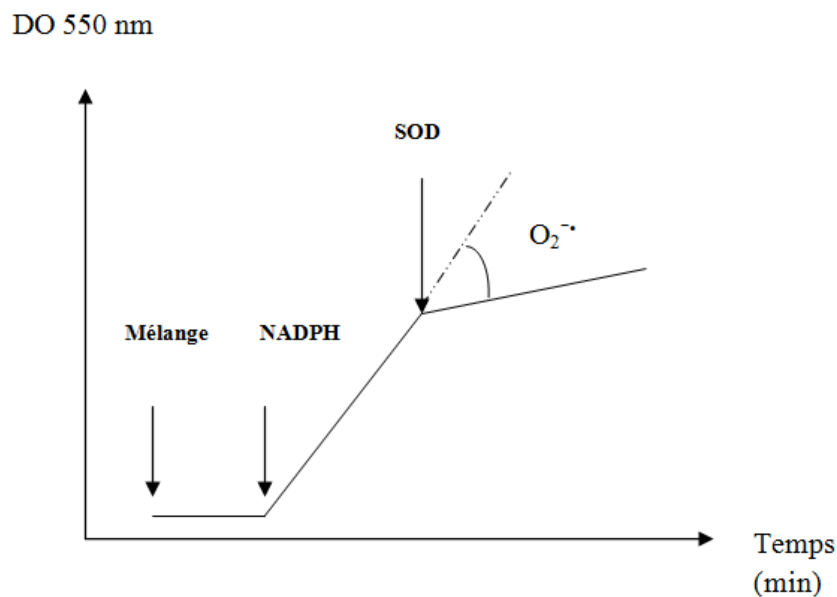


Figure 28: Mesure de l'activité de la NADPH oxydase

Pour la mesure de l'activité en fonction de la température, le mélange réactionnel a été incubé à des températures croissantes (de 10 à 40 °C) et le suivi de réduction du Cyt *c* est fait à la même température. Le test avec la SOD est réalisé pour chaque température.

MATERIELS & METHODES

Une optimisation de la mesure d'activité NADPH a été mise au point au niveau du volume d'incubation, du rapport Cyt_{b558}/protéines cytosoliques, du tampon et aussi parfois de produits de fournisseurs différents (acide arachidonique et le NADPH).

Nous avons en effet remarqué que le NADPH provenant de chez *Sigma Aldrich* n'est pas stable et s'oxyde rapidement contrairement à celui de chez *Accros Organics*. Nous avons aussi constaté que l'acide arachidonique (AA) provenant de chez *Accros Organics* conduit à une production d'O₂⁻ plus faible qu'avec l'AA de chez *Sigma Aldrich*. Nous avons réalisé leurs spectres d'absorption (Figure 29) qui montrent un pic majoritaire à 210 nm. Cependant des pics additionnels (environ 230 nm et 280 nm) sont présents dans le spectre du AA de chez *Sigma Aldrich* qui sont absents dans celui de chez *Accros Organics*.

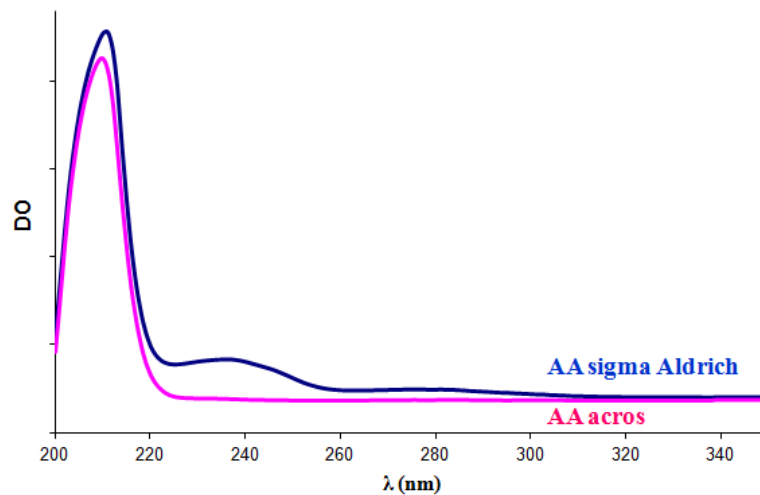


Figure 29: Spectres d'absorption d'AA

Le spectre bleu est le spectre d'absorption de l'AA de chez *Sigma Aldrich* et celui en rouge correspond au spectre d'absorption de l'AA de chez *Accros*.

VI. Méthodes de Biologie moléculaire

1. Extraction de l'ADN génomique de levure

L'ADN génomique (ADNg) de *P. pastoris* a été extraite en utilisant le kit commercialisé le Yeast DNA kit (*Omega Bio-tek, VWR*). L'extraction de l'ADNg est réalisée selon le protocole du kit à partir de 2 mL de culture de levure (à une DO_{600nm} égale à 10). Le rendement obtenu varie entre 3 à 25 µg d'ADN.

L'ADNg extrait est ensuite analysé sur gel d'agarose 1 %. Cette technique permet de séparer les fragments d'ADN de différentes tailles sous un courant électrique. La révélation est réalisée à l'aide du bromure d'éthidium (BET) en exposant le gel à des rayonnements ultraviolets.

2. Amplification d'ADN par la méthode polymérase chain réaction (PCR)

La PCR (Polymérase Chain Réaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes (Figure29) : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une extension grâce à l'action d'une ADN polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible.

Dans la réaction PCR, 100 ng d'ADN ont été utilisés comme matrice en présence de 20 μ moles de dNTP et 20 μ moles de chaque amorce. 1U de Phusion™ High-Fidelity DNA Polymérase a été suffisante pour amplifier la séquence du gène codant pour la protéine gp91^{phox} en 1 min à 72°C.

Le programme de la PCR effectué comprend : une étape de dénaturation primaire à 94°C pendant 3 min suivie de 35 cycles composés de : dénaturation à 94°C pendant 30 s, 1 min hybridation à 55°C et 1 min d'extension à 72°C. Une étape d'extension finale a été réalisée pendant 7min à 72°C.

RESULTATS & DISCUSSION

***CHAPITRE I : CARACTERISATION GENOMIQUE ET
FONCTIONNELLE DU Cytb₅₅₈ EXPRIME DANS LA
MEMBRANE DE LA LEVURE***

1. Introduction

Avant d'avancer vers l'optimisation de la purification de la protéine d'intérêt, il est important d'effectuer quelques vérifications au niveau génomique et phénotypique. Par conséquent des contrôles ont été rigoureusement effectués au niveau génomique et phénotypique. Ces contrôles ont pour objectif de vérifier la présence des gènes (*CYBB* et *CYBA* codant respectivement pour gp91^{phox} et p22^{phox}) introduits dans le génome des souches transgéniques de levures (puisque l'intégration de la cassette d'expression dans le génome de la levure s'effectue de façon aléatoire par recombinaison homologue). Mais aussi de savoir si les phénotypes de ces levures transgéniques sont stables et correspondent aux phénotypes attendus.

Ensuite il est important de vérifier si les protéines recombinantes dans les conditions de croissance à grande échelle restent fonctionnelles et sont intègres. Des comparaisons entre les caractéristiques enzymatiques du *Cytb*₅₅₈ recombinant et celles connues du *Cytb*₅₅₈ natif des membranes de neutrophiles ont été constamment effectuées pour valider le produit de l'expression hétérologue en levure.

2. Analyse génomique et phénotypique

Le point crucial lié à la manipulation génétique de nombreux organismes dépend de la capacité à introduire et à maintenir des séquences d'ADN d'intérêt. L'introduction de séquences dans la levure *P. pastoris* se réalise de la même manière que pour la levure modèle *S. cerevisiae* où les vecteurs peuvent être soit maintenus par des éléments de répllication autonome soit intégrés dans le génome de *P. pastoris* (217).

De manière identique à la levure *S. cerevisiae*, les événements d'intégration de la cassette d'expression (Figure 18) dans le génome de *P. pastoris* ont d'abord lieu par recombinaison homologue entre les séquences présentes à la fois sur le vecteur d'expression et dans le génome de la levure (273).

Pour permettre l'intégration du vecteur d'expression dans le génome de la levure, le plasmide contenant la cassette d'expression avec les gènes codant pour les deux protéines du *cytb*₅₅₈ à exprimer a été linéarisé par l'enzyme de restriction *AatII*. La linéarisation stimule le mécanisme de recombinaison et permet une intégration ciblée du plasmide dans le génome de la

levure (Figure 30). Le site de coupure *AatII* est localisé en amont du promoteur du gène *HIS4*. Plusieurs travaux ont montré que l'efficacité de transformation était dépendante du site de linéarisation utilisé et que la linéarisation du vecteur au niveau du site de l'enzyme *AatII* donnait de très bons résultats puisqu'elle facilite l'association des régions homologues lors de la recombinaison.

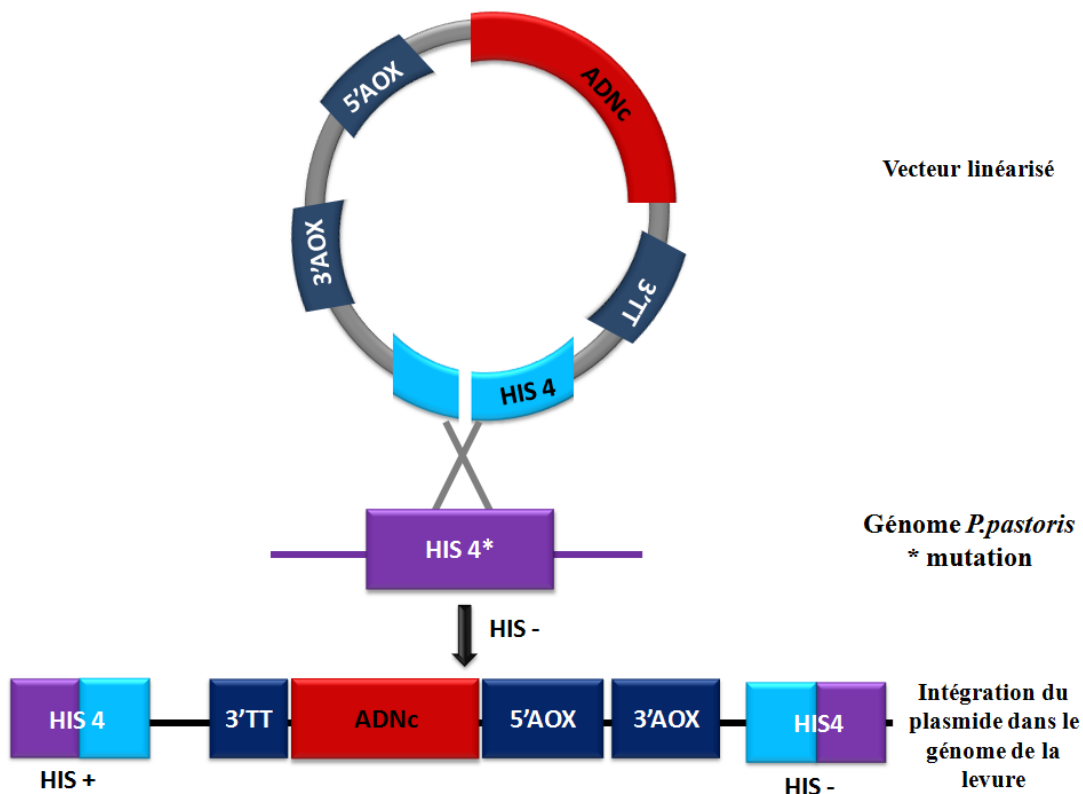


Figure 30 : Intégration de la cassette d'expression dans le génome de *P. pastoris*.

La souche de *P. pastoris* que nous avons utilisée est la souche SMD1168 qui présente la caractéristique d'être déficiente pour deux types de protéases (la protéinase A et la protéinase B, deux protéases vacuolaires) ce qui permet d'avoir un environnement encore plus stable pour l'expression de protéines hétérologues. Cette souche présente également une mutation dans le gène *HIS4* codant l'histidinol déshydrogénase, ce qui autorise la sélection de transformants ayant intégrés le gène *HIS4*.

L'étape suivante consiste à sélectionner de manière effective et efficace les clones d'intérêt en prenant en compte plusieurs éléments majeurs. Tous sont liés au fait que l'intégration de plusieurs copies du gène d'intérêt dans le génome de *P. pastoris* peut permettre une

augmentation du niveau d'expression de ce gène. C'est ainsi que le clone N11 sur lequel le travail a été effectué, a été sélectionné(206).

i. Vérification de la présence du gène *CYBB* codant pour gp91^{phox} dans le génome de *P. pastoris*

Lors d'une transformation intégrative, les évènements d'insertion multiples ont lieu spontanément chez la levure avec une fréquence allant de 1 à 10% du nombre total des transformants (274-275) et par un mécanisme de recombinaison homologue qui conduit à l'intégration en tandem des copies du vecteur.

Cependant par des évènements de crossing-over il est possible après plusieurs générations de perdre les gènes qui avaient été intégrés. Il était donc indispensable de vérifier la présence des gènes *CYBB* et *CYBA* codant respectivement pour la protéine gp91^{phox} et p22^{phox} du *Cytb*₅₅₈. Pour cela, nous avons extrait l'ADN génomique des levures transgéniques (Figure 31; A) puis amplifié l'ADN par PCR en utilisant des amorces spécifiques (Figure 31; B).

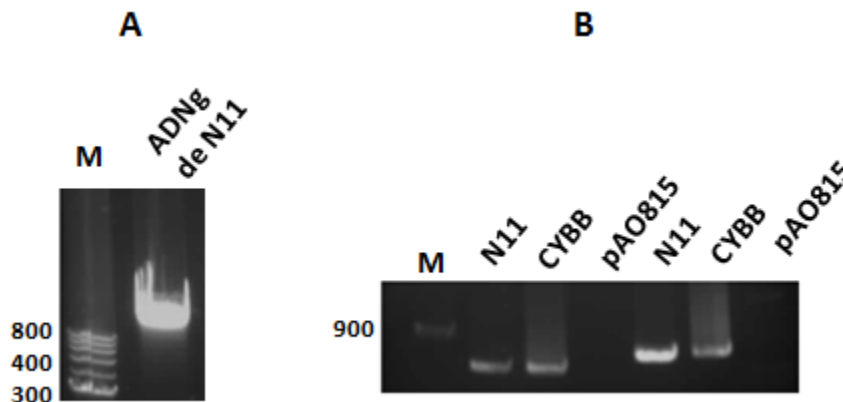


Figure 31 : Analyse sur gel agarose

Analyse de l'ADN génomique isolé sur gel agarose 1 %. M : marqueur 1kb DNA Ladder (BioLabs) ; ADNg de N11 : ADNg isolé de *P. pastoris* recombinant (clone N11); (B) ADN amplifié par PCR à l'aide de deux couples d'amorces spécifiques du gène *CYBB*; N11: ADNg de N11 ; *CYBB*: gène *CYBB* cloné dans le vecteur pGEM;pAO815 : vecteur vide pAO815.

Deux couples d'amorce ont été utilisés pour amplifier le gène *CYBB* qui code pour la protéine gp91^{phox} du flavocytochrome *b*₅₅₈ (Tableau 5).

	nom	séquence	Tm
Couple d'amorce N° 1	<i>gp91UP</i>	5'GGGAAGTGGGTTGTGAATGA3'	62,5°C
	<i>gp91REV</i>	5'TCTCTGGGAACCCCTCCTATG3'	59,3°C
Couple d'amorce N° 2	<i>gp91FOR</i>	5'TTGAAATGGATAGTGGGTCC 3'	55,3°C
	<i>gp91LW</i>	5'GGGAGTGCATTTTCATTTTCAAC3'	57,8°C

Tableau 5: Les deux couples d'amorce spécifiques de *gp91^{phox}*.

Le premier couple d'amorce (*gp91Up/gp91Rev*) amplifie une portion d'ADN située dans la première moitié du gène CYBB (828 pb) et le deuxième couple (*gp91FOR/gp91LW*) amplifie une portion d'ADN située dans la deuxième partie du gène (894 pb) (Figure 32).

```

ATGgp91UPGGGAAGTGGGTTGTGAATGAGGGCATCTCCAICTTTGTCATTCTGGT
ATGGCTGGGGATGAACGCTTCCCTTTTGTCTGGTACTACCGGGTTATG
ATATCCAGATAAGTTCTTTACACTCGAAAACCTTCTGGGTCAGCGCTG
GCCCTGGCCAGAGCCCTGCAGCCTGCCTGAATTCAACTGCATGCTGAT
TCTGCTGCCTGTCTGTCGAAATCTGCTCTCCTTCCCTCAGGGGTTCCAGTG
CGTGTCTCAACAAGAAATCCGGAGACAACTGGA CAGGAACTCACTTT
CATAAAATGGTGGCATGGATGATTGCACCTCACACTGCAATTCATACCAT
TGCACATCTATTAAATGTGGAGTGTGTGTAATGCCCGAGTCAACAATT
CTGATCCTTATCAATAGCACTCTCTGACATTGGAGATAAGCCTAATGAA
ACTTACCTCAATTTTGTTCGACAGAGAATCAAGAATCCTGAAGGAGGCCCT
GTATGTGGCTGTGACTCGGTTGGCAGGCCATCACTGGAGTCTCATTACAC
TGTGCCTGATATTAATTATCACATCCTCCACAAAACCATCCGGAGGCTCT
TATTTGAAGTGTTTGGTACACACACCACTCTCTTTGTGATCTTCTTCAT
TGGTCTCGCCATCCATGGAGCTCAGCGGATGTACGTGGGCAGACTGCAG
AGAGTTTGTGAAAACCAACCAAGAAAC TGTATCAAAAATCTCACAG
TGGGAAAAATAGAGAACTGCCCAATCCCAGAGTgp91REV (int.)TCTCTGGGAACCCCTCC
gp91FOR (int.)TATGACTTGGAAATGGATAGTGGGTCCCA TGTTCCTGTATCTCTGTGAGA
GGTTGGTACGGTTTGGAGATCTCAACGAAAGGTGGTCAACACCAAGGTG
GTCACCTCACCCCTTTCAAAAACATCGAGCTCCAGATGAAGAAGAAAGGATT
CAAGATGGAGGTGGGCCAAATACATTTTCGTCAGTGTCCC GTGGTGTCCA
AGCTGGAGTGGCACCTTT CACCCCTGACCCTGCCCCCTGAGGAAGACTTC
TTTAGCATCCATATCCGCACTCGTGGGGACTGGACAGAGGACTCTTCAA
AGCTTGTGGCTGTGATAAGCAGGAGTTTCAAGATGCCTGGAACTACCAA
AGATAGCTGTTGACGGGCCCTTTGGCACTGCCAGTGAGGACGTGTTCAGT
TACGAGGTGGTGTGTTAGTGGGAGCAGGATCGGGGTTACGCCCTTTGC
ATCCATCTCAAGTCCGCTGGTACAAATATTGCAATAAAGCCCCAAATC
TGAGGCTCAAAAAGATCTACTTCTACTGGCTGTGCCGGGACACACATGCC
TTTGTGTTGTTGCGGACCTGCTGCAGCTGCTGGAAACACAGATGCAGGA
GAA GAACAACACGGACTTCTCAGCTACACATCTGCCTCACTGGCTGGG
ATGAGTCTCAGGCCAGTCACTTTGCTATGCATCATGACGAGGAGAAAGAT
GTAATCACAGGCCTGAAACAAAAGACCTTGTATGGACGACCCAAC TGGGA
TAA CGAGT TCAAGACCAT T GGAAGTCAACATCCCAATACCAGAATAGGAG
TCTTCTCTGCGGACCGGAAGCCTTGGCTGACACCCTTAA TAAGCAGTGC
ATCTCCAATCCGACTCTGGCCCCAGGGAGTGCATTTCA TTTTCAACAA
GGAAAATCTTAAgp91LW

```

Figure 32 : Séquence nucléotidique codante de *gp91^{phox}* d'origine bovine avec les deux couples d'amorces spécifiques.

L'amplification par PCR de l'ADN de *P. pastoris* transgénique (N11), visualisée sur gel agarose (Figure 31 ; B), conduit à une bande de 828 pb avec le couple d'amorce (*gp91Up/gp91Rev*) dont la taille est similaire à celle trouvée avec le contrôle positive (vecteur pGEM portant le gène *CYBB*). De la même manière, le couple d'amorce (*gp91FOR/gp91LW*) conduit à une bande légèrement plus grande de 894 pb également amplifiée par ces amorces avec le vecteur contrôle pGEM portant le gène *CYBB*.

Ce résultat montre que la souche transgénique de *P. pastoris*(clone N11) possède bien le gène *CYBB* intégré dans son génome codant pour le gp91^{phox}. L'absence de bande d'amplification avec le vecteur vide pAO815 est ici un contrôle négatif.

ii. Phénotype de la souche transgénique de *P. pastoris* :

la souche SMD1168 présente une mutation au niveau du gène histidine (*HIS*⁻) donc elle ne peut pas pousser dans un milieu de culture non additionné d'Histidine sauf si la cassette d'expression contenant le gène Histidine a été insérée au niveau de son génome. Les levures du clone N11 ensemencées sur le milieu MD ont effectivement poussé au bout de 48 h indiquant ainsi que le vecteur contenant la cassette d'expression a bien été intégré au génome emportant avec le gène *HIS4* (Figure 33; A).

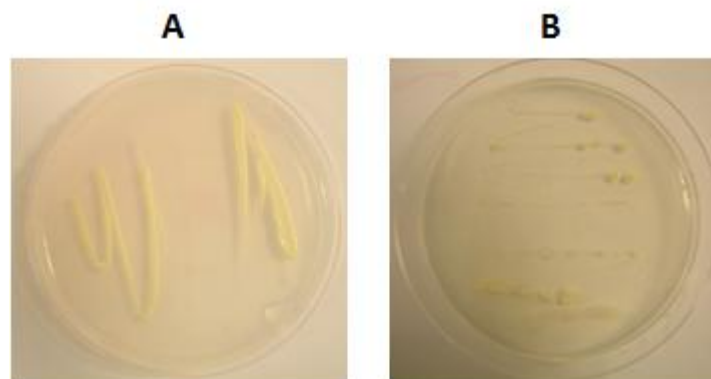


Figure 33 :Culture de *P.pastoris* sur milieu gélosé en boîte de pétri à 30 °C.
(A) en milieu minimum MD pendant 48 h ; (B) en milieu minimum avec méthanol MM pendant 72 h.

La présence de régions homologues au niveau de la partie 5'AOXI et 3'AOXI dans le vecteur et de l'ADN génomique de la levure *P. pastoris*, peut conduire à des recombinaisons en

remplaçant tout le gène fonctionnel de l'alcool oxydase AOXI par la cassette d'expression. Ce qui rend cette cellule incapable de métaboliser facilement le méthanol. Une légère fonction métabolique est assurée par le gène *AOXII* qui a un très faible taux d'expression ce qui donne plus de temps à la cellule pour pousser sur milieu contenant du méthanol (Mut^s : pour Méthanol utilisable slow).

Pour vérifier que l'insertion des gènes *CYBB* et *CYBA* a été faite au bon endroit dans le génome de *P. pastoris* et que le gène *AOX1* n'a pas été perdu lors de l'insertion du gène, nous avons réalisé une sélection sur milieu minimum dépourvu d'histidine (MD Minimal Dextrose Medium) puis vérifié une croissance sur un milieu contenant du méthanol (MM Minimal Méthanol).

Par la suite, nous nous sommes basés sur la particularité de *P. pastoris* qui réside dans sa capacité à utiliser le méthanol comme source de carbone grâce à l'enzyme alcool oxydase (AOX). Après incubation à 30°C pendant 72h sur milieu MM, des colonies de levures sont observées (Figure 33; B). Ce contrôle nous a permis de montrer que les levures transformées sont de phénotype Mut⁺ et non Mut^s (méthanol slow) c'est à dire que les levures recombinantes sont capables de consommer le méthanol comme source de carbone d'une part et d'autre part que la présence de méthanol n'influence pas négativement sur sa croissance cellulaire.

3. Activité NADPH oxydase des membranes de *P. pastoris* exprimant *Cytb*₅₅₈

i. Production d'anion superoxyde

En premier lieu, nous avons déterminé la capacité de la fraction membranaire totale (FMT) de *P. pastoris* exprimant *Cytb*₅₅₈ à produire d'O₂⁻. Pour cela, nous avons utilisé le système « cell-free » qui avait été mis en place au laboratoire auparavant pour l'étude des membranes de neutrophiles. Le principe de cette mesure est détaillé dans la section Matériels et Méthodes. Il consiste à reconstituer *in vitro* le complexe NADPH oxydase en associant les protéines cytosoliques recombinantes produites dans *E.coli* et les fractions membranaires de *P. pastoris* contenant le *Cytb*₅₅₈. De petites molécules activatrices telles que l'acide arachidonique ou le SDS sont indispensables. De par leur propriété amphiphile et de leur charge négative, ces molécules miment les événements de phosphorylation liés à la signalisation cellulaire en induisant des changements conformationnels favorables aux interactions protéine-protéine. Expérimentalement, la vitesse de production d'anion superoxyde produit par le complexe

assemblé est mesurée en présence du substrat (NADPH) en suivant la vitesse de réduction du Cyt_c par l'anion superoxyde (Figure 34 ; A, carrés bleus). Par cette méthode nous avons vérifié plusieurs points essentiels nous permettant de conclure que les propriétés du *Cytb₅₅₈* recombinant sont similaires aux *Cytb₅₅₈* natifs des membranes de neutrophiles.

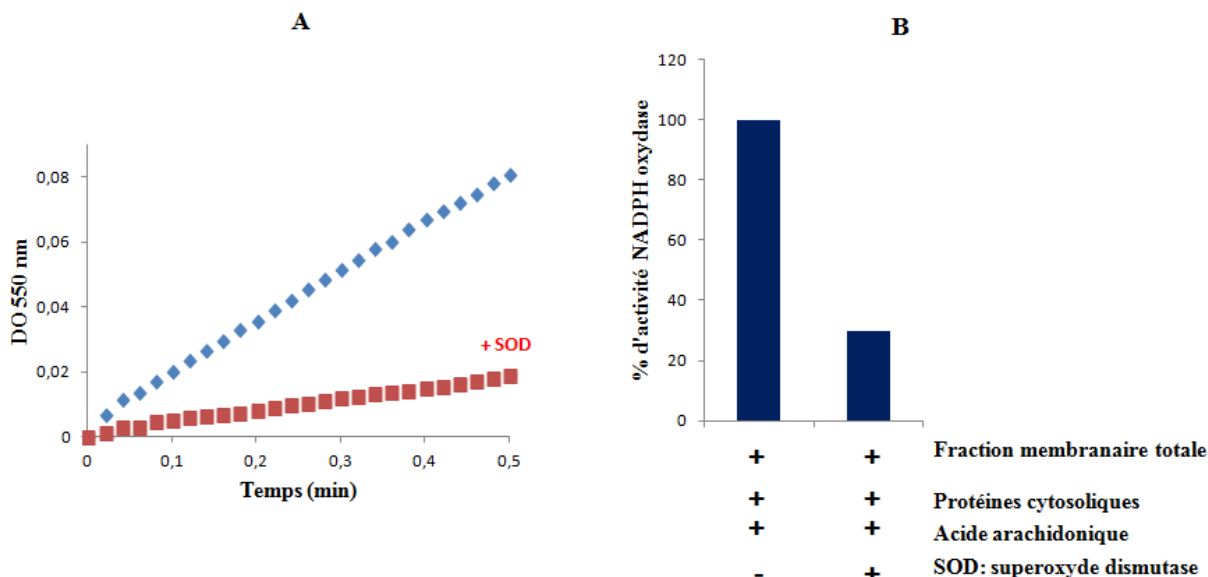


Figure 34 : Mesure de la production d'O₂⁻ avec la FMT de *P. pastoris* exprimant le *Cytb₅₅₈*.

(A) Cinétique de production d'O₂⁻; (B) Tests d'activité NADPH oxydase de la FMT en système cell-free.

La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome c à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Les fractions membranaires totales de levure (0.75 pmol *Cytb₅₅₈*) ont été incubées 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chacune) avec 780 μM cis acide arachidonique et avec ou sans 200 U de SOD. La réaction a été initiée par l'addition de 200 μM NADPH en présence de 50 μM cytochrome c. L'activité NADPH oxydase mesurée sans la SOD est considérée comme la valeur 100 % qui correspond à 350 mol O₂⁻/s/mol *Cytb₅₅₈*.

Tout d'abord, l'addition de l'anion superoxyde dismutase (SOD) diminue fortement la vitesse de réduction du Cyt_c (Figure 34) indiquant que 70 % de la réduction du Cyt_c est due à la présence de l'anion superoxyde probablement généré par le *Cytb₅₅₈*. Ces mêmes tests d'activité ont été effectués avec la fraction membranaire totale de la souche de *Pichia* transformée avec le vecteur d'expression vide (pAO815). La production d'anion superoxyde par le vecteur pAO815 produit une activité NADPH oxydase (< 5%) quel que soit la présence ou l'absence de l'acide arachidonique ou des protéines cytosoliques (Figure 35). Ce résultat montre que le vecteur vide ou plus précisément la membrane de *P. pastoris* ne produit pas de manière endogène de l'anion

superoxyde. Donc, les anions superoxydes qui réduisent le Cyt *c* dans l'expérience précédente sont bien issus de l'activité enzymatique du *Cytb*₅₅₈ recombinant.

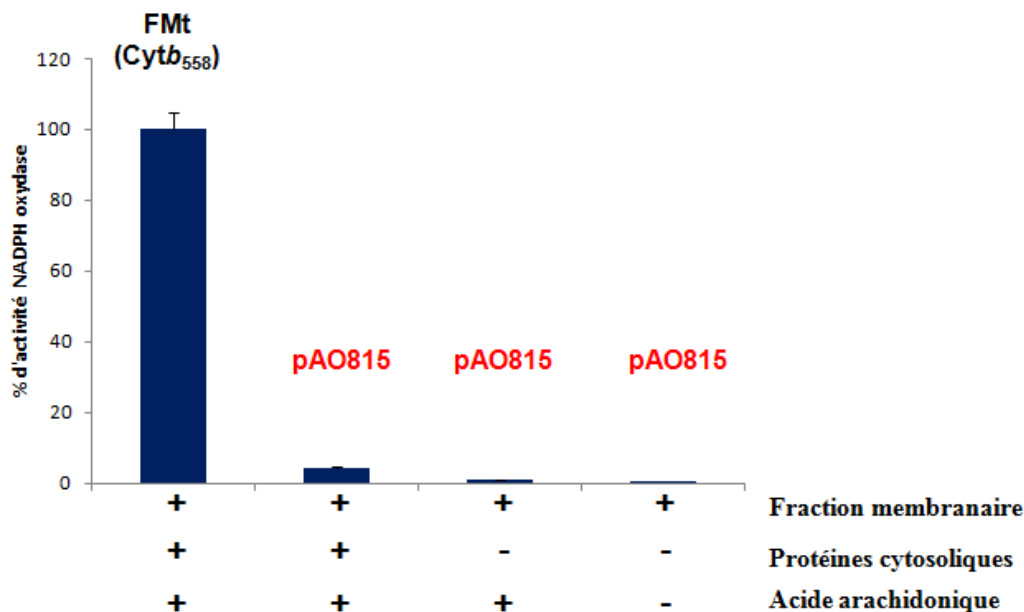


Figure 35 : Tests d'activité NADPH oxydase des FMT exprimant le *Cytb*₅₅₈ et celles de levures transformées avec le vecteur vide (PAO815).

La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome *c* à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Les fractions membranaires totales de levure transgéniques (0.75 μ mol *Cytb*₅₅₈) ou la membrane de *P. pastoris* transformée avec le vecteur vide (PAO815) (300 μ g) ont été incubées 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chacune) avec 780 μ M *cis* acide arachidonique. La réaction a été initiée par l'addition de 200 μ M NADPH en présence de 50 μ M cytochrome *c*. L'activité NADPH oxydase mesurée avec les fractions membranaires totales de levure transgéniques est considérée comme la valeur 100 % qui correspond à 350 mol O_2^- /s/mol *Cytb*₅₅₈.

ii. Activation par les facteurs cytosoliques

La NADPH oxydase est activable par des interactions protéine-protéine entre *Cytb*₅₅₈ et ses partenaires cytosoliques *p47^{phox}*, *p67^{phox}* et Rac en présence *in vitro* de l'activateur acide arachidonique (AA). L'absence d'activation par les protéines cytosoliques serait une indication d'un repliement protéique incorrect du *Cytb*₅₅₈. Nous avons donc comparé l'activité en présence et en absence de ces partenaires et constaté comme l'indique la figure 36 qu'en absence des partenaires cytosoliques, l'activité NADPH oxydase est faible (<20%). Cela signifie que la présence des protéines cytosoliques est importante pour obtenir une activité NADPH oxydase optimale.

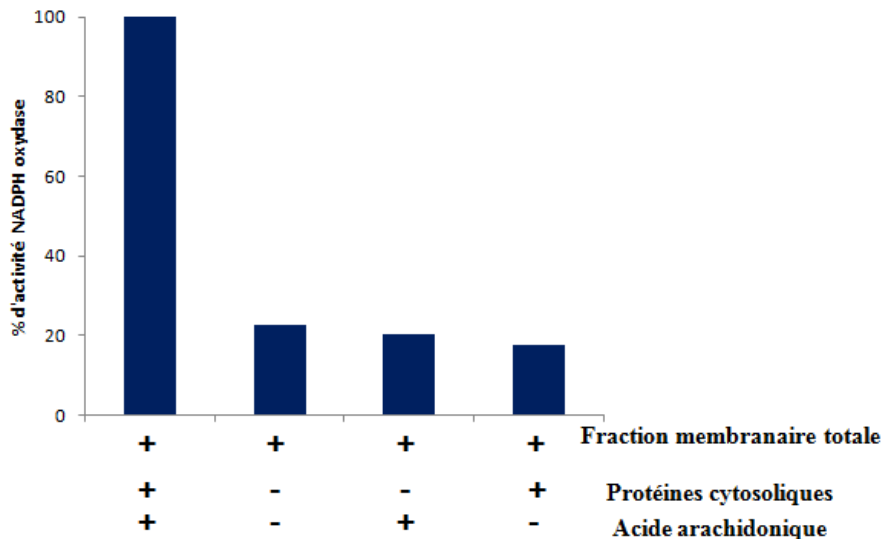


Figure 36 : Activation du *Cytb*₅₅₈ par les protéines cytosolique et par l'acide arachidonique.

Tests de l'activité NADPH oxydase des FMt de levures exprimant le *Cytb*₅₅₈ dans différentes conditions expérimentales. La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome c à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Les fractions membranaires totales de levure transgéniques (0.75 pmol *Cytb*₅₅₈) ont été incubées 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chaque protéine cytosoliques) avec 780 µM cis acide arachidonique. La réaction a été initiée par l'addition de 200 µM NADPH en présence de 50 µM cytochrome c. L'activité NADPH oxydase mesurée avec les fractions membranaires totales de levure transgéniques réalisée dans les conditions classiques du test d'activité est considérée comme la valeur 100 % qui correspond à 350 mol O₂./s/mol *Cytb*₅₅₈.

Ces résultats indiquent que l'activation du flavocytochrome recombinant fait intervenir les protéines cytosoliques de manière similaire à ce qui est décrit pour le complexe natif pour former un complexe actif. Nous pouvons en conclure que le *Cytb*₅₅₈ recombinant possède les éléments structuraux essentiels à son activation reconnaissables par les partenaires cytosoliques.

iii. Activation par l'acide arachidonique : effet dose-réponse

Il a été montré que l'activité NADPH oxydase en fonction d'une concentration croissante d'AA présente un profil d'activation de type dose-réponse caractéristique ayant une forme de cloche dans le neutrophile : la production d'anion superoxyde augmente avec la concentration d'AA pour atteindre un maximum puis cette activité diminue au-delà de cette concentration optimale. La concentration optimale d'AA dépend non seulement de la fraction membranaire mais aussi du rapport protéines cytosoliques/protéines membranaires(276). Dans le cas des membranes de neutrophiles bovins, cette concentration optimale en AA est d'environ 200 µM alors que pour les membranes de neutrophiles humains, cette concentration est d'environ 60 µM.

Dans le système « cell-free » utilisant la FM_t de levure exprimant le *Cytb₅₅₈* bovin, l'activité NADPH oxydase en fonction d'une concentration croissante d'AA présente également le profil en forme de cloche (Figure 37). Cependant la concentration optimale pour avoir une production maximale d'anion superoxyde par le *Cytb₅₅₈* recombinant exprimé dans *P. pastoris* est environ de 800 μM, cette concentration est quatre fois plus importante que celle déterminée pour le *Cytb₅₅₈* natif des neutrophiles bovins (277).

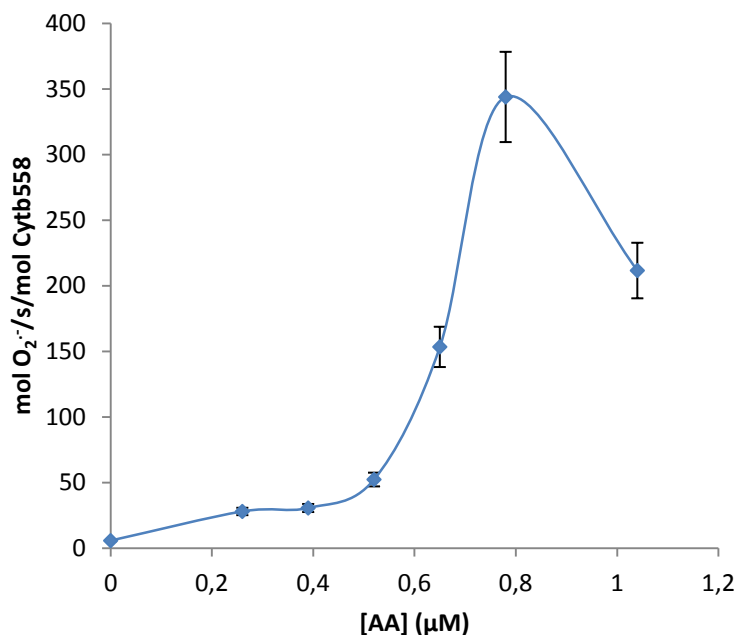


Figure 37 : Activation du complexe NADPH oxydase par l'acide arachidonique.

La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome c à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Les fractions membranaires totales de levure transgéniques (0,75 μmol *Cytb₅₅₈*) ont été incubées 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chaque protéine cytosolique) avec des concentrations croissantes du cis acide arachidonique. La réaction a été initiée par l'addition de 200 μM NADPH en présence de 50 μM cytochrome c. 780 μM d'AA est considérée comme la valeur optimale correspondant à une activité NADPH oxydase maximale.

Le maximum de production d'anion superoxyde est obtenu en présence de 780 μM d'AA. Cette concentration optimale d'AA pouvant varier d'une préparation membranaire à une autre, pour chaque préparation de FM_t nous avons fait ce test. Néanmoins, nous avons obtenu une très bonne reproductibilité pour la levure qui nous permet de nous affranchir de la réalisation systématique de cette expérience longue et fastidieuse.

4. Conclusion

L'ensemble de ces analyses nous conforte dans l'idée que le repliement, l'intégrité et le fonctionnement du *Cytb*₅₅₈ recombinant bovin produit de manière hétérologue dans la levure présente des caractéristiques proches de celles décrites pour le *Cytb*₅₅₈ bovin issu de neutrophile.

Sur cette base, nous avons donc poursuivi des études plus poussées afin d'avancer vers une meilleure caractérisation des modes de régulation de cet enzyme complexe.

CHAPITRE II: PURIFICATION Cytb₅₅₈ RECOMBINANT

Un des objectifs importants de ma thèse était de purifier le Cytb₅₅₈ recombinant en quantité suffisante pour effectuer des analyses biochimiques et physico-chimiques plus fines. Jusque-là, dans l'équipe, un protocole préliminaire de purification du Cytb₅₅₈ recombinant exprimé dans la levure à une petite échelle, c'est-à-dire sur des volumes de culture de levures de 10 mL avait été mis en place. Ce travail a montré que le Cytb₅₅₈ recombinant produit est intègre, correctement assemblé et fonctionnel (221). A cette occasion, certaines conditions de culture avaient été optimisées notamment la présence de DMSO, l'addition de précurseur de l'hème (acide levulinic) et la durée de culture. Néanmoins, ces mises au point préliminaires sont parfois entièrement à revoir lorsque l'on change d'échelle de grandeur de la culture car les cellules ne sont plus dans des conditions identiques de croissance. Cela peut alors avoir des conséquences sur les voies de biosynthèse protéique. C'est pourquoi l'objectif de mon travail qui sera décrit dans ce chapitre concerne d'une part l'optimisation de l'expression de Cytb₅₅₈ à partir de culture de levures à grande échelle et d'autre part la description des différentes étapes de purification biochimiques du Cytb₅₅₈. Ce travail a abouti à l'établissement d'un protocole qui était indispensable pour la poursuite de l'étude fonctionnelle du Cytb₅₅₈ recombinant.

Pour atteindre l'objectif fixé, j'ai été cependant rapidement confrontée à plusieurs problèmes majeurs:

- ✓ Les informations spectrales sont inappropriées pour l'évaluation de la quantité de cytochrome recombinant produit
- ✓ La complexité des structures possibles du cytochrome₅₅₈ recombinant
- ✓ L'inefficacité des étiquettes d'affinité (Flag) destinées à la purification de protéine
- ✓ L'impossibilité de tester l'activité enzymatique du cytb₅₅₈ en détergent puisqu'il perd ses fonctions oxydase qui ne sont restaurées qu'après reconstitution en membrane.

Chacun de ces points sera considéré au cours des différentes parties de ce chapitre.

I. Optimisation des conditions de culture

En passant d'un volume de culture de 10 mL à 1 L, les conditions de culture optimales changent. L'induction de la protéine est effectuée par addition de 1 % méthanol toutes les 24 h (Figure 38). La courbe de croissance est suivie régulièrement en mesurant l'absorbance à 600 nm qui permet de suivre la turbidité de la culture, cette dernière augmente régulièrement. Les levures sont récoltées par une centrifugation (2500 x g) et pesées.

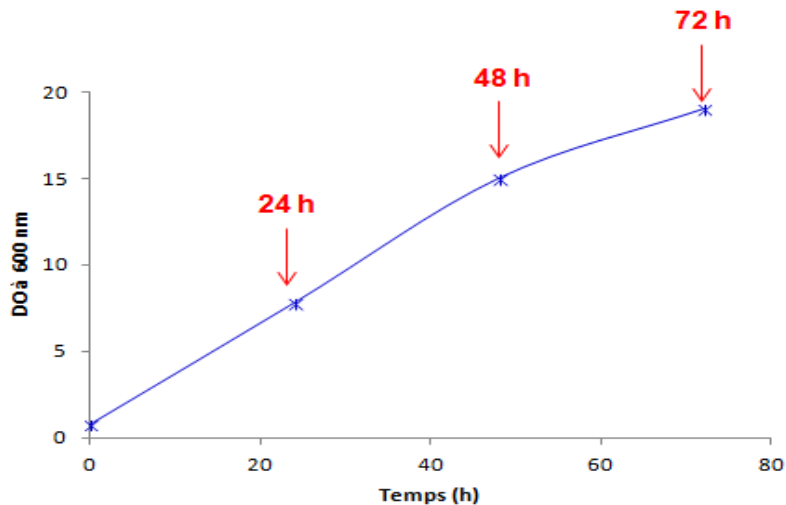


Figure 38 : Courbe de croissance de *P. pastoris* en milieu BYMM.
L'induction de l'expression du Cytb₅₅₈ a été réalisée avec 1 % méthanol tous les 24 h.

Nous avons ainsi fait varier la température, la vitesse d'agitation et le volume du milieu de culture et comparer dans ces différentes conditions la masse cellulaire obtenue.

Le meilleur rendement de culture obtenu était conditionné par une bonne aération du milieu obtenue par une agitation à 260 rpm associée à un faible volume de culture (1/5 du volume totale de l'Erlenmeyer) à une température d'induction inférieure à 20°C. La quantité en biomasse alors obtenue est en moyenne de 15 g de cellules/L de culture pour une culture de 72 h.

II. Lyse cellulaire mécanique manuelle et automatique

La préparation de lysat cellulaire est une étape cruciale pour toute étape ultérieure de fractionnement des organelles intracellulaires. Le but principal de cette étape était d'arriver à un haut degré de reproductibilité avec un minimum de dommages causés aux organelles et leurs membranes qui seront par la suite étudiées. Idéalement, l'objectif est de détruire la paroi des levures tout en gardant les membranes des organelles intracellulaires et la membrane plasmique intactes du point de vue de leur structure et fonction.

Les levures en général et *P. pastoris* en particulier, sont caractérisées par la présence d'une paroi cellulaire épaisse donc l'application d'une méthode classique de lyse apparaît difficile. Il existe plusieurs méthodes de lyse couteuses et spécifiques (comme la préparation des sphéroplastes en utilisant des zymolyases) mais peu sont efficaces pour la séparation des

PURIFICATION DU *Cytb*₅₅₈ RECOMBINANT

membranes intactes des différentes organelles intracellulaires. Nous avons par conséquent optimisé et comparé deux méthodes mécaniques de lyse cellulaire en utilisant des billes de verre : la première est manuelle en utilisant un vortex et la deuxième est automatique qui se fait à l'aide d'un vortex électrique appelé Bead-Beater.

La méthode de lyse manuelle par le Vortex est lente et un peu lourde de point de vue manipulation. En outre, le rendement de lyse n'est pas toujours reproductible mais cette technique de broyage des cellules ne provoque ni l'échauffement des échantillons ni la formation de mousse. La méthode de lyse automatique à l'aide du Bead-Beater est rapide, reproductible et simple du point de vue de la manipulation. Le réservoir est réfrigéré, le temps d'agitation et celui de repos ainsi que la vitesse d'agitation sont réglables. C'est donc cette méthode que nous avons choisi pour préparer les lysats cellulaires pour la suite des expériences.

En moyenne, la lyse de cellules conduit généralement à 6 - 5 mg de protéines membranaires totales /mL. Ce qui est important par la suite est de déterminer la quantité de *Cytb*₅₅₈ recombinant présent dans ces fractions membranaires.

✓ **Premier problème : Evaluation de la quantité de cytochrome recombinant**

Cette évaluation peut se faire à partir du spectre de différence d'absorption entre la forme réduite par le dithionite et la forme oxydée pour lequel les coefficients d'absorption sont connus pour le *Cytb*₅₅₈ de neutrophile (278). Le spectre de différence du *Cytb*₅₅₈ natif présent dans la membrane de neutrophile (Figure 39; B) possède des pics bien caractérisés : la bande de Soret (427nm) et 558nm (bande α).

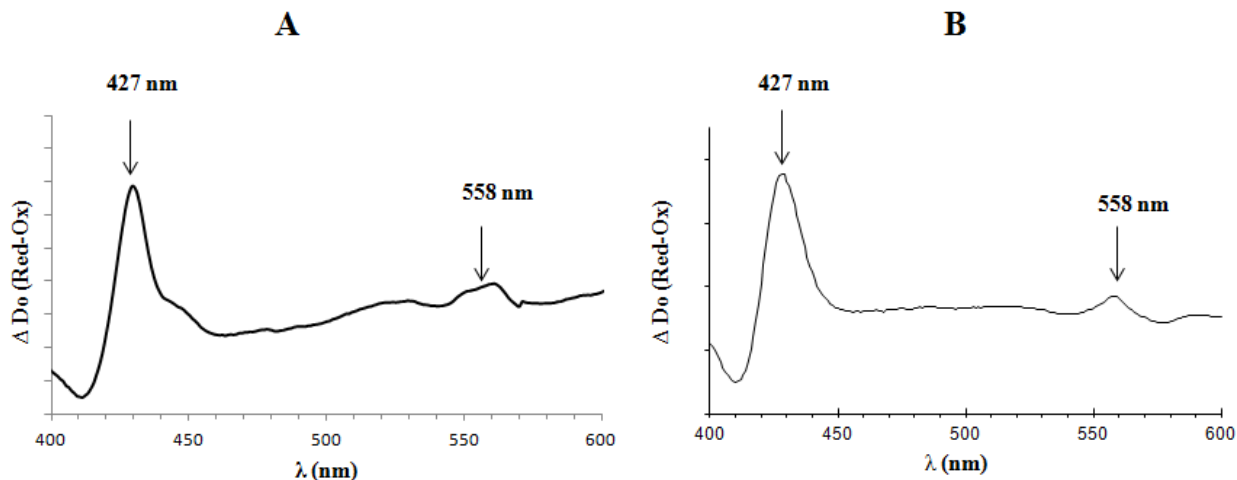


Figure 39 : Spectres de différence d'absorption différence réduit-oxydé du *Cytb*₅₅₈

A. Spectre de différence du *Cytb*₅₅₈ recombinant exprimé dans la membrane de *P. pastoris* après 72 h d'induction au méthanol. **B.** Spectre de différence des fractions membranaires de neutrophiles bovins.

Nous retrouvons ces mêmes pics dans le *Cytb*₅₅₈ des fractions membranaires de *P. pastoris* et nous en avons conclu que l'association de ces groupes prosthétiques s'est faite correctement. L'estimation de la quantité du *Cytb*₅₅₈ à l'aide du spectre et en tenant compte de la surestimation précédemment expliquée suggère qu'en moyenne 5.8 nmol de *Cytb* membranaires/mL sont présents dans les fractions membranaires de levures avec une concentration en protéines membranaires totales en moyenne égale à 5 – 6 mg /mL. Or nous avons rapidement constaté qu'en dehors du *Cytb*₅₅₈ d'intérêt, selon les conditions de culture de levures, dans la fraction membranaire totale de levure, différents cytochromes sont également exprimés de manière endogène (Figure 39. A) puisque le spectre de différence d'absorption présente plusieurs pics caractéristiques d'autres types de cytochrome (440 nm, 550 nm ; voir Tableau 2). Leur spectre de différence réduit-oxydé permet de les différencier facilement mais leur présence dans les membranes de levure rend la détection et l'estimation du cytochrome *b*₅₅₈ recombinant à partir du spectre d'absorption plus compliquées. Notamment les cytochromes de type *a* sont couramment détectés dans le spectre de différence d'absorption du *Cytb*₅₅₈. Nous avons constaté que selon les conditions de culture, la présence du *Cyt a* (contaminant) est plus au moins abondante.

Mais surtout, il existe d'autres protéines membranaires ayant des spectres très similaires à ceux du cytochrome *b*₅₅₈ : les protéines de la famille des ferriques réductases (FreI) qui altèrent encore plus la précision de l'évaluation de la quantité en *Cytb*₅₅₈.

PURIFICATION DU Cytb₅₅₈ RECOMBINANT

Cette difficulté d'estimation est évidemment liée au taux de production peu élevé du Cytb₅₅₈ recombinant par rapport à toutes ces autres protéines membranaires qui présentent des spectres similaires ou proches de ceux de la protéine d'intérêt (89).

Nous avons par conséquent cherché un moyen « indirect » pour évaluer le plus précisément possible la concentration du Cytb₅₅₈ effectif exprimé dans les membranes de *P. pastoris*. Pour cela, nous nous sommes basé sur l'activité spécifique NADPH oxydase enzymatique mesurable dans les membranes. Nous prenons comme référence les activités maximales obtenues avec le flavocytochrome_{b₅₅₈} natif issu de neutrophiles répertoriés dans la littérature qui avoisinent en moyenne 200 mol O₂⁻/s/mol de Cytb₅₅₈ à 25°C (279). Nous considérons que cette vitesse de production est en moyenne l'activité maximale que peut atteindre le Cytb₅₅₈ dans les mêmes conditions expérimentales.

Nous avons par conséquent cherché un moyen « indirect » pour évaluer le plus précisément possible la concentration du Cytb₅₅₈ effectif exprimé dans les membranes de *P. pastoris*. Pour cela, nous nous sommes basés sur l'activité spécifique NADPH oxydase enzymatique mesurable dans les membranes. Nous prenons comme référence les activités maximales obtenues avec le flavocytochrome _{b₅₅₈} natif issu de neutrophiles répertoriés dans la littérature qui avoisinent en moyenne 200 mol O₂⁻/s/mol de Cytb₅₅₈ à 25°C (279). Nous considérons que cette vitesse de production est en moyenne l'activité maximale que peut atteindre le Cytb₅₅₈ dans les mêmes conditions expérimentales. Par conséquent, pour avoir cette vitesse de production d'anion superoxyde, 0.6 pmol Cytb₅₅₈ a été utilisé dans un volume réactionnel de 150 µL donc la quantité d'anion superoxyde produite par seconde est égale à 120 pmol O₂⁻/s.

Dans notre cas, nous mesurons en moyenne 150 pmol O₂⁻/s avec les membranes totales de levure transgéniques. Nous mettons 5 µL dans un volume réactionnel de 500 µL. la quantité du Cytb₅₅₈ utilisée et estimée à partir du spectre de différence d'absorption est égale à 2.25 pmol, mais nous avons considéré que c'est une sur estimation de la quantité. Cela dû au fait qu'on a détecté avec les membranes de la levure transformée avec le vecteur vide (PAO815) un spectre de différence similaire à celui du Cytb₅₅₈. Donc pour pouvoir calculer la vitesse de production d'anion superoxyde en mol O₂⁻/s/mol de Cytb₅₅₈, nous avons fait le calcul en analogie avec les valeurs trouvées avec les membranes de neutrophiles.

PURIFICATION DU Cytb₅₅₈ RECOMBINANT

Pour produire 120 pmol O₂⁻/s, nous avons besoin de 0.6 pmol de Cytb₅₅₈ donc pour produire 150 pmol O₂⁻/s nous aurons besoin de 0.75 pmol de Cytb₅₅₈.

Nous pouvons en déduire qu'en estimant la quantité de Cytb₅₅₈ à partir des spectres de différence, nous surestimons sa quantité d'un facteur trois. Par conséquent dans la fraction membranaire totale de levure, nous avons un rendement de 5.7 nmol (0.5 mg) de Cytb₅₅₈/L de culture et non 17 nmol (1.5 mg) de Cytb₅₅₈ /L de culture comme cela avait été déterminé à partir de l'analyse spectrale.

Les neutrophiles sont les cellules exprimant la plus grande quantité de Cytb₅₅₈, le rendement obtenu, auparavant au laboratoire, estimé est d'environ 7.5 nmol (0,6 mg) de Cytb₅₅₈ dans les fractions membranaires issues de la manipulation fastidieuse de 10 L de sang de bœuf. De plus, dans la mesure où chaque purification de fraction membranaire de Cytb₅₅₈ de neutrophiles utilise le sang d'un animal différent, cela pose un problème de reproductibilité et nécessite à chaque fois une nouvelle optimisation (par mesure dose/réponse) de l'activation du système pour évaluer le *ratio* optimal de fractions membranaires/protéines cytosoliques/activateur (acide arachidonique). En contrôlant les conditions d'induction de la protéine et la lyse cellulaire, nous arrivons maintenant à obtenir des lots reproductibles de fractions membranaires totales en terme de quantité de Cytb₅₅₈ en moyenne de 5.7 nmol (0,5 mg) Cytb₅₅₈ / L de culture.

III. Solubilisation du Cytb₅₅₈ membranaire

1. Choix du détergent

Une étape critique de la purification d'une protéine membranaire est son extraction de la membrane par solubilisation en détergent. Les détergents miment les propriétés hydrophiles et hydrophobes des membranes et permettent ainsi de « solubiliser » les protéines membranaires afin de pouvoir les manipuler de manière similaire aux protéines solubles. Les régions hydrophobes des protéines normalement enfouies dans la bicouche lipidique sont, après solubilisation, entourées par les chaînes hydrophobes des détergents laissant les parties hydrophiles de ceux-ci exposées au solvant. Le choix du détergent est crucial pour réussir la solubilisation des protéines membranaires afin de conserver leur conformation et leur fonction. Le couple protéine membranaire/détergent qui ne dénature pas la protéine et lui conserve son

PURIFICATION DU Cyt_b558 RECOMBINANT

activité n'est pas connu d'avance. Chaque détergent est caractérisé par une concentration micellaire critique qui est sensible au pH, la force ionique et la température.

Pour solubiliser le Cyt_b558 des membranes totales de levures, différents détergents ont été testés, ils sont récapitulés dans le tableau ci-dessous (Tableau 6) :

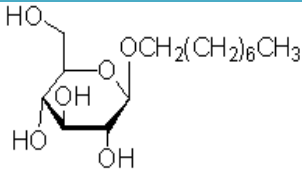
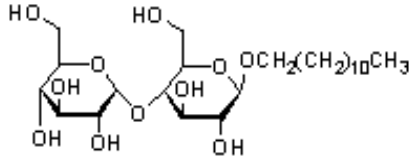
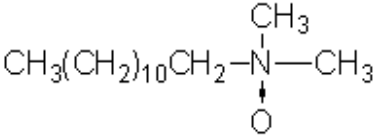
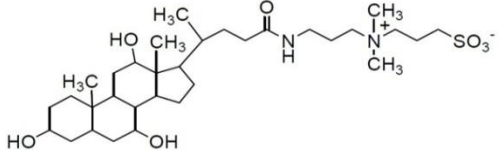
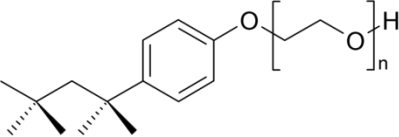
Détergent	Formule	Type	CMC
OG : Octyl β-D-glucopyranoside		Non ionique	20-25 mM (20-25°C)
DDM : n-Dodecyl β-D-maltoside		Non ionique	0,15 mM (20-25°C)
LDAO : Lauryldiméthylamine N-oxide		zwitterion	≈ 1 mM
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate		zwitterion	6-10 mM Ou 8mM
Triton X-100		Non ionique	0.23 mM

Tableau 6 : Liste des différents détergents utilisés pour la solubilisation du Cyt_b558 recombinant.

Nous avons comparé les spectres de différences d'absorption réduct-oxydé du Cytb₅₅₈ recombinant (Figure 40) pour évaluer l'effet de chaque détergent sur la fraction membranaire totale. Nous avons constaté que les effets sont différents selon le détergent utilisé.

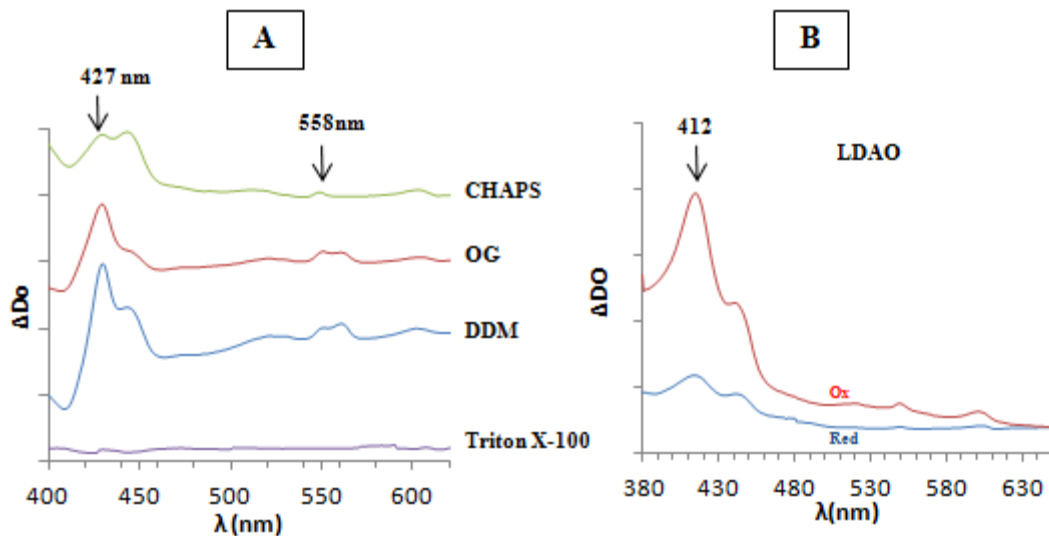


Figure 40 : Spectres d'absorption de la FM de *P. pastoris* solubilisée avec différents détergents

(A) spectres de différence d'absorption réduct (dithionite)- oxydé : 1.5 % OG (vert), avec 1,5 % DDM (bleu), avec 1.5 % CHAPS (rouge) et 1.5 % Triton X-100 (violet). (B) Spectre oxydé de la FM solubilisée avec 1.5 % LDAO (rouge) et spectre réduct par le dithionite de la FM solubilisée avec LDAO (bleu).

Pour pouvoir comparer l'efficacité des différents détergents, il a fallu calculer le rendement de solubilisation qui correspond au rapport de la quantité du Cytb₅₅₈ recombinant solubilisé par rapport à celle initialement présente dans la fraction membranaire totale, tous les deux étant estimées à partir du spectre de différence d'absorption.

A partir des spectres de FMt solubilisée, nous avons observé que la solubilisation des membranes avec 1,5 % OG (50 mM) (Figure 40; A spectre rouge) conduit à un spectre où les deux pics à 427 et 445 nm sont d'amplitudes similaires alors que les solubilisations avec 1,5 % CHAPS (24 mM) (Figure 40; A spectre vert) et 1,5 % DDM (30 mM) (Figure 40; A spectre bleu) conduisent à des spectres où les pics de différence caractéristique des Cytb (427 nm et 558 nm) sont majoritaires. L'utilisation de 1.5 % Triton X-100 (24 mM) (Figure 40; A spectre violet) a provoqué la perte du spectre d'absorption caractéristique ce qui indique probablement une dénaturation de la protéine. La solubilisation avec 1.5 % LDAO (24 mM) n'a pas pu être évaluée car le dithionite n'a pu efficacement réduire les protéines (Figure 40; B).

En comparaison avec de l'OG (15 %) et du CHAPS (45 %) le meilleur rendement de solubilisation est obtenu avec du DDM (80 %). Il avait déjà été montré que le DDM est un excellent détergent pour solubiliser le *Cytb*₅₅₈ des membranes de neutrophiles (d'origine bovine ou humaine) (196, 202, 280). Cela nous a confortés dans le choix du DDM pour la suite des expériences d'optimisation.

2. Optimisation de la concentration en DDM pour la solubilisation du *Cytb*₅₅₈

L'extraction d'une protéine membranaire de son environnement lipidique dépend à la fois de sa concentration dans la membrane, de la nature lipidique de celle-ci et de la nature chimique du détergent. Pour solubiliser efficacement les protéines membranaires, un excès de détergent est nécessaire. Cela permet ainsi une dissolution complète de la membrane et de pouvoir constituer un grand nombre de micelles afin d'obtenir une molécule de protéine par micelle.

Avant solubilisation, la concentration en *Cytb*₅₅₈ est estimée à partir du spectre de différence, comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes, à environ 0,5 μ M (soit 43 mg/L de *Cytb*₅₅₈). Pour optimiser la solubilisation du *Cytb*₅₅₈, nous avons fait varier la concentration de la fraction membranaire en solution et en DDM et nous avons suivi l'évolution du spectre de différence dans ces différentes conditions expérimentales.

La meilleure solubilisation de *Cytb*₅₅₈ qui a été estimée à partir du rapport entre le pic à 427 nm et 410 nm, a été obtenue avec un rapport détergent/protéine égale à 3 (w/w) et la fraction membranaire ayant été diluée de façon à ce que la concentration en protéine totale soit environ de 5 mg/mL. La solubilisation du *Cytb*₅₅₈ a donc été effectuée par ajout progressif de DDM jusqu'à une concentration finale de 1,5 %. La solubilisation du *Cytb*₅₅₈ avec ces conditions expérimentales a permis l'obtention d'un spectre de différence d'absorption présentant les pics caractéristiques à 427 nm et 558 nm (Figure 41).

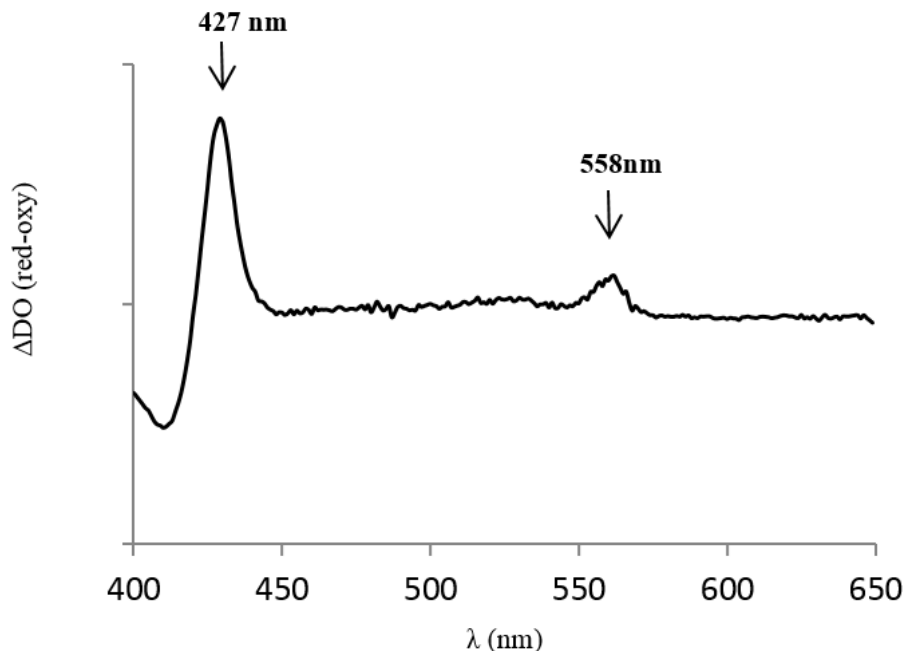


Figure 41: Spectre de différence d'absorption réduit-oxydé de la FM de levure solubilisée avec 1,5% DDM.

✓ **Deuxième problème : les différentes formes de p22^{phox} et gp91^{phox}**

Comme la solubilisation s'effectue à partir de la fraction membranaire totale de levure, différentes formes du Cyt_{b558} doivent être considérées potentiellement présentes dans les différentes membranes de la levure. Une étiquette Flag a été insérée en position N-terminale du gène codant pour gp91^{phox} (Figure 18) afin de pouvoir d'une part suivre par les techniques de Western Blot leurs niveaux d'expression mais surtout aussi pour faciliter à terme la purification du cytochrome *b558* recombinant. Cette étiquette est un petit peptide de 8 acides aminés (DYKDDDDK). En amont de chaque gène, une séquence signal d'adressage à la membrane plasmique (ou facteur α) a été insérée. En fin de séquence du facteur α , un site de clivage pour la protéase Kex2 est présent. La protéase Kex2 participe à la maturation des protéines membranaires lors de leur passage dans le Golgi. Bien que la souche de *P. pastoris* SMD1168 soit une souche déficiente en protéase, elle possède toujours le gène de la Kex2 assurant ainsi la maturation des protéines.

PURIFICATION DU Cytb₅₅₈ RECOMBINANT

Le tableau ci-dessous (Tableau 7) résume toutes les configurations des protéines potentiellement exprimées dans *P. pastoris* :

	Masse moléculaire (kDa)	Pi
p22^{phox}	20	9,48
α -p22 ^{phox}	29	5,99
Flag-gp91^{phox}	67	8,8
α -FLAG-gp91 ^{phox}	75	8,01
α -FLAG-gp91 ^{phox} / α -p22 ^{phox}	104	7,73
Flag-gp91^{phox}/p22^{phox}	86	8,92
Flag-gp91 ^{phox} / α - p22 ^{phox}	95	8,73
α - FLAG-gp91 ^{phox} /p22 ^{phox}	95	8,55

Tableau 7: Liste des différentes formes possibles du Cytb₅₅₈ recombinant exprimé dans *P. pastoris*.

Les masses moléculaires et les Pi ont été calculés à partir de leur séquence peptidique et à l'aide du serveur de calcul Expasy en ligne (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Selon la membrane considérée de la levure, le niveau de maturation atteint par le Cytb₅₅₈ et/ou la formation de l'hétérodimère, les sous unités gp91^{phox} et p22^{phox} peuvent être présentes sous différentes formes lors de l'expression des protéines. Ces différentes formes diffèrent par leurs tailles ou leurs points isoélectriques (Pi). Cela va ajouter un degré de complexité dans le suivi des étapes de purification. Néanmoins nous considérons généralement que la protéine qui atteint la membrane plasmique aura subi les étapes de maturation nécessaires et sera par conséquent clivée du facteur α . D'autre part, les protéines membranaires seront majoritairement issues de la membrane plasmique (40 % de la totalité des protéines membranaires d'après Kumar et al (281)).

Enfin, les masses moléculaires indiquées issues d'un calcul additif simple sur le serveur d'Expasy (ProtParam) ne tiennent absolument pas compte de la masse ajoutée par le phénomène de glycosylation. Le Cytb₅₅₈ possède sur les boucles extracellulaires du domaine membranaire 5 sites potentiels de N-glycosylation. Dans les neutrophiles, trois sites ont été identifiés comme site de glycosylation (Asn131, Asn148 et Asn239)(77). Les levures sont également capables d'effectuer ces modifications post-traductionnelles. Dans la souche *P. pastoris*, contrairement à *S. cerevisiae*, cela se fait sans entraîner des phénomènes d'hyperglycosylation. La forme mature de

l'hétérodimère Cytb₅₅₈ est donc attendue à la membrane plasmique sous une forme glycosylée puisqu'il est connu que la N-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique et se fait sur des protéines destinées à être sécrétées ou intégrées à la membrane plasmique.

IV. Les différentes étapes de chromatographie

Après solubilisation du Cytb₅₅₈, différentes techniques de chromatographie ont été testées en tenant compte des différentes propriétés physico-chimiques de la protéine telles que le point isoélectrique, la glycosylation, les tailles et l'étiquette introduite auparavant par manipulation génétique. Nous nous sommes attachés autant que possible à suivre les différentes étapes de purification d'une part par une analyse spectrophotométrique des échantillons pour identifier les fractions contenant des protéines (280 nm) et un spectre de différence caractéristique des cytochromes de type *b* ($\Delta DO_{411-427\text{nm}}$ et 558 nm), et d'autre part, par immunoblot pour identifier la protéine d'intérêt à l'aide d'anticorps spécifiques.

1. Critère de l'étiquette Flag : chromatographie d'affinité

Nous avons pensé évidemment d'abord prendre avantage de la présence de l'étiquette Flag présente en N-terminal de la sous-unité gp91^{phox} pour purifier le Cytb₅₅₈ par chromatographie d'affinité anti-Flag (ANTI-FLAG M2 Affinity Gel *Sigma Aldrich*). Cette technique avait préalablement assez bien fonctionné pour une purification à petite échelle (206).

Afin d'éviter toute déstabilisation éventuelle de l'interaction entre l'étiquette et la résine (ANTI-FLAG M2 Affinity Gel) due à la forte concentration en détergent nous avons tenté de réduire la concentration en détergent alternativement par dilution jusqu'à environ 0,7 % DDM). Cette solution protéique a été ensuite incubée avec la résine portant l'anticorps anti-Flag durant la nuit à 4°C. Deux lavages successifs ont été effectués avant d'éluer les protéines ayant été fixées à l'aide du peptide Flag. Chaque fraction des différentes étapes a été ensuite analysée sur gel SDS et par western-blot (Figure 42).

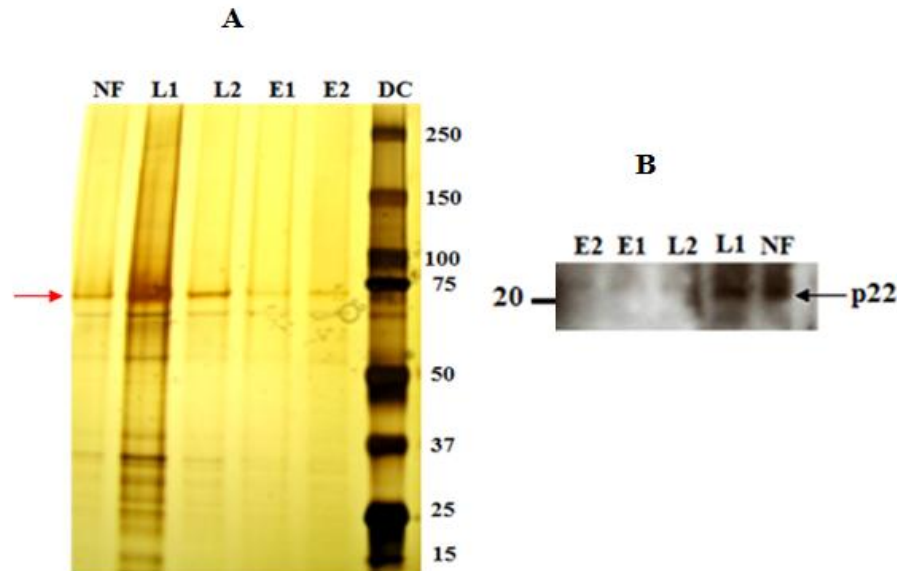


Figure 42 : Analyse qualitative des fractions de purification sur colonne anti-Flag.

(A) Gel SDS-PAGE coloré au Nitrate d'Argent (15 µg/puits); (B) Western Blot, détection avec l'anticorps polyclonal α -p22^{phox} (1/1000). M et DC : Marqueurs du poids moléculaire; NF : fraction non fixée (15µg/puits) ; L1: premier lavage (15µg/puits); L2 : deuxième lavage (4µg/puits) ; E1 et E2 : première et deuxième élution par le peptide Flag (4µg/ puits et 7µg/puits respectivement).

Sur le gel SDS-PAGE coloré au Nitrate d'Argent (Figure 42; A), plusieurs bandes sont visibles correspondant probablement à la sous unité gp91^{phox} qui a migré différemment selon son degré de glycosylation (de 55 à 70 kDa). Dans la ligne de migration de la fraction non fixée et du premier lavage, une trainée de taille supérieure à 75 kDa indique la forte glycosylation de la protéine. Nous constatons qu'une grande partie de la protéine ne s'accroche pas sur la résine. Nous avons vérifié la présence de la sous unité p22^{phox} dans ces fractions par la technique du Western-blot. La révélation sur Western Blot avec l'anticorps polyclonal anti-p22^{phox} (Figure 42; B) a donné une bande à la taille attendue (20 kDa) indiquant que p22^{phox} est présent en très forte quantité dans la fraction non fixée et le premier lavage puis très peu dans l'élution. Sa présence suit celle de gp91^{phox}.

Ces résultats montrent que la purification sur colonne d'affinité Flag n'est pas efficace puisque la quantité du Cytb₅₅₈ dans la fraction éluee est très faible par rapport à celle non fixée et celle du lavage. Plusieurs raisons peuvent être proposées pour expliquer la faible affinité de la protéine recombinante pour la résine anti-Flag. D'une part, il est possible que la glycosylation crée un encombrement et empêche la fixation sur la résine. D'autre part, il est aussi possible que

PURIFICATION DU Cytb₅₅₈ RECOMBINANT

l'étiquette Flag portée par la protéine solubilisée soit peu accessible à l'anticorps de par l'environnement protéique (étiquette cachée) ou la présence du détergent dans l'échantillon.

Pour comparaison, nous avons également voulu testé une résine anti-Flag préparée au laboratoire (voir le protocole dans la section Matériels et Méthodes) et effectué des analyses similaires. L'analyse qualitative de cette chromatographie « maison » est indiquée dans la Figure43:

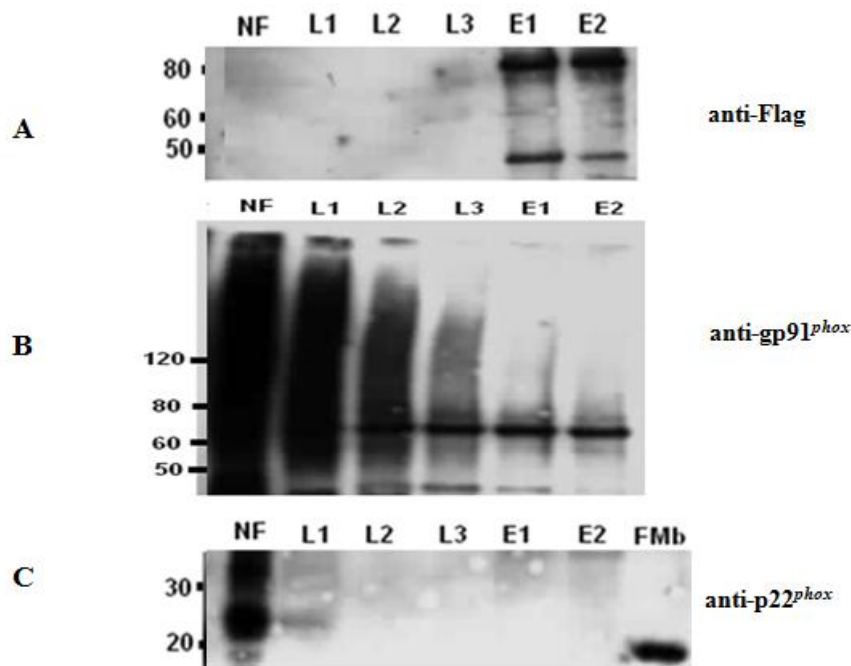


Figure 43 : Analyse qualitative des différentes étapes de purification sur colonne anti-Flag « maison ».

(A) Western Blot, détection avec l'anticorps monoclonal α -Flag (1/666) (B) Western Blot, détection avec l'anticorps polyclonal α -gp91^{phox} (1/1000) (20 μ L/puits); (2 μ l de NF, L1, L2, L3; 20 μ l de E1 et E2); (C) Western Blot, détection avec l'anticorps polyclonal α -p22^{phox} (1/1000) (2 μ l de NF, L1, L2, L3 et 20 μ l d'E1 et E2); M : Marqueurs du poids moléculaire; NF : fraction non fixée ; L1 : premier lavage; L2 : deuxième lavage; E1 et E2 : première et deuxième élution par le peptide Flag.

Il est intéressant de constater que par Western blot, il apparait clairement que dans les fractions éluées deux bandes protéiques sont visibles d'environ 80 et 50 kDa révélées par l'anticorps anti-Flag (Figure 43; A). Ces bandes sont associées à un signal plus important également dans les fractions éluées par révélation par l'anticorps polyclonal anti-gp91^{phox} (Figure 43; B). Cependant, l'anticorps anti-p22^{phox} (Figure 43; C) ne révèle aucun signal dans E1 et E2 suggérant que p22^{phox} n'est pas présent dans ces fractions où gp91^{phox} a été détecté.

PURIFICATION DU Cytb₅₅₈RECOMBINANT

D'après l'analyse avec différents anticorps, il apparaît que gp91^{phox} s'est fixé à la résine mais indépendamment de p22^{phox} présent dans la fraction non fixée. Il est alors intéressant de constater que les fractions E1 et E2 n'exhibent aucun spectre de différence caractéristique de type Cytb est présent contrairement aux fractions NF et de lavages.

En corrélant les données analytiques et spectroscopiques, nous pouvons conclure que dans les fractions éluées, gp91^{phox} ne fixe plus les cofacteurs redox à l'origine des spectres d'absorption et n'est pas associé à son partenaire membranaire p22^{phox}. Sous cette forme « dénaturée », gp91^{phox} semble donc se fixer facilement à la résine Flag. Cela nous conduit à penser également que sous sa forme dimérique, gp91^{phox} associé à p22^{phox} possède une conformation dans laquelle l'étiquette Flag situé en N-terminal de gp91^{phox} est inaccessible n'autorisant pas la fixation du Cytb₅₅₈ sur la résine. La chromatographie par affinité de l'étiquette Flag ne constitue donc pas une méthode de choix pour purifier le Cytb₅₅₈ sous une forme hétérodimérique et non dénaturée.

2. Critère du potentiel isoélectrique (Pi)

Les différentes formes du dimère Cytb ou monomère gp91^{phox} ou p22^{phox} recombinant se différencient aussi sur la base de leur Pi (Tableau 7). Le Pi du Cytb₅₅₈ (gp91^{phox}-p22^{phox}) mature est estimé autour de 8,8. Par conséquent au pH expérimental (pH 8), il devrait être chargé positivement. Cependant gp91^{phox} est une protéine glycosylée. Ce phénomène de glycosylation peut modifier le Pi de la protéine et conduire à un profil de multiples protéines avec des Pi différents alors qu'il s'agit d'une seule protéine ayant des niveaux de glycosylation différents. Nous avons choisi de tenter une purification de Cytb₅₅₈ sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anion DEAE Sepharose (DEAE-Sepharose® CL-6B) sur ses critères d'exclusion des protéines chargées positivement.

La solution protéique solubilisée en détergent est déposée sur DEAE préalablement équilibrée avec du tampon 20 mM Tris-HCl pH8, 0.025 % DDM et 1 mM PMSF. De manière inattendue, une grande partie des protéines s'est fixée sur la colonne de DEAE Sepharose. Chaque fraction est suivie par spectrophotométrie à 280 nm, 558 nm et la $\Delta DO_{411nm-427nm}$ (Figure 44).

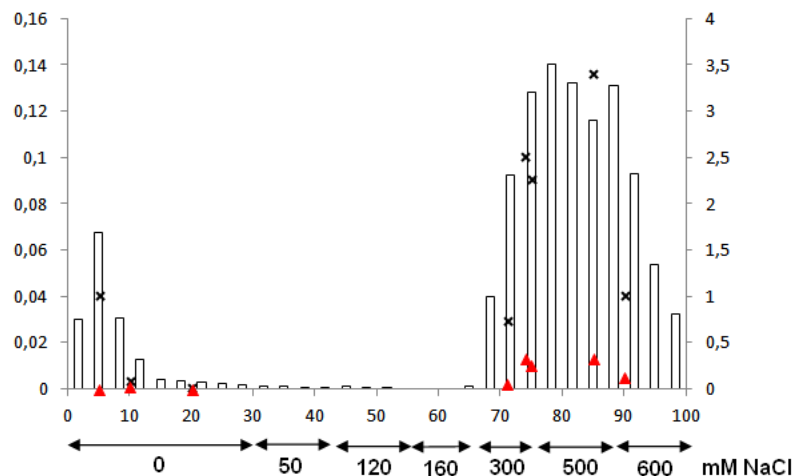


Figure 44 : Profil d'élution du *Cytb*₅₅₈ sur DEAE Sepharose.

DO à 280 nm (barre); ΔDO (411-427) (croix noires) et DO à 558 nm déterminées à partir du spectre de différence d'absorption (triangles rouges). L'élution de la protéine a été faite avec un gradient discontinu de NaCl.

Le profil d'élution montre qu'une quantité négligeable de protéines de type *Cytb* se trouve dans la fraction non fixée et que la majeure partie des protéines commence à être éluée de la résine à des concentrations en NaCl supérieure à 300 mM. En analysant les spectres de différence réduit-oxydé (Figure 45), nous constatons que les fractions éluées à 300 et 500 mM donnent des spectres caractéristiques du *Cytb* et que les fractions éluées à 600 mM présentent en plus un pic additionnel à 445 nm (caractéristique du *Cyt a*).

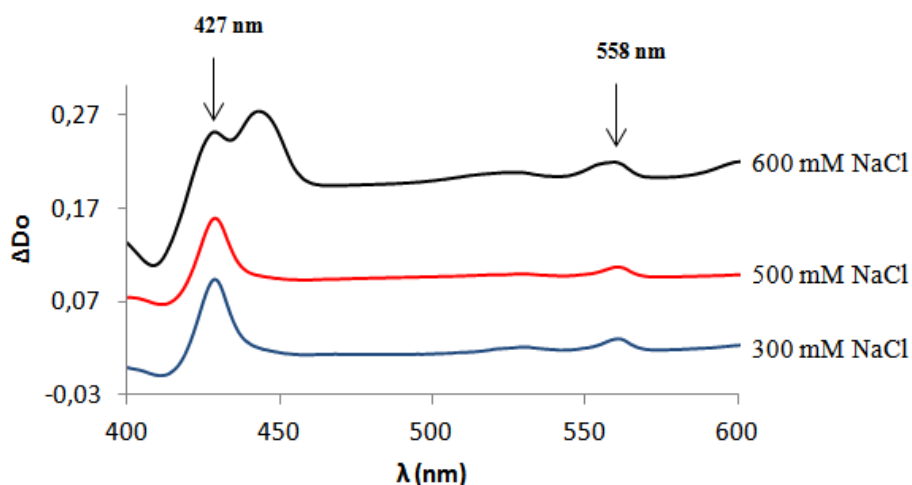


Figure 45 : Spectres de différence d'absorption (réduit-oxydé) des fractions purifiées sur DEAE Sepharose.

Fraction éluee à 300 mM NaCl (trait bleu) ; Fraction éluee à 500 mM NaCl (spectre rouge) ; Fraction éluee à 600 mM NaCl (spectre noir).

Ces résultats suggèrent que les protéines de type cytochrome *b* se fixe à la résine échangeuse d'anions suggérant que, si il s'agit du Cytb₅₅₈, la glycosylation a modifié significativement le Pi de la protéine. Pour des concentrations de NaCl entre 300-500 mM, le spectre de différence montre un spectre propre de type Cytb sans autres cytochromes contaminants.

i. Analyse par western blot des profils d'éluion de la chromatographie DEAE

Afin d'identifier dans quelle fraction le Cytb₅₅₈ est present, des immunoblots ont été effectués avec les fraction éluées. Dans la fraction membranaire solubilisé en détergent (FMs), la détection par l'anticorps anti-Flag révèle un signal à environ 75 kDa et un autre à 50 kDa (Figure 46; I). Le signal à environ 75 kDa est également révélé avec l'anti-gp91^{phox} suggérant que cette bande correspond à la protéine mature gp91^{phox} (Figure 46;I). Nous retrouvons cette bande dans l'éluion à 300 et 500 mM NaCl associé à des bandes de plus haut poids moléculaires (glycosylation) en cohérence avec l'existence d'un spectre de Cytb (Figure 46; II).Conjointement dans ces fractions, l'anti-p22^{phox} révèle aussi la présence de la protéine p22^{phox} (Figure 46; I).En revanche, la forme de gp91^{phox} (75 kDa) est absente dans le lavage bien que l'anti-gp91^{phox} semble reconnaître un épitope dans cette fraction. La fraction éluée à 600 mM NaCl a un profil de détection différent et ne présente pas la bande de 75 kDa mais une trainée de plus haut poids moléculaire (Figure 46; I).

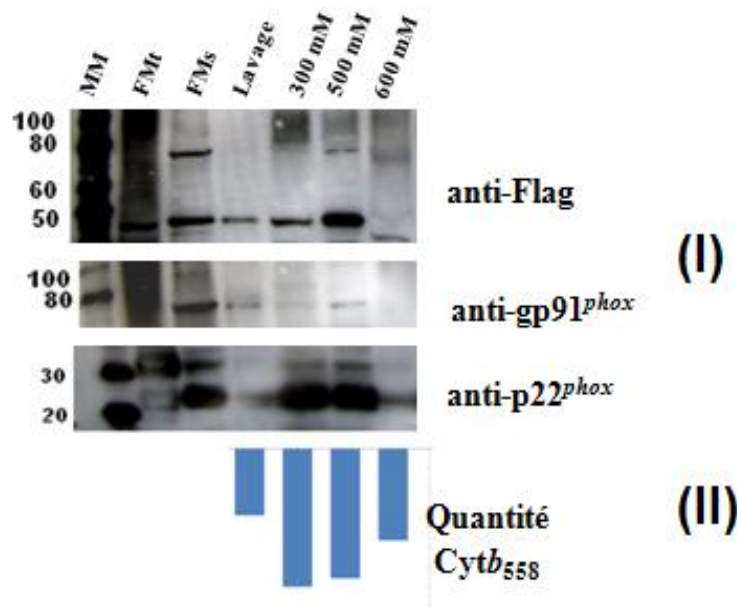


Figure 46 : Analyse des fractions de purification sur DEAE Sepharose

(I) Analyse qualitative par Western Blot avec l'anticorps monoclonal α -Flag (1/666), l'anticorps polyclonal anti-gp91^{phox} (1/2000) et l'anticorps polyclonal α -p22^{phox} (1/1000) (10 μ L/puits); (II) diagramme présentant la quantité du *Cytb*₅₅₈ estimée à partir du spectre de différence d'absorption; MM: Marqueurs du poids moléculaire (Magic marker); FMT : Fraction membranaire totale ; FMs : fraction membranaire solubilisée.

En résumé, les fractions d'élution de 300 et 500mM NaCl de la chromatographie DEAE donnent un profil assez proche par Western-blot, en cohérence avec les spectres, ces fractions contenant les deux protéines gp91^{phox} et p22^{phox}. La fraction protéique éluee à 600 mM NaCl est différente dans la mesure où l'immunodétection révèle un smear >100 KDa pouvant correspondre à la protéine gp91^{phox} fortement glycosylée mais au vu des spectres cette fraction est largement contaminée par des cytochromes de type *a*.

La purification s'est poursuivie en déposant les fractions éluées à 300-500 mM NaCl sur une colonne d'Héparine Sepharose (après dilution). Nous avons constaté que la majorité de l'échantillon contenant les propriétés spectrales de type *Cytb* ne se fixe pas sur l'héparine Sepharose (Figure 47). Contrairement à ce qui été attendu si le *Cytb*₅₅₈ est glycosylé. Très peu de protéines se sont fixées et ont été éluée à 200 et 500 mM de NaCl.

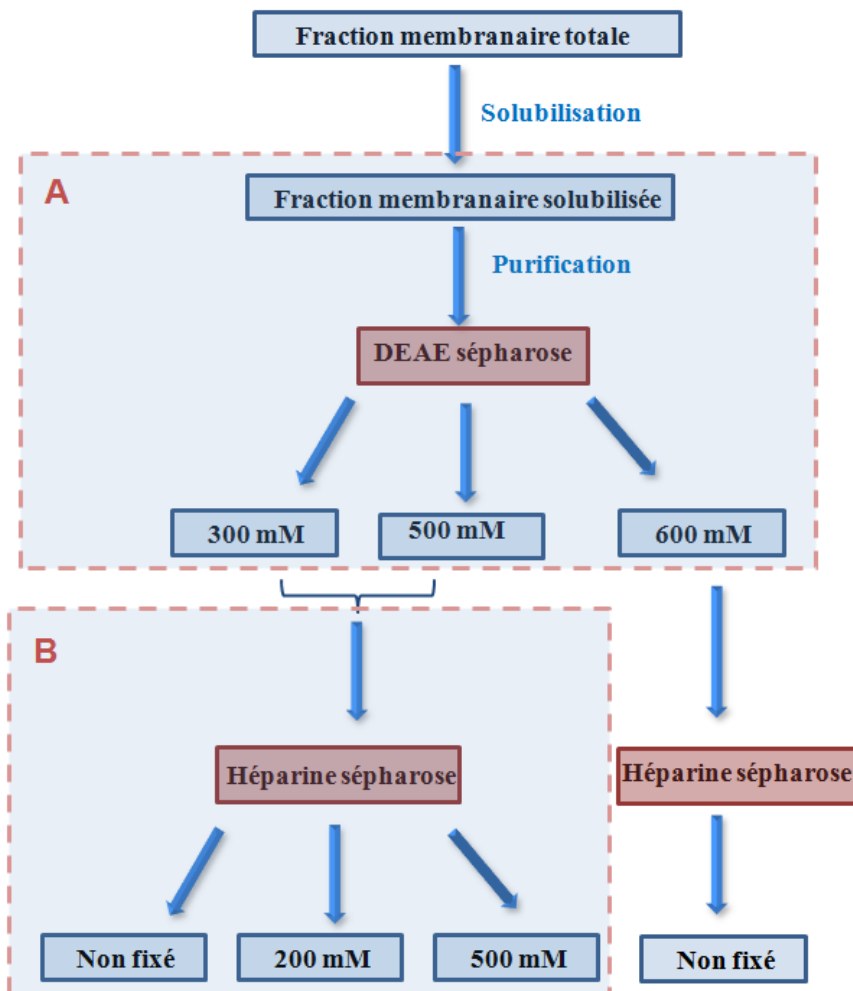


Figure 47 : Les différentes étapes de purification du Cytb₅₅₈.

ii. Analyse par western blot des profils d'éluion de la chromatographie Héparine Sepharose

L'analyse par immunodétection des fractions 300-500 mM NaCl réunies puis déposées sur héparine Sepharose (Figure48) montre que cette étape a séparé le « smear » (fraction non fixée (NF)) du signal important révélé par l'anti-Flag (75 kDa) dans l'éluion à 200 mM. Seule la fraction éluée à 200 mM de NaCl de l'héparine Sepharose, présente une bande reconnue à la fois par l'anti-Flag et l'anti-gp91^{phox} suggérant la présence de gp91^{phox} mais également celle de p22^{phox} révélée par l'anticorps anti-p22^{phox}. Ce résultat est cohérent avec l'existence d'un spectre de différence de Cytb dans cette fraction, cependant, il est regrettable de constater que par cette méthode le rendement n'est pas satisfaisant.

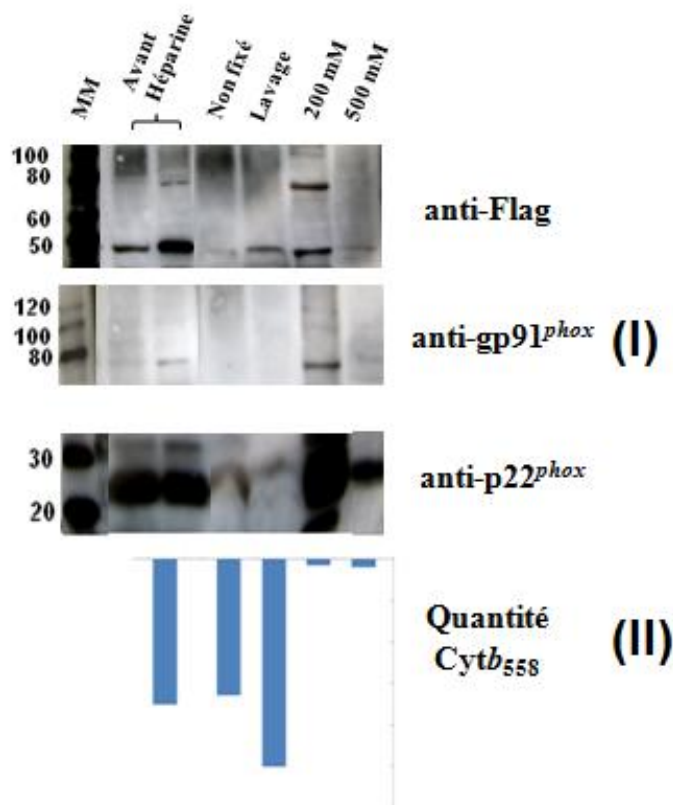


Figure 48 : Analyse des fractions de purification de l'héparine Sepharose des fractions 300 et 500 mM NaCl
(I) Analyse qualitative par Western Blot : détection avec l'anticorps monoclonal α -Flag (1/666), l'anticorps polyclonal anti-gp91phox (1/2000) et l'anticorps polyclonal α -p22phox (1/1000) (10 μ L/puits); (II) diagramme présentant la quantité du *Cytb*₅₅₈ estimée à partir du spectre de différence d'absorption ; MM: Marqueurs du poids moléculaire (Magic marker); FMt : Fraction membranaire totale ; FMs : fraction membranaire solubilisée.

Il existe une multiplicité de forme du *Cytb*₅₅₈ avec des P_i différents qui au final se traduit par une perte progressive de la protéine d'intérêt à chaque étape de chromatographie. Cette approche ne semble donc pas adéquate.

3. Critère de glycosylation

Puisque le *Cytb*₅₅₈ est une protéine glycosylée, nous avons décidé de tester comme 1^{ère} étape de séparation la chromatographie d'affinité héparine Sepharose, d'autant plus que cette technique avait été employée avec succès pour la purification du *Cytb*₅₅₈ des membranes de neutrophiles.

L'héparine immobilisée sur la résine de Sepharose fixe sélectivement les protéines glycosylées. L'élution se fait en cassant cette interaction en augmentant la force ionique. L'extrait

PURIFICATION DU Cytb₅₅₈ RECOMBINANT

protéique solubilisé en détergent est donc déposé sur une colonne d'Héparine Sepharose préalablement équilibrée avec le tampon (50 mM Tris HCl pH8, 1 mM EDTA, 0,025% DDM). L'éluion est faite à l'aide d'un gradient discontinu de concentration croissante de NaCl. Les fractions de différentes étapes sont conservées et analysées à 280 nm pour évaluer la présence en protéines totales (Figure 49, A, courbe bleu). Le spectre d'absorption différentiel est réalisé entre 400 et 650 nm pour certaines fractions choisies pour identifier la présence éventuelle de cytochrome (Figure 49, B).

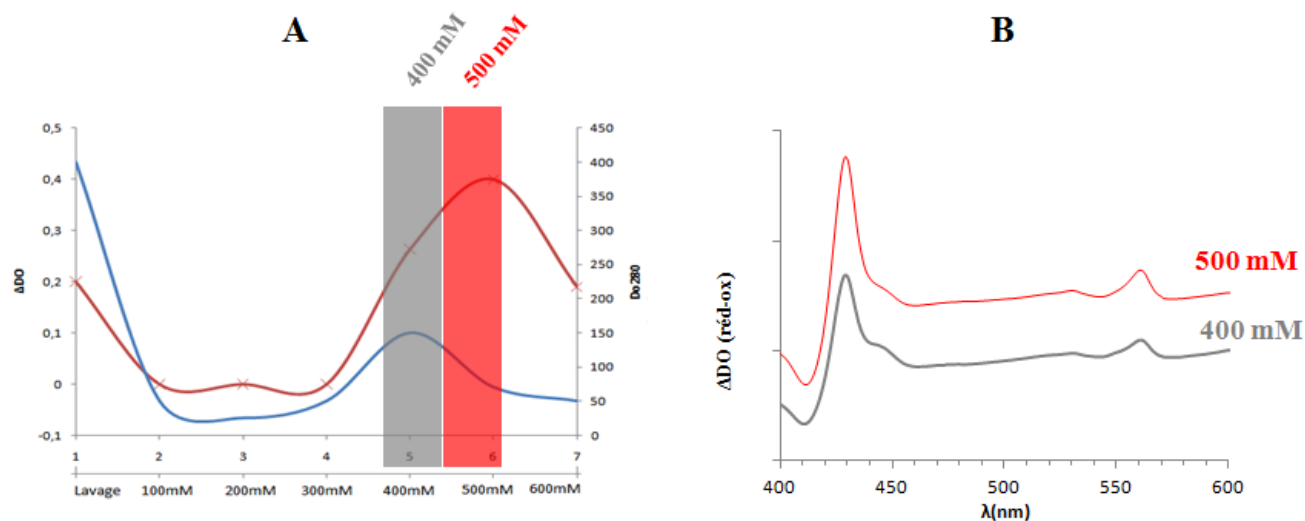


Figure 49 : Profil d'éluion à travers la colonne héparine Sepharose

A. Profil d'éluion : Absorbance à 280 nm (courbe bleu) ; différence d'absorption 411-427 nm (courbe rouge). B. Spectres de différence d'absorption (réduit-oxydé). Fraction éluée à 400 mM NaCl (spectre gris) ; fraction éluée à 500 mM NaCl (spectre rouge).

La comparaison de l'analyse spectrophotométrique à 280 nm (Figure 49; A) et des spectres de différence des différentes fractions de la chromatographie nous permet d'identifier un spectre de type cytochrome *b* dans les éluats de 400 mM de NaCl (Figure 49; B ; spectre rouge) avec un pic additionnel à 445 nm qui devient minoritaire pour les éluats de 500 et 600 mM.

L'analyse par l'anticorps anti-Flag de l'éluat de 400 mM présente une légère trainée entre 80 et 100 kDa puis un smear de forte intensité et est supérieur à 100 kDa (Figure 50; A). La détection avec l'anticorps anti-p22^{phox} (Figure 50; B) révèle une bande correspondant à la taille de la protéine p22^{phox}. Donc dans l'éluat à 400 mM de NaCl, les protéines gp91^{phox} et p22^{phox} sont présentes, gp91^{phox} étant fortement glycosylé. Cette fraction contient 284 µg de Cytb (Volume = 2.5 mL).

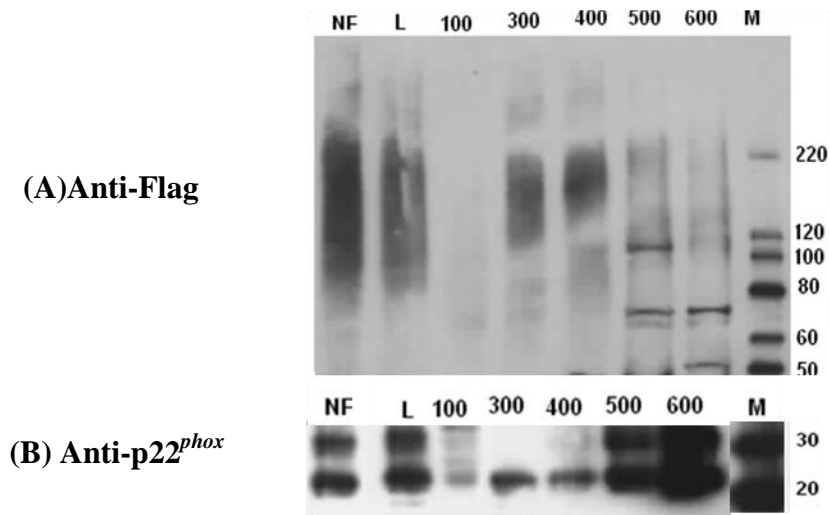


Figure 50 : Analyse qualitative des étapes de purification sur colonne Héparine Sepharose par Western Blot.
A. Détection avec l'anticorps monoclonal anti-Flag (1/666) (10 μ L/puits). (B) Détection avec l'anticorps polyclonal anti-p22^{phox} (1/1000); M: Marqueurs du poids moléculaire; NF : fraction non fixée ; L: fraction de lavage; 100 à 600 : les fractions éluées à différentes concentration de NaCl.

L'analyse de la fraction éluée à 500 mM de NaCl par immunoblot montre la révélation de deux bandes à environ 75 kDa et entre 100 et 120 kDa par l'anticorps anti-Flag (Figure 50; A). En outre, la présence de la protéine p22^{phox} a été également révélée par l'anticorps spécifique dans ces mêmes fractions (Figure 50; B). Cette fraction contient 258 μ g de *Cytb* (Volume = 1.5 mL).

L'analyse de l'éluat à 600 mM de NaCl par immunoblot donne un profil assez similaire à celui de l'éluat à 500 mM de NaCl avec les deux anticorps spécifiques mais la bande à 100 kDa révélée avec l'anticorps anti-Flag est absente au niveau de cette fraction.

Beaucoup de bandes protéiques sont encore présentes à l'issue de la chromatographie sur héparine Sepharose, la spécificité de cette étape étant assez relative. Il est indispensable d'associer à cette chromatographie une seconde étape de purification.

❖ Deuxième étape de purification :

Nous avons tenté d'utiliser la chromatographie d'affinité Flag afin de purifier « spécifiquement » le *Cytb*₅₅₈ recombinant. Cependant, à nouveau très peu de protéines ne sont accrochées à la résine Flag.

Dans la mesure où la séparation en fonction du Pi semble peu satisfaisante, nous avons alors préféré adopter pour cette deuxième étape de chromatographie une colonne d'exclusion sur gel. Cela nous a conduit à un résultat jugé satisfaisant et que nous considérons pour l'instant le protocole optimal de la purification du *Cytb*₅₅₈ dont les différentes étapes seront décrites dans la section suivante.

4. En conclusion : protocole de purification du *Cytb*₅₅₈

Après différentes combinaisons de chromatographies, l'association d'une chromatographie d'affinité (héparine Sepharose) à une chromatographie d'exclusion semble la plus appropriée pour obtenir un *Cytb*₅₅₈ recombinant suffisamment pur et en quantité suffisante pour les expériences de biophysique envisagées.

Les protéines solubilisées en détergent sont déposées sur une colonne de chromatographie d'héparine Sepharose (Heparin Sepharose 6 Fast Flow). Le profil d'élution suivi à 280 nm (Figure 51) conduit à un grand pic individualisé (300 mM de NaCl) et un petit (500 mM de NaCl).

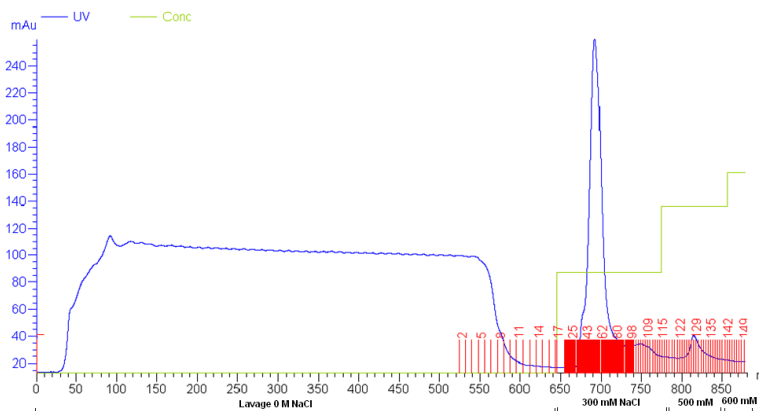


Figure 51 : Profil d'élution de la chromatographie d'affinité suivi à 280 nm.

Seule la fraction élue à 300 mM NaCl présente un spectre de différence d'absorption réduit-oxydé significativement important et présentant les pics caractéristiques de *Cytb* (pics de changement d'absorption à 427 nm et 558 ; Figure 52, spectre rouge). Cependant, cette fraction présente également des pics supplémentaires indiquant la présence d'autres cytochromes (probablement de type *a* avec un pic caractéristique à 440 nm).

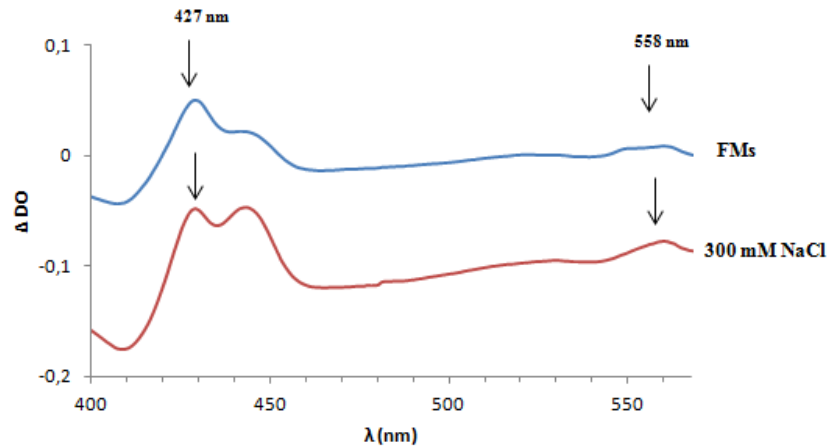


Figure 52 : Spectres de différence d'absorption (réduit-oxydé) de FM5 et de F300.

FM5: fraction membranaire solubilisée à 1.5% (spectre bleu) ; F300 : fraction éluée à 300 mM NaCl (spectre rouge).

L'analyse sur gel SDS des différentes fractions de la purification sur héparine Sepharose montre une bande à environ 75 kDa dans la fraction éluée à 300 mM NaCl correspondant à la sous unité gp91^{phox} car elle est également détectée par l'anticorps anti-gp91^{phox}. Le gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'Argent montre en plus une distribution de tailles différentes des protéines encore présentes dans l'éluat de 300 mM de NaCl (Figure53).

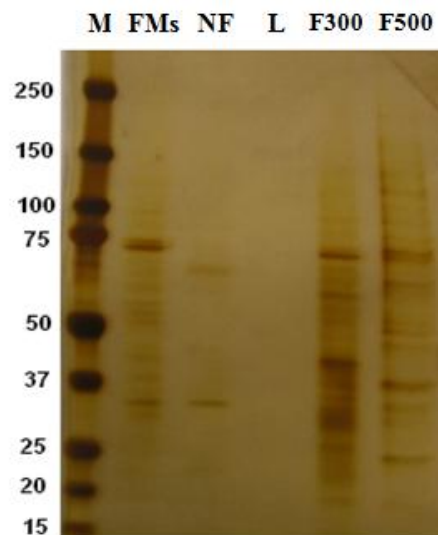


Figure 53 : Analyse qualitative des fractions purifiées sur héparine Sepharose sur gel SDS.

Le gel SDS a été coloré par le Nitrate d'Argent. M: Marqueur du poids moléculaire ;FM5: fraction membranaire solubilisée ; NF: fraction non fixée ; L: fraction de lavage ; E300: éluée à 300 mM NaCl ; E500: éluée à 500 mM NaCl. 5 µg de protéines membranaires totale ont été déposés par puits.

Une séparation en fonction de la taille est ensuite effectuée sur une chromatographie d'exclusion (Sephadex 200). Les fractions éluées à 300 mM de NaCl sont rassemblées, concentrées 10 fois dans des concentrateurs VIVASPIN 20 (10000 MWCO) puis déposées sur la colonne de gel filtration. Le débit de la colonne est ajusté à 0.5 mL/min. Le profil d'élution (Figure 54; A) présente plusieurs pics qui ont été analysés par spectrophotométrie.

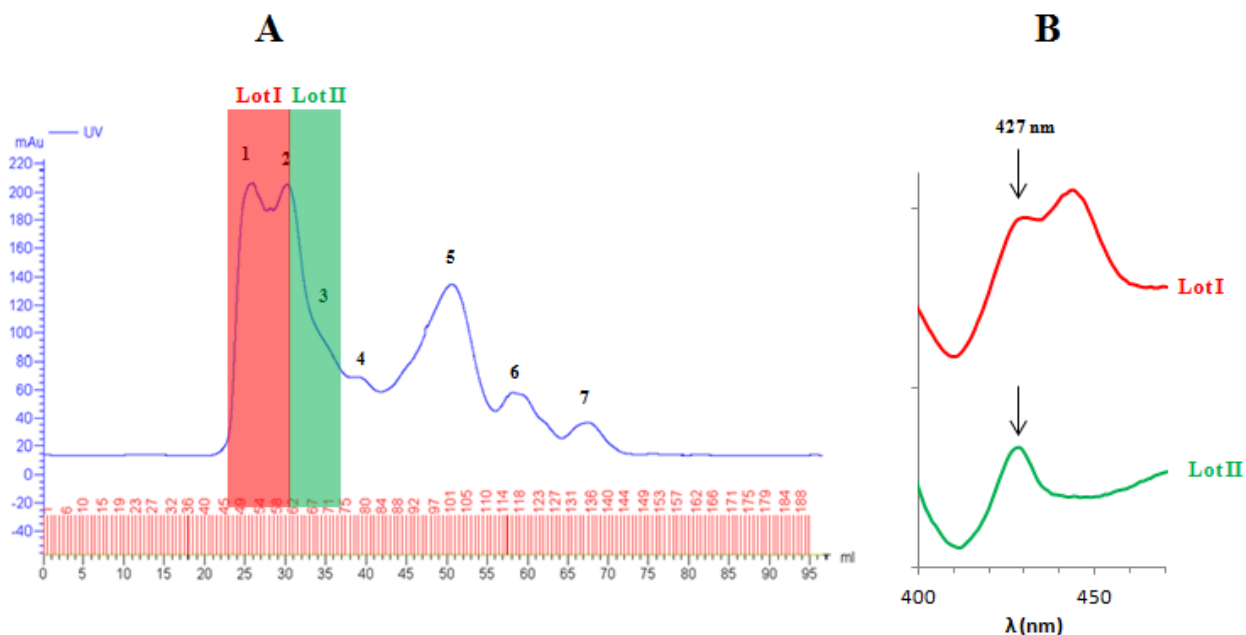


Figure 54 : Profil d'élution de la chromatographie d'exclusion.

(A) Profil d'élution: Absorbance à 280 nm (trait bleu); (B) Spectres de différence d'absorption (réduit-oxydé). Lot I (trait rouge); lot II (trait vert).

Seuls les trois premiers pics présentent les spectres de différence de type *Cytb* (pic de changement d'absorption à 427 nm et 558 nm) bien que dans la fraction correspondant au premier pic, les spectres indiquent également la présence d'autres cytochromes (Figure 54; B). Nous avons ainsi constitué deux lots : lot I (pic 1, spectre vert) et lot II (pic 2, spectre vert) en se basant sur leur profil de spectre de différence afin de les étudier ultérieurement.

L'analyse des deux lots purifiés sur gel d'exclusion sur gel SDS-Page coloré au bleu de Coomassie (Figure 55; A) montre la présence majoritairement d'une bande à environ 75 kDa qui correspond à la taille de la protéine de gp91^{phox}. La détection de la sous-unité p22^{phox} est difficile sur gel SDS.

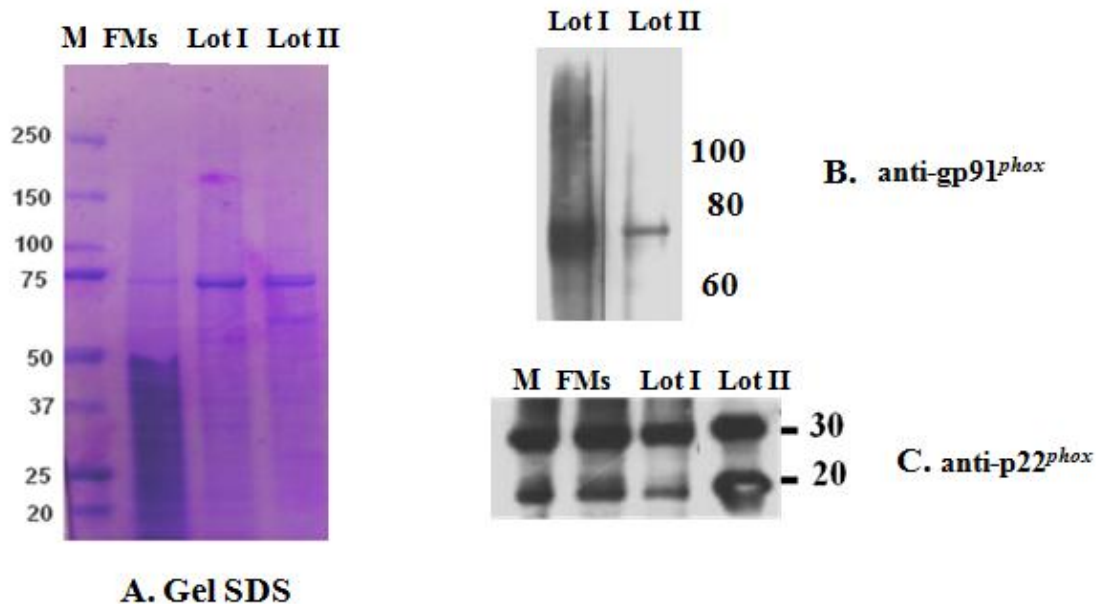


Figure 55 : Analyse qualitative des fractions purifiées sur gel filtration.

(A) Gel SDS coloré avec bleu de Coomassie; (B) : Western Blot avec l'anticorps monoclonal α -gp91 (1/1000) ; (C) Western Blot avec l'anticorps polyclonal anti-p22phox (1/2000). FMs : fraction membranaire solubilisée , Lot I : lot I gel filtration ; Lot II : lot II gel filtration (5 μ g protéines totales/puits) ; (B) : Western Blot avec l'anticorps polyclonal anti-p22phox (1/2000) ; (C) Immunoblot du lot II (5 μ g protéines totales/puits) avec l'anticorps monoclonal α -gp91 (1/1000). (5 μ g protéines totales/puits).

Pour identifier spécifiquement les protéines, nous avons analysé le lot I et II par immunoblots. Dans le lot I, l'anticorps anti-gp91^{phox} monoclonal (SC-130543; Figure 55; B) et qui reconnaît la partie C-terminale de gp91^{phox}, révèle une trainée de très forte intensité indiquant la présence de cette protéine avec un taux de glycosylation important et une bande à environ 75 kDa. Dans le lot II, cet anticorps révèle une bande intense à environ 75 kDa correspondant au gp91^{phox} similaire à celle observée sur le gel SDS mais pas de trainée de glycosylation.

L'utilisation de l'anticorps anti-p22^{phox} (Figure 55; C) montre la présence de deux bandes, la première à 30 kDa correspondant probablement à la protéine p22^{phox} dont le facteur α n'a pas été clivé et la deuxième bande est à environ 20 kDa qui correspond à la taille de la protéine p22^{phox} mature.

V. Conclusions

Ce dernier protocole nous a permis d'obtenir deux lots de degrés de pureté différent : lot I 4.8 nmol (0,4 mg) de *Cytb*₅₅₈ mais co-purifié avec un autre cytochrome de type *a* et le lot II contenant 1.62 nmol (0,14 mg) de *Cytb*₅₅₈ ayant un spectre ne présentant que les pics caractéristiques de l'hème du type *b*. Ces quantités de *Cytb*₅₅₈ ont été obtenues à partir de 1,5 Litre de culture (30 g de cellule). Bien que nous ayons enrichi les éluât en *Cytb*₅₅₈, la pureté et la quantité ne sont pas encore compatibles avec des expériences de biologie structurale mais sont suffisantes pour des approches biophysiques (voir Tableau 8)

Fraction	Volume (ml)	[protéines membranaires totales] (mg/ml)	[<i>Cytb</i> ₅₅₈] (nmol/ml)	Activité spécifique nmol <i>Cytb</i> ₅₅₈ /mg	Rendement %	Degré de purification
FM totale	90	5	0.25	0.05	---	---
FM solubilisée	96	3	0.17	0.033	72	0.66
Elution de l'Héparine à 300 mM NaCl	35	3.2	0.19	0.059	40	1.78
Lot I gel filtration	6	2.56	0.8	0.31	72	5.25
Lot II gel filtration	3	1.4	0.54	0.26	24.5	4.4

Tableau 8: Tableau récapitulatif du bilan de la purification

La concentration en *Cytb*₅₅₈ est déterminée à partir du spectre de différence d'absorption et en tenant compte de la surestimation de la quantité du *Cytb*₅₅₈ précédemment décrite. L'activité spécifique est égale au rapport de la quantité du *Cytb*₅₅₈ par la quantité des protéines membranaires totale. Le rendement est calculé en divisant la quantité du *Cytb*₅₅₈ contenu dans une fraction d'une étape de purification par la quantité estimée dans l'étape qui précède. Le degré de purification est égal au rapport de l'activité spécifique d'une étape sur celle de l'étape qui précède.

Dans la littérature, la purification du *Cytb*₅₅₈ à partir de membranes de neutrophiles est très difficile et se traduit par une perte énorme au cours de la purification (12 % d'après Batot et coll. (282)). Nous avons constaté que la purification du *Cytb*₅₅₈ recombinant à partir des membranes de levure est également difficile. Le rendement de ce dernier protocole de purification est nettement amélioré par rapport à ceux précédemment décrits mais il reste à

PURIFICATION DU Cytb₅₅₈RECOMBINANT

optimiser encore plusieurs aspects. Bien que la dernière étape de séparation en fonction de la taille a permis d'isoler un lot de Cytb₅₅₈assez pur (lot II), le recouvrement des pics dans les profils d'élution a pour conséquence une perte importante de Cytb₅₅₈ dans le pic I. Une meilleure séparation (plus fine) par la taille devrait enrichir la fraction en Cytb₅₅₈ purifié.

De plus, il reste d'autres types de chromatographies à envisager qui pourront apporter une amélioration au protocole de purification. Cependant, il est aussi nécessaire d'améliorer le niveau d'expression du Cytb₅₅₈ dans la levure, quelques tentatives d'expression à des températures < 20 °C semble en effet prometteuse. Un point encore obscur à clarifier est l'absence d'affinité pour la résine Flag alors que l'étiquette est bien présente sur gp91^{phox} comme l'indique les expériences d'immunodétection. Ce dernier point pourrait être un début de réflexions sur l'accessibilité et la localisation des régions terminales de gp91^{phox}.

***CHAPITRE III: EFFET DE L'ENVIRONNEMENT
MEMBRANAIRE SUR L'ACTIVITE NADPH OXYDASE***

1. Introduction

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au *Cytb₅₅₈* au cours de sa biosynthèse dans la levure en s'attachant aux modifications post-traductionnelles qui ont lieu lors de sa maturation. Pour cela, nous avons examiné les niveaux d'expression de *p22^{phox}* et *gp91^{phox}* dans les membranes des différentes organelles de la levure. Nous avons corrélé leur localisation cellulaire (réticulum endoplasmique, golgi, membrane plasmique) et leur composition (groupes prosthétiques, dimère) à leur capacité à produire l'anion superoxyde. Dans la mesure où la nature de l'environnement lipidique est apparu au cours de ce travail jouer un rôle important sur le fonctionnement de la NADPH oxydase, nous avons par la suite développé une étude plus complète de l'influence de l'environnement lipidique sur l'activité oxydase de l'enzyme.

2. Séparation et analyse des fractions membranaires subcellulaires de *P. pastoris*

Pour séparer les membranes des différentes organelles de *P. pastoris*, la fraction membranaire totale (1.5 ml à 6mg/mL de protéines membranaires totales) de levure exprimant le *Cytb₅₅₈* a été déposée sur un gradient de sucrose (20-60 %) (283).

La séparation des organelles sur le gradient de sucrose s'effectue selon la densité de la fraction membranaire. Deux couches bien séparées ont été visuellement identifiées (Figure 56). La première couche (FM1) est rosâtre et se concentre à environ 40 % de sucrose et la deuxième fraction (FM2) est de couleur jaunâtre et s'étale sur une surface plus large autour d'une concentration de 50 % de sucrose.

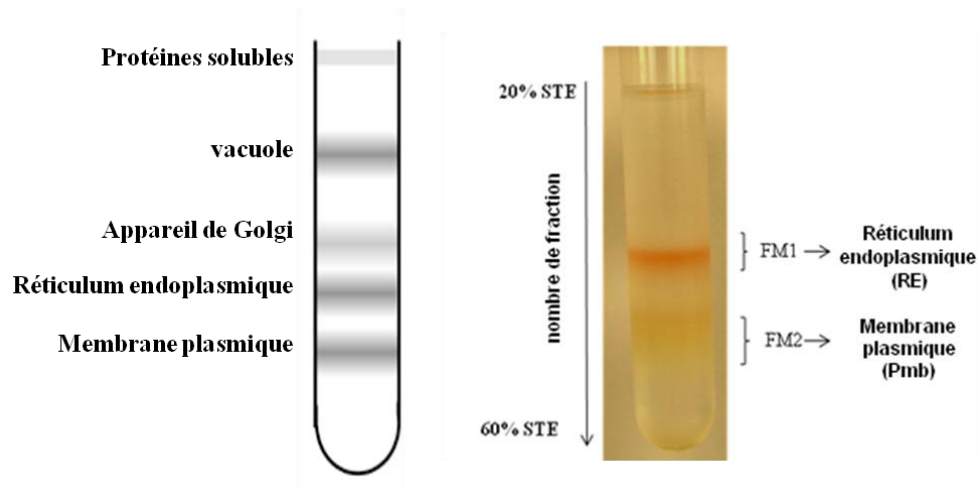


Figure 56: Séparation des fractions membranaires totales de *P. pastoris* sur gradient de sucrose.

Le schéma du tube à gauche présente le résultat théorique de séparation sur gradient de sucrose des organelles. La photo du gradient à droite correspond au résultat qu'on a obtenu suite à la séparation sur gradient de sucrose (20/40/60% de sucrose) des organelles de *P. pastoris* par ultracentrifugation (comme décrit dans la section Matériels et Méthodes).

Des fractions de 700 μ L ont été prélevées du haut jusqu'au bas du tube et numérotées de 1 jusqu'à 18 pour être analysées une par une soit par Western blot avec des anticorps spécifiques des organelles de levure mais aussi dirigés contre la protéine d'intérêt soit par spectrophotométrie.

❖ L'analyse des fractions par Western blot :

Tout d'abord nous avons voulu identifier dans quelle fraction notre protéine d'intérêt est présente. Pour cela, l'anticorps anti-Flag dirigé contre l'étiquette portée en N-terminal de gp91^{phox} et l'anticorps polyclonal anti-p22^{phox} dirigé contre p22^{phox} ont été utilisés (Figure 57).

Avec l'anticorps anti-Flag, une bande d'environ 70-75 kDa indiquant la présence de gp91^{phox} apparaît dès la fraction 7 et qui s'intensifie dans les fractions 8 et 9. Cette bande s'atténue et est progressivement remplacée par une trainée (smear) de plus haut poids moléculaire à partir des fractions 10 jusqu'à la fraction 12. Cela traduit certainement le phénomène de maturation associé à la glycosylation de la sous unité gp91^{phox}. Dans les fractions suivantes, une légère trainée est révélée par l'anticorps anti-Flag à haut poids moléculaire. En revanche, au niveau des

deux fractions (17 et 18) récoltées en bas du tube, une trainée très intense est détectée prouvant la présence de la sous unité gp91^{phox} avec une très forte glycosylation (Figure 57; C)

L'analyse de ces mêmes fractions avec l'anticorps polyclonal anti-p22^{phox}(Figure 57; D) montre la présence à partir de la fraction n°8 d'une bande d'environ 30 kDa qui correspond à la taille de p22^{phox} dont le facteur α n'a pas été clivé. Puis une bande d'environ 22 kDa correspondant à la taille mature de la protéine p22^{phox} et comparable à celle obtenue avec une fraction membranaire bovine apparait ultérieurement à partir de la fraction 10. Ces bandes redeviennent de faible intensité pour les fractions 14-16 puis sont à nouveau très importante pour les fractions 17 et 18 de manière équivalente à ce qui est observé avec l'anticorps anti-Flag. Contrairement à p22^{phox}, une seule bande est observée pour gp91^{phox}. Néanmoins, il est difficile de distinguer s'il s'agit de la forme avec (75 kDa) ou sans (67 kDa) facteur α . Ces résultats suggèrent que gp91^{phox} peut être trouvé seul (sans p22^{phox} associé) et que p22^{phox} peut subir un clivage tardif du facteur α . Mais ces données montrent aussi que la synthèse de gp91^{phox} se fait de manière disjointe de p22^{phox} et que la synthèse de p22^{phox} semble être couplée à la glycosylation du gp91^{phox}.

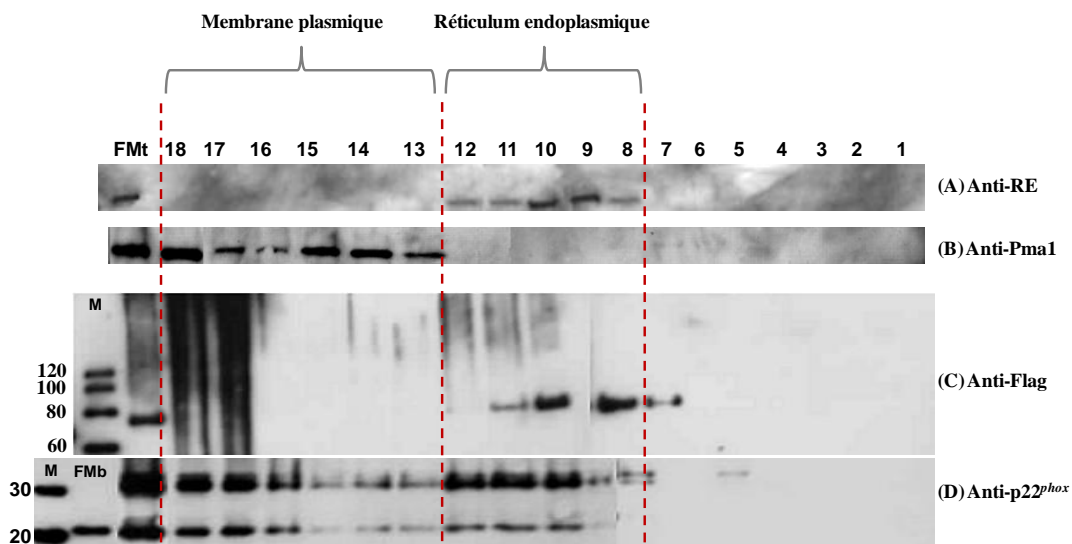


Figure 57 : Analyse par Western blot des fractions subcellulaires de *P. pastoris*

Révélation avec (A) l'anticorps monoclonal α -RE (Anti-Ribophorin 1)(1/2000), (B) l'anticorps anti-Pma1 (1/1000), (C) l'anticorps monoclonal anti-flag (1/1000) et (D) l'anticorps polyclonal anti-p22^{phox} 1/1000. (10 μ l d'échantillon /puits).

Dans le but d'identifier le type de membranes présentes dans les différentes fractions, nous avons utilisé des anticorps spécifiques d'organelles de *S. cerevisiae* : l'anticorps anti-Pma1 dirigé contre l'ATPase de la membrane plasmique (Figure 57, B) et les anticorps anti-réticulum endoplasmique (anti-RE) (Figure 57, A) tels que Dpm1p dirigé contre la dolichol phosphate mannose synthase (~ 30kDa) ou l'anti-ribophorin I dirigé contre une sous-unité de la N-oligosaccharyl transférase. La révélation avec ces anticorps montre que les fractions 8 à 12 correspondent à des membranes du réticulum endoplasmique et qu'à partir de la fraction 13, il s'agit de membranes plasmiques.

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que les deux sous unités gp91^{phox} et p22^{phox} sont décelées conjointement dans les fractions membranaires du RE et de la membrane plasmique. Nous montrons en particulier que la glycosylation de gp91^{phox} apparaît simultanément avec la détection de la forme mature à environ 20 kDa de p22^{phox} (fraction 10). Il semble donc que la synthèse des deux sous-unités gp91^{phox} et p22^{phox} se fasse de manière indépendante au niveau du RE mais que leurs maturations soient corrélées. Une colocalisation des deux sous-unités dans les deux types membranaires est donc probable. Il semble cependant que la forme précurseur anti-p22^{phox} s'accumule aussi au niveau de la membrane plasmique.

L'analyse spectrophotométrique de chaque fraction montre que des spectres de différence d'absorption de type cytochrome *b* sont observés dans les fractions 11-13 puis 17-18 corroborant les résultats des Western blots mais suggérant aussi que la fixation des hèmes *b* à l'holoprotéine se fait plus tardivement au niveau du RE lorsque les sous-unités ont mûries (Figure 58).

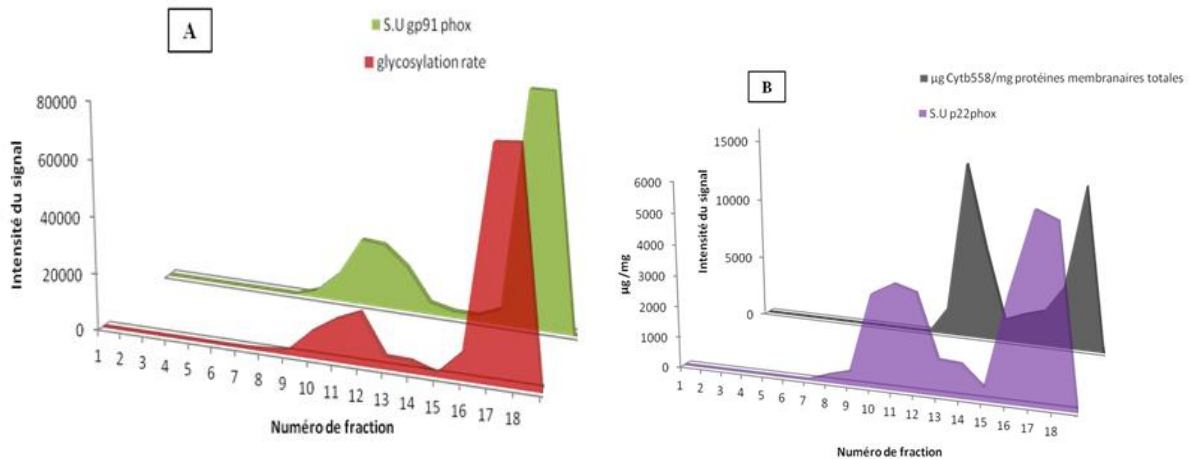


Figure 58: Quantification des niveaux d'expression des protéines et des niveaux des glycosylation dans les fractions subcellulaires de *P.pastoris*.

Analyse des différentes fractions séparées sur le gradient de sucrose par Westerns blots. L'estimation de l'intensité de signal des Western blot à l'aide du logiciel ImageJ de (A) gp91^{phox} (vert) et de son taux de glycosylation (rouge); et (B) p22^{phox} (violet); La quantité de Cytb a été déterminée à partir des spectres de différence (réduit-oxydé) rapportée à la quantité de protéines membranaires totales (µg Cytb₅₅₈/mg protéines totales) (gris).

Nous avons assemblé les fractions 8 à 12 (fraction dite « RE ») qui contient les sous-unités p22^{phox} et gp91^{phox} localisées au niveau du réticulum endoplasmique. Cette fraction est caractérisée par une glycosylation faible et hétérogène de gp91^{phox}. Les fractions 17 et 18 ont été également réunies (fraction « Pmb ») qui correspondent à la membrane plasmique avec les sous-unités matures et gp91^{phox} fortement glycosylé. Maintenant nous disposons de deux fractions subcellulaires (membrane plasmique et RE) de levure exprimant le Cytb₅₅₈ recombinant que nous pouvons étudier et caractériser d'un point de vue fonctionnel afin de mettre à jour éventuellement un comportement différent selon le type de membrane considéré et le niveau de maturation.

3. Caractérisation de l'activité NADPH oxydase dans les fractions membranaires du RE et Pmb

i. Analyse spectrale des fractions membranaires subcellulaires

L'analyse spectrale des membranes du RE et plasmique montre que dans les fractions membranaires subcellulaires, les pics caractéristiques du Cytb₅₅₈ sont présents indiquant un repliement correct de la protéine autour des cofacteurs des cytochromes *b* (Figure 59).

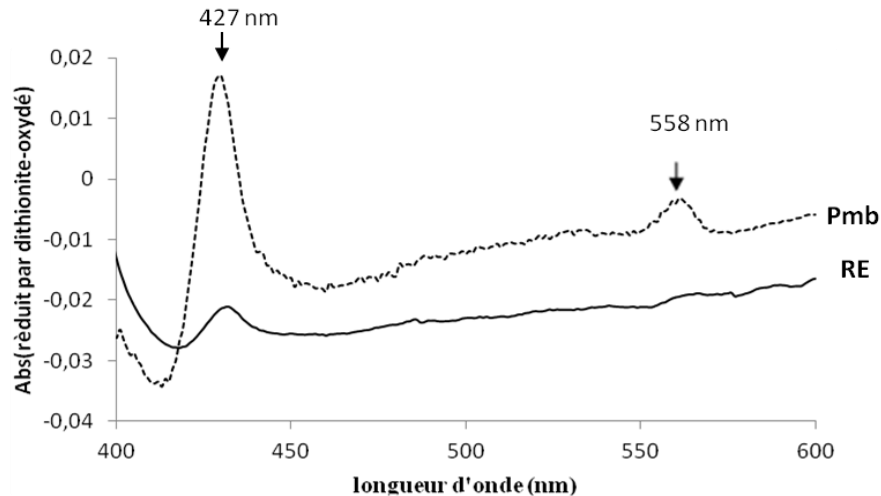


Figure 59 : Spectres de différence d'absorption réduit-oxydé du RE et Pmb.

Le spectre est mesuré pour la membrane du réticulum endoplasmique (spectre continu) et de la membrane plasmique (spectre pointillé). 250 et 100 μ g de protéines membranaires totales respectivement pour Pmb et RE.

Il faut mentionner que la membrane plasmique contient 0.13 nmol *Cytb*₅₅₈/mg de protéines membranaires totales alors que le RE contient environ 0.03 nmol *Cytb*₅₅₈/mg de protéines membranaires totales (d'après le calcul à partir du spectre et le dosage de protéines totales par méthode BCA). Cela est cohérent avec un adressage de la protéine à la membrane plasmique. Cependant il ne faut pas exclure une contribution des protéines de type FreI à ce spectre comme cela a été indiqué dans une section précédente puisque FreI est aussi principalement présente dans la membrane plasmique.

ii. Activation du complexe NADPH oxydase par l'acide arachidonique

Après la caractérisation de la composition des deux lots séparés sur gradient de sucrose, nous avons voulu testé si l'oxydase dans les membranes du RE et de la membrane plasmique présente des propriétés équivalentes notamment en regard de son activation par l'acide arachidonique. Nous avons donc mesuré l'activité NADPH oxydase en ajoutant des concentrations croissantes d'acide arachidonique (Figure 60).

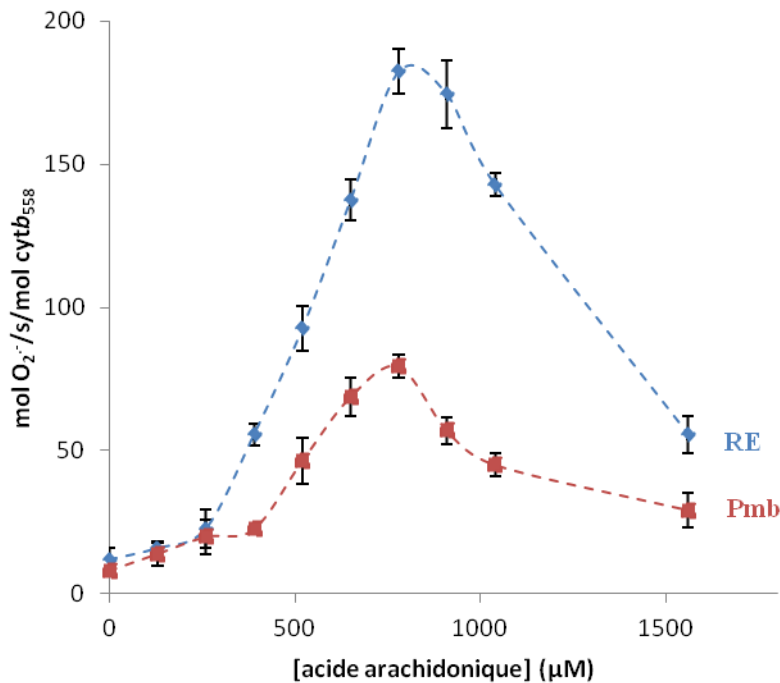


Figure 60 :Activation du complexe NADPH-oxydase par l'AA en utilisant les membranes du RE et de Pmb .

La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome c à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le test d'activité a été réalisé avec la membrane plasmique (triangles) ou avec le réticulum endoplasmique (losanges) la quantité du Cytb₅₅₈ utilisée est de 1 µmol pour la membrane plasmique (Pmb) et de 1.5 µmol pour le RE (estimée à partir du spectre et en tenant compte du facteur de sur estimation précédemment expliqué). Les fractions membranaires ont été incubées 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chaque protéine cytosoliques) avec des concentrations croissantes du cis acide arachidonique. La réaction a été initiée par l'addition de 200 µM NADPH en présence de 50 µM cytochrome c.

Pour les deux types membranaires, nous avons obtenu une courbe en cloche, caractéristique de l'activation du flavocytochrome₅₅₈ par l'acide arachidonique en présence des protéines cytosoliques. La courbe en cloche permet de déterminer la concentration optimale de l'acide arachidonique à utiliser pour avoir le maximum d'activité NADPH oxydase. Ainsi une

concentration d'environ 800 μM d'acide arachidonique est nécessaire pour obtenir une activité maximale *in vitro* quel que soit la fraction membranaire utilisée.

D'autre part, nous avons étudié la capacité des deux types membranaires (RE et Pmb) à produire des anions superoxydes dans différentes conditions d'activation selon la présence ou non des protéines cytosoliques (Figure 61).

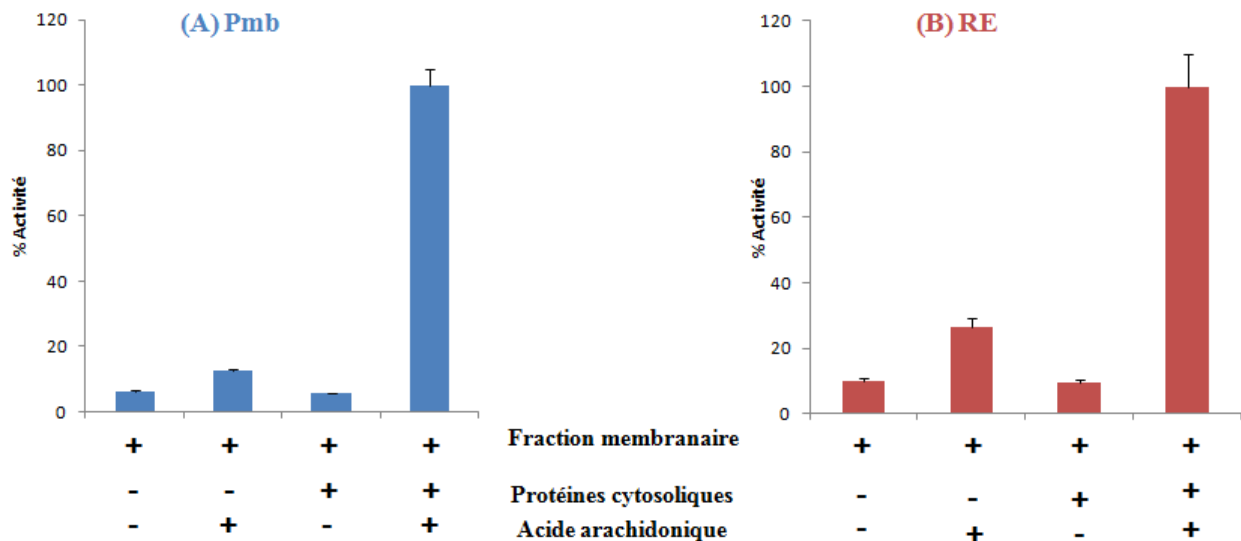


Figure 61 : Diagramme représentant l'activité NADPH oxydase mesurée en différentes conditions d'activation.

Les tests d'activité ont été réalisés avec (A) les membranes plasmique et (B) les membranes de RE. La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome c à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le test d'activité a été réalisé avec la membrane plasmique ou avec le réticulum endoplasmique. La quantité de Cyt_{558} utilisée est de 1 μmol pour la membrane plasmique (Pmb) et de 1.5 μmol pour le RE (estimée à partir du spectre et en tenant compte du facteur de sur estimation précédemment expliqué). Les fractions membranaires ont été incubées 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chaque protéine cytosoliques) avec 800 μM du cis acide arachidonique. La réaction a été initiée par l'addition de 200 μM NADPH en présence de 50 μM cytochrome c. Le 100 % d'activité avec la Pmb est égale à 79 mol $\text{O}_2^-/\text{s}/\text{mol}$ Cyt_{558} . Le 100 % d'activité avec le RE est égale à 182 mol $\text{O}_2^-/\text{s}/\text{mol}$ Cyt_{558} .

Pour les deux types de membranaire, en absence d'AA et quel que soit la présence ou non des protéines cytosoliques, la production d' O_2^- reste inférieure à 10 % par rapport à la production dans les conditions optimales. Une faible activité NADPH oxydase est décelée en incubant les FM avec l'acide arachidonique seul (18 % pour la Pmb et environ 30 % pour le RE) (Figure 61).

Nous pouvons en conclure que quel que soit la fraction subcellulaire et son niveau de maturation, le *cytb₅₅₈* est activable par les protéines cytosoliques et par l'acide arachidonique. L'activation par l'AA semble plus efficace sur la FM du RE, suggérant que la forme du *cytb₅₅₈* au niveau du RE est activable beaucoup plus facilement par l'AA directement. Il n'est pas à exclure qu'au niveau du RE, l'hétérodimère n'ait pas encore été constitué et qu'une forme monomère de *gp91^{phox}* soit plus sensible à AA.

Nous avons voulu déterminer plus finement les constantes cinétiques enzymatiques du *Cytb₅₅₈* dans les deux fractions membranaires ainsi que pour la fraction membranaire totale. Pour cela nous avons fait varier la concentration en substrat et mesuré la vitesse de production de l'anion superoxyde dans le système acellulaire en présence des sous-unités cytosoliques et d'acide arachidonique aux concentrations optimales. Les courbes ont été ajustées par l'équation de Michaelis et Mentent selon la formule suivante :

$$V_i = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{(Equation 4)}$$

Les valeurs cinétiques déduites pour la fraction membranaire totale, et pour les fractions membranaires isolées du RE et de la membrane plasmique sont indiquées dans le tableau affiché dans la figure 64. La constante apparente d'affinité varie entre 22 et 28 μM selon la membrane considérée. Cette valeur est proche de celle obtenue pour le *Cytb₅₅₈* des membranes de neutrophiles décrite dans la littérature, cette valeur variant entre 25 et 35 μM selon les auteurs (105). D'autre part, nous constatons que l'activité NADPH oxydase est significativement différente selon la nature de la fraction membranaire puisqu'elle est plus importante pour les fractions membranaires du RE que pour la membrane plasmique.

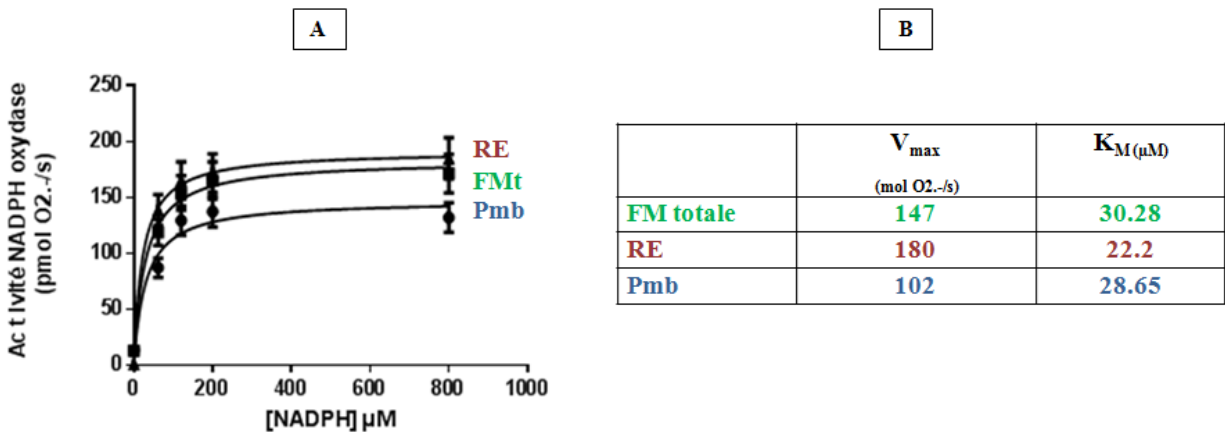


Figure 62 : Représentation de Michaelis–Menten

(A) la vitesse de production d'anion superoxyde en fonction de la concentration du substrat [NADPH] ; (B) tableau présentant les paramètres cinétiques de l'activité NADPH oxydase des différentes membranes.

La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome c à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le test d'activité a été réalisé avec la membrane plasmique ou avec le réticulum endoplasmique. La quantité de Cyt_{b558} utilisée est de 1 µmol pour la membrane plasmique (Pmb) et de 1.5 µmol pour le RE (estimée à partir du spectre et en tenant compte du facteur de sur estimation précédemment expliqué). Les fractions membranaires ont été incubées 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chaque protéine cytosoliques) avec 800 µM du cis acide arachidonique. La réaction a été initiée par l'addition des concentrations croissantes de NADPH et en présence de 50 µM cytochrome c. les valeurs de V_{max} et de K_M sont calculées à l'aide du logiciel GraphPadPrism.

Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer la différence d'activité oxydase observée entre les deux types membranaires:

- ❖ Le taux de glycosylation du Cyt_{b558} plus important au niveau de la membrane plasmique pourrait éventuellement jouer un rôle sur l'activité de l'enzyme mais cela serait en contradiction avec des données de la littérature montrant que la glycosylation n'intervient pas dans l'activité de l'enzyme (81)
- ❖ Il est aussi possible que le niveau de dimérisation gp91^{phox} avec p22^{phox} (que nous n'avons pas pu évaluer) ait une influence sur l'activité de l'enzyme. De très récents résultats que nous avons obtenus dans l'équipe sur l'étude de l'expression du monomère gp91^{phox} seul en l'absence de son partenaire membranaire p22^{phox} indique qu'une légère diminution de la production de l'anion superoxyde a lieu en absence de dimérisation. Si la dimérisation était à l'origine d'une plus forte activité cela indiquerait que dans la membrane du RE, il y a une plus forte dimérisation que dans la membrane plasmique. Cette hypothèse est assez peu probable.

EFFET DE L'ENVIRONNEMENT MEMBRANAIRE SUR L'ACTIVITE NADPH OXYDASE

- ❖ Enfin l'environnement membranaire pourrait être une explication plausible à cette différence. En effet, il est bien connu que la composition en lipides diffère d'une fraction subcellulaire à une autre (Tableau 9).

	% lipides totaux		
	Membrane plasmique	Réticulum endoplasmique	Mitochondrie
Phosphatidylcholine	15.0	39.9	38.5
Phosphatidyléthanolamine	19.5	23.0	29.6
Phosphatidylinositol	9.60	19.1	5.90
Phosphatidylsérine	40.4	6.10	1.40
Cardiolipin	0.30	4.00	11.5
Acide phosphatidique	2.30	2.00	1.70
Autres lipides	12.9	5.90	11.3
Phospholipides/protéines (w/w)	0.30	0.58	0.30
Ergostérol/protéines (w:w)	0.45	0.05	0.02

Tableau 9 : Composition lipidique des membranes des différentes organelles de *S. cerevisiae*(284).

Par conséquent nous avons décidé d'explorer plus finement le fonctionnement de l'enzyme dans les deux fractions membranaires subcellulaires et tenter d'expliquer ces différences cinétiques.

Comme le montre le tableau 9, la composition en lipides est différente selon les membranes des organelles de *S. cerevisiae*(284). Les membranes cellulaires possèdent des lipides de nature très variés, et ceux-ci ne sont pas distribués de façon homogène dans tous les organites, ni d'ailleurs sur les deux feuilletts. La membrane du réticulum endoplasmique (RE) est essentiellement constituée de glycérophospholipides insaturés, ce qui la rend très flexible et facilite l'incorporation des protéines néosynthétisées et présente une distribution des lipides symétrique sur les deux feuilletts de la membrane. La membrane plasmique est constituée de glycérophospholipides auxquels s'ajoutent des sphingolipides et du cholestérol en quantités

variables selon les types cellulaires et l'arrangement des phospholipides sur les deux feuillets de la membrane plasmique est asymétrique. Cette différence de composition a une conséquence immédiate sur les propriétés physico-chimiques de la membrane puisque la fluidité de celle-ci est directement liée à la proportion de lipides saturés/insaturés, à chaînes longues/courtes, chargés/neutres.

4. Dépendance en température de l'activité NADPH oxydase en RE et Pmb

Pour mieux comprendre, la différence d'activité NADPH oxydase entre la membrane du RE et de la membrane plasmique, nous avons déterminé les propriétés cinétiques et thermodynamique de l'activité oxydase en mesurant la production de l'anion superoxyde pour les deux fractions membranaires en fonction de la température entre 10 et 40°C. En effet, la température est un facteur influençant la vitesse des réactions chimiques. Dans tous les cas, il est connu que la vitesse des réactions augmente lorsqu'on augmente la température. Cette dépendance suit la loi d'Arrhenius qui contient deux paramètres qui sont indépendants de la température :

$$k = A \exp(E_a/RT) \quad (\text{Equation 5})$$

où A est le facteur pré-exponentiel (appelé aussi facteur de fréquence) tenant compte de la fréquence des collisions et des effets stériques, E_{ao} est l'énergie d'activation d'Arrhenius en $J.mol^{-1}$ et R est la constante des gaz parfaits ($R = 8,314 J.mol^{-1}.K^{-1}$). La température est en Kelvin.

L'énergie d'activation E_{ao} suit un profil typique en fonction de la progression de la réaction au cours du temps (Figure63).

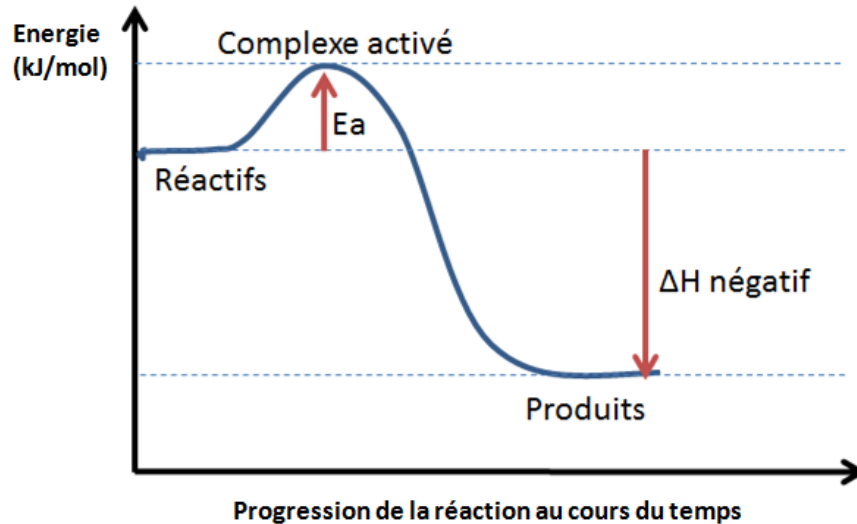


Figure 63: Profil énergétique.

La transformation de la loi d'Arrhenius en appliquant le logarithme de chaque membre devient :

$$\ln k = \ln A - (E_a/RT) \quad (\text{Equation 6})$$

Les points obtenus en traçant le $\ln k$ en fonction de $1/T$ s'alignent sur une ou deux pentes $-E_{ao}/R$ et d'ordonnée à l'origine $\ln A$. Une linéarité indique que la réaction NADPH oxydase en fonction de la température obéit bien à la loi d'Arrhenius.

De 10 à environ 20°C, les deux fractions membranaires ont une activité NADPH oxydase comparable en produisant autant d'anion superoxyde l'une que l'autre, cette activité étant peu dépendante de la température (la production d' O_2^- varie de 10 à environ 40 mol O_2^- /s/mol de *Cyt_{b558}*) (Figure 64; A). Cette donnée indique que dans cette gamme de température, la NADPH oxydase dans la membrane du RE ou plasmique possède des propriétés identiques que ce soient d'assemblage ou d'activation. Cela ne semble donc pas soutenir les hypothèses avancées de types structurales suggérant une différence de l'activité liée à la maturation, glycosylation ou la dimérisation. Intrinsèquement l'enzyme qu'elle soit dans le RE ou dans la membrane plasmique est fonctionnelle et présente les mêmes propriétés enzymatiques.

En revanche, au-delà de 20°C, une forte augmentation de la production de l'anion superoxyde est mesurée quelle que soit la membrane considérée sans atteindre, même à 40°C,

une déstabilisation de la protéine. Cette augmentation est plus importante dans les membranes du RE.

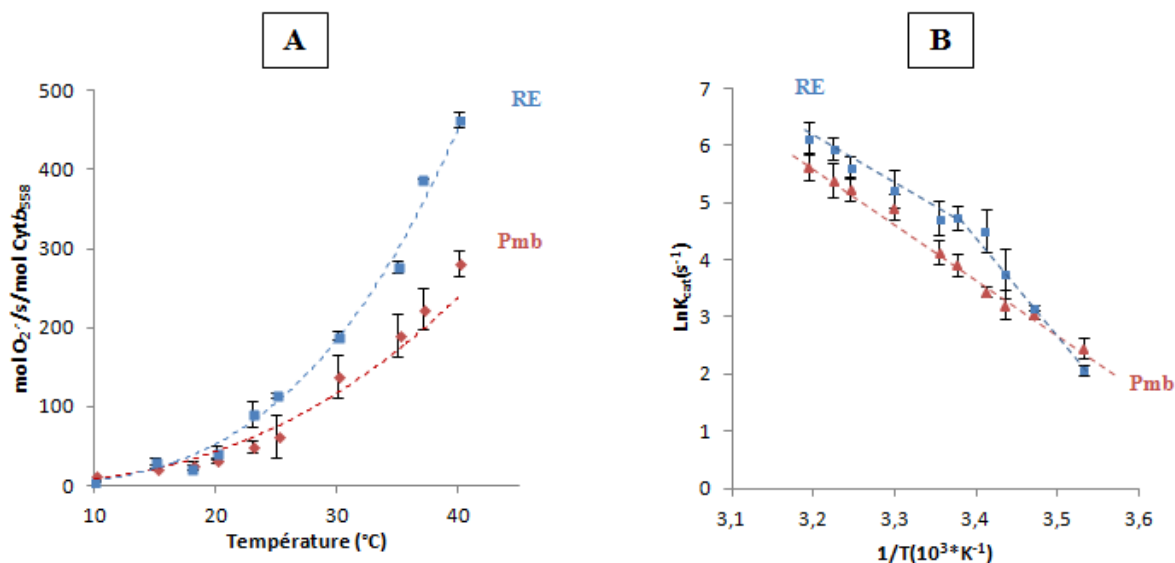


Figure 64 : Mesure de l'activité NADPH oxydase de la membrane du RE et de la Pmb en fonction de la température

(A) Dépendance en température de l'activité NADPH dans la fraction membranaire du RE (carré bleu) et de la membrane plasmique (losange rouge). (B) Plot d'Arrhenius de l'activité NADPH oxydase des fractions membranaires subcellulaires de membrane plasmique (triangle rouge) et du réticulum endoplasmique (carré bleu). Ce plot est tracé selon l'équation 6. La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome c à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le test d'activité a été réalisé avec la membrane plasmique ou avec le réticulum endoplasmique. Dans le mélange réactionnel, on a ajouté 1 à 1.5 nmol de Cytb (membrane plasmique et RE respectivement). Les fractions membranaires ont été incubées 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chaque protéine cytosoliques) avec 800 μM du cis acide arachidonique. La réaction a été initiée par l'addition de 200 μM NADPH en présence de 50 μM cytochrome c.

Pour déterminer les paramètres thermodynamiques de l'activité NADPH oxydase dans les deux fractions membranaires, les plots d'Arrhenius ont été tracés (Figure 64; B). Pour les deux fractions membranaires, il y a une augmentation d'environ 2.5 à 3 du lnk entre 10 et 40°C et les profils de dépendance en température diffèrent.

Le plot d'Arrhenius de Pmb présente un comportement linéaire sur toute la gamme de température étudiée (10-40°C) avec une énergie d'activation assez importante de 19 ± 1 kcal. Mol⁻¹ (soit 82 ± 4 J.mol⁻¹). En revanche, une discontinuité du tracé est observée pour l'activité NADPH oxydase avec les fractions membranaires du RE avec une cassure au voisinage de 21°C. La discontinuité dans le plot d'Arrhenius est réversible et présente alors une cassure dans la

même région de température. L'énergie d'activation pour les températures inférieures à 21°C, est importante et est d'environ $35 \pm 8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($150 \pm 34 \text{ kJ.mol}^{-1}$). L'énergie d'activation pour les températures supérieures à 21°C, est deux fois moins élevée et est d'environ $18 \pm 4 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ($73 \pm 18 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Cette valeur est proche de celle obtenu pour l'activité oxydase avec les fractions membranaires Pmb. Il est intéressant de noter que cette valeur est aussi du même ordre de grandeur que l'énergie d'activation de l'activité NADPH oxydase déterminée pour les cellules éosinophiles (25 kcal.mol^{-1}) (285).

De telles cassures avec une augmentation de l'énergie d'activation à basse température ont été également observées auparavant pour des enzymes présentes dans les mitochondries de mammifères et de levures (286-287). Ici nous comparons les membranes du RE et du Pmb de levures et observons que seul, dans les membranes du RE, une cassure du plot d'Arrhenius est présente. Des études ont montrées qu'une telle cassure peut être corrélée à un changement physique des lipides de la membrane de leur forme « cristalline liquide » au-dessus de la température de transition (T_m) vers un état dit « gel » en dessous de cette température (288). Cette température de transition est directement liée à la composition membranaire en lipides. Une membrane formée par majoritairement des lipides insaturés ayant une basse T_m présente une organisation de la membrane dite en phase liquide désordonnée. En revanche, une membrane enrichie en stérol présenterait une organisation de membrane dite liquide ordonné. Dans le phénomène que nous observons ici, il est possible que la différence de comportement soit liée à une valeur de T_m différente entre la membrane de RE et la membrane plasmique due à la nature et la composition générale différentes en lipides dans ces deux fractions subcellulaires, en particulier l'ergostérol.

5. Conséquence de l'extraction de l'ergostérol des membranes plasmiques

Il est connu que la concentration en stérol augmente tout au long des voies de sécrétion, étant la plus faible dans le RE et la plus important dans la membrane plasmique. Le stérol est l'un des constituants majeurs de la membrane plasmique. Il représente à lui seul 30 à 40% de la fraction lipidique selon les types cellulaires. Par contre le réticulum endoplasmique contient un très faible taux de stérol. Contrairement aux cellules de mammifères dans lesquelles le stérol est majoritairement le cholestérol, le stérol dans les levures est l'ergostérol (Figure 65), ces deux

molécules planes étant très voisines. Ils possèdent comme les phospholipides une région polaire et une chaîne hydrocarbonée non polaire.

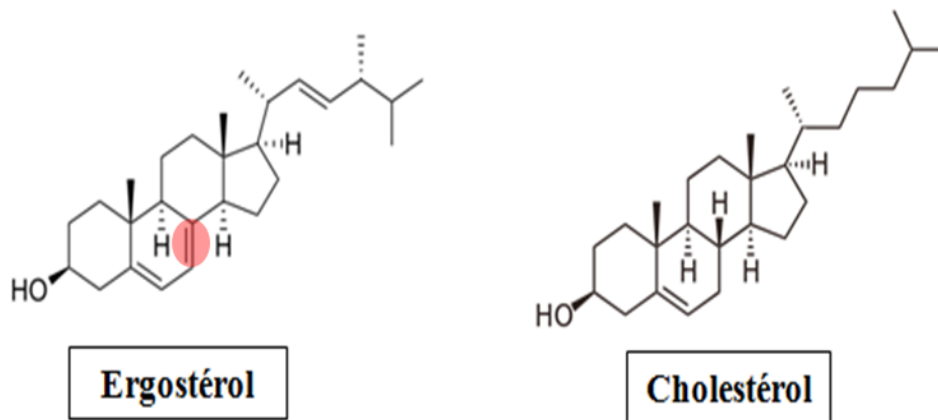


Figure 65 : Structure chimique de l'ergostérol et du cholestérol.

Nous avons extrait l'ergostérol des membranes plasmiques de levures exprimant le Cyt b_{558} recombinant. Cette extraction a été faite à l'aide du méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) qui est un oligosaccharide cyclique (Figure 66). Cette molécule-cage permet d'encapsuler les molécules hydrophobes et de les rendre solubles. Elle est largement utilisée pour extraire le cholestérol des membranes et étudier l'effet de ce dernier.

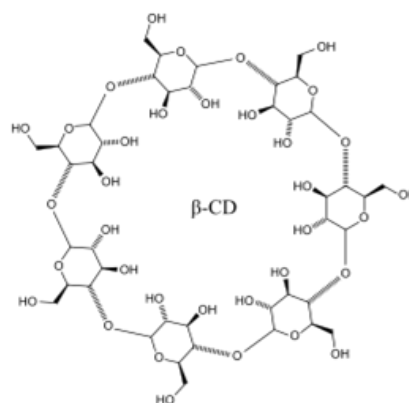


Figure 66 : Structure chimique diméthyle- β - cyclodextrine.

Les membranes plasmiques de *P. pastoris* dépletées d'ergostérols ont été étudiées de manière similaire que précédemment en mesurant la vitesse de production d' O_2^- en fonction de la température. Pour la membrane plasmique traitée avec la M β CD, cette vitesse augmente avec la

température comme cela a été observé avec le RE et la Pmb. Par contre, l'augmentation de la vitesse de production d'anion superoxyde avec la température est nettement plus importante. Elle atteint environ 1400 mol O₂⁻/s/mol Cytb₅₅₈ à 40°C alors qu'elle était seulement de 250 mol O₂⁻/s/mol cytb₅₅₈, avec la Pmb avec l'ergostérol (Figure 67; A). La déplétion de l'ergostérol de la Pmb entraîne une augmentation de la production d'anion superoxyde d'environ 5-6 fois.

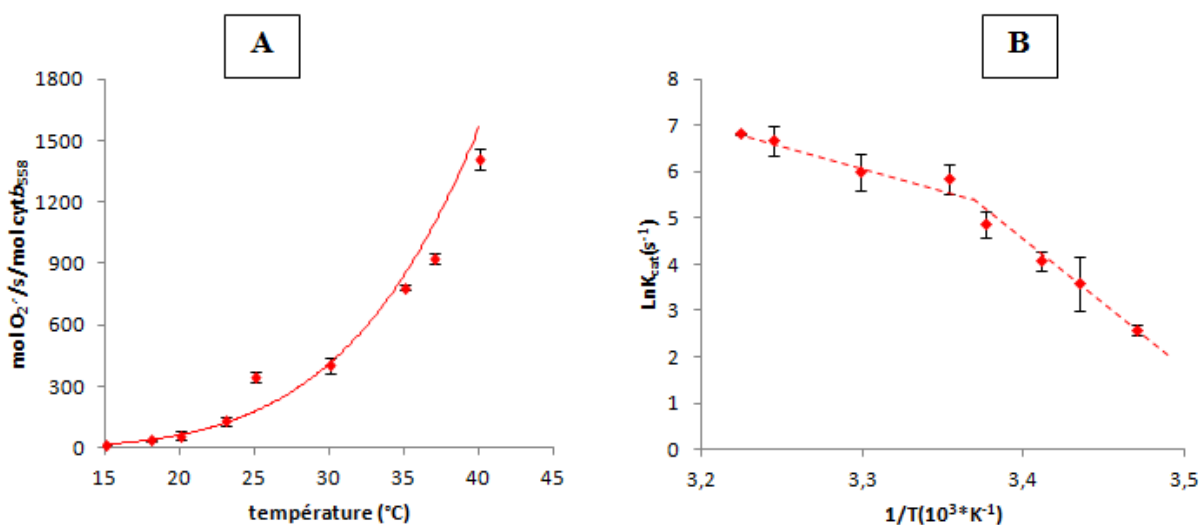


Figure 67 : Mesure de l'activité NADPH oxydase de la membrane plasmique traitée avec la MβCD.

(A) Dépendance en température de l'activité NADPH oxydase en utilisant la membrane plasmique traitée avec la MβCD. (B) Plot d'Arrhenius de l'activité NADPH oxydase de la membrane plasmique traitée avec la cyclodextrine. La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome c à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le test d'activité a été réalisé avec la membrane plasmique traitée avec la cyclodextrine (1 pmol Cytb). La fraction membranaire a été incubée 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chaque protéine cytosoliques) avec 800 μM du cis acide arachidonique. La réaction a été initiée par l'addition de 200 μM NADPH en présence de 50 μM cytochrome c.

La déplétion des membranes plasmiques en ergostérol conduit à un plot d'Arrhenius discontinu (et non plus linéaire) et avec une cassure à environ 25°C. Ce profil est très similaire à celui qui a été observé pour la membrane du RE (Figure 67; B) avec des énergies d'activation également très proche. Pour des températures supérieures à 25°C, l'énergie d'activation déterminée est de 17 ± 4 kcal.mol⁻¹ (74 ± 16 kJ.mol⁻¹) et elle atteint 53 ± 8 kcal.mol⁻¹ (221 ± 34 kJ.mol⁻¹) pour des températures inférieures à 25°C. L'extraction du stérol de la membrane plasmique a eu pour conséquence de lui conférer des propriétés thermodynamiques similaires à celles des membranes de RE.

Nous avons voulu effectué l'expérience inverse pour confirmer la corrélation de la présence/absence du stérol et du comportement linéaire ou non des plots d'Arrhenius. Pour cela, la membrane de RE a été incubée en présence d'ergostérol en respectant les proportions existant naturellement dans la membrane plasmique avec un rapport ergostérol/protéine est égale à 0.45 (Tableau 9). Puis la dépendance de la production de l'O₂⁻ en fonction de la température a été suivie en fonction de la température. Cette dépendance est similaire à ce qu'on a observé avec la Pmb et cette production augmente avec la température pour atteindre une valeur d'environ 350 mol O₂⁻/s/mol Cytb₅₅₈ (Figure 68; A).

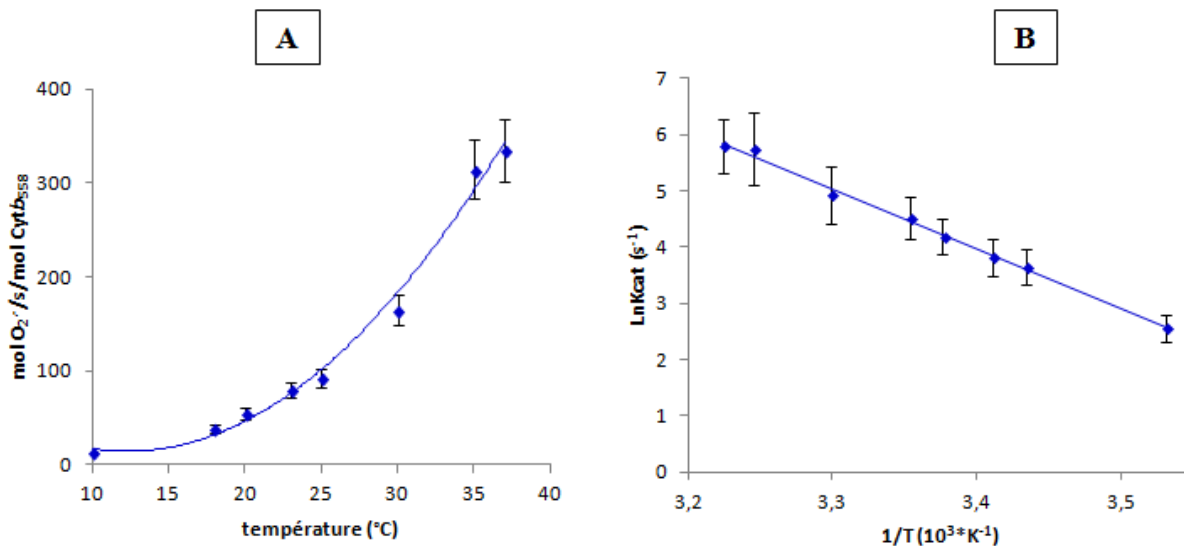


Figure 68 : Mesure de l'activité NADPH oxydase de la membrane du RE additionnée d'ergostérol.

(A) dépendance en température de l'activité NADPH oxydase en utilisant la membrane du RE (2 mg/ml en protéines membranaire totales) incubée en présence d'ergostérol (20   M) en respectant le rapport ergostérol/protéine égale à 0.45 (w/w) de la membrane plasmique précédemment indiquée dans le tableau 9. (B) Plot d'Arrhenius de l'activité NADPH oxydase de la membrane du RE additionnée d'ergostérol. La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome c    550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le test d'activité a été réalisé avec la membrane du réticulum endoplasmique additionnée d'ergostérol (1   mol Cytb). La fraction membranaire a été incubée 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chaque protéine cytosoliques) avec 800   M du cis acide arachidonique. La réaction a été initiée par l'addition de 200   M NADPH en présence de 50   M cytochrome c.

En rajoutant l'ergostérol à la fraction membranaire du RE, le plot d'Arrhenius retrouve une linéarité comparable à celle qui est observée dans la Pmb avec une énergie d'activation du même ordre de grandeur (21 à 1 kcal.mol⁻¹ ou 89 à 2 kJ.mol⁻¹).

Nous montrons ici que la présence de stérol dans la membrane biologique est responsable d'une diminution de la production d' O_2^- par le complexe NADPH oxydase. Son absence introduit une cassure dans la dépendance en température de l'activité oxydase. Le stérol agit en régulant la T_m de la membrane. Le stérol a avant tout un rôle structural dans les membranes. A température élevée, il tend à diminuer la fluidité de la membrane, probablement en interagissant avec les chaînes hydrocarbonées des phospholipides et des glycolipides. A basse température, il préserve une fluidité membranaire.

L'ensemble de ces résultats montre pour la première fois que l'activité NADPH oxydase est directement liée à l'arrangement des lipides de la membrane et qu'elle est sensible à sa structure. Lorsque les lipides sont organisés en une phase liquide désordonnée, l'énergie d'activation pour produire des anions superoxydes est moindre que lorsque la protéine est environnée de lipides sous leur forme rigide limitant ainsi la flexibilité protéique.

6. Reconstitution du Cytb₅₅₈ recombinant en membrane artificielle

Dans un des chapitres précédents était décrite la purification du Cytb₅₅₈ en détergent. En DDM, aucune activité NADPH oxydase n'est détectée. Un moyen pour restaurer cette activité est de reconstituer en membrane artificielle le Cytb₅₅₈ purifié. Nous avons pris avantage de cette expérience pour tester l'effet de la rigidité de la membrane sur l'activité de l'enzyme.

La reconstitution correspond à l'opération inverse de la solubilisation. Il s'agit de remplacer par les lipides le détergent présent dans les micelles protéine/détergent pour reformer une vésicule lipidique contenant la protéine insérée dans la bicouche (protéoliposomes) (223). De nombreuses méthodes sont efficaces pour réussir cette étape : dialyse, adsorption hydrophobe à l'aide de Bio-Beads (résines hydrophobes capable d'adsorber les détergents) (289) et les techniques de chromatographie échangeuse d'ions ou de filtration sur gel.

Deux lipides ont été choisis pour leurs propriétés différentes : le DOPC et le DMPC (Tableau 10). Ces deux lipides se différencient en terme de longueur de chaîne carbonée, degrés d'insaturation et de leur température de transition de phase T_m .

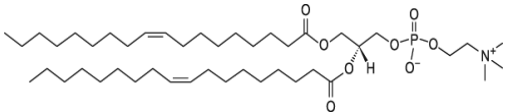
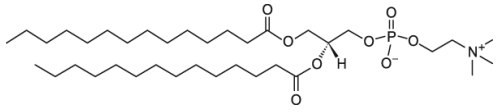
	DOPC	DMPC
	1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
Formule chimique		
Longueur de chaîne	18:1 (Δ^9 -Cis)	14:0
insaturation	PC(18:1(9Z)/18:1(9Z))	PC(14:0/14:0)
T_m	-17°C	24 °C

Tableau 10: Structures et propriétés des deux phospholipides utilisés

i. Activation des protéoliposomes par l'acide arachidonique

Les protéoliposomes ont été utilisées de la même manière que les fractions membranaires de levure pour mesurer en système acellulaire l'activité NADPH oxydase. Dans un premier temps, différentes concentration en acide arachidonique ont été testées pour identifier d'une part, la concentration optimale d'activateur à ajouter aux essais et d'autre part pour voir si le comportement en réponse à l'activateur est de type dose-réponse. La figure 73 illustre cette expérience. Pour ces expériences nous nous sommes placées de manière à ce que les lipides de la membrane des liposomes soient dans leur structure en phase liquide. C'est pourquoi les mesures ont été effectuées pour les protéoliposomes de DMPC à 30°C (au-dessus de la T_m de DMPC). La figure 69 montre qu'une concentration de l'ordre de 700 μ M d'AA est nécessaire pour obtenir le maximum d'activité NADPH oxydase quel que soit le lipide considéré mais aussi quel que soit le rapport protéine/lipide (1/5 ou 1/10) utilisé. Cette valeur est légèrement plus faible que la concentration nécessaire pour activer les membranes de levures. La courbe en cloche confirme que l'activation par l'AA du *Cytb*₅₅₈ en liposome se déroule de manière similaire au *Cytb*₅₅₈ recombinant en membrane de levure ou au *Cytb*₅₅₈ natif des membranes de neutrophiles.

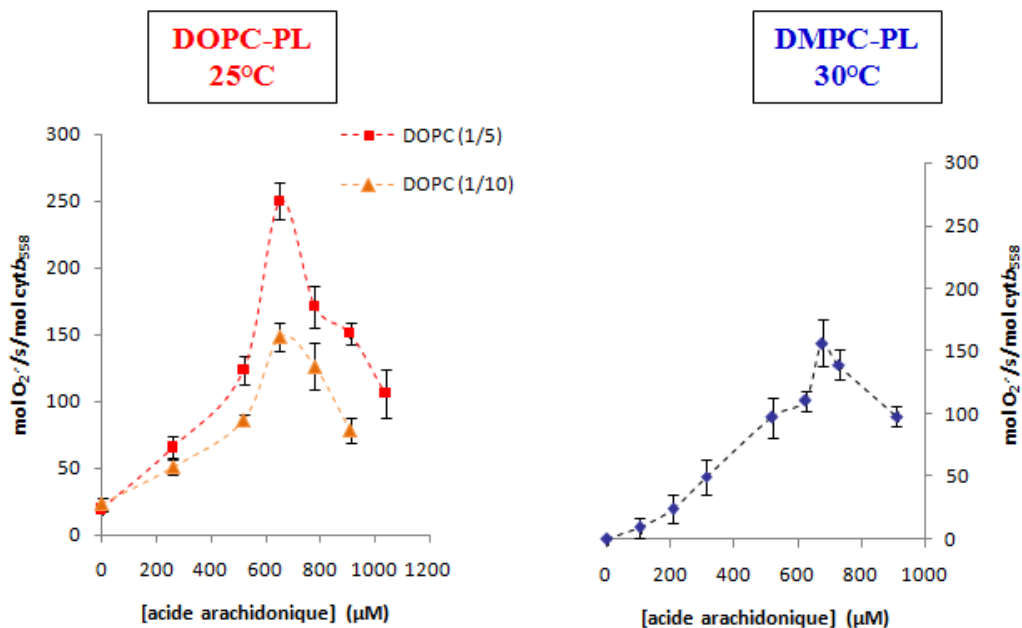


Figure 69 : Activation du complexe NADPH-oxydase par l'AA en utilisant les DOPC-PL et DMPC-PL.

Dans le mélange réactionnel, les protéoliposomes en DOPC à un rapport protéine/lipide 1/5 (carré) ou 1/10 (triangle) ou en DMPC (losange) ont été incubé 5 min avec les protéines cytosoliques recombinantes et des concentrations différentes de l'acide arachidonique à 25 °C pour les DOPC-PL et à 30 °C pour les DMPC-PL. La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome c à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le test d'activité a été réalisé avec les protéoliposome (0.5 μ mol Cytb). La fraction membranaire a été incubée 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chaque protéine cytosoliques) avec des concentrations croissantes du cis acide arachidonique. La réaction a été initiée par l'addition de 200 μ M NADPH en présence de 50 μ M cytochrome c.

ii. Activation des protéoliposomes par les facteurs cytosoliques

L'activation par les sous-unités régulatrices et activatrices du Cytb₅₅₈ recombinant reconstitué en liposomes est un bon contrôle de la conservation des déterminants structuraux qui régulent son activation par l'intermédiaire des interactions protéine-protéine. Nous avons mesuré l'activité du cyt b₅₅₈ en liposomes de DOPC et de DMPC dans différentes situations expérimentales dans un système acellulaire:

- en DMPC-PL, en absence d'activateur AA ou de protéines cytosoliques l'activité NADPH oxydase est négligeable, alors qu'en présence d'AA, une activité d'environ 40% est mesurée.
- En DOPC-PL, une activité d'environ 30% est mesurée et la présence des protéines cytosoliques ou l'AA conduit à 20 % et 60 % d'activité respectivement (Figure 70).

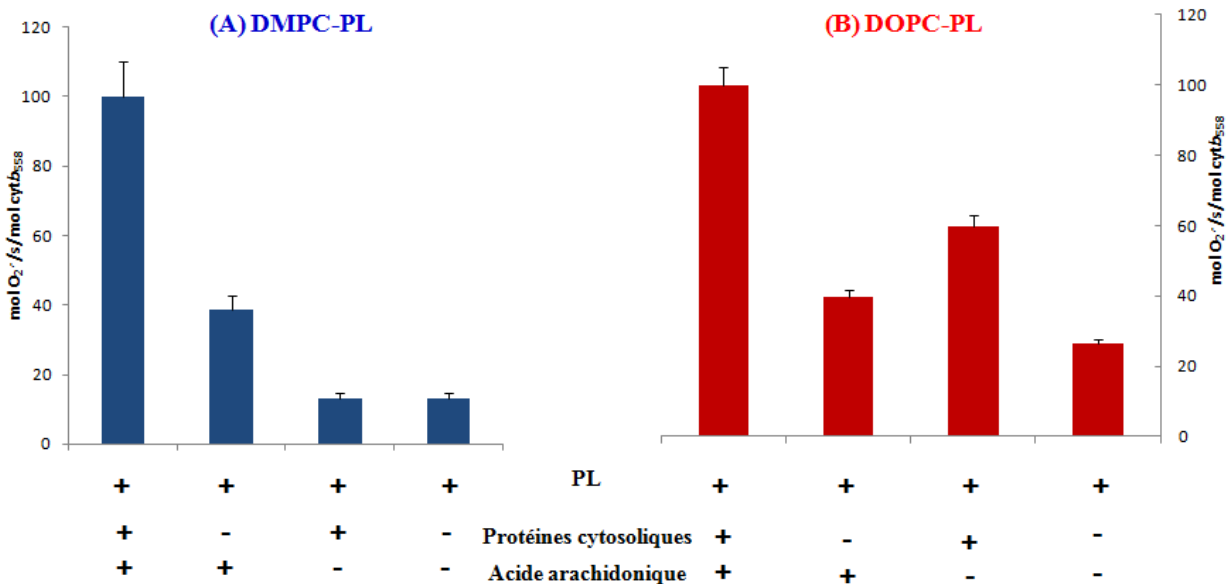


Figure 70 : Mesure de l'activité NADPH oxydase des DMPC-PL(A) et de DOPC-PL(B) dans différentes conditions expérimentales en système acellulaire.

Les PLs ont été testés seuls ou en présence de l'activateur AA (650 μ M) ou les protéines cytosoliques seules ou ensembles avec l'AA. La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome c à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le test d'activité a été réalisé avec la membrane les protéoliposomes (0.5 μ mol Cytb). La fraction membranaire a été incubée 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chaque protéine cytosoliques) avec 650 μ M cis acide arachidonique. La réaction a été initiée par l'addition de 200 μ M NADPH en présence de 50 μ M cytochrome c. pour les DMPC-PL les mesures ont été réalisées à 30 °C et le 100 % correspond à 150 mol O₂⁻/s/mol Cytb₅₅₈. Pour les DOPC-PL les mesures ont été réalisées à 25 °C et le 100 % correspond à 250 mol O₂⁻/s/mol Cytb₅₅₈

Les résultats obtenus avec DMPC-PL montrent que les interactions protéine-protéine intervenant dans les mécanismes d'activation du Cytb₅₅₈ par les protéines cytosoliques sont conservées malgré les différentes étapes de solubilisations et purification de la protéine. La reconstitution en lipides a permis de restaurer son activité oxydase et ses propriétés d'activation. Cependant en DOPC-PL, une activité constitutive est mesurée suggérant que cet environnement confère une structure active (30 %) capable de produire de l'O₂⁻ en absence de protéines cytosoliques et d'AA.

iii. Dépendance en température de l'activité NADPH oxydase du Cytb₅₅₈ reconstitué en liposomes

Les vitesses de production d'anions superoxydes par le Cytb₅₅₈ reconstitué en protéoliposomes (PL) de DMPC et de DOPC ont été mesurées en fonction de la température entre 15 et 40°C (Figure 71). De façon similaire à ce qui avait été observé pour les dépendances en

température des fractions membranaire de levures, une augmentation de la vitesse de production d'anion superoxyde est observée lorsque la température augmente. Cette augmentation est particulièrement importante pour les DMPC-PLs qui produisent à 40°C environ 1000 mol O₂⁻ /s/mol de Cytb. Cette valeur est proche de celle obtenue avec les membranes de RE déplétées d'ergostérol. La production d'anion superoxyde à 40°C des DMPC- PLs est moindre puisqu'ils produisent environ 580 mole de O₂⁻/s/mole de Cytb et semble atteindre un plateau indiquant peut-être un début de dénaturation/déstabilisation de l'enzyme. Un environnement de lipides mono-insaturés en C17 de DOPC n'est pas aussi favorable pour la stabilité du Cytb₅₅₈ que les lipides de DMPC plus court et saturé.

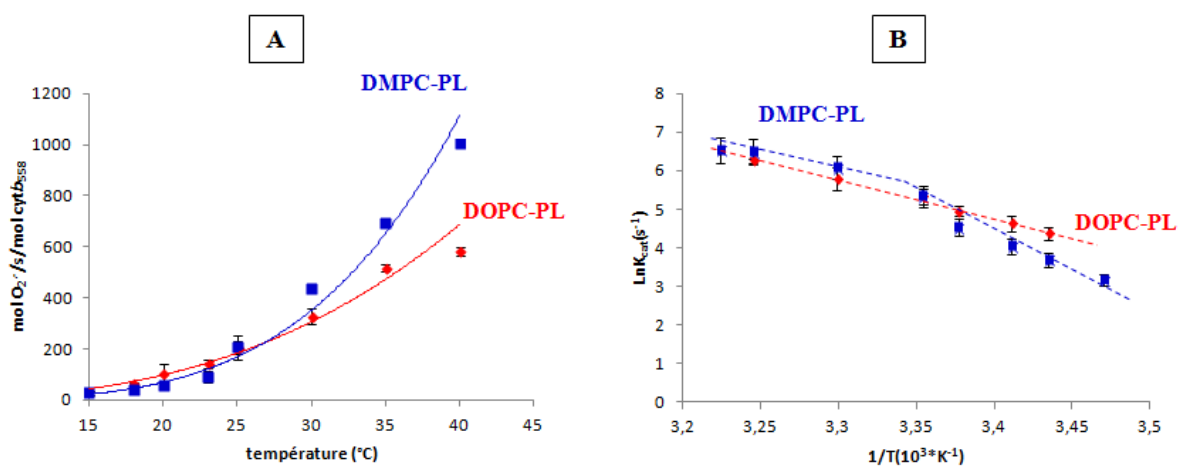


Figure 71 : Mesure de l'activité NADPH oxydase avec les PL-DOPC et PL-DMPC en fonction de la température.

(A) Effet de la température sur l'activité NADPH oxydase et B. plot d'Arrhenius de l'activité NADPH oxydase du Cytb₅₅₈ reconstitué en protéoliposomes de DMPC (carré bleu) et de DOPC (losange rouge). La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome c à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le test d'activité a été réalisé avec les protéoliposome (0.5 μ mol Cytb). La fraction membranaire a été incubée 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chaque protéine cytosoliques) avec 650 μ M cis acide arachidonique. La réaction a été initiée par l'addition de 200 μ M NADPH en présence de 50 μ M cytochrome c.

Les plots d'Arrhenius de l'activité NADPH oxydase en DOPC-PL et DMPC-PL ont été tracés dans la figure 71; B. Le plot d'Arrhenius avec les DOPC-PL présente un comportement linéaire sur toute la gamme de température testée. Il s'agit d'une dépendance en température très similaire à celle qui a été obtenu avec la membrane plasmique. Sur cette gamme de température où les lipides sont dans une phase désordonnée formant une bicouche fluide, l'énergie d'activation de l'activité NADPH oxydase est de 17 ± 1 kcal.mol⁻¹ (72 ± 4 kJ.mol⁻¹).

Le plot d'Arrhenius de l'activité NADPH oxydase en PL-DMPC (Figure 71; B ; courbe bleue) présente en revanche une discontinuité sur la gamme de température testée. Cette cassure est à environ 27 ± 3 °C, température légèrement plus élevée que la température de transition de phase du DMPC. L'énergie d'activation obtenue pour des températures supérieures à 27°C est de 18 ± 1 kcal.mol⁻¹ (77 ± 3 kJ.mol⁻¹) et atteint 34 ± 4 kcal.mol⁻¹ (145 ± 31 kJmol⁻¹) pour des températures inférieures à 27°C. Le comportement en fonction de la température et les énergies d'activation de l'activité NADPH oxydase du Cyt_b₅₅₈ en DMPC-PL de part et d'autre de la T_m sont particulièrement proche de ceux obtenus avec les fractions membranaires du RE. Ce résultat nous amène à penser que les phénomènes de transition de phase des lipides et la présence d'ergostérol sont intimement liés et impactent l'activité NADPH oxydase de manière similaire.

Pour compléter cette étude, nous avons aussi suivi la dépendance en température de l'activité NADPH oxydase du Cyt_b₅₅₈ en DMPC-PL incubé avec l'ergostérol (Figure 72; A). Comme cela était attendu, plus aucune cassure dans le plot d'Arrhenius (Figure 72 ; B) n'est décelée sur toute la gamme de température étudiée et l'énergie d'activation déterminée à partir de ces plots a diminué à 23 ± 1 kcal.mol⁻¹ (96 ± 5 kJmol⁻¹) proche de celles obtenues pour les lipides dans leur phase fluide comme cela est le cas avec le DOPC, la membrane plasmique ou bien au-dessus de la T_m . L'ajout de l'ergostérol a clairement déplacé la T_m de la membrane vers une plus faible valeur.

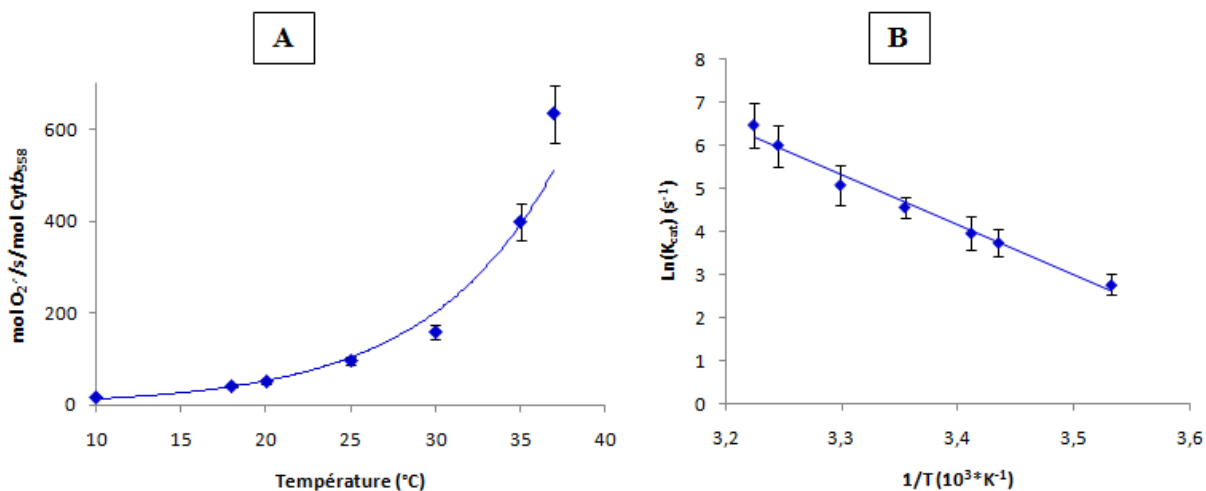


Figure 72 : Mesure de l'activité NADPH oxydase de DMPC-PL additionné d'ergostérol en fonction de la température.

EFFET DE L'ENVIRONNEMENT MEMBRANAIRE SUR L'ACTIVITE NADPH OXYDASE

(A) Effet de la température sur l'activité NADPH oxydase et (B) plot d'Arrhenius de l'activité NADPH oxydase du Cyt_{b558} reconstitué en DMPC et après ajout d'ergostérol. La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cytochrome c à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le test d'activité a été réalisé avec les protéoliposome (0.5 μ mol Cytb). La fraction membranaire a été incubée 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes (200 nM de chaque protéine cytosoliques) avec des concentrations croissantes du cis acide arachidonique. La réaction a été initiée par l'addition de 200 μ M NADPH en présence de 50 μ M cytochrome c.

Le tableau 11 résume les différents paramètres enzymatiques et thermodynamiques obtenus avec les différentes membranes.

	V _{max} (pmol/s/pmol cytb ₅₅₈ ± 10 %) 30°C	K _m (NADPH) (μ M) 25°C	E _a (kcal.mol ⁻¹ ± 10 %)	
			T > 23°C	T < 23°C
Réticulum endoplasmic (RE)	205	22	T > 23°C	T < 23°C
			17	35
RE + ergostérol	165	n.d	21	
Membrane plasmique (Pmb)	138	28	19	
Pmb + cyclodextrine	401	n.d	T > 23°C	T < 23°C
			18	53
DOPC-PL	328	n.d	17	
DMPC-PL	436	n.d	T > 27°C	T < 27°C
			18	35
DMPC-PL + ergostérol	158	n.d	23	

Tableau 11: Tableau récapitulatif des énergies d'activation et des V_M à 30°C des différentes fractions membranaires.

Ces résultats montrent que :

- Chaque fois que le stérol n'est pas présent dans la membrane, cela a pour conséquence d'augmenter significativement l'activité NADPH oxydase de 30 - 36 %.
- La rigidité de la membrane se traduit par une augmentation de l'énergie d'activation de l'activité NADPH oxydase. Par conséquent, la réaction de production d'O₂⁻ peut être contrôlée par rapport à l'environnement membranaire.

- L'addition de l'ergostérol à la fraction membranaire de RE diminue la production d'anion superoxyde de 20 % alors que son ajout au DMPC-PL diminue l'activité de 65 %. Donc le renforcement de la bicouche lipidique *via* le stérol inhibe l'activité NADPH oxydase.

7. Conclusion

L'ensemble de ces données obtenues sur les fractions membranaires plasmique et du RE puis comparées à celles obtenues sur le Cyt_b₅₅₈ reconstitué en PL apporte des informations nouvelles concernant le rôle de l'environnement membranaire sur l'activité NADPH oxydase.

D'abord, nous avons confirmé que la maturation du Cyt_b₅₅₈ tant au niveau de sa glycosylation que la coupure de la pré-séquence d'adressage à la membrane s'effectue au cours de son passage dans la membrane du RE. La colocalisation dans les fractions membranaires de gp91^{phox} et de p22^{phox} suggère qu'une dimérisation a également lieu à ce niveau. L'insertion des hèmes semble avoir lieu séquentiellement après l'étape de maturation.

Comme, nous avons observé que l'activité NADPH oxydase diffère selon qu'il s'agisse de la membrane du RE ou la membrane plasmique. Nous avons dans ce travail tenté d'identifier l'origine de cette différence de comportement entre les deux types de membranes et d'amener ainsi des perspectives sur l'influence des stérols sur l'activité de la NADH oxydase.

L'activité NADPH oxydase augmente avec la température. Très peu de données sont disponibles dans la littérature sur ce sujet. Seule une étude de la dépendance en température de la NADPH oxydase dans les éosinophiles a été décrite (285) où il a été montré qu'au-delà de 30°C, la protéine se dénature. On y retrouve une énergie d'activation comparable à celle que nous avons trouvée dans la membrane plasmique de la levure ou DOPC-PL. cette sensibilité où la température est proche de celui que nous avons observé en DOPC-PL diminue vers 35 °C. Cela n'est pas le cas des membranes de levure où quel que soit la membrane d'organelle utilisée, la protéine reste fonctionnelle jusqu'à une température > 40 °C.

La composition en acides gras des membranes de la levure et celle des neutrophiles est très différente. Nous avons déterminé la composition en acides gras dans la fraction membranaire totale (277) et constaté que les membranes de *P. pastoris* sont enrichies en acides gras saturés par rapport aux membranes des neutrophiles (Figure 73). Cela suggère que la membrane des neutrophiles est probablement plus fluide que celle des levures et stabilise moins bien la NADPH

oxydase à des températures élevées (il serait intéressant de vérifier avec les membranes de neutrophiles). Cette différence peut expliquer aussi la concentration différente qu'il est nécessaire d'ajouter en acide arachidonique pour obtenir une activité oxydase optimale en levures (750 μ M) ou neutrophiles (200 μ M).

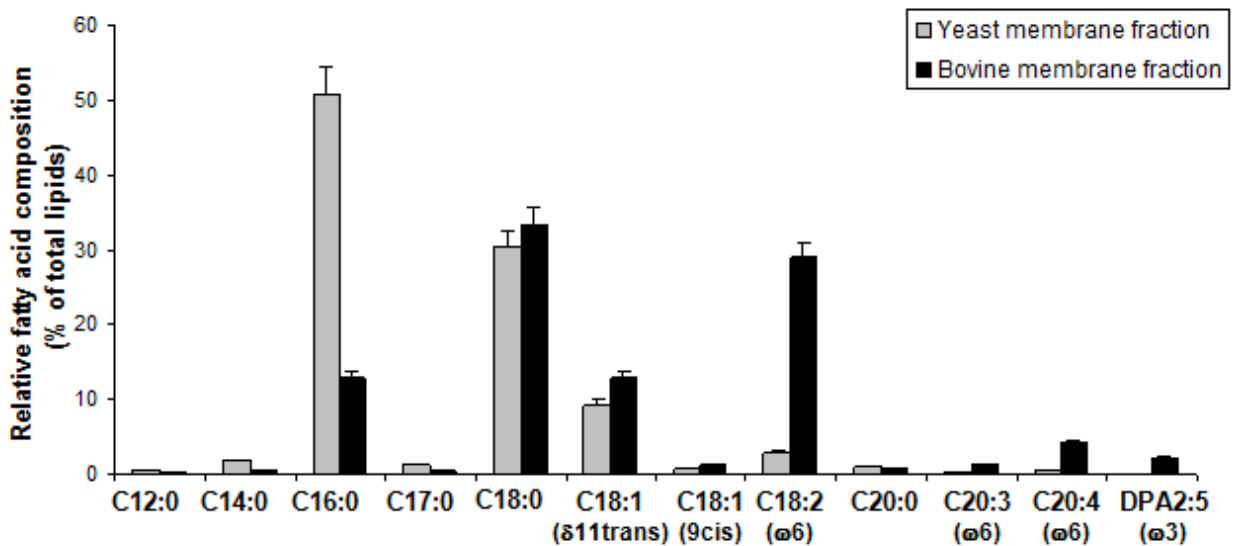


Figure 73: La composition en acides gras des membranes de la levure *P. pastoris* et de neutrophiles.

Les FM de *P. pastoris* (barres grises) et des fractions membranaires des neutrophiles bovins (barres noires). L'identification des lipides a été effectuée en utilisant des composés de référence. Les pics sont exprimés en pourcentages relatifs par rapport aux lipides totaux.

L'ensemble de l'étude nous permet de montrer que l'environnement membranaire régule l'activité oxydase :

❖ **L'état physique de la membrane :**

- Plus la membrane est constituée de lipides à chaînes courtes et saturées, plus la vitesse de production de l'anion superoxyde sera grande.
- Une rigidité de la membrane augmente l'énergie d'activation de l'activité oxydase suggérant que lorsque les lipides sont dans la phase gel, plus d'énergie est nécessaire pour produire de l'anion superoxyde par la NADPH oxydase

La vitesse de production d' $O_2^{\cdot -}$ est donc dépendante de la nature physique de la membrane.

Cependant la production de l'anion superoxyde faite suite à une succession de processus d'interactions protéine - protéine destinées à la régulation et l'activation de l'enzyme. Ces mécanismes complexes ne semblent pas être ici des facteurs limitants.

❖ Rôle du stérol dans les membranes

Nous avons clairement montré que le stérol a deux effets sur l'oxydase : d'une part, sa présence dans la membrane induit une diminution de la production des ROS, et d'autre part, par un phénomène d'atténuation de la T_m d'une membrane, l'ergostérol fluidifie la membrane si celle-ci est rigide. De fait, cela diminue l'énergie d'activation de l'activité oxydase. Ce double rôle du stérol dans la membrane est majeur puisqu'il facilite l'activation de l'oxydase dans la membrane plasmique (E_{ao} diminue) mais en contre partie est capable de brider son activité.

Les stérols permettent de réguler très efficacement l'activité NADPH oxydase en contrôlant très efficacement la fluidité et la viscosité de la membrane (229). L'ajout du stérol permet d'augmenter la micro-viscosité des membranes, ce qui signifie que les chaînes d'acides gras des phospholipides sont mieux organisées et plus serrées (290). Les stérols comme le cholestérol sont particulièrement présent au niveau des radeaux lipidique (ou rafts lipidiques : RLs). Ces microdomaines membranaires enrichis également en sphingolipides sont connus par leur capacité à former des réseaux de signalisation impliqués dans la régulation des activités ou des fonctions cellulaires (250).

Il y a très peu de travaux qui ont étudié la distribution et la régulation des protéines NOX au niveau cellulaire. Ces travaux qui ont tous été réalisés en cellules, ont effectivement suggéré que le $Cytb_{558}$ pourrait être localisé au niveau des RLs. Nous avons observé que la déplétion du cholestérol par la $M\beta CD$ permet d'augmenter la production d'anion superoxyde. Ce résultat est tout à fait en accord avec les travaux de Han *et coll.* Qui ont montré que la déplétion en cholestérol des cellules rénales humaines augmentait aussi la production de ROS. Ces travaux ont suggéré que les RLs jouent un rôle crucial dans le maintien de la NADPH oxydase dans un état inactif (251). Ici nous confirmons cette hypothèse par les expériences obtenues à la fois sur membranes de *P. pastoris* ou sur protéoliposomes.

Néanmoins, d'autres travaux ont montré des résultats différents. Parmi lesquels les travaux de Shao *et coll.* qui montre aucun changement de production d'anion superoxyde suite au traitement des membranes avec du $M\beta CD$ mais un retard considérable de l'activation. Ces

auteurs ont suggéré que les LR affectent l'assemblage des protéines cytosoliques à la membrane(247).

D'autres résultats observés ont montré que l'extraction du cholestérol des membranes diminue la production de l'anion superoxyde. Vilhardt et *coll.* ont trouvé que la production de l'anion superoxyde par la NADPH oxydase des neutrophiles est inhibée par la déplétion du cholestérol en cellule HL60 ou en système acellulaire et ont attribué cela à une altération de la translocation des protéines cytosoliques à la membrane. En accord avec ces résultats, Malla et *coll.* ont étudié l'expression et la régulation du Cytb₅₅₈ par les LR dans les cellules cancéreuses du sein et ont observé que gp91^{phox} et p22^{phox} sont co-localisés avec les LR. La perturbation des LR par la MβCD diminue la production des ROS et diminue l'expression des protéines membranaires de l'oxydase (252).

Tous ces études appuient sur la notion que le stérol (cholestérol chez les cellules de mammifères), un composant essentiel des LR, affecte l'activité basale de la NADPH oxydase et la production des ROS *via* la stimulation ou l'inhibition.

Les résultats présentés dans ce manuscrit, s'appuient sur le fait que le stérol (ergostérol chez la levure) a un effet régulateur sur l'activité NADPH oxydase. Le traitement des membranes plasmiques avec la MβCD a provoqué la perturbation de l'organisation lipidique de la membrane au niveau des LR. Cette perturbation provoque une augmentation de l'activité NADPH oxydase d'un facteur 3. Ce résultat est confirmé lorsque l'ergostérol est rajouté à la membrane du réticulum, la production de l'O₂⁻ a diminué d'un facteur deux. Cela suggère que l'ergostérol module l'activité NADPH oxydase, il n'inhibe pas la production d'anion superoxyde mais la modère.

***CHAPITRE IV: EFFET DES ISOMERES DE L'ACIDE
ARACHIDONIQUE SUR LE COMPLEXE NADPH
OXYDASE***

Ce travail a fait l'objet de la publication d'un article intitulé « *Trans* Arachidonic acid isomers inhibit NADPH-oxidase activity by direct interaction with enzyme components » (*BBA Biomembranes*, 2012, voir annexe n° 2).

1. Introduction

Lors de la phagocytose d'un pathogène, la NADPH oxydase produit massivement des anions superoxyde dans le phagosome. Le volume de celui-ci est petit et par conséquent la production totale de l'anion superoxyde est importante et a été estimée entre 1 et 4 M. Paradoxalement les radicaux superoxydes sont peu réactifs vis-à-vis de la majorité des molécules biologiques. Leur toxicité s'effectue de manière indirecte puisque en réagissant avec l'eau, les radicaux superoxydes réagissent avec H₂O₂ pour donner des radicaux OH[•] ou bien avec des radicaux NO[•] et conduire à l'apparition de peroxy-nitrites dont la toxicité est bien connue. L'anion superoxyde peut aussi être toxique de manière directe par dismutation spontanée rapidement en H₂O₂, ce dernier pouvant diffuser facilement au travers des membranes et réagir. Dans le phagosome, ces espèces sont responsables directement ou indirectement de nombreux dommages oxydatifs (ADN, protéines, lipides) du pathogène. Néanmoins aucuns travaux n'avaient été effectués jusque-là sur les conséquences de ces espèces sur le fonctionnement de l'enzyme qui est l'origine de cette production massive d'espèces réactives de l'oxygène : la NADPH oxydase. Récemment, dans l'équipe, il a été montré que les cibles privilégiées des radicaux sont les fractions membranaires contenant la partie catalytique de l'enzyme, le Cytb₅₅₈, mais aussi une des protéines cytosoliques p67^{phox} (291). Dans cette partie du travail, nous nous sommes intéressées à une autre cible potentielle des espèces réactives de l'oxygène qui est l'activateur lui-même de la NADPH oxydase : l'acide arachidonique.

2. L'acide arachidonique

Lors de l'activation des neutrophiles il y a translocation de l'enzyme cytosolique phospholipase A2 (CPLA2) qui clive préférentiellement les phospholipides ayant un acide arachidonique en position 2 (292-293). Ces acides gras étant les composants principaux des phospholipides et des sphingolipides, la régulation de leur synthèse conditionne celle de la membrane. Ils servent aussi à ancrer certaines protéines dans les membranes cellulaires. Le rôle des acides gras comme l'acide arachidonique (5C, 8C, 11C, 14C-C20:4, *cis*-AA) est crucial dans l'activation de la NADPH oxydase puisqu'il participe aussi à l'activation des kinases

EFFET DES ISOMERES DE L'AA SUR LE COMPLEXE NADPH OXYDASE

responsables du processus de phosphorylation des protéines cytosoliques. Il a été également démontré que les acides gras polyinsaturés à longue chaîne sont directement impliqués dans le processus d'assemblage de la NADPH oxydase et de production d'anion superoxyde, en mentionnant l'acide arachidonique comme l'activateur le plus puissant. *In vitro*, il a été montré que cet acide gras provoque des changements structuraux aux niveaux des différentes composantes cytosoliques qui conduisent à l'assemblage du complexe NADPH oxydase (294).

Dans les cellules eucaryotes, la géométrie courante des acides gras insaturés est la configuration *cis*. La modification de la géométrie *cis* à la géométrie isomère *trans* est un événement anormal (Figure 74). Cela peut se produire de manière exogène, avec l'apport d'acides gras *trans* présent dans les aliments contenant des huiles végétales partiellement hydrogénées, désodorisées ou transformées à haute température (295-296). De plus on sait que, sous irradiation ou sous l'action de radicaux libres, les doubles liaisons des acides gras peuvent subir une isomérisation (297). Par conséquent, par voie endogène, un enrichissement en acides gras insaturés de configuration *trans* peut aussi avoir lieu dans la cellule au cours de l'activité de la NADPH oxydase. Il a été observé précédemment sur des cellules que le changement de configuration géométrique naturelle des lipides insaturés peuvent aussi affecter l'activité NADPH oxydase (298).

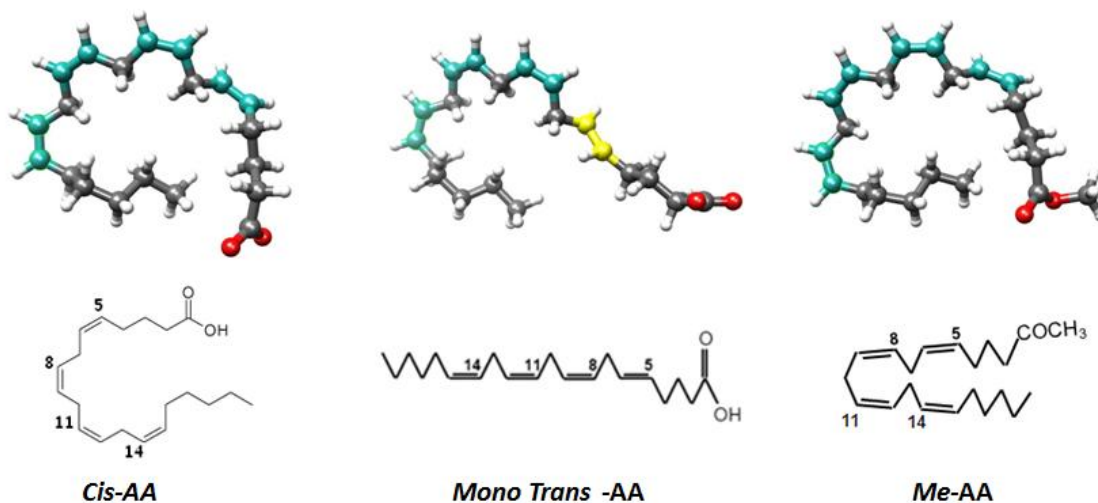


Figure 74 : Structures chimiques des deux isomères d'AA et du méthyl-ester arachidonate

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au niveau moléculaire à l'importance de la géométrie de l'acide arachidonique sur le fonctionnement de la NADPH oxydase.

3. Géométrie *cis-trans* de l'AA et activation du complexe NADPH oxydase

Nous avons comparé le profil d'activation dose-réponse caractéristique sous forme de cloche (voir explication *chapitre I*) en fonction de la présence de l'AA sous sa forme *cis* ou *trans* dans le système acellulaire (Figure 75).

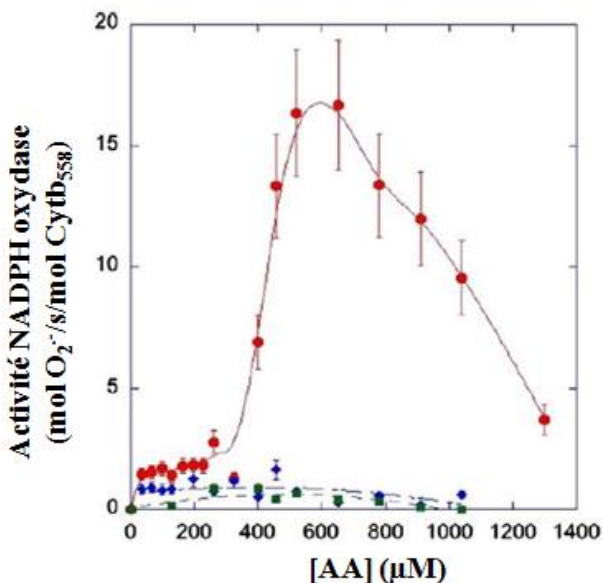


Figure 75 : Activation du complexe NADPH oxydase par différents isomères d'AA.

La production d'anion superoxyde a été mesurée par le suivi de réduction du cyt *c* à 550 nm comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Les fractions membranaires de levure ont été incubées 5 min en présence des protéines cytosoliques recombinantes avec différentes concentrations du *cis*-AA (cercle rouge), *trans*-AA (losange bleu) ou le *me*-AA (carré vert). Les résultats sont présentés comme la moyenne de quatre expériences indépendantes.

Nous avons constaté que, contrairement au *cis*-AA, le *trans*-AA ne peut induire aucune production d'anion superoxyde (Figure 75). Cette absence d'activation a été expliquée comme étant due à l'absence de la charge négative présente dans *me*-AA indispensable à l'activation des protéines cytosoliques de la NADPH oxydase. Comme contrôle négatif, nous avons effectué la même expérience en présence du méthyle-ester arachidonate décrit comme étant incapable d'activer la NOX. En effet, lorsque le méthyle ester est utilisé à la place de l'activateur *cis*-AA, aucune production d'anion superoxyde n'est constatée (61, 299). L'absence d'activation par le *trans* AA indique que, contrairement au *cis*-AA, l'isomère *trans* est incapable d'activer le complexe NADPH oxydase même s'il contient la charge négative semblable à la forme *cis*.

Des résultats similaires ont été aussi obtenus pour l'étude de l'activité NADPH oxydase en utilisant des membranes de neutrophiles à la place des membranes *P. pastoris*.

4. Effet inhibiteur du *trans*-AA sur l'activité NADPH oxydase

Nous avons voulu savoir si le *trans*-AA est en fait un inhibiteur de l'oxydase. Pour cela, on s'est placé au maximum d'activité NADPH oxydase puis l'AA sous forme *cis* ou *trans* a été progressivement ajouté (Figure 76).

En se plaçant au maximum d'activité et en ajoutant *trans*-AA, nous nous trouvons dans la zone décroissante de la courbe en cloche. Ainsi avec l'ajout progressif du *cis*-AA, l'activité NADPH oxydase induite par le *cis*-AA diminue forcément jusqu'à environ 50 %. Cependant, lorsque ce dernier est remplacé par *trans*-AA, cette chute est alors de 70 %. Ces résultats indiquent que l'effet inhibiteur du *trans*-AA résulte de la synergie de deux actions: une inhibition non spécifique et une inhibition spécifique.

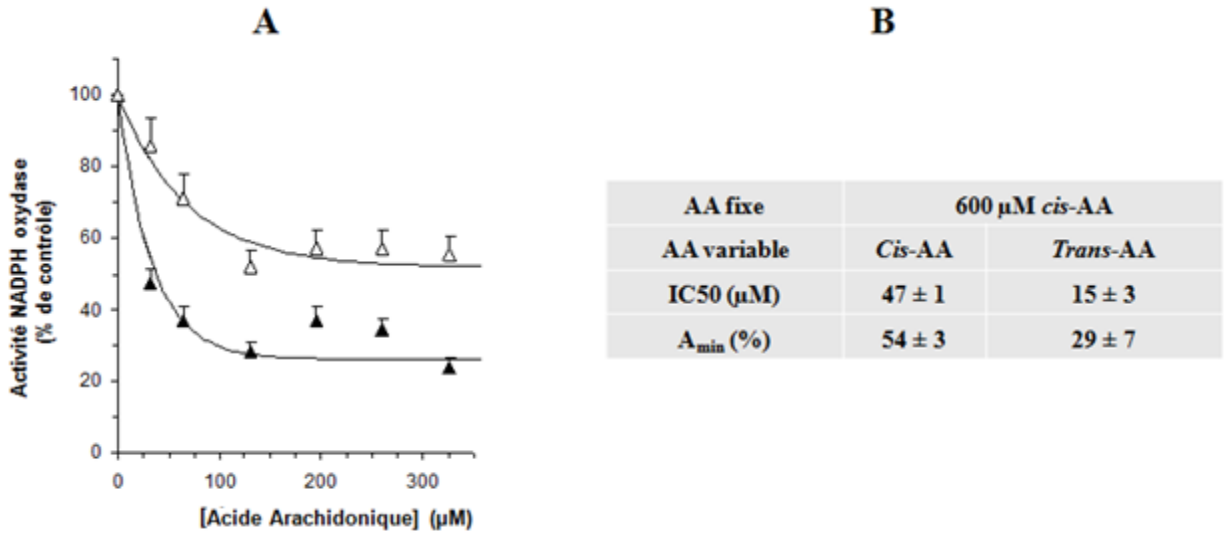


Figure 76 : Inhibition de l'activité NADPH oxydase par l'isomère *trans* de l'AA en utilisant les membranes de levure.

(A) La fraction membranaire de levure et les protéines cytosoliques recombinantes ont été incubé en présence de 600 µM *cis*-AA avec ajout de concentrations croissantes de *trans*-AA (triangles noirs) ou du *cis*-AA (triangles vides) ;
 (B) tableau représentant les constantes cinétiques selon l'équation 7.

Les dépendances de l'activité NADPH oxydase (A) en fonction de la concentration en AA ont été ajustées en utilisant l'équation 7 à l'aide du logiciel GraphPad prism 5 :

$$A = A_{\min} + \frac{\Delta A}{1 + 10^{\log(\text{IC}_{50}-[\text{AA}])x_n}} \quad \text{(Equation 7)}$$

EFFET DES ISOMERES DE L'AA SUR LE COMPLEXE NADPH OXYDASE

Où n est la constante de Hill et ΔA la différence entre l'activité minimale et la maximale. Ces ajustements des courbes donnent des valeurs de la concentration inhibitrice médiane (IC50) de $15 \pm 3 \mu\text{M}$ et $47 \pm 1 \mu\text{M}$ respectivement pour *trans*-AA et *cis*-AA.

Des résultats comparables ont été obtenus avec la fraction membranaire bovine.

Une expérience complémentaire a été effectuée dans laquelle l'activité est suivie, en présence d'une concentration constante de *trans*-AA (100 μM) et des concentrations variables de *cis*-AA (Figure 77). L'activité NADPH oxydase maximale induite par l'addition de *cis*-AA atteint seulement 40% de la valeur obtenue dans l'expérience de contrôle dans lequel 100 μM *cis*-AA ont été ajouté au lieu de 100 μM *trans*-AA. Dans ce cas, la valeur IC50 pour le *cis*-AA n'est pas affectée par la présence de l'isomère *trans*. Ce résultat suggère que l'inhibition est compétitive.

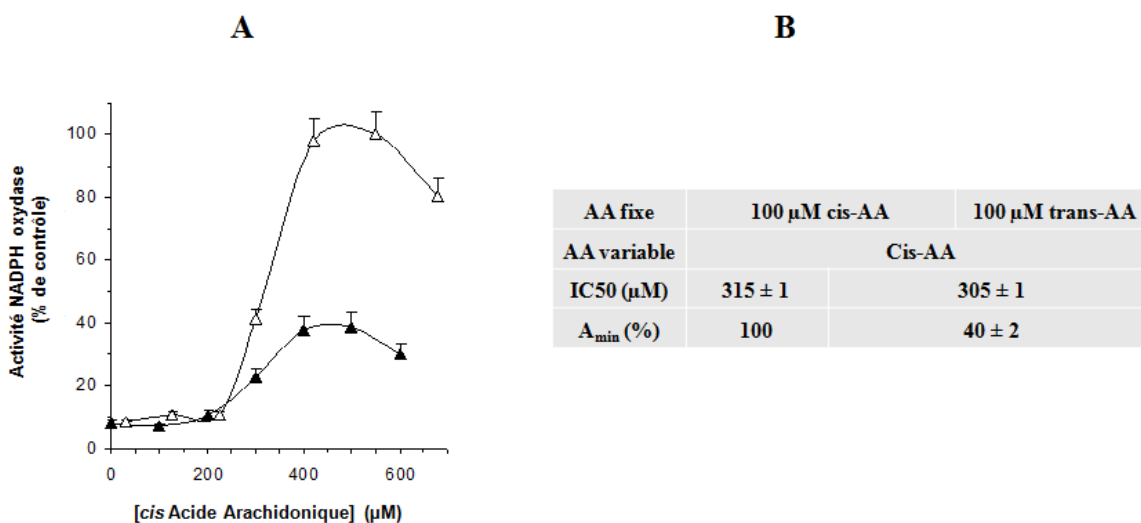


Figure 77 : Inhibition de l'activité NADPH oxydase par l'isomère trans de l'acide arachidonique en utilisant les membranes de levure.

(A) La fraction membranaire de levure et les protéines cytosoliques recombinantes ont été incubé en présence de 100 μM du *trans*-AA (triangles noirs) ou du *cis*-AA (triangles vides) avec ajout de concentrations croissantes du *cis*-AA. (B) tableau représentant les constantes cinétiques selon l'équation 7.

5. Identification des protéines ciblées par le *trans*-AA

Dans le but de comprendre de quelle manière *trans*-AA inhibe l'activité de la NADPH oxydase, nous avons tenté d'identifier ses cibles protéiques. Pour cela, nous avons incubé la membrane et les protéines cytosoliques simultanément ou séparément avec l'un des deux isomères de l'acide arachidonique (*cis* ou *trans*) (Figure 78). Puis mesuré la capacité du système à produire l' $\text{O}_2^{\cdot-}$. Nous avons d'abord constaté que dès lors que les fractions membranaires et cytosoliques sont incubées séparément en présence du *cis*-AA puis mélangées juste avant la

EFFET DES ISOMERES DE L'AA SUR LE COMPLEXE NADPH OXYDASE

mesure de l'activité, l'assemblage ne se fait pas de manière optimale puisque seulement 10 % d'activité est mesurée (Figure 78, barre noire). Cela montre que les interactions protéine-protéine et protéine-phospholipides qui ont lieu au cours de l'incubation sont nécessaire pour donner lieu à un complexe actif. Très peu de production d' $O_2^{\cdot-}$ est observé également en absence d'AA (Figure 78, barre verte) ou bien en présence du *trans* AA (Figure 78, barre rouge).

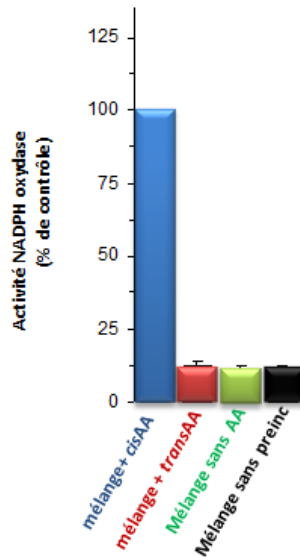


Figure 78 : Activité NADPH oxydase en système acellulaire avec différentes conditions de pré-incubation.

La fraction membranaire et les protéines cytosoliques ont été incubées 5 min en présence de 600 μ M *cis*-AA ou *trans*-AA ou sans l'addition d'AA. Un autre contrôle a été réalisé qui consiste à ajouter 600 μ M *cis*-AA à la totalité des composants mais sans temps de pré-incubation et la mesure d'activité a été réalisée immédiatement après l'ajout du NADPH. Les résultats sont présentés comme la moyenne des trois expériences indépendantes.

Afin de tenter d'identifier la cible protéique du *trans*-AA, nous avons effectué des tests d'activité NADPH oxydase où les fractions cytosoliques et membranaires ont été pré-incubées séparément (Figure 79). L'ajout de l'isomère *trans* à la fraction membranaire et la fraction cytosolique donne lieu à une production faible d' $O_2^{\cdot-}$ (<12%) (Figure 79; barres vertes). Une production d' $O_2^{\cdot-}$ d'environ 50 % est observée dès lorsque le *cis*-AA est présent (Figure 79; barres oranges).

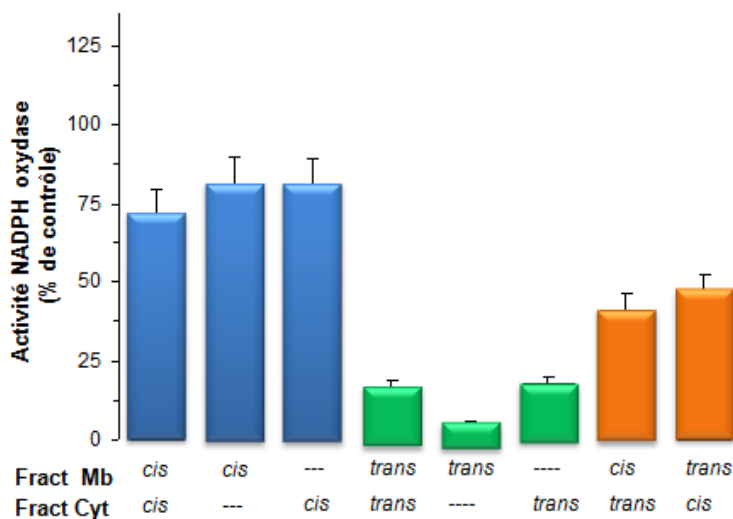


Figure 79 : Activité NADPH oxydase en système acellulaire avec différentes conditions de pré-incubation.

La fraction membranaire de levure et les protéines cytosoliques ont été incubées séparément en présence ou en absence du *cis* ou *trans* acide arachidonique. L'activité induite après l'incubation de l'ensemble des composantes de la NADPH oxydase en présence de *cis*-AA est considérée comme la valeur de référence (100%) (La barre bleue figure 88). Les résultats sont présentés comme la moyenne des trois expériences indépendantes.

Pour résumer, ces résultats nous laisse proposer que l'isomère *trans*-AA agit à la fois sur la fraction membranaire et les partenaires cytosoliques. Ces résultats suggèrent non seulement l'incapacité de *trans*-AA à activer le complexe NADPH oxydase, mais montrent aussi sa capacité d'inhiber le processus d'activation de l'oxydase.

6. Effet du *trans* acide arachidonique sur le *Cytb*₅₅₈

Puisque nous avons montré que *trans*-AA cible à la fois les protéines cytosoliques mais aussi la fraction membranaire, nous avons voulu étudier dans quelle mesure *trans*-AA vise directement le *Cytb*₅₅₈. Pour cela, nous avons utilisé un protocole spectrophotométrique précédemment utilisé par le groupe de Doussière (61) qui permet de discriminer la transition du spin du fer hémique en utilisant du *ter*-butyl-isocyanide inhibiteur de l'hème (Figure 80).

Dans ces travaux, ils ont montré que *cis*-AA facilitait l'accessibilité du *ter*-butyl-isocyanide à l'hème et ainsi la transition de l'état de spin du fer de l'hème qui est identifiable dans le spectre de différence d'absorption.

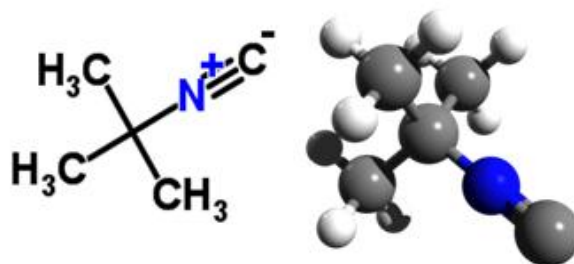


Figure 80 : Structure du ter-butyl-isocyanide

Au préalable, nous avons vérifié si chaque composé séparément (isomères AA ou inhibiteur) a un effet sur les spectres de différence d'absorption. Aucun changement spectral n'a été observé (Figure 81).

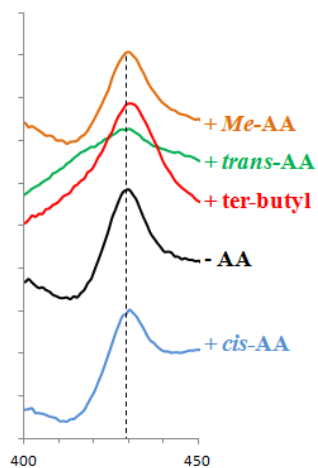


Figure 81 : Spectres de différence d'absorption du $Cytb_{558}$ recombinant en présence de différents isomères d'AA et de l'inhibiteur de l'hème.

Les fractions de la membrane plasmique de la levure exprimant le $Cytb_{558}$ sont traitées avec 600 μM d'un des isomères de l'acide arachidonique ou avec 30 mM ter-butyl-isocyanide. Ensuite incubées 5 min à 25 °C. La réduction du $Cytb_{558}$ a été faite avec 20 mM dithionite et est traité avec un des composés.

Ensuite nous avons enregistré les spectres d'absorption du $Cytb_{558}$ recombinant en présence de ter-butyl-isocyanide avec les isomères d'AA (Figure82).

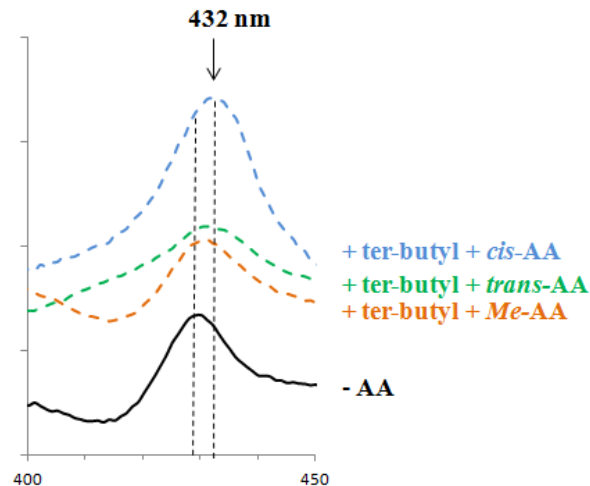


Figure 82 : L'effet des isomères de l'AA et le ter-butyl-isocyanide sur le spectre de différence d'absorption du Cytb₅₅₈ recombinant.

Les fractions de la membrane plasmique de la levure exprimant le Cytb₅₅₈ sont traitées avec 600 µM d'un des isomères de l'acide arachidonique avec 30 mM ter-butyl-isocyanide. Ensuite incubées 5 min à 25 °C. La réduction du Cytb₅₅₈ a été faite avec 20 mM dithionite et le Cytb₅₅₈ réduit est traité avec la concentration adéquate d'un des isomères de l'acide arachidonique et on y rajoute 30 mM du ter butyl isocyanide.

Comme observé précédemment, l'ajout du *cis*-AA (Figure 82, spectre bleu) à la fraction membranaire en présence du ter-butyl-isocyanide induit le déplacement de la bande de Soret du 429 à 432 nm indiquant une fixation du ter-butyl-isocyanide au niveau de l'hème. Contrairement au *cis*-AA, l'addition du *trans*-AA (Figure 82, spectre vert) ou du *me*-AA ((Figure 82, spectre orange) n'a pas modifié le spectre de différence d'absorption. Ces résultats indiquent que contrairement à l'isomère *cis*-AA, le *me*-AA ne facilite pas la fixation du ter-butyl-isocyanide au niveau de l'hème du Cytb₅₅₈ membranaire.

7. Effet du *trans*-AA sur la translocation des fractions cytosoliques à la membrane

Nous avons voulu analyser dans quelle mesure l'isomère *trans*-AA agit sur les étapes qui conduisent à l'assemblage. Il a été décrit précédemment que dans les expériences réalisées en système acellulaire la durée d'incubation de 5 min est nécessaire pour permettre la translocation des composantes cytosoliques à la membrane et de rester stable pendant plusieurs minutes (299).

Dans notre système acellulaire 5 min d'incubation sont en effet également nécessaires pour assurer une production constante de l'anion superoxyde indiquant un assemblage complet (291). Pour tester l'effet des isomères d'AA sur la translocation, nous avons réalisé une co-sédimentation de la fraction membranaire de levure avec les composantes cytosoliques par

EFFET DES ISOMERES DE L'AA SUR LE COMPLEXE NADPH OXYDASE

ultracentrifugation en présence des différents isomères d'AA et analysé leur répartition par immunoblot en utilisant des anticorps spécifiques aux protéines cytosoliques.

Brièvement, nous avons mis les fractions membranaires et cytosoliques en présence des isomères d'AA : *cis*, *trans* et *me*. Après une incubation de 5 min à 25°C, les fractions membranaires et solubles sont séparées par centrifugation (150,000 x g pendant 30 minutes à 15°C) sur gradient de sucrose discontinu (1,5 mL de 10 % (w/v), 6,5 mL de 15 % (w/v) et 2 mL de 50 % (w/v) de sucrose préparé dans le tampon 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA et 10 mM NaN₃). Après centrifugation le haut du tube (surnageant) et le bas du tube (culot) sont prélevés. Le haut du tube contient les protéines solubles non transloquée à la membrane et le culot contient la fraction membranaire avec ou non les protéines cytosoliques associées. Les protéines cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox} présentes sont identifiées dans chaque situation par Western blot en utilisant soit un anticorps anti-p47^{phox} soit anti-p67^{phox}.

Cette expérience nous permet ainsi de suivre les protéines cytosoliques qui ont été transloquée à la membrane, et celles non assemblées restées dans le surnageant du gradient selon l'isomère de l'AA ajouté.

Comme cela est montré dans la figure 83, les échantillons incubés en présence de *cis*-AA conduisant à des signaux avec l'anti p47^{phox} (Figure 83; A) et avec l'anti-p67^{phox} (Figure 83; B).

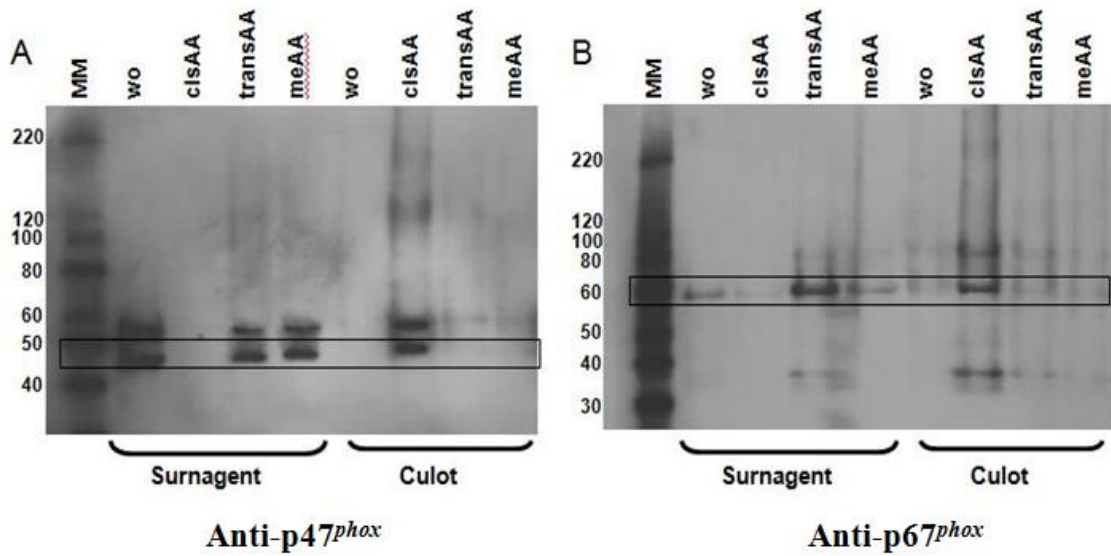


Figure 83: Effet des isomères d'AA sur l'assemblage du complexe NADPH oxydase.

La fraction membranaire de levure enrichie en Cytb₅₅₈, p47^{phox}, p67^{phox} et RacQ61L sont incubés ensemble pendant 5 min en présence ou en absence du *cis*-AA, *trans*-AA ou *me*-AA. Le Western blot a été réalisé en utilisant des anticorps polyclonaux : anti p47^{phox} (A) ou anti p67^{phox} (B).

Ces résultats sont cohérents avec l'idée que *cis*-AA favorise la translocation des cytosoliques à la membrane. Cela est confirmé par l'expérience contrôle négatif où l'incubation s'est fait en absence du *cis*-AA, montrant aucun signal de présence du p47^{phox} ou p67^{phox} associé à la fraction membranaire. En revanche, la pré-incubation avec *trans*-AA et *me*-AA conduisent également à des signaux correspondant à p47^{phox} et p67^{phox} principalement dans le surnageant indiquant que la translocation vers la membrane de ces protéines n'a pas eu lieu en présence de *trans* et *me*-AA.

8. Conclusion

Dans cette partie de travail, nous avons montré que la forme *trans*-AA n'est pas capable d'activer le complexe NADPH oxydase, contrairement à la forme *cis*-AA. En plus cet isomère peut inhiber la production de l'anion superoxyde par une interaction directe avec la composante cytosolique p67^{phox} et avec la fraction membranaire et probablement indirectement par modification des propriétés physiques de la membrane. Son effet joue à la fois sur les protéines cytosoliques et membranaires.

Il est rapporté que les molécules amphiphiles conduisent à des changements de conformation sur p47^{phox} semblables à ceux induits par les modifications post traductionnelles

EFFET DES ISOMERES DE L'AA SUR LE COMPLEXE NADPH OXYDASE

telles que la phosphorylation qui induit à l'activation de l'oxydase (183-184). Ces changements activent l'oxydase en favorisant la fixation du domaine SH3 de p47^{phox} à la sous-unité p22^{phox} du Cytb₅₅₈(145), la sous unité p67^{phox} subit aussi quelques phosphorylations mais leur rôle n'est pas encore clairement établi mais c'est possible qu'un site de phosphorylation de la région C-terminale sont masqué par la région N-terminale de la protéine intacte, et ne devienne accessible qu'après un changement de conformation de la protéine (300-302).

Par ailleurs, il a été démontré par des analyses RET (transfert d'énergie par résonance) que le *cis*-AA, le SDS et le dodécylsulfate de lithium (LDS) induisent des changements conformationnels du flavocytochrome *b*₅₅₈ (61, 261, 303)

Pour être efficace, les molécules activatrices doivent partager des caractéristiques similaires: une tête polaire anionique et une longue chaîne hydrophobe avec une fonction alkyle (24, 261, 294, 304). Curieusement, la forme *trans*-AA possède aussi ces caractéristiques.

Nos résultats montrent que *trans*-AA peut interagir avec p47^{phox} et p67^{phox} mais n'autorise pas l'assemblage du complexe NADPH oxydase, puisque l'expérience de co-sédimentation montre qu'il n'y a pas de translocation des protéines cytosoliques à la membrane en présence de *trans*-AA. Cela est également en cas d'absence d'AA. L'absence de translocation vers la membrane en présence de *me*-AA pourrait être due à l'absence de la partie anionique, à laquelle avait été attribué un rôle important dans la formation des formes actives des protéines cytosoliques. En revanche, l'effet du *trans*-AA est plus subtil puisque l'absence de co-translocation vers la membrane en présence du *trans*-AA ne peut être attribuée à la charge. Par spectroscopie de fluorescence de Tryptophane, nous avons aussi étudiés dans le groupe (206) l'effet des concentrations des différentes formes d'AA sur le spectre de fluorescence. Alors que les spectres de fluorescence de p47^{phox} évoluent de manière similaire avec les concentrations de *cis* ou *trans*-AA, ceux de p67^{phox} se comporte différemment. Cela suggère que les changements induits sur p67^{phox} par *trans*-AA sont différents de ceux induits par *cis*-AA et pourraient donc être à l'origine de l'incapacité de celui-ci à interagir avec la membrane.

Nous avons aussi montré que l'isomère *trans*-AA, contrairement au *cis*-AA, ne facilite pas la fixation d'uter-butyl-isocyanide à l'hème du Cytb₅₅₈ comme l'indique l'absence de modification du spectre de différence d'absorption du Cytb₅₅₈ (Figure 82). Ce résultat est en accord avec l'hypothèse avancée par le groupe de Doussière dans lequel le processus d'activation de la NADPH oxydase dépend de l'état de spin du fer hémique et que l'AA participe à cette

EFFET DES ISOMERES DE L'AA SUR LE COMPLEXE NADPH OXYDASE

transition du spin. Dans les conditions expérimentales décrites ici, *trans*-AA ne favorise pas cette transition de spin cela suggère que les interactions mises en jeu entre l'AA et le Cyt_{b558} sont moins favorisées avec l'isomère *trans*.

CONCLUSIONSET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La NADPH-oxydase est un des éléments clés du mécanisme de défense des cellules phagocytaires du système immunitaire inné des organismes supérieurs. Ces cellules constituent la première ligne de défense contre les agents infectieux. La NADPH oxydase est une machinerie protéique complexe formée par des quatre sous-unités cytosoliques, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, et la protéine Rac et une protéine membranaire le flavocytochrome *b*₅₅₈. L'assemblage de l'ensemble des protéines conduit à un complexe enzymatique actif capable de produire l'anion superoxyde précurseurs des ROS.

La réussite de production du Cytb₅₅₈ intègre et fonctionnel exprimé chez la levure *P. pastoris* sur petit volume de culture (206) a initié ce travail de thèse dont l'enjeu était en partie de pouvoir produire et purifier le Cytb₅₅₈ en grande quantité pour des études biophysiques.

Afin de pouvoir avancer vers la caractérisation structurale et fonctionnelle du Cytb₅₅₈, nous avons été amenées à contrôler l'expression de la protéine recombinante dans la levure *P. pastoris* en effectuant des contrôles rigoureux au niveau génomique et phénotypique. Enfin, de la comparaison des propriétés spectrales et fonctionnelles du Cytb₅₅₈ natif en membrane de neutrophiles, nous avons pu conclure que le Cytb₅₅₈ recombinant en membrane de levures de cultures obtenues à grande échelle possède les mêmes caractéristiques.

Cette vérification nous a donc poussés à poursuivre la purification du Cytb₅₅₈ recombinant dans le but d'en obtenir en qualité et quantité suffisante. Plusieurs combinaisons de techniques de chromatographie ont été utilisées et nous avons été amenés à contourner plusieurs difficultés. Cette partie du travail a été une approche technologique fastidieuse mais néanmoins nécessaire pour aboutir à une protéine la mieux purifiée possible. Néanmoins cela est également le cas pour la purification du Cytb₅₅₈ à partir de membranes de neutrophiles qui est également très difficile et se traduit par une perte énorme au cours de la purification. Avec la levure nous avons en revanche de nombreux avantages comme la reproductibilité et un rendement meilleur puisque nous démarrons la purification à partir d'un litre de culture et non de 10 L de sang de bœuf. En outre le dernier protocole de purification décrit peut encore être amélioré ainsi que le niveau d'expression dans la levure.

Notamment l'étape de purification devrait être améliorée pour une séparation plus fine par la taille (en utilisant très certainement une colonne de chromatographie plus longue et un débit plus faible). D'autre part, la purification pourrait aussi être améliorée en jouant sur les conditions de

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

culture de *P. pastoris*. Au cours des expériences réalisées, nous avons constaté que chaque paramètre est très important pour l'expression du Cyt_{b558} recombinant. La diminution de la température d'induction a conduit à un taux d'expression plus important. Nous avons aussi remarqué que l'aération de la culture (vitesse d'agitation et volume de la culture) joue énormément sur la qualité de la protéine recombinante produite dans la levure. En effet, lorsque la culture est fortement aérée, nous avons observé que le spectre de la fraction membranaire totale présente un pic additionnel (correspondant au Cyt de type *a*) plus important. Un point encore obscur à clarifier est l'absence d'affinité pour la résine Flag alors que l'étiquette est bien présente sur gp91^{phox} comme l'indique les expériences d'immunodétection.

D'autres clones de *P. pastoris* exprimant le Cyt_{b558} ont été réalisés et sont disponibles au laboratoire, possédant d'autres étiquettes pouvant faciliter la purification. En plus, ces clones ont été exprimés dans une autre souche de *P. pastoris* qui semble avoir un meilleur rendement d'expression.

Cependant au cours de ce travail de thèse, j'ai tout de même réussi à élaborer un protocole nous permettant d'avoir un échantillon protéique en Cyt_{b558} suffisant pour des approches biophysiques qui m'ont permis d'aborder des questions plus fondamentales en regard du fonctionnement et de la régulation de la NADPH oxydase. J'ai ainsi entrepris l'étude de la modulation de l'activité de la NADPH oxydase par l'environnement lipidique membranaire (effet de viscosité, épaisseur, charge de la membrane). Nous avons d'abord confirmé que la maturation du Cyt_{b558} s'effectue au cours de son passage dans la membrane du réticulum endoplasmique. La colocalisation de gp91^{phox} et de p22^{phox} suggère qu'une dimérisation a également lieu à ce niveau. Nous avons constaté que la nature de l'environnement lipidique (réticulum endoplasmique, membrane plasmique, liposome) module l'activité de ce complexe enzymatique. Nous avons donc essayé d'identifier l'origine de cette différence de comportement.

Au cours de cette étude, nous avons déterminé les paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'activité NADPH oxydase dans des environnements lipidiques contrôlés. Nos résultats sont en accord avec la seule étude réalisée sur éosinophiles. D'une manière générale, nous avons pu montrer que l'environnement membranaire joue directement un rôle sur la régulation de l'activité oxydase. En effet la production de l'anion superoxyde est modulée par la composition lipidique de la membrane, mais plus particulièrement par la présence du stérol.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nos résultats suggèrent que la présence du stérol dans la membrane provoque une diminution de la production des ROS. Ce qui est en cohérence avec le rôle important des stérols dans la rigidification de la membrane. Il est possible que la présence du Cytb₅₅₈ au niveau des domaines membranaires riches en stérols le maintien dans un état inactif.

Enfin, nous nous sommes également intéressés au rôle de l'activateur de la NADPH oxydase : l'acide arachidonique et plus précisément à l'effet de la conformation *cis/trans* de l'AA sur la NADPH oxydase. Nous avons montré que la forme *trans*-AA n'est pas capable d'activer le complexe NADPH oxydase, contrairement à la forme *cis*-AA. En plus cet isomère peut inhiber la production de l'anion superoxyde par une interaction directe avec la composante cytosolique p67^{phox} et avec la fraction membranaire et probablement indirectement par modification des propriétés physiques de la membrane. Son effet joue à la fois sur les protéines cytosoliques et membranaires.

Ce travail ouvre des perspectives nombreuses sur la possibilité d'étudier le fonctionnement de la NADPH oxydase dans un environnement maîtrisé. La reconstitution en protéoliposomes devrait amener vers des études plus approfondies de la topologie de gp91^{phox} et de p22^{phox}. Nous avons des outils au laboratoire qui pourrait être exploités dans ce but (microscopie de fluorescence, AFM).

Au cours de ce travail de thèse, il y a eu quelques travaux non présentés dans ce mémoire. Parmi lesquels, j'ai effectuée des expériences à l'Institut de Biologie Structurale en collaboration avec Franck Fieschi (Grenoble) dans le but d'étudier l'interaction de la région C-terminale de p22^{phox} avec la protéine p47^{phox} délétée de sa région C-terminale d'interaction avec p22^{phox} (p47^{phox}ΔC-ter) en présence d'AA. Nous avons utilisé la méthode de SPR (surface plasmon resonance). Les résultats obtenus n'ont pas été suffisamment concluants et nécessitait une longue mise au point des conditions expérimentales.

Récemment, nous avons obtenu quelques résultats préliminaires sur la conformation du Cytb₅₅₈ recombinant par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (SR-CD, ligne DISCO, synchrotron SOLEIL) en collaboration avec Frank Wien. Ces données sont encore en exploitation mais suggèrent déjà que la structure secondaire est en accord avec la topologie prédite et que cette conformation conduit à un spectre de dichroïsme circulaire qui est très peu affecté par la température. Ces travaux sont en cours.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Batot, G., Martel, C., Capdeville, N., Wientjes, F., and Morel, F. (1995) Characterization of neutrophil NADPH oxidase activity reconstituted in a cell-free assay using specific monoclonal antibodies raised against cytochrome b558, *Eur J Biochem* 234, 208-215.
2. Segal, A. W., Garcia, R., Goldstone, H., Cross, A. R., and Jones, O. T. (1981) Cytochrome b-245 of neutrophils is also present in human monocytes, macrophages and eosinophils, *Biochem J* 196, 363-367.
3. Warburg, O. (1908) Beobachtungen uber die Oxydationsprozesse im Seeigelei. , *Z Physiol Chem* 57.
4. Baldridge, and Gérard. (1932) The extra respiration of phagocytosis., *Am. J. Physiol*, 235-236.
5. MacLeod, A. J. (1943) The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. , *Am J Physiol* 138, 512-518.
6. J., M. (1943) The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. , *Am J Physiol* 138, 512-518.
7. Sbarra, A. J., and Karnovsky, M. L. (1959) The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes, *J Biol Chem* 234, 1355-1362.
8. Iyer, G., Islam, D., and Quastel, J. (1961) Biochemical aspects of phagocytosis. , *Nature* 192, 535-542.
9. Rossi, F., and Zatti, M. (1964) Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells, *Experientia* 20, 21-23.
10. Klebanoff, S. J. (1970) Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes, *Science* 169, 1095-1097.
11. Babior, B. M., Kipnes, R. S., and Curnutte, J. T. (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent, *J Clin Invest* 52, 741-744.
12. Berendes, H., Bridges, R. A., and Good, R. A. (1957) A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome, *Minn Med* 40, 309-312.
13. Baehner, R. L., and Nathan, D. G. (1967) Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease, *Science* 155, 835-836.
14. Holmes, B., Page, A. R., and Good, R. A. (1967) Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function, *J Clin Invest* 46, 1422-1432.
15. Quie, P. G., White, J. G., Holmes, B., and Good, R. A. (1967) In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood, *J Clin Invest* 46, 668-679.
16. Babior, B. M., Curnutte, J. T., and Kipnes, B. S. (1975) Pyridine nucleotide-dependent superoxide production by a cell-free system from human granulocytes, *J Clin Invest* 56, 1035-1042.
17. Segal, A. W., and Jones, O. T. (1978) Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes, *Nature* 276, 515-517.
18. Segal, A. W., Jones, O. T., Webster, D., and Allison, A. C. (1978) Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease, *Lancet* 2, 446-449.
19. Royer-Pokora, B., Kunkel, L. M., Monaco, A. P., Goff, S. C., Newburger, P. E., Baehner, R. L., Cole, F. S., Curnutte, J. T., and Orkin, S. H. (1986) Cloning the gene for an

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location, *Nature* 322, 32-38.
20. Teahan, C., Rowe, P., Parker, P., Totty, N., and Segal, A. W. (1987) The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245, *Nature* 327, 720-721.
 21. Dinauer, M. C., Orkin, S. H., Brown, R., Jesaitis, A. J., and Parkos, C. A. (1987) The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex, *Nature* 327, 717-720.
 22. Parkos, C. A., Dinauer, M. C., Walker, L. E., Allen, R. A., Jesaitis, A. J., and Orkin, S. H. (1988) Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3319-3323.
 23. Segal, A. W. (1987) Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease, *Nature* 326, 88-91.
 24. 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, 13539-13545.
 25. Heyneman, R. A., and Vercauteren, R. E. (1984) Activation of a NADPH oxidase from horse polymorphonuclear leukocytes in a cell-free system, *J Leukoc Biol* 36, 751-759.
 26. Nuno, H., Rotrosen, D., Gallin, J. I., and Malech, H. L. (1988) Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors, *Science* 242, 1298-1301.
 27. Volpp, B. D., Nauseef, W. M., and Clark, R. A. (1988) Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease, *Science* 242, 1295-1297.
 28. Knaus, U. G., Heyworth, P. G., Evans, T., Curnutte, J. T., and Bokoch, G. M. (1991) Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2, *Science* 254, 1512-1515.
 29. Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C. G., and Segal, A. W. (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1, *Nature* 353, 668-670.
 30. Wientjes, F. B., Hsuan, J. J., Totty, N. F., and Segal, A. W. (1993) p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains, *Biochem J* 296 (Pt 3), 557-561.
 31. Lambeth, J. D., and Neish, A. S. (2013) Nox Enzymes and New Thinking on Reactive Oxygen: A Double-Edged Sword Revisited, *Annu Rev Pathol*.
 32. Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K., and Lambeth, J. D. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1, *Nature* 401, 79-82.
 33. Geiszt, M., Kopp, J. B., Varnai, P., and Leto, T. L. (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8010-8014.
 34. De Deken, X., Wang, D., Many, M. C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J. E., and Miot, F. (2000) Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family, *J Biol Chem* 275, 23227-23233.
 35. Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G., and Lambeth, J. D. (2001) Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5, *Gene* 269, 131-140.
 36. Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., and Sumimoto, H. (2001) A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney, *J Biol Chem* 276, 1417-1423.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

37. Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demaurex, N., and Krause, K. H. (2001) A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes, *J Biol Chem* 276, 37594-37601.
38. Guichard, C., Moreau, R., Pessayre, D., Epperson, T. K., and Krause, K. H. (2008) NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes?, *Biochem Soc Trans* 36, 920-929.
39. Takeya, R., Ueno, N., Kami, K., Taura, M., Kohjima, M., Izaki, T., Nunoi, H., and Sumimoto, H. (2003) Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases, *J Biol Chem* 278, 25234-25246.
40. Geiszt, M., Lekstrom, K., Brenner, S., Hewitt, S. M., Dana, R., Malech, H. L., and Leto, T. L. (2003) NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91phox in the regulated production of superoxide by phagocytes, *J Immunol* 171, 299-306.
41. Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D., and Sumimoto, H. (2003) Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4474-4479.
42. Bedard, K., and Krause, K. H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiol Rev* 87, 245-313.
43. Dahlgren, C., and Karlsson, A. (1999) Respiratory burst in human neutrophils, *J Immunol Methods* 232, 3-14.
44. Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noel-Hudson, M. S., Deme, D., and Virion, A. (1999) Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas, *J Biol Chem* 274, 37265-37269.
45. Martyn, K. D., Frederick, L. M., von Loehneysen, K., Dinauer, M. C., and Knaus, U. G. (2006) Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases, *Cell Signal* 18, 69-82.
46. Meitzler, J. L., Antony, S., Wu, Y., Juhasz, A., Liu, H., Jiang, G., Lu, J., Roy, K., and Doroshow, J. H. (2013) NADPH Oxidases: A Perspective on Reactive Oxygen Species Production in Tumor Biology, *Antioxid Redox Signal*.
47. Vigone, M. C., 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, 395.
48. Geiszt, M., Witta, J., Baffi, J., Lekstrom, K., and Leto, T. L. (2003) Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense, *FASEB J* 17, 1502-1504.
49. El Hassani, R. A., Benfares, N., Caillou, B., Talbot, M., Sabourin, J. C., Belotte, V., Morand, S., Gnidehou, S., Agnandji, D., Ohayon, R., Kaniewski, J., Noel-Hudson, M. S., Bidart, J. M., Schlumberger, M., Virion, A., and Dupuy, C. (2005) Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G933-942.
50. Chang, S., Linderholm, A., Franzi, L., Kenyon, N., Grasberger, H., and Harper, R. (2013) Dual oxidase regulates neutrophil recruitment in allergic airways, *Free Radic Biol Med* 65C, 38-46.
51. Krause, K. H. (2004) Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases, *Jpn J Infect Dis* 57, S28-29.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

52. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., and Telser, J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol Cell Biochem* 266, 37-56.
53. Nunes, P., Demaurex, N., and Dinauer, M. C. (2013) Regulation of the NADPH Oxidase and Associated Ion Fluxes During Phagocytosis, *Traffic* 14, 1118-1131.
54. Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., and Chiarotto, E. (2004) Oxidative stress and cell signalling, *Curr Med Chem* 11, 1163-1182.
55. Flannagan, R. S., Cosio, G., and Grinstein, S. (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies, *Nat Rev Microbiol* 7, 355-366.
56. Babior, B. M. (2004) NADPH oxidase, *Curr Opin Immunol* 16, 42-47.
57. Segal, A. (2005) How neutrophils kill microbes., *Annual Review of Immunology Vol. 23:* 197-223, 10.1146.
58. Quinn, M. T., and Gauss, K. A. (2004) Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases, *J Leukoc Biol* 76, 760-781.
59. Babior, B. M. (1997) Superoxide: a two-edged sword, *Braz J Med Biol Res* 30, 141-155.
60. Vignais, P. V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism, *Cell Mol Life Sci* 59, 1428-1459.
61. Doussiere, J., Gaillard, J., and Vignais, P. V. (1996) Electron transfer across the O₂-generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component, *Biochemistry* 35, 13400-13410.
62. El-Benna, J., Dang, P. M., Gougerot-Pocidalo, M. A., Marie, J. C., and Braut-Boucher, F. (2009) p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases, *Exp Mol Med* 41, 217-225.
63. 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.
64. Dana, R., Leto, T. L., Malech, H. L., and Levy, R. (1998) Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the phagocyte NADPH oxidase, *J Biol Chem* 273, 441-445.
65. Groemping, Y., and Rittiger, K. (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective, *Biochem J* 386, 401-416.
66. Raad, H., Paclet, M. H., Boussetta, T., Kroviarski, Y., Morel, F., Quinn, M. T., Gougerot-Pocidalo, M. A., Dang, P. M., and El-Benna, J. (2009) Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox, *FASEB J* 23, 1011-1022.
67. Donald Vo , J. G. V. (2004) *Biochimie*, 2nd ed., de boeck.
68. KEILIN, D. (1966) *The History of Cell Respiration and Cytochrome*, Cambridge University Press, london.
69. Chamulitrat, W., Stremmel, W., Kawahara, T., Rokutan, K., Fujii, H., Wingler, K., Schmidt, H. H., and Schmidt, R. (2004) A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes, *J Invest Dermatol* 122, 1000-1009.
70. Maturana, A., Arnaudeau, S., Ryser, S., Banfi, B., Hossle, J. P., Schlegel, W., Krause, K. H., and Demaurex, N. (2001) Heme histidine ligands within gp91(phox) modulate proton conduction by the phagocyte NADPH oxidase, *J Biol Chem* 276, 30277-30284.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

71. Palfey, B. A., Ballou, D. P., and Massey, V. (1997) Flavin conformational changes in the catalytic cycle of p-hydroxybenzoate hydroxylase substituted with 6-azido- and 6-aminoflavin adenine dinucleotide, *Biochemistry* 36, 15713-15723.
72. Muller, F. (1987) Flavin radicals: chemistry and biochemistry, *Free Radic Biol Med* 3, 215-230.
73. Rotrosen, D., Yeung, C. L., Leto, T. L., Malech, H. L., and Kwong, C. H. (1992) Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase, *Science* 256, 1459-1462.
74. Chou, K. C., and Elrod, D. W. (1999) Prediction of membrane protein types and subcellular locations, *Proteins* 34, 137-153.
75. Yu, L., Zhen, L., and Dinauer, M. C. (1997) Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits, *J Biol Chem* 272, 27288-27294.
76. Parkos, C. A., Allen, R. A., Cochrane, C. G., and Jesaitis, A. J. (1987) Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000, *J Clin Invest* 80, 732-742.
77. Wallach, T. M., and Segal, A. W. (1997) Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro, *Biochem J* 321 (Pt 3), 583-585.
78. Maly, F. E., Schuerer-Maly, C. C., Quilliam, L., Cochrane, C. G., Newburger, P. E., Curnutte, J. T., Gifford, M., and Dinauer, M. C. (1993) Restitution of superoxide generation in autosomal cytochrome-negative chronic granulomatous disease (A22(0) CGD)-derived B lymphocyte cell lines by transfection with p22phox cDNA, *J Exp Med* 178, 2047-2053.
79. Yu, L., DeLeo, F. R., Biberstine-Kinkade, K. J., Renee, J., Nauseef, W. M., and Dinauer, M. C. (1999) Biosynthesis of flavocytochrome b558 . gp91(phox) is synthesized as a 65-kDa precursor (p65) in the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem* 274, 4364-4369.
80. Harper, A. M., Chaplin, M. F., and Segal, A. W. (1985) Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein, *Biochem J* 227, 783-788.
81. Paclet, M. H., Coleman, A. W., Vergnaud, S., and Morel, F. (2000) P67-phox-mediated NADPH oxidase assembly: imaging of cytochrome b558 liposomes by atomic force microscopy, *Biochemistry* 39, 9302-9310.
82. Sumimoto, H., Sakamoto, N., Nozaki, M., Sakaki, Y., Takeshige, K., and Minakami, S. (1992) Cytochrome b558, a component of the phagocyte NADPH oxidase, is a flavoprotein, *Biochem Biophys Res Commun* 186, 1368-1375.
83. Segal, A. W., West, I., Wientjes, F., Nugent, J. H., Chavan, A. J., Haley, B., Garcia, R. C., Rosen, H., and Scrace, G. (1992) Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes, *Biochem J* 284 (Pt 3), 781-788.
84. Paclet, M. H., Henderson, L. M., Campion, Y., Morel, F., and Dagher, M. C. (2004) Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies, *Biochem J* 382, 981-986.
85. Davis, A. R., Mascolo, P. L., Bunger, P. L., Sipes, K. M., and Quinn, M. T. (1998) Cloning and sequencing of the bovine flavocytochrome b subunit proteins, gp91-phox and

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- p22-phox: comparison with other known flavocytochrome b sequences, *J Leukoc Biol* 64, 114-123.
86. Biberstine-Kinkade, K. J., DeLeo, F. R., Epstein, R. I., LeRoy, B. A., Nauseef, W. M., and Dinauer, M. C. (2001) Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox), *J Biol Chem* 276, 31105-31112.
 87. Heyworth, P. G., Curnutte, J. T., Rae, J., Noack, D., Roos, D., van Koppen, E., and Cross, A. R. (2001) Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (second update), *Blood Cells Mol Dis* 27, 16-26.
 88. Finegold, A. A., Shatwell, K. P., Segal, A. W., Klausner, R. D., and Dancis, A. (1996) Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase, *J Biol Chem* 271, 31021-31024.
 89. Shatwell, K. P., Dancis, A., Cross, A. R., Klausner, R. D., and Segal, A. W. (1996) The FRE1 ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae* is a cytochrome b similar to that of NADPH oxidase, *J Biol Chem* 271, 14240-14244.
 90. Fujii, H., Finnegan, M. G., and Johnson, M. K. (1999) The active form of the ferric heme in neutrophil cytochrome b(558) is low-spin in the reconstituted cell-free system in the presence of amphophil, *J Biochem* 126, 708-714.
 91. Miki, T., Fujii, H., and Kakinuma, K. (1992) EPR signals of cytochrome b558 purified from porcine neutrophils, *J Biol Chem* 267, 19673-19675.
 92. Ueno, I., Fujii, S., Ohya-Nishiguchi, H., Iizuka, T., and Kanegasaki, S. (1991) Characterization of neutrophil b-type cytochrome in situ by electron paramagnetic resonance spectroscopy, *FEBS Lett* 281, 130-132.
 93. Isogai, Y., Iizuka, T., and Shiro, Y. (1995) The mechanism of electron donation to molecular oxygen by phagocytic cytochrome b558, *J Biol Chem* 270, 7853-7857.
 94. Isogai, Y., Iizuka, T., Makino, R., Iyanagi, T., and Orii, Y. (1993) Superoxide-producing cytochrome b. Enzymatic and electron paramagnetic resonance properties of cytochrome b558 purified from neutrophils, *J Biol Chem* 268, 4025-4031.
 95. Biberstine-Kinkade, K. J., Yu, L., and Dinauer, M. C. (1999) Mutagenesis of an arginine- and lysine-rich domain in the gp91(phox) subunit of the phagocyte NADPH-oxidase flavocytochrome b558, *J Biol Chem* 274, 10451-10457.
 96. Csanyi, G., Cifuentes-Pagano, E., Al Ghouleh, I., Ranayhossaini, D. J., Egana, L., Lopes, L. R., Jackson, H. M., Kelley, E. E., and Pagano, P. J. (2011) Nox2 B-loop peptide, Nox2ds, specifically inhibits the NADPH oxidase Nox2, *Free Radic Biol Med* 51, 1116-1125.
 97. Li, X. J., Grunwald, D., Mathieu, J., Morel, F., and Stasia, M. J. (2005) Crucial role of two potential cytosolic regions of Nox2, 191TSSTKTIRRS200 and 484DESQANHFVHHDEEKD500, on NADPH oxidase activation, *J Biol Chem* 280, 14962-14973.
 98. Doussiere, J., Brandolin, G., Derrien, V., and Vignais, P. V. (1993) Critical assessment of the presence of an NADPH binding site on neutrophil cytochrome b558 by photoaffinity and immunochemical labeling, *Biochemistry* 32, 8880-8887.
 99. Ravel, P., and Lederer, F. (1993) Affinity-labeling of an NADPH-binding site on the heavy subunit of flavocytochrome b558 in particulate NADPH oxidase from activated human neutrophils, *Biochem Biophys Res Commun* 196, 543-552.
 100. Koshkin, V. (1995) Spatial and electrogenic properties of superoxide-producing cytochrome b-559 incorporated into liposomes, *Biochim Biophys Acta* 1229, 329-333.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

101. Koshkin, V., Lotan, O., and Pick, E. (1997) Electron transfer in the superoxide-generating NADPH oxidase complex reconstituted in vitro, *Biochim Biophys Acta* 1319, 139-146.
102. Koshkin, V., and Pick, E. (1994) Superoxide production by cytochrome b559. Mechanism of cytosol-independent activation, *FEBS Lett* 338, 285-289.
103. Orii, Y., Miki, T., and Kakinuma, K. (1995) Kinetic characterization of the redox components in solubilized membranes from porcine neutrophils: reduction with dithionite and photoexcited NAD(P)H, *Photochem Photobiol* 61, 261-268.
104. Parkinson, J. F., and Gabig, T. G. (1988) Phagocyte NADPH-oxidase. Studies with flavin analogues as active site probes in triton X-100-solubilized preparations, *J Biol Chem* 263, 8859-8863.
105. Cross, A. R., and Segal, A. W. (2004) The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems, *Biochim Biophys Acta* 1657, 1-22.
106. Stasia, M. J., Bordigoni, P., Floret, D., Brion, J. P., Bost-Bru, C., Michel, G., Gatel, P., Durant-Vital, D., Voelckel, M. A., Li, X. J., Guillot, M., Maquet, E., Martel, C., and Morel, F. (2005) Characterization of six novel mutations in the CYBB gene leading to different sub-types of X-linked chronic granulomatous disease, *Hum Genet* 116, 72-82.
107. Yoshida, L. S., Saruta, F., Yoshikawa, K., Tatsuzawa, O., and Tsunawaki, S. (1998) Mutation at histidine 338 of gp91(phox) depletes FAD and affects expression of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase, *J Biol Chem* 273, 27879-27886.
108. Stasia, M. J., Lardy, B., Maturana, A., Rousseau, P., Martel, C., Bordigoni, P., Demareux, N., and Morel, F. (2002) Molecular and functional characterization of a new X-linked chronic granulomatous disease variant (X91+) case with a double missense mutation in the cytosolic gp91phox C-terminal tail, *Biochim Biophys Acta* 1586, 316-330.
109. Taylor, W. R., Jones, D. T., and Segal, A. W. (1993) A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain, *Protein Sci* 2, 1675-1685.
110. Debeurme, F., Picciocchi, A., Dagher, M. C., Grunwald, D., Beaumel, S., Fieschi, F., and Stasia, M. J. (2010) Regulation of NADPH oxidase activity in phagocytes: relationship between FAD/NADPH binding and oxidase complex assembly, *J Biol Chem* 285, 33197-33208.
111. Adams, E. R., Dratz, E. A., Gizachew, D., Deleo, F. R., Yu, L., Volpp, B. D., Vlases, M., Jesaitis, A. J., and Quinn, M. T. (1997) Interaction of human neutrophil flavocytochrome b with cytosolic proteins: transferred-NOESY NMR studies of a gp91phox C-terminal peptide bound to p47phox, *Biochem J* 325 (Pt 1), 249-257.
112. Li, X. J., Fieschi, F., Paquet, 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.
113. Dahan, I., Issaeva, I., Gorzalczany, 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, 8421-8432.
114. Taylor, R. M., Burritt, J. B., Baniulis, D., Foubert, T. R., Lord, C. I., Dinauer, M. C., Parkos, C. A., and Jesaitis, A. J. (2004) Site-specific inhibitors of NADPH oxidase activity and structural probes of flavocytochrome b: characterization of six monoclonal antibodies to the p22phox subunit, *J Immunol* 173, 7349-7357.
115. Meijles, D. N., Howlin, B. J., and Li, J. M. (2012) Consensus in silico computational modelling of the p22phox subunit of the NADPH oxidase, *Comput Biol Chem* 39, 6-13.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

116. 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, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10650-10654.
117. 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, 22152-22158.
118. Dinauer, M. C., Pierce, E. A., Erickson, R. W., Muhlebach, T. J., Messner, H., Orkin, S. H., Seger, R. A., and Curnutte, J. T. (1991) Point mutation in the cytoplasmic domain of the neutrophil p22-phox cytochrome b subunit is associated with a nonfunctional NADPH oxidase and chronic granulomatous disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11231-11235.
119. Biberstine-Kinkade, K. J., Yu, L., Stull, N., LeRoy, B., Bennett, S., Cross, A., and Dinauer, M. C. (2002) Mutagenesis of p22(phox) histidine 94. A histidine in this position is not required for flavocytochrome b558 function, *J Biol Chem* 277, 30368-30374.
120. Zhu, Y., Marchal, C. C., Casbon, A. J., Stull, N., von Lohneysen, K., Knaus, U. G., Jesaitis, A. J., McCormick, S., Nauseef, W. M., and Dinauer, M. C. (2006) Deletion mutagenesis of p22phox subunit of flavocytochrome b558: identification of regions critical for gp91phox maturation and NADPH oxidase activity, *J Biol Chem* 281, 30336-30346.
121. Lewis, E. M., Sergeant, S., Ledford, B., Stull, N., Dinauer, M. C., and McPhail, L. C. (2009) Phosphorylation of p22phox on threonine 147 enhances NADPH oxidase activity by promoting p47phox binding, *J Biol Chem*.
122. Quinn, M. T., Mullen, M. L., and Jesaitis, A. J. (1992) Human neutrophil cytochrome b contains multiple hemes. Evidence for heme associated with both subunits, *J Biol Chem* 267, 7303-7309.
123. Foubert, T. R., Bleazard, J. B., Burritt, J. B., Gripenrog, J. M., Baniulis, D., Taylor, R. M., and Jesaitis, A. J. (2001) Identification of a spectrally stable proteolytic fragment of human neutrophil flavocytochrome b composed of the NH2-terminal regions of gp91(phox) and p22(phox), *J Biol Chem* 276, 38852-38861.
124. DeLeo, F. R., Burritt, J. B., Yu, L., Jesaitis, A. J., Dinauer, M. C., and Nauseef, W. M. (2000) Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly, *J Biol Chem* 275, 13986-13993.
125. Parkos, C. A., Dinauer, M. C., Jesaitis, A. J., Orkin, S. H., and Curnutte, J. T. (1989) Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease, *Blood* 73, 1416-1420.
126. Champion, Y., Jesaitis, A. J., Nguyen, M. V., Grichine, A., Herenger, Y., Baillet, A., Berthier, S., Morel, F., and Paquet, M. H. (2009) New p22-phox monoclonal antibodies: identification of a conformational probe for cytochrome b 558, *J Innate Immun* 1, 556-569.
127. Lewis, E. M., Sergeant, S., Ledford, B., Stull, N., Dinauer, M. C., and McPhail, L. C. (2010) Phosphorylation of p22phox on threonine 147 enhances NADPH oxidase activity by promoting p47phox binding, *J Biol Chem* 285, 2959-2967.
128. 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, *J Biol Chem* 277, 10121-10128.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

129. 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.
130. Grizot, S., Grandvaux, N., Fieschi, F., Faure, J., Massenet, C., Andrieu, J. P., Fuchs, A., Vignais, P. V., Timmins, P. A., Dagher, M. C., and Pebay-Peyroula, E. (2001) Small angle neutron scattering and gel filtration analyses of neutrophil NADPH oxidase cytosolic factors highlight the role of the C-terminal end of p47phox in the association with p40phox, *Biochemistry* 40, 3127-3133.
131. Wilson, M. I., Gill, D. J., Perisic, O., Quinn, M. T., and Williams, R. L. (2003) PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62, *Mol Cell* 12, 39-50.
132. Lapouge, K., Smith, S. J., Walker, P. A., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., and Rittinger, K. (2000) Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP, *Mol Cell* 6, 899-907.
133. Roos, D., van Bruggen, R., and Meischl, C. (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils, *Microbes Infect* 5, 1307-1315.
134. 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.
135. 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.
136. 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, 4268-4276.
137. 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, 5345-5349.
138. Segal, A. W., Heyworth, P. G., Cockcroft, S., and Barrowman, M. M. (1985) Stimulated neutrophils from patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease fail to phosphorylate a Mr-44,000 protein, *Nature* 316, 547-549.
139. 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.
140. Faust, L. R., el Benna, J., Babior, B. M., and Chanock, S. J. (1995) The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis, *J Clin Invest* 96, 1499-1505.
141. Fontayne, A., Dang, P. M., Gougerot-Pocidallo, M. A., 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, 7743-7750.
142. Koshkin, V., Lotan, O., and Pick, E. (1996) The cytosolic component p47(phox) is not a sine qua non participant in the activation of NADPH oxidase but is required for optimal superoxide production, *J Biol Chem* 271, 30326-30329.
143. Freeman, J. L., and Lambeth, J. D. (1996) NADPH oxidase activity is independent of p47phox in vitro, *J Biol Chem* 271, 22578-22582.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

144. 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.
145. 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, 13793-13801.
146. 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, 835-840.
147. Benna, J. E., Dang, P. M., Gaudry, M., Fay, M., Morel, F., Hakim, J., and Gougerot-Pocidalo, M. A. (1997) Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways, *J Biol Chem* 272, 17204-17208.
148. Dusi, S., and Rossi, F. (1993) Activation of NADPH oxidase of human neutrophils involves the phosphorylation and the translocation of cytosolic p67phox, *Biochem J* 296 (Pt 2), 367-371.
149. Forbes, L. V., Moss, S. J., and Segal, A. W. (1999) Phosphorylation of p67phox in the neutrophil occurs in the cytosol and is independent of p47phox, *FEBS Lett* 449, 225-229.
150. Vergnaud, S., Paclet, M. H., El Benna, J., Pocidalo, M. A., and Morel, F. (2000) Complementation of NADPH oxidase in p67-phox-deficient CGD patients p67-phox/p40-phox interaction, *Eur J Biochem* 267, 1059-1067.
151. Babior, B. M. (1999) NADPH oxidase: an update, *Blood* 93, 1464-1476.
152. 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, 25051-25060.
153. 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, 3938-3946.
154. Cross, A. R., Noack, D., Rae, J., Curnutte, J. T., and Heyworth, P. G. (2000) Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (first update), *Blood Cells Mol Dis* 26, 561-565.
155. 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, 583-589.
156. Tamura, M., Shiozaki, I., Ono, S., Miyano, K., Kunihiro, S., and Sasaki, T. (2007) p40phox as an alternative organizer to p47phox in Nox2 activation: a new mechanism involving an interaction with p22phox, *FEBS Lett* 581, 4533-4538.
157. 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.
158. Tamura, M., Kanno, M., and Endo, Y. (2000) Deactivation of neutrophil NADPH oxidase by actin-depolymerizing agents in a cell-free system, *Biochem J* 349, 369-375.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

159. Tsunawaki, S., Kagara, S., Yoshikawa, K., Yoshida, L. S., 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, 893-902.
160. Fuchs, A., Bouin, A. P., Rabilloud, T., and Vignais, P. V. (1997) The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells, *Eur J Biochem* 249, 531-539.
161. Bouin, A. P., Grandvaux, N., Vignais, P. V., 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, 30097-30103.
162. Someya, A., Nunoi, H., Hasebe, T., and Nagaoka, I. (1999) Phosphorylation of p40-phox during activation of neutrophil NADPH oxidase, *J Leukoc Biol* 66, 851-857.
163. Haataja, L., Groffen, J., and Heisterkamp, N. (1997) Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family, *J Biol Chem* 272, 20384-20388.
164. Didsbury, J., Weber, R. F., Bokoch, G. M., Evans, T., and Snyderman, R. (1989) rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates, *J Biol Chem* 264, 16378-16382.
165. Gabig, T. G., Crean, C. D., Mantel, P. L., and Rosli, R. (1995) Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation, *Blood* 85, 804-811.
166. Geiszt, M., Dagher, M. C., Molnar, G., Havasi, A., Faure, J., Paclet, M. H., Morel, F., and Ligeti, E. (2001) Characterization of membrane-localized and cytosolic Rac-GTPase-activating proteins in human neutrophil granulocytes: contribution to the regulation of NADPH oxidase, *Biochem J* 355, 851-858.
167. Nisimoto, Y., Freeman, J. L., Motalebi, S. A., Hirshberg, M., and Lambeth, J. D. (1997) Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase, *J Biol Chem* 272, 18834-18841.
168. Kwong, C. H., Malech, H. L., Rotrosen, D., and Leto, T. L. (1993) Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins, *Biochemistry* 32, 5711-5717.
169. 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, 184-190.
170. 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, 329-338.
171. Li, X. J., Tian, W., Stull, N. D., Grinstein, S., Atkinson, S., and Dinauer, M. C. (2009) A fluorescently tagged C-terminal fragment of p47phox detects NADPH oxidase dynamics during phagocytosis, *Mol Biol Cell* 20, 1520-1532.
172. 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, 589-593.
173. Leusen, J. H., Fluiter, K., Hilarius, P. M., Roos, D., Verhoeven, A. J., and Bolscher, B. G. (1995) Interactions between the cytosolic components p47phox and p67phox of the

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- human neutrophil NADPH oxidase that are not required for activation in the cell-free system, *J Biol Chem* 270, 11216-11221.
174. 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, 185-194.
175. 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, 6312-6320.
176. Finan, P., Shimizu, Y., Gout, I., Hsuan, J., Truong, O., Butcher, C., Bennett, P., Waterfield, M. D., and Kellie, S. (1994) An SH3 domain and proline-rich sequence mediate an interaction between two components of the phagocyte NADPH oxidase complex, *J Biol Chem* 269, 13752-13755.
177. Heyworth, P. G., Bohl, B. P., Bokoch, G. M., and Curnutte, J. T. (1994) Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558, *J Biol Chem* 269, 30749-30752.
178. Nisimoto, Y., Motalebi, S., Han, C. H., and Lambeth, J. D. (1999) The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558), *J Biol Chem* 274, 22999-23005.
179. Diebold, B. A., and Bokoch, G. M. (2001) Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase, *Nat Immunol* 2, 211-215.
180. Sarfstein, R., Gorzalczyk, Y., Mizrahi, A., Berdichevsky, Y., Molshanski-Mor, S., Weinbaum, C., Hirshberg, M., Dagher, M. C., and Pick, E. (2004) Dual role of Rac in the assembly of NADPH oxidase, tethering to the membrane and activation of p67phox: a study based on mutagenesis of p67phox-Rac1 chimeras, *J Biol Chem* 279, 16007-16016.
181. 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, *Biochem J* 396, 183-192.
182. Leusen, J. H., Bolscher, B. G., Hilarius, P. M., Weening, R. S., Kaulfersch, W., Seger, R. A., Roos, D., and Verhoeven, A. J. (1994) 156Pro-->Gln substitution in the light chain of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase (p22-phox) leads to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox, *J Exp Med* 180, 2329-2334.
183. Park, H. S., and Park, J. W. (1998) Conformational changes of the leukocyte NADPH oxidase subunit p47(phox) during activation studied through its intrinsic fluorescence, *Biochim Biophys Acta* 1387, 406-414.
184. Swain, S. D., Helgerson, S. L., Davis, A. R., Nelson, L. K., and Quinn, M. T. (1997) Analysis of activation-induced conformational changes in p47phox using tryptophan fluorescence spectroscopy, *J Biol Chem* 272, 29502-29510.
185. Regier, D. S., Greene, D. G., Sergeant, S., Jesaitis, A. J., and McPhail, L. C. (2000) Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation, *J Biol Chem* 275, 28406-28412.
186. Garcia, R. C., and Segal, A. W. (1988) Phosphorylation of the subunits of cytochrome b-245 upon triggering of the respiratory burst of human neutrophils and macrophages, *Biochem J* 252, 901-904.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

187. Cross, A. R. (2000) p40(phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558), *Biochem J* 349, 113-117.
188. Cross, A. R., and Curnutte, J. T. (1995) The cytosolic activating factors p47phox and p67phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase, *J Biol Chem* 270, 6543-6548.
189. Cross, A. R., Higson, F. K., Jones, O. T., Harper, A. M., and Segal, A. W. (1982) The enzymic reduction and kinetics of oxidation of cytochrome b-245 of neutrophils, *Biochem J* 204, 479-485.
190. Cross, A. R., Parkinson, J. F., and Jones, O. T. (1985) Mechanism of the superoxide-producing oxidase of neutrophils. O₂ is necessary for the fast reduction of cytochrome b-245 by NADPH, *Biochem J* 226, 881-884.
191. Koshkin, V. (1995) Aerobic and anaerobic functioning of superoxide-producing cytochrome b-559 reconstituted with phospholipids, *Biochim Biophys Acta* 1232, 225-229.
192. Ellis, J. A., Cross, A. R., and Jones, O. T. (1989) Studies on the electron-transfer mechanism of the human neutrophil NADPH oxidase, *Biochem J* 262, 575-579.
193. Cross, A. R., Rae, J., and Curnutte, J. T. (1995) Cytochrome b-245 of the neutrophil superoxide-generating system contains two nonidentical hemes. Potentiometric studies of a mutant form of gp91phox, *J Biol Chem* 270, 17075-17077.
194. Cross, A. R., Erickson, R. W., and Curnutte, J. T. (1999) The mechanism of activation of NADPH oxidase in the cell-free system: the activation process is primarily catalytic and not through the formation of a stoichiometric complex, *Biochem J* 341 (Pt 2), 251-255.
195. Cross, A. R., Yarchover, J. L., and Curnutte, J. T. (1994) The superoxide-generating system of human neutrophils possesses a novel diaphorase activity. Evidence for distinct regulation of electron flow within NADPH oxidase by p67-phox and p47-phox, *J Biol Chem* 269, 21448-21454.
196. Taylor, R. M., and Jesaitis, A. J. (2007) Immunoaffinity purification of human phagocyte flavocytochrome b and analysis of conformational dynamics, *Methods Mol Biol* 412, 429-437.
197. Lord, C. I., Riesselman, M. H., Gripenrog, J. M., Burritt, J. B., Jesaitis, A. J., and Taylor, R. M. (2008) Single-step immunoaffinity purification and functional reconstitution of human phagocyte flavocytochrome b, *J Immunol Methods* 329, 201-207.
198. Grishammer, R., Little, J., and Aharony, D. (1994) Expression of rat NK-2 (neurokinin A) receptor in E. coli, *Receptors Channels* 2, 295-302.
199. Han, C. H., Nisimoto, Y., Lee, S. H., Kim, E. T., and Lambeth, J. D. (2001) Characterization of the flavoprotein domain of gp91phox which has NADPH diaphorase activity, *J Biochem* 129, 513-520.
200. 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, 9567-9575.
201. DeChatelet, L. R., McPhail, L. C., Mullikin, D., and McCall, C. E. (1974) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase activity in human polymorphonuclear leukocytes, *Infect Immun* 10, 528-534.
202. Taylor, R. M., Baniulis, D., Burritt, J. B., Gripenrog, J. M., Lord, C. I., Riesselman, M. H., Maaty, W. S., Bothner, B. P., Angel, T. E., Dratz, E. A., Linton, G. F., Malech, H. L.,

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- and Jesaitis, A. J. (2006) Analysis of human phagocyte flavocytochrome b(558) by mass spectrometry, *J Biol Chem* 281, 37045-37056.
203. Devauchelle G., C. M. (1993) Les Baculovirus d'insectes vecteurs d'expression de gènes étrangers. Regard sur la biochimie.
204. Katkin, J. P., Malech, H. L., and Leto, T. L. (1992) Baculovirus mediated expression of human phagocytic cell oxidase cytochrome b558 in sf9 insect cells, *Inflammation* 16, 393-410.
205. O'Reilly, D. R. (1997) Use of baculovirus expression vectors, *Methods Mol Biol* 62, 235-246.
206. Ostuni, M. A., Lamanuzzi, L. B., Bizouarn, T., Dagher, M. C., and Baciou, L. (2010) Expression of functional mammal flavocytochrome b(558) in yeast: comparison with improved insect cell system, *Biochim Biophys Acta* 1798, 1179-1188.
207. Berrier, C., Park, K. H., Abes, S., Bibonne, A., Betton, J. M., and Ghazi, A. (2004) Cell-free synthesis of a functional ion channel in the absence of a membrane and in the presence of detergent, *Biochemistry* 43, 12585-12591.
208. Klammt, C., Lohr, F., Schafer, B., Haase, W., Dotsch, V., Ruterjans, H., Glaubitz, C., and Bernhard, F. (2004) High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins, *Eur J Biochem* 271, 568-580.
209. Marques, B., Liguori, L., Paclet, M. H., Villegas-Mendez, A., Rothe, R., Morel, F., and Lenormand, J. L. (2007) Liposome-mediated cellular delivery of active gp91(phox), *PLoS One* 2, e856.
210. Champion, Y., Paclet, M. H., Jesaitis, A. J., Marques, B., Grichine, A., Berthier, S., Lenormand, J. L., Lardy, B., Stasia, M. J., 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, 1145-1158.
211. Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., and Higgins, D. R. (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*, *Mol Biotechnol* 16, 23-52.
212. Porro, D., and Mattanovich, D. (2004) Recombinant protein production in yeasts, *Methods Mol Biol* 267, 241-258.
213. Lagane, B., Gaibelet, G., Meilhoc, E., Masson, J. M., Cezanne, L., and Lopez, A. (2000) Role of sterols in modulating the human mu-opioid receptor function in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* 275, 33197-33200.
214. Faber, K. N., Harder, W., Ab, G., and Veenhuis, M. (1995) Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins, *Yeast* 11, 1331-1344.
215. Rossanese, O. W., Soderholm, J., Bevis, B. J., Sears, I. B., O'Connor, J., Williamson, E. K., and Glick, B. S. (1999) Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol* 145, 69-81.
216. Cereghino, J. J., Cloyd, J. C., and Kuzniecky, R. I. (2002) Rectal diazepam gel for treatment of acute repetitive seizures in adults, *Arch Neurol* 59, 1915-1920.
217. Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y., and Madden, K. R. (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations, *Mol Cell Biol* 5, 3376-3385.
218. Reilander, H., and Weiss, H. M. (1998) Production of G-protein-coupled receptors in yeast, *Curr Opin Biotechnol* 9, 510-517.
219. Grinna, L. S., and Tschopp, J. F. (1989) Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, *Yeast* 5, 107-115.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

220. Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A., and Gingeras, T. R. (1987) Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*, *Nucleic Acids Res* 15, 3859-3876.
221. Ostuni, M. A., Lamanuzzi, L. B., Bizouarn, T., Dagher, M. C., and Baciou, L. (2010) Expression of functional mammal flavocytochrome b(558) in yeast: Comparison with improved insect cell system, *Biochim Biophys Acta* 1798, 1179-1188.
222. Le Guyader, L. (2002) Utilisation de sondes pyréniques in vivo pour caractériser l'état de phase global de la membrane plasmique de cellules eucaryotes. Application à la détection de la liaison d'agonistes au récepteur d'opioïde murin. Doctorat. , In *Université Paul Sabatier - Toulouse III, Toulouse*.
223. Shechter, E. (2006) *Biochimie et Biophysique des membranes: Aspects structuraux et fonctionnels*, 2 ed.
224. Barenholz, Y., and Thompson, T. E. (1999) Sphingomyelin: biophysical aspects, *Chem Phys Lipids* 102, 29-34.
225. Volkman, J. K. (2003) Sterols in microorganisms, *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 495-506.
226. Svoboda, J. A., and Weirich, G. F. (1995) Sterol metabolism in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*--a review, *Lipids* 30, 263-267.
227. Benveniste, P. (2002) Sterol metabolism, *Arabidopsis Book* 1, e0004.
228. Yeagle, P. L. (1985) Cholesterol and the cell membrane, *Biochim Biophys Acta* 822, 267-287.
229. Demel, R. A., and De Kruyff, B. (1976) The function of sterols in membranes, *Biochim Biophys Acta* 457, 109-132.
230. Nes, W. D., Janssen, G. G., Crumley, F. G., Kalinowska, M., and Akihisa, T. (1993) The structural requirements of sterols for membrane function in *Saccharomyces cerevisiae*, *Arch Biochem Biophys* 300, 724-733.
231. Marc Eeman, M. D. (2010) From biological membranes to biomimetic model membranes, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 14(4), 719-736.
232. Gorter, E., and Grendel, F. (1925) On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood, *J Exp Med* 41, 439-443.
233. Heimburg, T. (2007) *Thermal Biophysics of Membranes.*, Vol. ISBN: 978-3-527-40471-1.
234. Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175, 720-731.
235. Engelman, D. M. (2005) Membranes are more mosaic than fluid, *Nature* 438, 578-580.
236. Seet, L. F., and Hong, W. (2006) The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic, *Biochim Biophys Acta* 1761, 878-896.
237. Brechard, S., Plancon, S., and Tschirhart, E. J. (2013) New insights into the regulation of neutrophil NADPH oxidase activity in the phagosome: a focus on the role of lipid and Ca(2+) signaling, *Antioxid Redox Signal* 18, 661-676.
238. 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, *Nat Cell Biol* 3, 675-678.
239. 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, *J Biol Chem* 278, 14469-14479.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

240. 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.
241. 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.
242. Bravo, J., Karathanassis, D., Pacold, C. M., Pacold, M. E., Ellson, C. D., Anderson, K. E., Butler, P. J., Lavenir, I., Perisic, O., Hawkins, P. T., Stephens, L., and Williams, R. L. (2001) The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate, *Mol Cell* 8, 829-839.
243. Tamura, M., Ogata, K., and Takeshita, M. (1993) Phosphatidic acid-induced superoxide generation in electropermeabilized human neutrophils, *Arch Biochem Biophys* 305, 477-482.
244. Peng, G., Huang, J., Boyd, M., and Kleinberg, M. E. (2003) Properties of phagocyte NADPH oxidase p47-phox mutants with unmasked SH3 (Src homology 3) domains: full reconstitution of oxidase activity in a semi-recombinant cell-free system lacking arachidonic acid, *Biochem J* 373, 221-229.
245. 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, 19204-19219.
246. Regier, D. S., Waite, K. A., Wallin, R., and McPhail, L. C. (1999) A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22(phox), an NADPH oxidase component, *J Biol Chem* 274, 36601-36608.
247. Shao, D., Segal, A. W., and Dekker, L. V. (2003) Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils, *FEBS Lett* 550, 101-106.
248. Klopfenstein, D. R., Tomishige, M., Stuurman, N., and Vale, R. D. (2002) Role of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor, *Cell* 109, 347-358.
249. Vilhardt, F., and van Deurs, B. (2004) The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly, *EMBO J* 23, 739-748.
250. Jin, S., Zhou, F., Katirai, F., and Li, P. L. (2011) Lipid raft redox signaling: molecular mechanisms in health and disease, *Antioxid Redox Signal* 15, 1043-1083.
251. Han, W., Li, H., Villar, V. A., Pascua, A. M., Dajani, M. I., Wang, X., Natarajan, A., Quinn, M. T., Felder, R. A., Jose, P. A., and Yu, P. (2008) Lipid rafts keep NADPH oxidase in the inactive state in human renal proximal tubule cells, *Hypertension* 51, 481-487.
252. Rao Malla, R., Raghu, H., and Rao, J. S. (2010) Regulation of NADPH oxidase (Nox2) by lipid rafts in breast carcinoma cells, *Int J Oncol* 37, 1483-1493.
253. Madani, S., Hichami, A., Legrand, A., Belleville, J., and Khan, N. A. (2001) Implication of acyl chain of diacylglycerols in activation of different isoforms of protein kinase C, *FASEB J* 15, 2595-2601.
254. Hazan, I., Dana, R., Granot, Y., and Levy, R. (1997) Cytosolic phospholipase A2 and its mode of activation in human neutrophils by opsonized zymosan. Correlation between 42/44 kDa mitogen-activated protein kinase, cytosolic phospholipase A2 and NADPH oxidase, *Biochem J* 326 (Pt 3), 867-876.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

255. Rubin, B. B., Downey, G. P., Koh, A., Degousee, N., Ghomashchi, F., Nallan, L., Stefanski, E., Harkin, D. W., Sun, C., Smart, B. P., Lindsay, T. F., Cherepanov, V., Vachon, E., Kelvin, D., Sadilek, M., Brown, G. E., Yaffe, M. B., Plumb, J., Grinstein, S., Glogauer, M., and Gelb, M. H. (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, 7519-7529.
256. Girotti, M., Evans, J. H., Burke, D., and Leslie, C. C. (2004) Cytosolic phospholipase A2 translocates to forming phagosomes during phagocytosis of zymosan in macrophages, *J Biol Chem* 279, 19113-19121.
257. Shmelzer, Z., Haddad, N., Admon, E., Pessach, I., Leto, T. L., Eitan-Hazan, Z., Hershfinkel, M., and Levy, R. (2003) Unique targeting of cytosolic phospholipase A2 to plasma membranes mediated by the NADPH oxidase in phagocytes, *J Cell Biol* 162, 683-692.
258. Petheo, G. L., Orient, A., Barath, M., Kovacs, I., Rethi, B., Lanyi, A., Rajki, A., Rajnavolgyi, E., and Geiszt, M. (2010) Molecular and functional characterization of Hv1 proton channel in human granulocytes, *PLoS One* 5, e14081.
259. Doussiere, J., Bouzidi, F., and Vignais, P. V. (2002) The S100A8/A9 protein as a partner for the cytosolic factors of NADPH oxidase activation in neutrophils, *Eur J Biochem* 269, 3246-3255.
260. Doussiere, J., Bouzidi, F., and Vignais, P. V. (2001) A phenylarsine oxide-binding protein of neutrophil cytosol, which belongs to the S100 family, potentiates NADPH oxidase activation, *Biochem Biophys Res Commun* 285, 1317-1320.
261. Foubert, T. R., Burritt, J. B., Taylor, R. M., and Jesaitis, A. J. (2002) Structural changes are induced in human neutrophil cytochrome b by NADPH oxidase activators, LDS, SDS, and arachidonate: intermolecular resonance energy transfer between trisulfopyrenyl-wheat germ agglutinin and cytochrome b(558), *Biochim Biophys Acta* 1567, 221-231.
262. 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, 4232-4236.
263. Baciou, L., Erard, M., Dagher, M. C., and Bizouarn, T. (2009) The cytosolic subunit p67phox of the NADPH-oxidase complex does not bind NADPH, *FEBS Lett* 583, 3225-3229.
264. le Maire, M., Champeil, P., and Moller, J. V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents, *Biochim Biophys Acta* 1508, 86-111.
265. Helenius, A., and Simons, K. (1975) Solubilization of membranes by detergents, *Biochim Biophys Acta* 415, 29-79.
266. Lichtenberg, D. (1985) Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants, *Biochim Biophys Acta* 821, 470-478.
267. Ollivon, M., Lesieur, S., Grabielle-Madelmont, C., and Paternostre, M. (2000) Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles, *Biochim Biophys Acta* 1508, 34-50.
268. Kragh-Hansen, U., le Maire, M., and Moller, J. V. (1998) The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes, *Biophys J* 75, 2932-2946.
269. Paternostre, M., Viard, M., Meyer, O., Ghanam, M., Ollivon, M., and Blumenthal, R. (1997) Solubilization and reconstitution of vesicular stomatitis virus envelope using octylglucoside, *Biophys J* 72, 1683-1694.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

270. Mouritsen, O. G. (2005) *Life - As a Matter of Fat: The Emerging Science of Lipidomics*, Springer.
271. Light, D. R., Walsh, C., O'Callaghan, A. M., Goetzl, E. J., and Tauber, A. I. (1981) Characteristics of the cofactor requirements for the superoxide-generating NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes, *Biochemistry* 20, 1468-1476.
272. Greenwood, C., and Palmer, G. (1965) Evidence for the existence of two functionally distinct forms cytochrome c monomer at alkaline pH, *J Biol Chem* 240, 3660-3663.
273. Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P., and Stillman, C. A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*, *Mol Cell Biol* 9, 1316-1323.
274. Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruze, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P., and et al. (1989) High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Biochemistry* 28, 4117-4125.
275. Higgins, D. R., and Cregg, J. M. (1998) Introduction to *Pichia pastoris*, *Methods Mol Biol* 103, 1-15.
276. Pilloud, M. C., Doussiere, J., and Vignais, P. V. (1989) Parameters of activation of the membrane-bound O₂- generating oxidase from bovine neutrophils in a cell-free system, *Biochem Biophys Res Commun* 159, 783-790.
277. Souabni, H., Thoma, V., Bizouarn, T., Chatgililoglu, C., Siafaka-Kapadai, A., Baciou, L., Ferreri, C., Houee-Levin, C., and Ostuni, M. A. (2012) trans Arachidonic acid isomers inhibit NADPH-oxidase activity by direct interaction with enzyme components, *Biochim Biophys Acta* 1818, 2314-2324.
278. Lutter, R., van Zwieten, R., Weening, R. S., Hamers, M. N., and Roos, D. (1984) Cytochrome b, flavins, and ubiquinone-50 in enucleated human neutrophils (polymorphonuclear leukocyte cytoplasts), *J Biol Chem* 259, 9603-9606.
279. Dagher, M. C., and Pick, E. (2007) Opening the black box: lessons from cell-free systems on the phagocyte NADPH-oxidase, *Biochimie* 89, 1123-1132.
280. Taylor, R. M., Burritt, J. B., Foubert, T. R., Snodgrass, M. A., Stone, K. C., Baniulis, D., Gripenrog, J. M., Lord, C., and Jesaitis, A. J. (2003) Single-step immunoaffinity purification and characterization of dodecylmaltoside-solubilized human neutrophil flavocytochrome b, *Biochim Biophys Acta* 1612, 65-75.
281. Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J. A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K. H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G. S., and Snyder, M. (2002) Subcellular localization of the yeast proteome, *Genes Dev* 16, 707-719.
282. BATOT, G. (1996) Le flavocytochrome b558 des neutrophiles et des lymphocytes B, In *laboratoire d'Enzymologie, CHU grenoble et Laboratoire de Biochimie DBMS/CEN Grenoble*, Université Joseph Fourier, Grenoble.
283. Roberg, K. J., Rowley, N., and Kaiser, C. A. (1997) Physiological regulation of membrane protein sorting late in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol* 137, 1469-1482.
284. Pichler, H., Gaigg, B., Hrastnik, C., Achleitner, G., Kohlwein, S. D., Zellnig, G., Perktold, A., and Daum, G. (2001) A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids, *Eur J Biochem* 268, 2351-2361.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

285. Morgan, D., Cherny, V. V., Murphy, R., Xu, W., Thomas, L. L., and DeCoursey, T. E. (2003) Temperature dependence of NADPH oxidase in human eosinophils, *J Physiol* 550, 447-458.
286. Raison, J. K., Lyons, J. M., and Thomson, W. W. (1971) The influence of membranes on the temperature-induced changes in the kinetics of some respiratory enzymes of mitochondria, *Arch Biochem Biophys* 142, 83-90.
287. Lenaz, G., Sechi, A. M., Parenti-Castelli, G., Landi, L., and Bertoli, E. (1972) Activation energies of different mitochondrial enzymes: breaks in Arrhenius plots of membrane-bound enzymes occur at different temperatures, *Biochem Biophys Res Commun* 49, 536-542.
288. Oldfield, E., and Chapman, D. (1972) Dynamics of lipids in membranes: Heterogeneity and the role of cholesterol, *FEBS Lett* 23, 285-297.
289. Rigaud, J. L., Mosser, G., Lacapere, J. J., Olofsson, A., Levy, D., and Ranck, J. L. (1997) Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins, *J Struct Biol* 118, 226-235.
290. Bloch, K. E. (1983) Sterol structure and membrane function, *CRC Crit Rev Biochem* 14, 47-92.
291. Ostuni, M. A., Gelinotte, M., Bizouarn, T., Baciou, L., and Houee-Levin, C. (2010) Targeting NADPH-oxidase by reactive oxygen species reveals an initial sensitive step in the assembly process, *Free Radic Biol Med* 49, 900-907.
292. Dennis, E. A. (1994) Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2, *J Biol Chem* 269, 13057-13060.
293. Clark, J. D., Lin, L. L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S., Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Milona, N., and Knopf, J. L. (1991) A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP, *Cell* 65, 1043-1051.
294. Bromberg, Y., and Pick, E. (1984) Unsaturated fatty acids stimulate NADPH-dependent superoxide production by cell-free system derived from macrophages, *Cell Immunol* 88, 213-221.
295. Bezelgues, J.-B., and Dijkstra, A. J. (2009) *Formation of trans fatty acids during catalytic hydrogenation of edible oils*, 2 ed., The Oily Press, Bridgwater.
296. Ferreri, C. (2009) *Trans Fatty Acids and Oxidative Transformations by Free Radicals: the Role in Health*, AOCS Press.
297. Chatgialiloglu, C., and Ferreri, C. (2005) Trans lipids: the free radical path, *Acc Chem Res* 38, 441-448.
298. Badwey, J. A., Curnutte, J. T., Robinson, J. M., Berde, C. B., Karnovsky, M. J., and Karnovsky, M. L. (1984) Effects of free fatty acids on release of superoxide and on change of shape by human neutrophils. Reversibility by albumin, *J Biol Chem* 259, 7870-7877.
299. Ligeti, E., Doussiere, J., and Vignais, P. V. (1988) Activation of the O₂(-)-generating oxidase in plasma membrane from bovine polymorphonuclear neutrophils by arachidonic acid, a cytosolic factor of protein nature, and nonhydrolyzable analogues of GTP, *Biochemistry* 27, 193-200.
300. Dang, P. M., Morel, F., Gougerot-Pocidallo, M. A., 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, 4520-4526.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

301. Durand, D., Vives, C., Cannella, D., Perez, J., Pebay-Peyroula, E., Vachette, P., and Fieschi, F. NADPH oxidase activator p67(phox) behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers, *J Struct Biol* 169, 45-53.
302. Durand, D., Vives, C., Cannella, D., Perez, J., Pebay-Peyroula, E., Vachette, P., and Fieschi, F. (2010) NADPH oxidase activator p67(phox) behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers, *J Struct Biol* 169, 45-53.
303. Taylor, R. M., Foubert, T. R., Burritt, J. B., Baniulis, D., McPhail, L. C., and Jesaitis, A. J. (2004) Anionic amphiphile and phospholipid-induced conformational changes in human neutrophil flavocytochrome b observed by fluorescence resonance energy transfer, *Biochim Biophys Acta* 1663, 201-213.
304. Curnutte, J. T., Kuver, R., and Babior, B. M. (1987) Activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils, *J Biol Chem* 262, 6450-6452.

ANNEXES

Annexe n°1

❖ Milieu de culture

BMGY	Buffered Glycerol-complex Medium
BMMY	Buffered Methanol-complex Medium
	1 % extrait de levure
	2 % peptone
	100 mM phosphate de potassium, pH 6
	1,34 % YNB (Yeast Nitrogen Base with Amonium Sulfate without amino acide)
	4*10 ⁻⁵ % biotine
	1 % glycérol ou 0,5 % méthanol
	0,05 mg / L ampicilline
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose Medium
	1 % extrait de levure
	2 % peptone
	2 % dextrose (glucose)
	0,05 mg/L ampicilline
10X YNB	13.4% Yeast nitrogen with amonium sulfate without amino acids
	34 g / L YNB sans sulfate d'amonium (SNH ₄)
	100 g / L Sulfate d'amonium
500X Biotine	20 mg/ L Biotine
	(0.02% biotine)
1M tampon phosphate pH6	132 mL / L K ₂ HPO ₄ (1M)
	868 mL / L KH ₂ PO ₄ (1M)
10X Glycérol	100 ml Glycérol dans 900 ml d'eau distillée
	(10% Glycérol)
10X Dextrose	200 g / L D-glucose
	(20% Dextrose)

❖ **Tampons**

Tampon de lyse : 20 mM Phosphate de sodium pH 8
1 mM PMSF
1 mM EDTA
5 % Glycérol

Tampon de resuspension: 20 mM Tris-HCl pH 8
120 mM NaCl
10 % Glycérol
1 mM EDTA
1 mM PMSF

Tampon STE XX % Sucrose
XX: 20 mM Tris HCl pH 8
1 mM EDTA

Tampon TBS- 10 mM Tris HCl pH 8
Tween: 150 mM NaCl
0,1 % Tween

❖ **Coloration au bleu de Coomassie :**

A la fin de la migration, le gel SDS-PAGE est démoulé et placé pendant 1 h dans une solution de fixation (50 % éthanol ; 10 % acide acétique dans l'eau milli Q) sous agitation

Ensuite le gel est rincé et est placé dans du bleu de Coomassie (2,5 g /L Coomassie Brillant blue R250 stain ; 50 % éthanol ; 10 % acide acétique dans l'eau milli Q).

Décolorer ensuite le gel par plusieurs bains d'une solution 5 % ethanol et 1 % acide acétique dans l'eau milliQ.

❖ **Coloration au nitrate d'argent :**

A la fin de la migration, le gel est démoulé et placé 1 h dans une solution de fixation (50 % éthanol, 10 % acide acétique dans l'eau milli Q) et agiter 30 min ou plus.

La première étape est la sensibilisation qui est réalisée dans le tampon 5 % éthanol, 1 % acide acétique, sous agitation pendant 15 min. Le gel est ensuite lavé trois fois pendant 5 min.

ANNEXES

La deuxième étape consiste à tremper le gel dans une solution de Sodium thiosulfate pendant 1 min à 0.2 g/L sous agitation. Le gel est ensuite lavé trois fois pendant 5 min.

La réaction à l'argent est faite avec une solution Nitrate d'argent (2 g/L) et formaldéhyde (37% w/v), l'incubation se fait sous agitation pendant 20 min.

Pour développer la coloration, le gel est mis dans une solution de Carbonate de sodium (60 g/L), formaldéhyde (37 % w/v) et thiosulfate de sodium 0.2/L. l'agitation est faite pendant 2 à 5 min jusqu'à ce que la coloration convienne sachant qu'elle s'éclaircira avec la solution stop au moment opportun).

La révélation est arrêtée par une solution à 5 % d'acide acétique. Le gel peut être conservé dans l'eau milli Q ou bien séché.

Annexe n°2



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem

trans Arachidonic acid isomers inhibit NADPH-oxidase activity by direct interaction with enzyme components

H. Souabni ^{a,b}, V. Thoma ^{c,d}, T. Bizouarn ^{a,b}, C. Chatgialiloglu ^c, A. Siafaka-Kapadai ^d, L. Baciou ^{a,b}, C. Ferreri ^d, C. Houée-Levin ^{a,b,*}, M.A. Ostuni ^{a,b,*}

^a UMR8000, CNRS, 91405 Orsay, France

^b Laboratoire de Chimie-Physique Bat. 350, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

^c I.S.O.F., Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Piero Gobetti 101, 40129 Bologna, Italy

^d Department of Chemistry (Biochemistry), University of Athens, Panepistimioupolis, 15771 Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 November 2011

Received in revised form 23 April 2012

Accepted 24 April 2012

Available online 3 May 2012

Keywords:

NADPH oxidase

trans Fatty acid

Arachidonic acid

Protein complex assembly

Cell free system

Superoxide production inhibition

ABSTRACT

NADPH-oxidase is an enzyme that represents, when activated, the major source of non-mitochondrial reactive oxygen species. In phagocytes, this production is an indispensable event for the destruction of engulfed pathogens. The functional NADPH-oxidase complex consists of a catalytic membrane flavocytochrome *b* (Cyt_{b558}) and four cytosolic proteins p47^{phox}, p67^{phox}, Rac and p40^{phox}. The NADPH-oxidase activity is finely regulated spatially and temporally by cellular signaling events that trigger the translocation of the cytosolic subunits to its membrane partner involving post-translational modifications and activation by second messengers such as arachidonic acid (AA). Arachidonic acid in its natural *cis*-poly unsaturated form (C20:4) has been described to be an efficient activator of the enzyme *in vivo* and *in vitro*. In this work, we examined in a cell-free system whether a change of the natural *cis* geometry to the *trans* configuration, which could occur either by diet or be produced by the action of free radicals, may have consequences on the functioning of NADPH-oxidase. We showed the inability of mono-*trans* AA isomers to activate the NADPH-oxidase complex and demonstrated the inhibitory effect on the *cis*-AA-induced NADPH oxidase activation. The inhibition is mediated by a direct effect of the mono-*trans* AA which targets both the membrane fraction containing the cytb₅₅₈ and the cytosolic p67^{phox}. Our results suggest that the loss of the natural geometric feature (*cis*-AA) induces substantial structural modifications of p67^{phox} that prevent its translocation to the complex.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.