



HAL
open science

Mesures de l'activité de l'enzyme NADPH oxydase du neutrophile (NOX2) en système compartimenté et mise au point de protéoliposomes géants pour l'étude concertée de son assemblage et de sa fonction

Xavier Serfaty

► To cite this version:

Xavier Serfaty. Mesures de l'activité de l'enzyme NADPH oxydase du neutrophile (NOX2) en système compartimenté et mise au point de protéoliposomes géants pour l'étude concertée de son assemblage et de sa fonction. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS243 . tel-01912790

HAL Id: tel-01912790

<https://theses.hal.science/tel-01912790v1>

Submitted on 5 Nov 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.

Mesures de l'activité de l'enzyme NADPH oxydase du neutrophile (NOX2) en système compartimenté et mise au point de protéoliposomes géants pour l'étude concertée de son assemblage et de sa fonction

Thèse de doctorat de L'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris Sud

Ecole doctorale n°571 Molécules, Matériaux, Instrumentation et
Biosystèmes, 2MIB
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse de doctorat présentée et soutenue en France, à Orsay (91), le 1^{er} octobre 2018, par

Xavier Serfaty

Composition du Jury :

Mme Marie Erard Professeure, Université Paris Sud (LCP, CNRS, UMR 8000)	Présidente
M. Franck Fieschi Professeur, Université Grenoble Alpes (IBS, CEA, CNRS, UMR 5075)	Rapporteur
Mme Marie-José Stasia MCF, PhD, HDR, Université Grenoble Alpes (TIMC-IMAC, CNRS, UMR 5525)	Rapporteuse
M. Stéphane Arbault DR, PhD, HDR, Université de Bordeaux, (ISM, CNRS, UMR 5255)	Examineur
Mme Stéphanie Bonneau MCF, PhD, HDR, Université Pierre et Marie Curie, (LJP, CNRS, UMR 8237)	Examinatrice
Mme Corinne Dupuy DR, PhD, HDR, Université Paris Saclay, (IGR, CNRS, UMR 8200)	Examinatrice
M. Francis Haraux DR, PhD, HDR, Université Paris Sud, (I2BC, CEA, CNRS, UMR 9198)	Examineur
Mme Tania Bizouarn CR, PhD, HDR, Université Paris Saclay, (LCP, CNRS, UMR 8000)	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

----- DEBUT IMAGINAIRE ($\subset \mathbb{C}$) -----

Dans le prologue du résumé du premier chapitre préliminaire, je présenterai le début des remerciements initiaux, puis dans un deuxième chapitre consécutif à la suite du prologue de la fin du résumé du début des remerciements finaux, j'exposerai la suite des remerciements intermédiaires et enfin, un troisième chapitre permettra d'aborder la question de la fin du commencement des remerciements de l'extrémité C-terminale. La conclusion permettra de conclure sur une conclusion et d'introduire une perspective d'avenir futur.

Si vous avez tenté de comprendre le paragraphe précédent, vous auriez dû commencer par la fin de la suite afin de comprendre le début qui n'est qu'un tissu totalement insensé en coton cardé hydrophile anhydre.

Cela étant dit, les irréductibles qui auront réussi à passer cette courte phase d'extravagance post-doctorale (nécessairement !) pourront sans doute lire ce qui suit avec facilité !

----- FIN IMAGINAIRE ($\subset \mathbb{C}$) -----

----- DEBUT REEL ($\subset \mathbb{R}$) -----

Je vous préviens, ce sera long. Eh oui, la fin de ma thèse est aussi la fin de mes études. Cela fait donc 29 ans de contributions à ce que je suis, à où j'en suis et à ce que je fais aujourd'hui. Donc ce sera long, mais très brièvement long. D'un point de vue relatif, ce sera donc court. J'ai d'ailleurs choisi de numéroter les pages avec les lettres de l'alphabet français de A à Z afin de me limiter.

Rendre hommage est un exercice comme les autres et nécessite, à mon avis, une certaine complétude pour être bien fait ; effectivement il est selon moi inutile de faire quelque chose si nous partons du principe qu'elle peut être bâclée : 'faire avec l'intention de bien faire est la seule façon de faire'. J'estime qu'un remerciement implique d'expliquer le stimulus et ses conséquences, sans toutefois de prétention d'exhaustivité, un léger développement s'avèrera donc nécessaire. Le nombre de mots de la langue française étant limité, il y aura nécessairement des répétitions, qui conservent néanmoins toute l'essence et l'authenticité du message de mes remerciements, qui sont des aspects qui me tiennent particulièrement à cœur.

Selon moi, même les petits moments et les petits échanges contribuent à divers niveaux à apprécier un environnement, à apprécier un moment, une situation, une personne – quelque chose ou quelqu'un. Toutes ces petites choses peuvent participer très significativement et cela dépend notamment de la personne et de la façon dont celle-ci perçoit et partage ces petites choses à un instant t (ce n'est pas directement proportionnel à la quantité mais, par exemple, beaucoup dépendant du rythme). Ainsi, j'essaierai de penser à chaque personne ayant contribué de manière suffisamment marquante, même s'il s'est agi d'un unique échange. Néanmoins, il est certain que je ne pourrai pas citer tout le monde, mais sachez que le cœur y est même si je vous ai fortuitement oublié...

De surcroît, je tiens à remercier chaque personne qui a contribué à me faire arriver là où j'en suis aujourd'hui et je citerai donc, non exhaustivement pour des raisons de place et de mémoire, plusieurs personnes, ou groupes de personnes, qui ont eus un impact suffisamment significatif pour qu'ils me viennent à l'esprit pendant la rédaction de ces remerciements.

➤ **Côté Recherche :**

✓ **A la Direction du Laboratoire de Chimie Physique (LCP)**

Philippe Maître, en tant que Directeur du Laboratoire de Chimie Physique (LCP), m'a permis de faire ma thèse au LCP, (Université Paris Sud, Campus d'Orsay, Orsay (91), France), dans de bonnes conditions et m'a fait confiance à de nombreuses reprises. Nous nous souviendrons de l'urgence inondations en juin 2016, de l'événement cambriolage de 2018, ou plus simplement de l'organisation de la journée des doctorants, de ma participation en tant que représentant des doctorants ou encore des efforts faits par Philippe pour que je puisse amener une nouvelle technologie au laboratoire et conclure ma thèse sur un « je l'ai fait ! » tout en enrichissant une plateforme du LCP. J'ai aussi constaté à quel point tu t'es démené pour obtenir du personnel administratif et technique avec la vague de départs et de difficultés que le LCP a connu, nous avons toutes et tous vu ces efforts et, en ce qui me concerne, j'ai trouvé rassurant d'avoir un directeur qui se démène autant pour son labo ! Merci Philippe pour tout cela, sache aussi que ta confiance et ta reconnaissance ont été précieuses pour moi personnellement et professionnellement, d'autant plus en tant que 'simple doctorant'.

Il est, bien sûr, aussi important pour moi d'évoquer *Pedro De Oliveira*, directeur adjoint du LCP, qui m'a accordé la même confiance que Philippe à plusieurs reprises et m'a souvent encouragé lorsque nous nous croisions en général tôt le matin. Pedro, en tant que membre du jury du concours de l'école doctorale, a aussi contribué à la décision qui m'a permis de décrocher ma bourse de thèse. Pour toutes ces raisons, merci Pedro, ce fut un plaisir et tout aussi précieux !

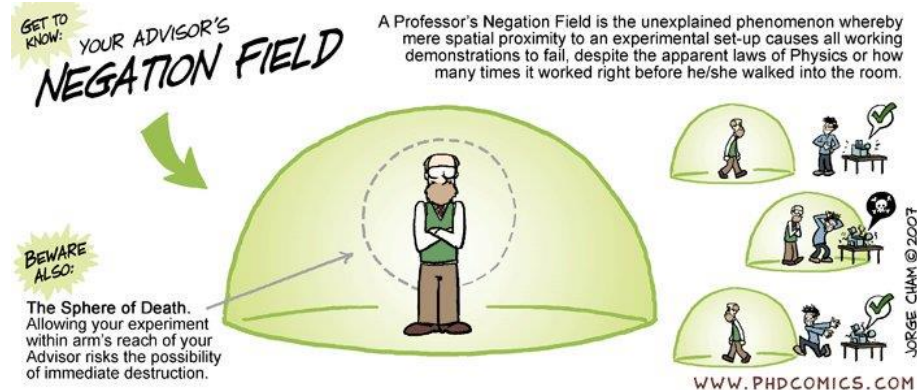
✓ **A mon Jury de Thèse**

Franck Fieschi et *Marie-José Stasia*, ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse et de se déplacer depuis Grenoble pour confronter leurs idées aux miennes. Merci Franck et Marie-José pour vos rapports sur mon manuscrit et pour cette discussion enrichissante à de nombreux égards. Bien sûr, l'ensemble des membres du jury, *Stéphane Arbault* qui s'est déplacé depuis Bordeaux, *Francis Haraux* aussi membre externe de mon comité de suivi de thèse qui m'a bien aidé et que je remercie en bonus pour cela, *Stéphanie Bonneau*, *Corinne Dupuy*, Madame la Présidente *Marie Erard* et ma directrice de thèse *Tania Bizouarn* ont chacun et chacune contribué de manière significative à l'intérêt de ma soutenance de thèse, merci donc à toutes et à tous d'avoir participé à ma présentation et à cette discussion ! Enfin, je vous remercie très chaleureusement pour le très beau rapport de soutenance, avec un bonus supplémentaire à Marie pour sa rédaction !

✓ **A ma chère équipe BIO-TLFC (acronyme improvisé) du LCP**

Tania Bizouarn ▪ Chère Tania, tu as été ma directrice de stage de M1 en 2014, de stage de M2 en 2015 et ma directrice de thèse entre 2015 et 2018. J'ai donc passé environ 4 ans sous ta direction, ce qui m'a permis d'apprécier initialement ton tempérament très humain avec des convictions éthiques bien définies, ainsi que des compétences scientifiques de très bon niveau. Déjà en Master 1 et 2, j'ai beaucoup apprécié ta façon d'encadrer, tu me laissais beaucoup de liberté. Une raison majeure pour laquelle j'ai souhaité faire une thèse au LCP était que le cadre et la supervision, en particulier la possibilité d'être autonome et la confiance qui y était associée, me correspondaient, au-delà de l'intérêt du sujet, dans la mesure où un environnement de travail bienveillant et compétent m'est indispensable pour travailler efficacement. Tu m'as beaucoup appris techniquement sur la production et la purification de protéines recombinantes,

l'enzymologie également et de manière générale sur la biochimie ; j'ai beaucoup apprécié tes compétences, ton expérience et ton application à obtenir des résultats pertinents et ton honneur de faire de la belle science. Alors que tu me connaissais mieux, en fin de M2 puis en thèse, tu m'as laissé encore davantage de liberté et donné ton entière confiance, tu as toute ma gratitude et ce fut réellement très précieux pour moi d'avoir de ta part cette considération. J'ai donc travaillé de façon très autonome, ce qui m'a évité l'effet de « champ de négation » sur mes



manips :-D ! Cependant, lorsque j'en ai eu besoin, tu as toujours été vraiment disponible et toujours de façon très efficace. Sans vouloir être dithyrambique, tu as été une directrice de thèse parfaite pour les besoins du doctorant que j'étais. Evidemment, il est toujours

possible de faire mieux, de s'améliorer au temps $t + \Delta t$, mais à l'instant t , nous avons toujours fait au mieux. Je résumerai notre relation par « Chacun sa tâche, chacun sa responsabilité ». Un jour, je ne sais pas pourquoi, tu semblais craindre que je sois négatif à ton égard une fois ma soutenance passée. Sache que je ne t'ais pas d'éloges lorsque je parle de toi autour de moi et ça ne changera pas en ce qui concerne mon encadrement ! De manière plus globale, tu t'es démenée pour que ma thèse se passe bien, d'un point de vue scientifique bien sûr, mais également personnel, par exemple lorsque je fus attaqué par des punaises de lit ou lorsque je me suis cassé le poignet, tu m'as soutenu et donné des conseils, ou encore lorsqu'un mec bourré a détruit ma voiture, tu m'as carrément prêté une voiture pendant plus d'une année qui m'a été incroyablement utile (et qui l'est encore en novembre 2018) ! Mais ce n'est pas tout, sachant que j'aime les légumes, tu m'as régulièrement apporté des courges, des courgettes, des tomates *etc.* de ton jardin. Nous avons aussi beaucoup discuté autour des jardins, de la faune et de la flore, de tes animaux, de ton propre jardin, entre autres sujets ; ce furent de très bons moments mêlant science, culture, environnement et bien sûr rires ! Alors un énorme Merci Tania, ce fut vraiment agréable, un réel plaisir, de travailler avec toi qui a été si compatible, si compétente, si attentionnée et qui m'a tant fait confiance ! Merci pour tous ces cadeaux, sache que ça a contribué de façon colossale et ce fut donc extrêmement précieux pour moi professionnellement mais aussi personnellement !

Chantal Houée-Levin ■ Chère Chantal, je te connais depuis plus de 5 ans, soit depuis que j'ai suivi ton cours sur le stress oxydant en 2013, lorsque j'étais en L3. En fin d'UE, je t'ai demandé si tu avais un stage à me proposer, ce qui était effectivement le cas ! Tu m'as donc permis de faire ce stage au LCP, plus précisément à CLIO, où j'ai travaillé sous ta supervision et celle de Debora. Ce fut un stage très instructif et aussi mon premier passage au LCP. Le travail que j'ai réalisé a ainsi contribué à une publication et tu as généreusement reconnu significative ma contribution en me permettant de le cosigner, ce fut mon premier article. A la fin du stage, tu m'as aussi fait participer à une expérience sur ELYSE, j'ai ainsi eu la chance de travailler à CLIO et à ELYSE, ainsi qu'à l'irradiateur panoramique gamma dès la L3, ce qui fut réellement enrichissant et motivant pour la suite ! Constatant que mon anglais était à l'époque au ras des pâquerettes, tu m'as fourni l'opportunité de faire mon stage de M1 à l'étranger – pour lequel j'ai décroché un financement européen grâce à ton aide – sous la direction de Tania et de Corinne. Cette expérience à l'étranger en immersion totale dans un pays, une ville, une université et un laboratoire que je ne connaissais pas m'a beaucoup aidé en anglais ainsi qu'en sciences et en capacité d'adaptabilité. Enfin, j'ai poursuivi ma route avec Tania et lorsque Rawand est partie

en PostDoc, je me suis installé dans ton bureau que nous avons partagé pendant 3 ans. Tu étais toujours disponible pour m'épauler scientifiquement en science et en chimie et pour partager tes connaissances et tes compétences, tu étais également prévenante à propos de mon bien être et de ma réussite. En plus de cela, nous avons bien ri, entre la chaise qui couine, le bien être végétal du bureau (qui n'a pas été un succès sur la fin...), la gestion du café (déca bien sûr !) et du chocolat qui était à flux tendu, nos tests 'tisanières', nos observations éthologiques d'écureuils et d'oiseaux variés, notre quête de noisettes au détriment des écureuils (pas très éthique tout cela !!), la rentabilisation des poubelles papier du laboratoire sur un coup de tête (ou comment jeter tous les papiers d'une vie de travail en 15 minutes !) et j'en passe ! Je suis sûr que Madame la Duchesse ne regrettera pas le bazar que j'ai pu avoir sur mon bureau, mais qui sait ? :-) Un très grand merci Chantal pour toutes ces années de science et de partage qui ont vraiment été très précieuses pour moi !

Laura Baciou ▪ Chère Laura, je te connais depuis mon stage de M1 en 2014 où nous avons travaillé ensemble pour la première fois lors d'un run de SRCD de 48h à SOLEIL. Nous avons ensuite travaillé ensemble pendant mon stage de M2 et pendant ma thèse, ce qui nous a notamment permis de beaucoup discuter science, parfois de façon plutôt houleuse vu nos façons de voir les choses souvent différemment, d'autres fois pacifiquement, mais dans tous les cas cela a été constructif !!! Tu m'as aussi permis de participer au congrès du GFB 2017 et à l'EBEC 2018 qui ont été des expériences formatrices et très intéressantes à divers niveaux. Tu avais à cœur que tout se passe bien pour moi pendant ma thèse, tu t'es beaucoup investie pour que ce fût le cas et nous avons même eu l'occasion d'aborder certains aspects personnels et entre autres, tu m'as écouté patiemment pendant mes phases où j'avais besoin de me plaindre (en bon Gaulois Réfractaire comme dirait M. Macron !) et tu as essayé de me remettre sur les rails ! Tu m'as aussi, entre autres, énormément aidé pour ma soutenance de thèse et tu t'investis pour que je trouve un post-doctorat ! Merci beaucoup Laura pour toutes tes contributions qui m'ont été très précieuses dans la réussite de ma thèse et pour le reste ! P.S. : Je conseille toujours de faire des ajustement Gaussien et Lorentzien du n^{ème} ordre et bien d'autres et je propose toujours mes services pour nettoyer ton ordi ! Et je crois toujours pertinemment qu'il fait trop chaud dans ce labo (la preuve un -80 °C nous a lâché dès la reprise du chauffage... bon OK il n'y a pas de contrôle donc ce n'est pas une preuve :-P) ! Je souhaite aussi à ton chien d'arrêter de manger des mirabelles pour limiter l'excès de fibres et pour la santé des cygnes et des ramasseuses de plumes, que Francis eut moins bu !

Florence Lederer ▪ Chère Florence, nous nous croisons dans les labos, à la cafétéria et dans ton bureau depuis 2014, lorsque j'étais en M1. Passionnée et rigoureuse, nous avons plusieurs fois discuté science et fort de ton expérience, tu as toujours répondu à mes questions de façon très détaillée, en donnant, au passage, souvent des remarques ou anecdotes utiles et parfois amusantes. Ta façon très ordonnée de ranger les produits et ta gestion du gel de silice est une vraie leçon pour tout scientifique qui veut de l'ordre, je me souviendrai toujours de cela et même si je n'ai pas réussi à l'appliquer pendant ma thèse – comme tu as pu le constater – je suis certain que cela me sera utile ! Tu as appris à me faire confiance sur l'utilisation des appareils, ce fut un plaisir de te filer un coup de main lorsque tu en avais besoin et de discuter sur la pertinence des expériences. D'autre part, tu m'as volontiers dépanné lorsque j'ai eu besoin de quelque chose, que ce fût au labo ou plus simplement par exemple de paracétamol lorsque la rédaction me filait la migraine. Ce fut aussi très sympathique de discuter de choses et d'autres en dehors de la science comme par exemple de bras cassés (quelle équipe !) et tu t'es souvent inquiétée de mes manipulations et de l'après-thèse. Tu m'as aussi présenté plusieurs personnes au Workshop EMBO 2018 à Pavia (Italie) où nous avons aussi pas mal discuté et cela était

enrichissant. Pour résumé, de nombreux bons et enrichissants moment ! Merci beaucoup Florence pour ta contribution qui fut précieuse et importante pour moi !

Aïcha Bouraoui ▪ Chère Aïcha, nous nous connaissons depuis ton stage de M2 en 2016 où nous avons partagé un bureau avec Myriam. Tu m'as épaté par tes capacités d'adaptation tant à la paillasse que dans la théorie de diverses sciences où tu t'accroches même lorsque tu ne sais pas, ce qui est, je souhaite le souligner, extrêmement rare pour un/une étudiant/e, (voilà que je parle comme si j'étais déjà un chef, à me plaindre des étudiant(e)s !). Tu m'as fait confiance pour beaucoup d'aspects techniques et tu as pu me suivre dans mes explications malgré mes précisions très détaillées, mes folies théoriques et expérimentales. Tu t'es intéressée à ce que je faisais et tu m'as aussi consulté sur la théorie, le traitement des données, ou alors simplement pour discuter des résultats, réfléchir, pour que je te donne mon avis et des idées. Nous avons beaucoup discuté de sujets scientifiques, mais également de l'enseignement, du fonctionnement et des membres du laboratoire, de la responsabilité de représentant des doctorants, de l'organisation de la journée des doctorants, entre autres. En plus de cela, tu fus une confidente de mes problèmes, autant que tu me fis confiance pour les tiens, qu'ils fussent personnels ou professionnels ; la pièce de l'Uvikon étant visiblement un lieu privilégié pour ce genre d'épanchements ! Tu m'as fait une magnifique carte-avion pour mon cadeau de thèse où les personnes du laboratoire ont pu laisser des petits mots qui furent émouvants pour moi et j'ai trouvé ta réalisation super ! Merci Aïcha pour tous ces précieux moments, j'ai été très heureux de t'avoir à mes côtés pendant ma thèse ! P.S. : Je te conseille fortement de continuer de traiter les gens de LEVURE dès qu'ils rentrent dans ton bureau ou même juste en les croisant dans le couloir ou dans le RER, ça détend ! Ta copine *Pichia* sera un peu jalouse mais qu'importe puisqu'elle a la mauvaise idée de prendre l'initiative spontanée de cliver ta protéine. Quoi que, mieux vaut ne pas trop la titiller, elle pourrait arrêter tout bonnement de l'exprimer :-P !

Stephenson Owusu ▪ Cher Stephenson, nous nous connaissons depuis ton stage de Master 2 en 2017, pendant lequel j'ai eu le plaisir de t'encadrer pour partie. Tu étais volontaire et tu as appris rapidement de nombreux concepts et de nombreuses techniques compliquées qui t'étaient totalement inconnues et tu as réussi à t'adapter rapidement à un laboratoire de biochimie et de chimie alors que tu n'y avais jamais travaillé et tes capacités à t'accrocher et à t'intégrer scientifiquement m'ont impressionnées ! Tu es quelqu'un de discret, très souriant, tu relativises facilement ce qui fait que tu es plutôt positif malgré les difficultés. Merci Stephenson, ce fut un plaisir de te connaître et de travailler avec toi !

Céline Ferard ▪ Chère Céline, tu es arrivée au labo environ un mois avant que je soutienne ma thèse. Ça m'a fait plaisir de savoir que tu fais toi aussi partie de la team des ancien(s)es STL-BGB qui ont appris la µbio, la BH, la bioch et la chimie à la paillasse avec un examinateur par étudiant et 24h de TP par semaine pendant au moins 2 ans ; en cet instant *t*, j'ai donc confiance en ton travail actuel et futur et ça me rassure que tu fasses partie de cette équipe qui m'est chère, je pense sincèrement que tu fais et feras un super boulot ! Cela se confirme chaque fois que je te forme à une technique, tu es alerte, tu notes les choses rigoureusement, tu fais des fiches méthodo, tu n'hésites pas à prendre en mains une manip nouvelle et tu arrives à supporter les milliards de détails abordés à chaque fois que je montre quelque chose, c'est un plaisir de te former, même lorsque les techniques sont aussi difficiles à prendre en mains que la microinjection et la micromanipulation. Tu m'as aussi fait l'honneur d'assister à mes quasi-4h de soutenance jusqu'au bout ! En plus de l'aspect scientifique, tu as un tempérament agréable et positif, ce que j'ai beaucoup apprécié ! Merci Céline pour tout cela, ça m'a fait plaisir et ça m'a enrichi de te connaître et de travailler avec toi !

Rawand Masoud ▪ Chère Rawand, nous nous sommes croisés pour la première fois en 2013 lors de mon stage de M2, où tu m'as montré comment tu réalisais des mesures d'activité de NOX2 en système cell-free. Par la suite, nous avons fait une purification de neutrophiles ensemble et nous n'avons plus beaucoup eu l'occasion de discuter sciences, mais ce fut toujours très agréable de te croiser et de discuter avec toi ! Ta gentillesse et ton sourire apportaient beaucoup au laboratoire. Merci Rawand, ça m'a fait plaisir de te connaître et de travailler avec toi !

Myriam Moussaoui ▪ Chère Myriam, nous étions dans le même bureau lors de mon M1 en 2014, M2 en 2015 et pendant le début de ma thèse. Nous n'avons pas réellement travaillé ensemble, (si j'exclus les x-fois où tu m'as fait remarquer que j'avais oublié d'éteindre la lampe du 'visualiseur' de gel :-P), mais nous avons beaucoup discuté, je t'ai écouté et j'ai tenté de tout cœur de te fournir de l'empathie lors de ta phase de rédaction et des difficultés qui y étaient liées. J'ai réellement apprécié de partager ton bureau, j'ai aimé ton honnêteté, ta spontanéité, ta gentillesse, ta capacité à te mettre en empathie, mais aussi la confiance que tu m'accordais scientifiquement qui m'a fait vraiment plaisir. Merci beaucoup Myriam pour tous ces moments qui ont contribué d'un point de vue personnel et professionnel et qui étaient précieux pour moi, j'ai été très heureux de te connaître ! P.S. : je crois que plus jamais quelqu'un/e ne me demandera de l'enfermer à double tour ne pas qu'il/elle s'échappe ou que quelqu'un/e vienne l'embêter pendant sa rédaction !

Paul Machillot ▪ Cher Paul, j'ai travaillé avec toi en M2 et au début de ma thèse où tu as fait de nombreuses constructions plasmidiques pour moi, tu m'as aussi donné des conseils très pertinents pour mes purifs et fait d'excellentes remarques lors de mes présentations au laboratoire. Je tiens à préciser que sans les constructions que tu as faites, je n'aurais pas été en mesure de mener à bien environ la moitié de ma thèse, par conséquent, ta contribution en plus d'être utile, était décisive. En outre, tu étais disponible et très efficace dès que j'avais besoin de quelque chose au laboratoire. En plus de cela, tu avais un super caractère et étais très agréable à côtoyer ! J'ai trouvé (et je suis loin d'être le seul !) que tu faisais un super boulot au labo et j'ai constaté, lors du congrès PhysBio 2018 à la suite de la conférence de Catherine Picart, que tu continuais à faire de l'excellent boulot ce qui m'a fait plaisir ! Merci beaucoup Paul pour ta contribution déterminante et enrichissante à la réussite de ma thèse, ce fut très important pour moi !

Je pense aussi bien sûr à toutes et tous les stagiaires de passage dans le groupe et qui ont contribué à pimenter mon expérience LCP-iennne à travers leur présence, parfois mon encadrement, leur confiance... !...

✓ ***A mes chers collaborateurs bordelais du groupe NSysA de l'ISM de Bordeaux***

Stéphane Arbault ▪ Cher Stéphane, nous nous connaissons depuis février 2016, où tu es venu au LCP faire quelques tests préliminaires avec Pauline. Tu m'as ensuite accueilli très chaleureusement dans ton laboratoire à Bordeaux et tu as fait au mieux pour que je sois dans de très bonnes conditions de travail. Lors de nos expériences à Bordeaux avec Pauline, tu es venu plusieurs fois par jour t'assurer que tout allait bien, tu as procuré de nombreux et judicieux conseils, voire tu as carrément fait marcher la manip lorsque la mesure d'électrochimie sous microscope dans la cage de Faraday s'avérait laborieuse ! De manière plus générale, tu as partagé tes grandes compétences et connaissances avec patience et tu m'as fait confiance pour l'utilisation du matériel du laboratoire et pour le traitement des données. Tu as aussi été examinateur de ma thèse et fait une très belle contribution scientifique et personnelle lors de ma soutenance de thèse. Au-delà de ça, tu as été quelqu'un de très attentionné et d'une grande gentillesse, avec qui j'ai beaucoup appris mais aussi souvent ri lors de nos interactions

à divers sujets, incluant ta passion pour l'optimisation que la qualité audio de ton installation par des améliorations de la qualité de la transmission électrique. Ce fut un réel plaisir de te connaître, Merci Stéphane pour tout cela, ce fut très précieux pour moi et ça a vraiment beaucoup contribué pour ma thèse et pour moi-même !

Pauline Lefrançois ▪ Chère Pauline, nous nous connaissons depuis février 2016, lorsque tu étais venu faire quelques tests au LCP avec Stéphane. Ensuite, tu m'as toi aussi très chaleureusement accueilli dans ton laboratoire à Bordeaux où nous avons fait un excellent binôme de travail sur notre projet commun ! Même si cela t'a pris du temps sur ton propre sujet de thèse, tu as fait les manip intensément avec moi tous les jours du matin au soir et au passage formé à la microscopie confocale à fluorescence, à la micromanipulation et aux fondamentaux de la microélectrochimie. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi, qui est aussi passée par une section technologique qui t'a permis, en plus de ton tempérament naturellement rigoureux, d'acquérir une excellente pertinence technique et j'ai donc eu totalement confiance en ce que tu faisais (et je suis exigeant !) ! Ainsi, nous avons travaillé dur pendant 4 semaines et quelques jours pour obtenir des données très prometteuses ! En plus de cela tu m'as accueilli au labo avec beaucoup de prévenance et de gentillesse et nous avons pu discuter de plein de choses au-delà de la science qui ont clairement enrichi cette expérience collaborative. Merci pour tout Pauline, je garderai un excellent souvenir de ta contribution et de cette collaboration qui furent précieuses pour moi, scientifiquement et personnellement !

✓ **A l'équipe BIO-ON du LCP**

Sophie Dupré ▪ Chère Sophie, je te connais depuis le M2, au cours duquel tu as été ma rapporteure de stage. Tu es de celles qui font des journées de dingue et tu as donc été, toi aussi, une présence précieuse dans les moments de vide du laboratoire ! Tu as toujours été très gentille, calme, attentionnée et j'ai le sentiment que tu me fais confiance scientifiquement depuis le début. Par ailleurs, tu m'as beaucoup aidé scientifiquement, à travers nos discussions en général, mais aussi pour le traitement de mes données de microscopie de fluorescence. Tes conseils sur ce dernier sujet sont en fait à la base de l'ensemble du traitement réalisé sur mes données de microscopie, ça m'a vraiment permis d'évaluer la pertinence de ce que j'observais en différenciant les artefacts techniques du signal réel et au-delà de ça, d'initier de nouvelles réflexions personnelles sur le traitement des données. Tes connaissances en biologie cellulaire et tes grandes qualités de chercheuse (et pas que !!) m'ont également éclairé de nombreuses fois et j'ai ainsi trouvé très intéressant de discuter science avec toi. Bien sûr, nous avons partagé sur d'autres sujets que des sujets scientifiques. Par exemple, tu es une mangeuse de chocolat préférentiellement bio-équitable et tu m'en as souvent offert, ce qui m'a paru tout à fait légitime vu mes carences en cacao, détectables par une simple observation de l'état psychologique, (cela est, bien sûr, purement une excuse de cacaophage chimioorganohétérotrophe aérobie strict). En outre, anecdotiquement, tu étais la seule personne à comprendre la difficulté d'entretenir des cheveux bouclés longs et je l'écris juste parce que ça m'amuse ! Merci beaucoup Sophie pour tout cela, si ta présence a été déterminante scientifiquement, ton côté humain a aussi énormément contribué à ma réussite morale, intellectuelle et psychologique jusqu'au bout de ma thèse, ce fut précieux pour moi !

Oliver Nüsse ▪ Cher Oliver, tes conseils sur le matériel de microinjection et sur les étireuses m'ont bien servi pour faire des choix avisés. Tu as monté le microscope MONA et nous avons même été jusqu'à relier la table flottante au réseau d'air comprimé de la fac, donc le poste de travail est maintenant quasiment optimal ! A cette occasion tu m'as fait confiance et tu m'as formé pour son utilisation. Tu es très souvent venu t'enquérir et me poser des questions sur la suite de ma thèse, notamment le soir tard lors des journées à rallonge pendant lesquelles tu

m'accompagnais à quelques bureaux de là, tu m'as donné de nombreux conseils et des pistes, ces discussions étaient enrichissantes. Merci Oliver de ta prévenance et de ta confiance, ça m'a fait plaisir !

Elodie Hudik ▪ Chère Elodie, je t'ai croisé pour la première fois lorsque j'étais en stage de M2 au LCP. Je me demandais qui était et ce que faisait dans les environs, cette sympathique intruse qui accompagnait parfois Laurent Nault. Un an et quelques mois plus tard, voilà que tu embarques à bord du LCP et que tu prends tes aises à quelques pas de mon bureau ! Eh bien, grand mien m'en fasse, tu fus une voisine fort sympathique à l'instar de ta personne :-)! Scientifiquement, tu m'as essentiellement fait une excellente formation à la cytométrie en flux et tu étais toujours prête à rendre service ! De manière générale, nous avons bien ri, bien discuté, que ce fût dans les sittings laboratoire, sittings couloirs, aux repas ou encore chez toi en soirées-collègues ! Sache que j'ai remarqué mais aussi beaucoup apprécié ta franchise, ton honnêteté, ta gentillesse, ta prévenance et ta générosité. Merci beaucoup Elodie, c'était super chouette que tu sois au labo ça a vraiment égayé mon quotidien et aidé à tenir et ça m'a fait vraiment plaisir de te connaître ! Un grand merci aussi à ton mari. Merci Guillaume pour ta gentillesse et ta générosité qui ont contribué d'un point de vue personnel lors du dernier mois de ma thèse et de façon plus générale ça m'a fait plaisir de te rencontrer ! P.S. : Il est certain que le Fantôme de Donald Drunk, euh pardon, Donald Trump, reviendra, un jour, hanter les environs et effrayer la population avec des bracelets luminescents dans les narines !

Alexandra Zak ▪ Chère Alexandra, les quelques échanges que nous avons pu avoir lors des réunions NOX, de la JDD ou encore du congrès PhysBio 2018 ou encore de la soirée Halloween (bien que postérieurs à ma soutenance) étaient très plaisants ! J'ai trouvé mon maître sur les jeux de mots ! D'un point de vue scientifique, je trouve que tu réfléchis bien et que tu as l'esprit vif, j'ai donc aussi beaucoup apprécié de discuter science avec toi. Merci Alexandra, ça m'a fait plaisir de te connaître et ta contribution a été importante pour moi :-)! !

Jérémy Joly ▪ Cher Jérémy, ton arrivée au LCP fut mouvementée, tu as mis un certain temps à t'adapter au groupe mais finalement je trouve que tu t'es très bien intégré malgré ton tempérament Jérémyen ! Cette intégration a fait apparaître quelqu'un de cultivé, qui aime partager en toute simplicité autant que dans la complexité de notions, entre autres, historiques, culturelles, politiques et scientifiques. Si au début notre relation était compliquée, finalement la puissance de la communication et son caractère indispensable ainsi que nos évolutions personnelles respectives ont impliqué une compréhension réciproque qui nous a permis de bien discuter et de partager de bons moments où le rire était très présent et en ce qui me concerne j'ai appris à t'apprécier avec tes particularités ! Par ailleurs, nos discussions scientifiques étaient généralement intéressantes, j'ai apprécié de pouvoir parler à un immunologiste. Je ne sais toujours pas comment aligner spontanément et cursivement toutes les lettres de Yoghourt, ni de Yaourt et nous n'avons toujours pas trouvé d'adjectif pour 'lapin', en revanche maintenant nous savons qu'il s'agit d'une aliquote et d'un zymosane et si notre recherche des pires journaux de bio cell est restée mitigée, je suis sûr qu'il est possible d'en dégoter un ! Merci Jérémy pour ces bons moments dont ces quelques derniers moments dans un bureau commun, j'ai apprécié de t'avoir dans le groupe pour la dynamique de vie de labo supplémentaire que ça a apportée !

✓ **A l'équipe BIO-FM du LCP**

Marie Erard ▪ Chère Marie, nous avons essentiellement échangé en science, à travers notre travail d'équipe sur NOX2 pour la réalisation du papier trimère, mais aussi pendant les réunions NOX et autres discussions lors d'un passage à la cafétéria par exemple. Ces échanges étaient chaque fois enrichissants. J'ai en particulier apprécié de travailler avec toi sur l'initiation du projet trimère en cellules, au cours duquel tu m'as permis d'élargir mon champ de

connaissances et de compétences, mais aussi de m'adapter rapidement et de travailler efficacement sur des techniques et sur un sujet qui m'étaient inconnus. Tu m'as également donné des conseils très judicieux sur la microscopie de fluorescence qui nous ont aidés, Pauline et moi, à avoir des résultats encore plus pertinents sur les GUV ! Tu m'as fait confiance sur ces différents sujets et projets et ça a contribué à ma réussite et cette confiance fut vraiment précieuse pour moi. Enfin, tu as accepté de faire partie de mon Jury de Thèse et je te suis reconnaissant pour cette contribution ainsi que pour la rédaction de l'excellent rapport de soutenance. Merci Marie pour toutes ces contributions qui étaient importantes et précieuses pour moi et parfois même décisives, ça m'a fait plaisir de croiser ta route !

Hélène Pasquier ▪ Tu m'as apporté des éclaircissements importants sur l'utilisation des spectrophotomètres du deuxième sous-sol, en particulier sur l'utilisation du spectrofluorimètre que je ne maîtrisais pas totalement. Nous avons eu des échanges intéressants lors des réunions SIMBIOSE et à quelques occasions, nous avons un peu discuté de l'agriculture biologique et des arbres fruitiers, ça m'a apporté un petit plus au cours de ma thèse. Merci Hélène pour cette contribution qui a eu son importance pour moi !

Fabienne Merola ▪ Nos sujets de discussion étaient souvent centrés sur l'environnement, l'éthique de différents projets et de certaines stratégies gouvernementales, j'ai apprécié ta grande implication dans des causes qui sont importantes pour moi. Ces discussions étaient toujours enrichissantes. Pendant les inondations de 2016, tu m'as accordé ta confiance pour la surveillance des congélateurs et tu m'as invité à déjeuner avec un groupe de gens engagés très sympathiques avec qui je partageais globalement les opinions. Ces gestes gratifiants m'ont fait plaisir et je ne l'oublierai pas. De plus, entre autres, concernant mon sujet d'étude de la mesure des anions superoxyde en système compartimenté, tu m'as conseillé sur la réalisation de calculs d'approximations qui m'ont vraiment aidé pour mes interprétations. Merci Fabienne pour tout cela, ta contribution m'a beaucoup apporté !

Hana Ilichová ▪ Chère Hana, nous nous connaissons depuis un peu plus d'un an (2017) et tu as notamment repris mes manips sur le trimère en cellules. Tu m'as souvent accordé ta confiance en écoutant et même parfois en demandant mes conseils scientifiques/techniques et cela me fait plaisir, j'espère que ça a contribué pour toi ! En tout cas j'aime bien parler sciences avec toi parce que tu réfléchis bien, que tu as l'esprit vif et que tu sais te remettre en question mais aussi critiquer constructivement le travail des autres. Nous avons aussi un peu discuté de nos enseignements et c'était instructif ! Hors science, tu fus notre organisatrice de sortie restau et notre motrice pour tous les autres événements sociaux des doctorants, ce que j'apprécie. C'est facile de parler avec toi et souvent amusant, je te taquine un peu sur les erreurs linguistiques mais toujours avec bienveillance, ça fait partie du jeu, ton français est déjà excellent ! J'espère vraiment que tu atteindras tes objectifs. Merci pour tout Hana, j'ai réellement apprécié de t'avoir comme collègue doctorante pour cette dernière année de thèse, ça a beaucoup contribué pour moi ! P.S. : évite de te planter trop de haches dans la tête, sinon ça finira par se voir :-P !

Yasmina Bousmah ▪ Chère Yasmina, c'est un réel plaisir toujours renouvelé de parler avec toi, ça me met en général de bonne humeur, nous rions souvent, tu es toujours souriante, toujours très serviable et respectueuse. J'ai particulièrement apprécié ta gentillesse et ta serviabilité. Nous nous saluons généralement au moins deux fois par jour, parce que mieux vaut deux que zéro, n'est-ce pas ?! C'était chouette de ne pas être seul à venir bosser au labo le samedi, ce fut un plaisir de t'accompagner moralement dans tes révisions pour la L3 !!! Tu as aussi d'excellentes idées concernant l'organisation des repas mensuels. Sinon je suis d'accord avec toi, d'une part je ne fais pas de concession et d'autre part c'est nettement plus pratique de

manger sur une table que de manger par terre :-D ! Merci beaucoup Yasmina pour tout, ta présence a beaucoup contribué à mon intégration et au fait que je me plaise au labo, ce fut précieux pour moi !

✓ **A l'équipe BIO-CS du LCP**

Emilie Brun ▪ Chère Emilie, nous nous connaissons depuis le cours que tu faisais en binôme avec Fabien Caillez sur la chimie des surfaces au début de ma L3, en 2012. Depuis que je te connais, j'ai pu apprécier au fil de mes différents stages et de ma thèse au LCP ce que j'ai vu comme une progression girafe (je pense que tu comprendras, vu les remarques sur le développement personnel que tu fais parfois !) et ça m'a fait plaisir de voir ce développement, bénéfique pour l'ensemble du groupe selon moi (et probablement, je l'espère, pour toi ;-)) ! Alors que Pedro pourrait dire « First ! » quasiment tous les jours, tu pourrais quasiment toujours dire « Second ! » et moi « third ! » et Tania « fourth ! ». Cela ne t'empêchera pas de pouvoir dire souvent « der... » en fin de journée, avant pouvoir redire « Second ! », voire « First ! » le lendemain matin. Ainsi je t'ai, par phases, accompagné dans la réalité du « 10 à 15h par jour », réalité de celles et ceux qui aiment leur boulot et 'sacrifient' (guillemets parce qu'il s'agit d'un choix !) en conséquence une partie de leur 'vie privée' (guillemets parce que la vie pro peut aussi faire partie de la vie privée selon le point de vue !), et c'était très rassurant de savoir que nous étions au moins deux à trimer sur des durées extravagantes à des heures indues ! Anecdotiquement, être deux fut notamment utile lorsque nous nous sommes retrouvés nez-à-nez avec un cambrioleur qui a fui devant notre divine prestance (n'est-ce pas ? :-D), oubliant la majorité de son larcin ! Tu m'as aussi donné des conseils en pédagogie – et pas seulement pendant la formation à la pédagogie – mais également formé à la DLS, aidé parfois dans l'utilisation de ton labo... Merci Emilie pour ces moments scientifiques et non scientifiques incluant ce soutien que j'espère au moins un peu réciproque, ça a contribué à ma réussite de façon significative et cela m'était précieux !

Cécile Sicard-Roselli ▪ Nous avons peu échangé mais c'était stimulant pour le boulot de voir une voisine de bureau (et pas que) arriver tôt et repartir tard en sachant que tu viens d'une ville adjacente à Viroflay, (là où j'habite) et que tu fais donc sensiblement le même trajet que moi (j'assume être un peu simple d'esprit : les similitudes me font me sentir plus proche) ! Tu m'as filé des coups de pattes pour l'utilisation de ton labo et la cordialité a toujours été de mise, lorsque nous nous croisions, tu m'as souvent demandée si tout allait bien avec un sourire communicatif. Comme tu fais aussi des horaires un peu fous, tu fus également une voisine de bureau rassurante lors de mes rushs de boulot ! Merci Cécile pour ces petits +, qui ont contribué moralement de manière significative à ma réussite !

Stéphanie Droniou ▪ Voisine de bureau, depuis ma L3 lors de mon premier stage avec Chantal en 2013, nous avons toujours eu un relationnel positif avec le sourire et tu m'as souvent aidé pour l'utilisation du labo et quelques fois donné des conseils pour les irradiations. Une fois, nous avons aussi déménagé une énorme armoire métallique d'un autre bâtiment jusqu'au 350 et ce moment était, je dois dire, assez fun ! Même si nous avons finalement assez peu échangé, ces quelques moments furent plaisants et utiles et je me souviendrai de ta contribution. Merci Stéphanie d'avoir participé à ma vie au laboratoire, c'était important pour moi !

Fanny Mousseau ▪ Chère Fanny, c'est marrant de parler avec toi, souriante, souvent positive, parfois difficile à cerner, un peu naïve, franche et je dirais un peu lunatique – selon mon appréciation, il s'agit d'une caractéristique neutre – ce qui a enrichi les échanges ! Toi aussi tu fais parfois des horaires intensivement extensifs et tu m'as accompagné dans ces horaires post-alar-me-du-350 activée ! Nous avons pas mal discuté tant en science qu'en non-science (je n'ai pas trouvé le soulignement par au-dessus l'histoire de faire pseudo-matheux), et fait des

activités extra-labo avec d'autres doctorants. Je retiens que tu n'es pas forte à Mario-Kart mais que c'est quand même cool de jouer et j'aime bien cette mentalité puisque j'ai la même :-D ! Tu as aussi posé de nombreuses questions judicieuses et fait des remarques très pertinentes lorsque je répétais ma présentation de thèse. Merci Fanny pour toutes ces contributions que j'ai beaucoup appréciées, c'était vraiment un plaisir de te côtoyer en tant que voisine de bureau et en tant que collègue ! P.S. : 'Dans la jungle terrible jungle le lion est mort ce soir'... Forcément, à force de tirer la langue il se déshydrate et à force d'enlever sa fourrure pour danser il vend sa peau trop facilement... c'est malin aussi !!

✓ **A l'équipe BIO-SB du LCP**

Sophie Bernad ▪ Chère Sophie, tu as toujours été très gentille, attentionnée et empathique, ta présence tôt le matin avant tes enseignements, tes encouragements, ta compréhension des différentes situations vécues, professionnelles autant que personnelles, étaient très importantes pour moi. J'étais ton décacheteur de copies attiré (vive la carte d'étudiant !), mais aussi ton collègue de TP de chimie des solutions et c'était rassurant de pouvoir discuter des résultats et du contenu avec toi. Merci beaucoup Sophie pour ta gentillesse et d'avoir contribué de façon très importante à mon intégration tant au labo qu'en enseignement et aussi souvent contribué à mon moral, ce qui fut déterminant !

Delphine Onidas ▪ Chère Delphine, chaque fois que ma clé USB était sur l'imprimante, tu faisais croire à tout le groupe que je l'avais oubliée là alors que j'avais juste envie de la laisser là pendant 3 ou 4 (ou 5) jours ! Et quand une clé du labo disparaissait, tu faisais toujours croire que c'était moi qui avais oublié de la remettre à sa place fortuitement alors que j'avais juste envie de la garder dans ma poche pendant 3 ou 4 (ou 5) jours ! Franchement, je n'oublie jamais rien nulle part, ce sont des 'Fake News' ! Eh oui, le Tofu fumé par frottement c'est mon favori, même si je n'ai toujours pas compris sur quoi ils frottent ce fichu morceau de lait de soja coagulé avec du $MgCl_2$ pour le fumer ? Combien de fois ais-je éteint la lumière de ce fichu couloir pour constater que tu étais encore là toi aussi à des heures indues ? En tout cas, c'était très sympa et instructif de discuter avec toi de tout plein de choses, merci Delphine de ta bonne humeur communicative et de ta gentillesse et notamment d'avoir mis en sécurité mes clés USB (et autres affaires), tout cela m'était très précieux ! P.S. : rétrospectivement, tu ne parles pas si vite que cela et une fois le décodeur installé, seuls les profanes ont encore cette impression ! ;-)

Valérie Derrien ▪ Chère Valérie, parler au second degré est une seconde nature, ce qui fait de ton second degré un premier degré Valérien, qu'il est nécessaire de traduire systématiquement en premier degré conventionnel afin de comprendre le sens de ce que tu dis et ça me fait bien tripper. Nous nous sommes entraînés à l'utilisation du « casse-noisette 8 bar N_2 » (nom officiel à 100 k€) du labo et la pièce du casse-noisette ayant l'avantage d'être climatisée, était ainsi un lieu privilégié de nos combats de second degré et de nos partages de radiateurs, parquets, meulières, brocantes, pôle-nord, skis, fusibles, ajustements non linéaires, d'inhibitions par excès de substrat, de cheville 'entorsionnée', de poignet cassé, de plantes, de pommes de terre, de jardin et j'en passe ! Tu as toujours été à l'écoute des aspects professionnels comme personnels, toujours prête à rendre service également et j'aime beaucoup parler avec toi. Merci beaucoup pour toutes ces contributions, ces anecdotes et cette complicité qui ont eu un impact (factor) majeur sur l'ambiance de ma thèse, mon moral et mes réflexions et étaient précieuses pour moi !

✓ **A l'équipe AFMIR du LCP, physiciens en régime transitoire du groupe bio !**

Merci à tous les trois pour votre partage de bonne humeur, de compétences, votre gentillesse et serviabilité.

Alexandre Dazzi ▪ Parce qu'il faut bien commencer par le Chef, n'est-ce pas ? Nous avons échangé du sujet le moins sérieux possible jusqu'aux sujets scientifiques très sérieux. Tu ne te prends pas la tête, c'est facile de parler avec toi et je trouve ça cool. Maintenant que tes médailles sont en sécurité, il ne reste plus qu'à éviter la coriandre, les champs magnétiques, les avions... :-D ! Merci Alex, ça m'a vraiment fait plaisir de te connaître et de discuter avec toi !

Ariane Deniset ▪ La deuxième chef. J'ai eu le plaisir de discuter de plein de choses avec toi, sérieuses, moins sérieuses ou carrément pas sérieuses et ce fut vraiment sympa ! Tu m'as aussi souvent encouragé et tu as montré une grande confiance quant à mon avenir et tout cela m'a bien motivé ! Tu nous as aussi fourni une aide précieuse lors de nos manip préliminaires sur les GUV faites avec Jérémie. Tout cela a fortement contribué à l'ambiance positive de ma thèse, à ma bonne humeur et à ma motivation. Merci Ariane pour ta précieuse contribution ! Oh, j'allais oublier, merci d'avoir filé un coup de patte à mes parents pour mon pot de thèse ; ça nous a aussi donné une excellente occasion de parler pois-chiches et topinambours de façon détaillée et de nous marrer un peu !

Jérémie Mathurin ▪ Cher Jérémie, tu as commencé ta thèse en même temps que la mienne, la vie a fait que tu la termineras un peu après moi, mais quel super camarade tu as été ! Scientifiquement, tant en pratique qu'en théorie tu m'as été d'une grande aide, j'ai pu constater tes grandes compétences et les apprécier, c'était notamment très intéressant de travailler avec toi, même si nous n'avons pas eu le temps d'optimiser suffisamment la manip pour avoir des résultats probants. D'un point de vue personnel, nous avons pas mal discuté de sujets généraux, souvent de sujets médicaux, beaucoup des prouesses de médiocrité scientifique d'un certain David, tellement énormes qu'il vaut mieux en rire (bon OK il ne faut pas dire du mal des gens, mais là il y a un sacré level) ! Mais aussi, nous nous souviendrons, entre autres anecdotes, de JF Kennedy, de la chromatographie liquide et plus précisément de la fameuse HPLC sous laquelle il pourrait un jour se cacher une surprise... Merci beaucoup Jérémie, j'ai beaucoup apprécié ces moments et ces discussions, ça m'a beaucoup apporté, ça m'a été réellement précieux !

Ece Aybeke ▪ Chère madame la Turque, tu es restée quelques mois au labo en tant que post-doc et tu nous as apporté ton accent, ton sourire, un peu de ta culture et beaucoup de ta bonne humeur, de ta gentillesse et de ta générosité ! Nous avons discuté de beaucoup de choses différentes essentiellement hors-science et ces moments étaient très amusants ! Merci à toi Ece pour ce passage qui a laissé une marque très positive et qui a contribué significativement pour moi !

Jehan Waeytens ▪ Cher monsieur le belge en réaction oscillante avec AFMIR, tu fais partie des gens très sympas avec qui discuter sciences est extrêmement facile parce que tu aimes beaucoup ça, mais aussi parce que tu en sais vraiment beaucoup et que tu es très à l'aise sur les fondamentaux, notamment grâce à la masse impressionnante des enseignements que tu donnes au cours de ta thèse. En parallèle, nous avons parlé de tes enseignements, de tes voyages, de la cuisine et plus généralement de tout ce que tu fais hors science. J'ai toujours pris plaisir à discuter avec toi ! Merci Jehan pour cette riche contribution qui fut importante pour moi !

✓ **A l'équipe RISMAS du bâtiment 350 du LCP**

En préambule, je souhaite vous remercier en globalité pour votre gentillesse, votre présence, votre soutien et votre bienveillance. Ainsi, vous avez contribué significativement à enrichir le quotidien de ma thèse.

Michel Héninger ▪ Ta bonne humeur, ton positivisme, ton calme et parfois ta nonchalance, mais aussi nos discussions variées, souvent enrichissantes, par exemple sur l'emploi et aussi

ton intérêt systématique pour la suite de ma carrière professionnelle, m'ont fait vraiment passer de bons moments et cela m'a même remotivé plusieurs fois. Merci Michel pour ta bienveillance et ta présence, c'était important pour moi ! Et... Bon courage ! (Il fallait bien que je le case quelque part !)

Joël Lemaire ▪ Tu es discret mais très sympa ! J'ai beaucoup apprécié de parler de plein de choses, notamment le midi quand tu mangeais ta boîte de salade raisonnable de 1 L et moi ma boîte de salade déraisonnable de 5 L ! Nous avons bien ri ! Merci Joël pour ces moments agréables qui ont beaucoup enrichi mon quotidien de façon quasi quotidienne, ce fut un plaisir !

Hélène Mestdagh ▪ Nous avons beaucoup discuté pédagogie, enseignement, pertinence des enseignements, évolution des programmes du secondaire ou encore des programmes du CAPES/AGREG et ces discussions ont été vraiment importantes pour mes réflexions personnelles sur l'enseignement et la pédagogie, deux aspects qui sont pour moi centraux, tant ils m'ont tantôt beaucoup aidé, tantôt beaucoup desservi, mais toujours enrichi. Ces discussions, mais aussi les autres, comme celles concernant ton jardin, tes arbres fruitiers, l'escalade & co., étaient vraiment enrichissantes sur de nombreux plans. Merci Hélène, j'apprécie beaucoup ta gentillesse et ta bienveillance qui ont été importantes pour moi ! P.S. : J'espère que tu conserveras ton canapé au chauffage solaire près de ton bureau !

Claire Romanzin ▪ Nous nous sommes croisés la première fois lors d'un TD que tu donnais en M1 Chimie, (il s'agissait vraisemblablement de l'UE spectroscopies optiques). Nos discussions de sujets variés furent généralement requinquantes et rassurantes pour ma part, cela m'a permis de me sentir moins seul pour beaucoup d'interrogations comme le problème des compétences 'un peu trop' transversales, celui de la formation des EC et d'autres aspects de l'enseignement, les sittings du vendredi soir où nous nous racontions que ce sera mieux la semaine d'après tout en sachant qu'au prochain sitting du vendredi soir la situation pour ne pas être pire qu'aujourd'hui n'en sera probablement pas meilleure non plus ! Enfin, Merci Claire pour ces quelques moments qui ont contribué significativement pour moi !

Christian Alcaraz ▪ Nous avons eu l'occasion d'échanger sur différents sujets comme la cuisine, le lien entre généalogie et préfecture, (j'essaie d'ailleurs de refaire mon passeport, j'espère que ça se passera bien !) et j'ai eu le plaisir d'assister à votre soulagement à Alan et toi lorsque sa thèse fut finalement soumise. Ça m'a aussi fait plaisir d'évoquer avec un Ulissien la ville des Ulis que j'apprécie pour des raisons personnelles. Merci Christian d'avoir contribué pour moi à l'ambiance positive du labo !

Essylt Louarn ▪ L'ultra-bretonne du labo, je te comprends, la Bretagne c'est génial, je le sais même si je ne suis que demi-sel ! Nous avons eu des discussions variées généralement très dynamiques, notamment sur l'environnement, la Bretagne les enseignements *etc.* Scientifiquement, tu m'as aussi donné de précieuses idées, ne serait-ce qu'en tombant fortuitement sur quelques figures de mon manuscrit de thèse, tu m'as aidé à peaufiner un aspect méthodologique de ma thèse et tu nous as aidé lorsque Camille et moi avons tenté de mesurer l'HOCl dans mes solutions ; même si ce fut un échec, ce fut intéressant. Tu t'es aussi inquiétée de mon après-thèse et m'as donné des pistes. Merci Essylt, ce fut un réel plaisir et ta contribution fut importante pour moi !

Filippo Rusconi ▪ Que de discussions toutes plus détaillées les unes que les autres ! Certain(e)s personnes me disent souvent que je suis pointilleux, que je m'attarde trop sur les détails, voire que je suis trop rigoureux. Je crois que ces personnes n'ont pas dû croiser ta route et comme j'adore la précision, je dis cela en toute bienveillance ! Nous nous sommes attardés, sans jeu de mots, sur des infinitésimalités littéraires, philosophiques, historiques, scientifiques

et culturelles. Tu es la seule personne avec qui j'ai pu entrer dans les détails à ce point sur des sujets variés, (et encore j'estime que cela est resté superficiel), sans que je me sente limité Par mon interlocuteur. Merci Filippo, c'était très enrichissant, cela m'a fait vraiment plaisir !

Alan Lopez ▪ Cher Alan, tu as soutenu ta thèse en 2017 et tu es resté au LCP 6 mois en postdoc. Durant ces années, nous avons régulièrement discuté de choses variées. Tu m'as notamment soutenu moralement en partageant ta propre expérience et donné de nombreux conseils. Sur un autre plan, tu m'as beaucoup aidé dans ma fonction de représentant des doctorants et d'organisateur de la journée des doctorants. Merci Alan pour ces précieux conseils et pour ton soutien, c'était important pour moi !

Hala Dadi ▪ Chère Hala, tu as commencé ta thèse au même moment que moi et nous discussions régulièrement lorsque tu travaillais dans le même bâtiment que le mien. J'ai beaucoup apprécié ta gentillesse, ton calme, ta prévenance et j'ai adoré discuter avec toi de sciences et autre !! Merci Hala pour cette gentillesse qui m'a fait beaucoup de bien au cours de ma thèse ! Je te souhaite le meilleur.

Camille Duguet ▪ De passage pour plusieurs stages dont ton stage de M2, nous avons papoté de pas mal de choses et c'était vraiment sympa. Tu m'as parlé facilement de toi-même sans crainte du jugement et j'ai pu apprécier cette confiance, peu importe qu'elle soit personnalisée ou pas, ça a enrichi les discussions de façon significative. Enfin, nous avons fait des manips pour essayer de mesurer le HOCl en phase aqueuse et gazeuse, ça n'a pas fonctionné mais c'était intéressant, intrigant et amusant. J'ai pu, à cette occasion, observer avec plaisir une scientifique rigoureuse et investie. Merci Camille pour ces partages qui ont enrichi mon quotidien et m'ont motivé, notamment pendant la rédaction de mon manuscrit !

✓ **A l'équipe TEMIC du LCP**

Pedro De Oliveira ▪ J'ai déjà évoqué ma chaleureuse gratitude dans la partie concernant la direction du LCP ! Je n'ai pas évoqué que vous étiez mon enseignant en cours, en TD et pour certains TPs d'électrochimie en L3, ainsi que pour un TP d'électrochimie sur la voltamétrie cyclique en M2. Merci Pedro de m'avoir initié à ce passionnant domaine de la chimie qui m'a été très utile intellectuellement et plus concrètement pour de nombreuses expériences réalisées au cours de ma thèse, ce fut important pour moi !

Anne-Lucie Teillout ▪ La première fois que nous nous sommes croisés, tu m'as appris les bases pratiques de la voltamétrie cyclique en TP de L3. Par la suite, tu m'as beaucoup aidé pour l'utilisation de l'oxymètre Neofox d'Ocean Optics et ce fut une expérience très intéressante, bien que je n'aie pas réussi à en tirer quelque chose de concluant, faute essentiellement de temps pour réaliser des optimisations. Néanmoins, ces expériences m'ont appris une nouvelle technique et ce background m'a été extrêmement utile pour évaluer la pertinence de différentes méthodes de mesures du dioxygène notamment en congrès. Nous avons aussi un peu discuté de la thèse en général et je suis d'accord avec toi lorsque tu dis que la rédaction est une partie plutôt facile et pas le monstre qui nous est initialement présenté. Merci Anne-Lucie pour ton partage de compétences et pour ta gentillesse, ça a été important pour moi !

Israel Mbomekalle ▪ Nous nous sommes croisés de nombreuses fois notamment le matin, sans avoir beaucoup échangé, ta bonne humeur quasi-constante et ton sourire permanent étaient très communicatifs et me donnaient un petit boost du matin ! Un autre exemple de petite interaction qui a son importance pour la vie de tous les jours. Merci Israel pour ce petit plus qui était important pour moi !

Jean-Louis Marignier ▪ Tu m'as fait la visite d'Elyse au détour d'une manip une fois quand j'étais en L3 et une deuxième fois beaucoup plus en détail en fin de thèse au cours d'une autre manip. Je t'ai alors posé des dizaines et des dizaines de questions auxquelles tu as toujours répondu avec plaisir, pédagogie et rigueur. En outre j'ai constaté que tu es quelqu'un de gentil, sympa et passionné, avec qui j'ai vraiment bien aimé travailler même si cela était de courte durée ! Merci Jean-Louis pour toutes ces connaissances transmises et pour ta bienveillance, ce fut un réel plaisir et une réelle contribution au cours de ma thèse !

Marie Clément ▪ Nous avons formé un binôme efficace pour certains aspects en tant que représentants des doctorants, notamment pour la JDD, un peu moins pour d'autres. Dans tous les cas, merci Marie pour ta contribution à la réussite de notre action dans cette fonction !

Teseer Bahry ▪ Nous avons eu peu d'occasions de parler mais c'était toujours super cool de partager avec quelqu'un de souriant et sympa comme toi ! Merci pour ta gentillesse et ta spontanéité qui ont contribué à l'ambiance positive que j'ai ressentie pendant ma thèse !

Thomas Noblet ▪ Cher Thomas, en plus d'être très sympa et pédagogue, tu fais de nombreuses choses pour la communication et l'animation du laboratoire et ça m'impressionne beaucoup ! Tu as pris la succession en tant que représentant des doctorants avec Aïcha, vous avez vraiment su booster l'ambiance et même si par moment ça n'a pas suivi, cela traduit seulement la complexité de l'animation pour laquelle vous avez fait beaucoup d'efforts ; la journée des doctorants était aussi très réussie. Par ailleurs, tu es très gentil, prêt à aider, dynamique et communicant. Tu es physicien et pourtant tu es venu assister à ma thèse jusqu'au bout, incluant les presque 3h de questions de biochimie, biophysique et physicochimie !!! J'espère avoir été assez pédagogue pour que tu en tires quelques enseignements. J'ai beaucoup aimé partager avec toi, merci Thomas d'avoir enrichi mon quotidien de thèse, ça a beaucoup compté pour moi !

Et pour les autres avec qui j'ai pu interagir mais auxquell(e)s je n'ai pas pensé en écrivant ces remerciements, merci pour vos contributions qui furent utiles à leur niveau.

✓ **A l'équipe Théosim du LCP**

Pascal Pernot ▪ Merci Pascal d'avoir accepté de faire la vérification régulière que tout se passait bien pour moi pendant ma thèse et plus généralement de ta gentillesse et d'avoir toujours été attentionné lorsque nous nous croisions, ça m'a rassuré et j'ai apprécié cela !

Aurélien De La Lande ▪ Nous nous connaissons depuis le M2 où tu m'avais fait cours sur les différentes méthodes de modélisations en chimie théorique, tu as aussi été mon rapporteur de stage de M2. *Fabien Caillez* ▪ Nous nous connaissons depuis la L3 où tu m'avais fait cours sur la chimie des surfaces. Merci Aurélien et Fabien pour votre gentillesse et votre prévenance qui ont beaucoup contribué pour moi pendant ma thèse et avant !

Merci aux autres, *Carine Clavaguera*, *Isabelle Demachy* (aussi en tant qu'enseignante en modélisation en M2 !), *David Lauvergnat* (également pour les TPs de chimie théorique en M2 !), *Bernard Levy* (également pour ton cours de physique en M2 !), *Jacqueline Ridard*, *Bernard Rousseau*... pour vos apports humains et, ou scientifiques pendant la JDD, pendant Simbiose ou au détour d'un couloir ! Aux autres que je ne cite pas mais pour lequel le cœur y est si vous avez contribué !

Rémi Fauve ▪ C'était très sympa d'échanger avec toi sur la science, la thèse, la recherche et autres ! J'ai toujours beaucoup apprécié nos interactions, systématiquement intelligentes et pleines d'humour ! Merci pour ta contribution Rémi ça m'a fait vraiment plaisir !

✓ **Au groupe CLIO du LCP**

Nicolas Gestin ▪ Oui Nicolas, je sais que tu manges de la viande ! Tu fais partie des gens qui taquinent sur le mode de vie et je fais partie des gens que ça amuse, c'était bien drôle de parler avec toi sur ça ou d'autres sujets. Merci Nicolas, ça m'a fait plaisir de partager avec toi !

Vincent Steinmetz ▪ Nous avons travaillé ensemble à CLIO avec Debora et Chantal lorsque j'étais en stage de L3 en 2013. Tu m'as bien aidé pour les manips et la compréhension de l'ICR, de l'IRMPD, du laser CLIO ainsi que de la spectro de masse et des lasers en général. En plus de cela, tu étais très sympa et compétent et c'était agréable de travailler avec toi. Merci Vincent de m'avoir fait confiance et d'avoir contribué à faire de ce stage une riche expérience à plein de niveau !

Debora Scuderi ▪ Tu as été mon enseignante en TD de spectroscopies optiques en L3, puis tu m'as encadré à CLIO lors de mon stage de L3 en 2013 avec Chantal. Ce stage fut vraiment très formateur, tu étais disponible, didactique et passionnée, mais aussi super sympa, nous avons bien ri toujours constructivement et tu répondais à chacune de mes questions ! Merci beaucoup Debora, pour ton apport technique, scientifique et de m'avoir transmis ta passion pour la recherche, ça m'a beaucoup apporté !

Jan Bohl ▪ Je ne trouve pas ton groupe officiel au LCP donc je te mets chez CLIO ! C'était très sympa de parler avec toi, entre autres sujets des différences entre les systèmes de recherche et les aspects sociaux des différents pays et des différents laboratoires, mais aussi du futur de la recherche en général ou encore de notre futur en tant que Docteurs en Chimie. Merci Jan, j'ai été ravi de te connaître et de partager avec toi !

✓ **To the Biomedical Research Group of the Aston Research Centre for Healthy Ageing, Aston University, (Birmingham, Aston Triangle, B4 7ET, UK)**

My English is still not perfect, but anyway, I strongly wish to give you from the bottom of my hearth my most sincere aknowledgement! You certainly all contributed significantly to my success in research.

Corinne M. Spickett and Andrew Pitt ▪ Dear Corinne and Andrew, we know each other since 2014. You welcomed me very nicely in your lab for a 3-months internship and Corinne helped me enormously with accommodation, UK life and to get a European funding. I really liked your kindness, your availability and the dynamic you had in your team. I strongly appreciated your thorough knowledge and skills, and particularly your patience and understanding regarding my low English level, hopefully partially compensated by my scientific background and understanding in Chemistry. I remember very well how strongly you trusted me, notably with Mascot database but not only, despite I was just a Student in first year MSc! I know I seemed a little bit strange because of my English inhibition – today it is much better I can speak freely! – and because I am maybe sometime too thorough and quiet and as well sometime excessive, but I really liked this experience that was strongly enriched thanks to you both. I am really glad I met you, I will always remember you and this very challenging experience, scientifically but also personally! Thank you so much for everything, Corinne and Pitt, that was very valuable and important and your contributions for me was awesome!

Karina Tveen Jensen ▪ Dear Karina, you kindly welcomed me in your team and helped me in the lab and especially with LC-MSMS and for the dialysis of my proteins before Circular Dichoism. We also had nice personal discussions outside lab. Thank you, Karina, for your help and your kindness, that was important for me!

Gemma Warren ▪ Dear Gemma, you also nicely welcomed me in your team, you helped me many times in the lab for everyday experiments. Then, you helped me to prepare samples and finally to perform Circular Dichroism at the University of Warwick and that was a very nice experience. At this occasion, you also showed me the campus of the University of Warwick and we discussed of your background in mathematics, of your PhD but also of your French experience during your studies in Strasbourg. Thank you, Gemma, for these nice moments, for your help, your positivism and your kindness, you contributed significantly for me!

Also, thanks a lot to all the PhD Students for their kindness and understanding in front of my, sometimes, curious behaviour and English inhibition, and precisely to helped me to remove my inhibitions... More specifically *Stuart Meredith*, you helped me a lot with in-gel protein digestion and LC-MSMS, *Sabah Pasha* and *Ivan Verrastro*, you helped me for LC-MSMS and data processing, *Stuart Calimport*, for your kind advices in lab and during Tuesday-monthly meeting, *Alpesh Thakker* for your generous explanations of LC-MSMS on lipids and your trust on my scientific knowledge. So, thank you all, as well for your kindness and generosity, you have contributed in many ways strongly for me and I wish you to know this is important for me!

I would like as well to acknowledge postdocs, researchers, including *Alex Cheong* and *Michael Davies*, and others in the open space and in offices around, that contributed for me in any way.

✓ ***A mon équipe de l'ancien Institut de Biologie des plantes (IBP) aujourd'hui Institut des Sciences des Plantes de l'Université Paris Saclay à Gif-sur-Yvette***

Graham Noctor et *Amna Mhamdi* ▪ Cher Graham et Chère Amna, vous avez encadré et supervisé mon premier stage de recherche volontaire lorsque j'étais en L2 en 2012 et Graham, vous avez été mon enseignant de biochimie végétale en L2. Vous m'avez rapidement laissé manipuler en toute autonomie. Vous m'avez appris les bases de la recherche rigoureuse, vous m'avez permis de faire un stage intensif avec des horaires très étendues ce qui m'a donné la chance de faire et d'apprendre beaucoup de choses et de techniques. Vous m'avez aussi fait confiance pour les manips, même pour manipuler le BET et le Carbone 14, ou encore pour le cahier de labo, le traitement des données, le rapport... Je vous suis extrêmement reconnaissants, vous avez fait émerger en moi une passion pour la recherche, ce qui m'a fait m'orienter et m'épanouir dans cette direction. Bien entendu, Amna et moi avons de surcroît beaucoup discuter en dehors de la science et j'ai beaucoup apprécié ta gentillesse, ta spontanéité et ta générosité. Merci beaucoup Graham et Amna pour ces énormes contributions et pour cette opportunité que vous m'avez offerte, ça a été et c'est encore précieux pour moi.

Je souhaite également remercier *Marie-Sylviane Rahantaniaina*, *Shengchun Li* et *Yi Han* pour leur gentillesse et les échanges que nous avons pu avoir qui ont contribué pour moi à la réussite, à l'époque, de mon stage et à mon intégration au labo.

✓ ***À mon école doctorale Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes (2MIB)***

Christophe Colbeau-Justin ▪ Merci de m'avoir permis, en tant que directeur de l'ED, de faire partie de cette ED et donc d'être doctorant de l'Université Paris Saclay. Merci de ta gentillesse et d'avoir contribué à ce que mon doctorat se passe dans de bonnes conditions !

Corinne Ruello ▪ Chère Corinne, en tant que secrétaire de mon école doctorale, tu t'es occupée de tous les aspects administratifs de façon remarquable. Tu communiquais régulièrement avec nous pour nous informer, mais aussi nous expliquer, toujours de façon claire et pertinente, ce que nous avons à faire et ce que nous pouvions faire et tu étais toujours disponible pour

répondre rapidement et efficacement à mes questions. J'ai apprécié de discuter avec toi également (il faut dire que tu as la parole facile :-)) ! Merci Corinne pour ta compétence, ton efficacité, mais aussi pour ta gentillesse et ton soutien qui ont contribué pour moi à la réalisation dans de bonnes conditions de mon doctorat et donc à ma réussite !

✓ **Aux autres services, administratifs, informatiques et logistiques.**

Merci à tout le service administratif du LCP pour l'important travail qui a été fait chaque jour et qui fut indispensable pour le bon fonctionnement du LCP et pour la réussite de ma thèse. En particulier, *Séverine Bourguignon* s'est occupée de la majorité des aspects administratifs de ma thèse, de mon équipe et de mon groupe en faisant le lien avec le CNRS et la Fac, en s'occupant des commandes, des ordres de mission, des remboursements de mission... Merci beaucoup *Séverine* pour tout ce travail, mais aussi pour ta gentillesse et ta prévenance. Merci aussi à *Anne Morel* pour son efficacité en tant que secrétaire de direction mais aussi sa gentillesse et les discussions très intéressantes que nous avons eues. Merci aussi à *Eve Ranvier* pour son aide lors de la journée des doctorants, en tant que secrétaire de mon M2 et pour tous les efforts réalisés pour la communication du LCP. Merci à toutes, ainsi qu'à toutes les autres (bonjour la parité :-D ;-P !) pour vos contributions qui furent déterminantes pour que j'arrive au bout de ma thèse (et de mes stages !) dans de bonnes conditions !

Merci au service informatique du LCP, *Jessica Martinez*, *Karim Hasnaoui* et *Jean-Marie Teuler* pour leur important travail dans la maintenance et amélioration du parc informatique ainsi que des différents outils à disposition. Ils nous ont donc permis de travailler dans de bonnes conditions et ce, toujours avec le sourire ! Merci donc pour tout cela, qui a été très utile pour la réalisation de ma thèse !

Merci au service logistique du LCP, en particulier *Joël François* et *Merciano De Azevedo*, qui m'ont beaucoup aidé notamment en réceptionnant les colis, en réparant ce qui était cassé, en imprimant mes posters, en s'investissant dans les différents événements du LCP et notamment la journée des doctorants, mais aussi en m'aidant à gérer les cas d'urgence comme lors des inondations de 2016. Merci également à vous d'avoir été si disponibles, si gentils, si serviables et d'avoir su garder le sourire en toute circonstance, ça a compté pour moi !

Merci à *Amandine Ucciani* pour sa gentillesse, ses compétences, sa patience, sa compréhension et sa réactivité dans la gestion de mon dossier pour l'archivage de mon manuscrit, la détermination des mots clés et tout ce que cela implique. J'ai beaucoup apprécié votre contribution, c'était rassurant de savoir que vous vous occupiez de mon dossier et ça a compté notamment, mais pas uniquement, dans l'urgence pour le dépôt final !

Merci à *Sophie Havard* et à *Mathilde Khétache* pour leur gentillesse, leur compréhension, leur compétence, leur patience et leur réactivité au service financier de l'université pour les doctorants de Paris Sud. Et croyez-moi, je pèse sincèrement mes mots parce que, honnêtement, vous manquez déjà beaucoup à toutes les doctorantes et tous les doctorants dans ce service !

➤ **Côté Enseignement**

Aurélien Debelle et au reste de l'équipe enseignante ▪ Cher Aurélien, tu m'as permis d'enseigner l'Atomistique pendant mes trois années de thèse dans l'UE, (CHIM101C/DLCH101C), dont tu étais le responsable. Tu as été très disponible, très à l'écoute, tu communiquais vraiment très bien avec l'équipe des enseignants, tu m'as fait confiance. J'ai

beaucoup aimé enseigner dans cette UE et travailler avec toi et l'équipe. Merci Aurélien de m'avoir permis de faire ces enseignements qui ont été pour moi très enrichissants, très formateurs et une excellente expérience !

Lionel Amiaud et au reste de l'équipe enseignante ▪ Cher Lionel, tu m'as donné l'opportunité d'encadrer les TPs de l'UE CHIM109 dont tu étais le responsable. Cette UE m'a permis d'encadrer des centaines d'étudiants et il était très intéressant pédagogiquement de voir tout ce panel d'étudiants ! Toutes les directives qui concernaient l'UE étaient très claires, j'ai eu plaisir à travailler avec toi et l'équipe. Merci Lionel pour cette opportunité dont j'ai tiré des enseignements importants !

Merci à l'ensemble de mes étudiants d'avoir suivi mes TDs et mes TPs, travailler avec vous toutes et vous tous fut très riche d'enseignements à de nombreux niveaux !

➤ **Côté Etudes**

A toutes mes enseignantes et tous mes enseignants en primaire, au collège Jean-Racine de Viroflay, au lycée Marie-Curie de Versailles, en prépa TB à l'ENCPB de Paris et à la fac d'Orsay ▪ j'en citerai seulement certains et certaines, notamment *M. Cordin* et *M. Corda*, qui étaient respectivement mes enseignants de SVT et de Sciences Physiques lorsque j'étais en 3^{ème} au Collège Jean-Racine de Viroflay et sans qui je n'aurais probablement pas pu passer en seconde STL. Ils ont en effet eu confiance en moi et ont beaucoup insisté pour que j'aie l'autorisation de passer en seconde STL, alors que je n'avais clairement pas le niveau sauf en SVT, ce qui a donné ce que je suis aujourd'hui – comme quoi, 'pas le niveau' ne veut vraiment rien dire. Mais aussi toutes et tous les autres et je souhaite citer en particulier *Dominique Pariot* de Terminale STL pour sa confiance et ses grandes qualités pédagogiques, ou encore lorsque j'étais en classes préparatoires TB à l'ENCPB de Paris, *Joëlle Rumeau-Faivre* qui m'a initiée si rigoureusement à la téléologie, *Philippe Canadas* qui s'est acharné pour redresser notre niveau en maths et en particulier m'a permis d'acquérir une excellente rigueur, *Patrice Cazaubon* pour son cours si complet et si bien fait sur l'enzymologie et la chromatographe, *Sophie Warin*, pour son acharnement à nous faire comprendre la chimie. Ou encore à l'Université Paris Sud *Talal Mallah*, qui le premier a réussi à me faire comprendre intuitivement la chimie et à me la faire apprécier au-delà de tout ce que je pouvais imaginer, *Vincent Gandon*, pour son super cours bien complet de chimie organique avancée de L2 (7,5 ECTS !), grâce auquel j'ai pu intuitivement beaucoup de choses, *Raphaël Haumont*, pour ses grandes capacités pédagogiques et sa transmission très efficace de la cristallographie, *Lionel Amiaud*, pour son efficacité à transmettre la symétrie moléculaire et j'en passe... .. Merci à toutes et à tous.

Paul Jacob Dana ▪ Cher Monsieur Dana, mon père et mes frères – et même d'autres membres de ma famille – ont été vos étudiants, puis nous nous sommes connus à mon entrée en seconde, en 2005. J'ai passé au moins quatre heures par semaine – parfois beaucoup plus – à travailler les mathématiques avec vous, entre le début de la seconde et la fin de la prépa. Il est important de préciser qu'en sortant du collège, je partais d'un niveau où je ne savais pas ce qu'était un exposant et je savais tout juste diviser 4 par 2, la notion de « trait de fraction » était d'ailleurs pour moi encore très obscure (pour ne pas dire 'trait obscure'). Poser une multiplication ou une addition et encore pire une soustraction, étaient des exercices particulièrement compliqués pour moi. Le mot 'théorème' avait tendance à me faire fuir et la notion d'équation m'était inconnue. Bon, sans rentrer davantage dans le détail, globalement je ne connaissais quasiment rien en maths. En 3 ans, non seulement vous m'avez appris les mathématiques – j'ai appris tout le programme du collège et le programme du lycée (et plus encore) et je me suis tellement acharné

que je suis finalement devenu bon – mais en plus vous avez réussi à me faire aimer les mathématiques ! Tout cela en grande partie grâce à vous, vos qualités d'écoute, vos qualités pédagogiques, mais aussi vos qualités humaines, votre colossale culture et votre grande curiosité. Point très important, vous m'avez donc sorti de la spirale infernale dans laquelle j'étais plongé en étant 'nul en maths' et je suis là où je suis et ce que je suis aujourd'hui en grande partie grâce à vous, (vous disiez ne pas aimer cette expression, « grâce à », à cause de sa connotation sacrée, mais je la trouve plutôt appropriée dans le présent cas). Avec votre indispensable aide, un élève tamponné « très mauvais en maths » à la fin du collège, a eu finalement 20/20 au bac de maths et est devenu le premier en analyse et en algèbre en prépa... puis a décroché un doctorat de chimie. De surcroît, j'ai réellement adoré travailler avec vous pendant toutes ces années, vos qualités scientifiques et vos qualités d'enseignant étaient incroyables, mais vos qualités humaines l'étaient tout autant et cela m'a énormément enrichi. Merci infiniment Monsieur Dana pour tout ce que vous avez fait, d'avoir partagé avec moi toutes ces connaissances, ces compétences, mais aussi ces qualités qui vous sont propres. Merci d'avoir tant contribué à ma réussite et à ma personne, ce fut extrêmement précieux pour moi et ça l'est toujours !

➤ **Côté Perso : Contributions déterminantes hors du cercle des proches**

Francis Bardot ▪ J'ai longtemps chanté en tant que soprano, puis en tant que ténor sous la direction de Francis. Cher Francis, tu m'as énormément apporté notamment à travers ta rigueur, ton exigence, ta sévérité, ta passion, tes ambitions, mais aussi ta gentillesse et ta générosité. Sous ta direction, j'ai énormément gagné en confiance, en autonomie et j'ai trouvé une passion, que je ne peux malheureusement plus poursuivre, la vie en ayant décidé autrement. J'aimais vraiment beaucoup apprendre, mais aussi chanter en concert sous ta direction. De nombreux concerts, plusieurs magnifiques tournées dans le monde, Tunisie, Grèce, USA... Bien sûr tout cela n'a été possible qu'avec la contribution de nombreuses autres personnes impliquées dans les rouages de tes chorales, mais aussi évidemment avec la contribution de toutes et de tous les autres choristes. Très chaleureusement, Merci Beaucoup Francis pour cette splendide expérience extrêmement formatrice et enrichissante sur de nombreux plans ! Merci aussi à toutes et à tous les autres d'avoir contribué. Très honnêtement, je ne serais probablement pas arrivé là sans cette formidable aventure, véritable expérience de vie dans laquelle j'ai baigné pendant une dizaine d'années et qui fut et est encore extrêmement précieuse pour moi.

Isabelle Padovani ▪ Chère Isabelle, tu ne me connais pas, je te connais via Youtube et j'ai assisté à une de tes Rencontres au Cœur du Vivant à Villejuif en octobre 2018. Néanmoins, sans me connaître tu m'as apporté énormément pendant ma thèse à des moments qui étaient très difficiles pour moi en me faisant découvrir la CNV, l'existence des MAI, en partageant les récits de tant d'expériences... Mais pas seulement, alors que j'étais à une impasse en développement personnel, tu m'as ouvert les yeux vers de nouveaux horizons et je peux maintenant me fixer des objectifs et avancer sur le chemin de mon choix. Merci de tout mon cœur Isabelle pour cet apport qui fut en vérité à plusieurs moments déterminant pour mon équilibre et qui continue de m'apporter beaucoup.

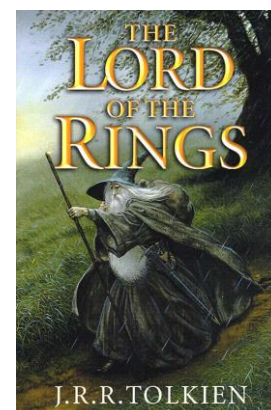
Mais aussi, Merci à mon ancien club de volley de l'USMV dans lequel j'ai passé 7 ans et notamment à *Guy Vergely* pour m'avoir fait tant progresser sans préjugés malgré des difficultés intrinsèques, me permettant de me libérer de nombreuses inhibitions, Merci à mon ancien club d'équitation de Versailles Porchefontaine dans lequel j'ai passé 6 années de très bons moments

et appris beaucoup, encore une fois parmi des gens qui me prenaient tels que j'étais, Merci à mon club d'Aikibudo de Vélizy-Villacoublay dans lequel j'ai passé trop peu de temps mais qui m'a intensément enrichi et en particulier merci à *Sensei Dominique Blanc-Pain* pour ses indéniables qualités de Sensei, Merci à mon club de Karaté de l'USMV et notamment *Jean-Michel Amireille-Coldiche* pour la discipline qu'il m'a transmise.

Christophe et Isabelle Huneau ▪ Cher Christophe et Chère Isabelle, je vais faire très court, mais il est important pour moi de souligner à quel point cette expérience d'environ 3 ans de travail sur le marché avec vous et grâce à vous a été importante pour moi et formatrice. J'ai appris beaucoup sur les fruits et légumes, je me suis endurci, j'ai appris le contact avec la clientèle. Et bien d'autres choses, mais surtout j'ai découvert en vous des patrons humains, gentils, attentionnés, équitables, rigoureux. De plus, vous m'avez donné votre confiance à de nombreux niveaux et ça m'a vraiment fait chaud au cœur de constater que vous croyiez en moi. Merci beaucoup Christophe et Isabelle de m'avoir permis de faire cette super expérience enrichissante, ça a beaucoup compté pour moi ! J'ai été très heureux de vous rencontrer et de travailler avec vous en participant à la belle aventure d'Essentiel Bio !

➤ **Côté Perso : A mes amies et amis**

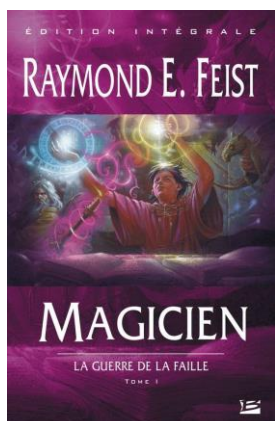
Thomas Du Crest et sa famille ▪ Je vais rester dans les très grandes lignes, (non, pas le TGV...), parce que je pourrais écrire un livre ! Très cher Thomas, nous étions dans la même classe en maternelle et cela fait maintenant 20 ans que nous sommes amis, depuis le CM2 à l'École des Arcades de Viroflay. A l'époque, notre affinité commune pour certains jeux vidéo (au hasard, quelques images ;-)) a initié notre pérenne amitié, puis nous avons partagé beaucoup de choses, nos passions, nos divertissements, nos sports... bref, (j'avais commencé à développer mais voyant le nombre de pages augmenter dangereusement, j'ai décidé d'abrégé par un 'bref' :-)) nous étions très souvent inséparables, jusqu'à partir en vacances ensemble. Tu m'as apporté énormément d'un point de vue personnel, à travers ta gentillesse, ta générosité, ton calme, ton pragmatisme, mais aussi les réflexions que tu as pu me faire en tant qu'ami et grâce auxquelles j'ai pris conscience de nombreux aspects de ma personne, ce qui m'a permis de travailler dessus. De surcroît, tu as très fortement impacté et tu impactes encore le développement de ma culture artistique, ludique, cinématographique et littéraire et plus largement contribué à l'élargissement et à l'affinement, ou devrais-je même dire l'affinage, de mes affinités. Tu m'as notamment, de façon totalement non exhaustive, transmis ta passion, encore d'actualité, pour la science-fiction et l'heroic-fantasy. En outre, tu t'es intéressé à mes études, à ce que je faisais, alors que ce n'était pas du tout ton domaine et j'ai aussi pris beaucoup de plaisir à m'intéresser à tes études et à ta passion pour le dessin qui t'a conduit, à force de travail acharné – j'en ai été le témoin ! – à avoir un niveau à mon avis carrément génial et à en faire ton métier en tant que 'concept artist' de jeux vidéo puis de films, (allez hop un peu de pub, bon OK la visibilité est 'plus-que-bof', mais sait-on jamais :-P <https://thomasducrest.artstation.com/> (le 31/10/2018)). Pour conclure, tu m'as toujours soutenu dans tout ce que j'entreprenais et vivais et j'ai toujours été de tout cœur avec toi également, aujourd'hui nous sommes physiquement éloignés puisque tu es à Londres et moi en Ile-de-France, (et je ne sais pas où je serai demain), mais le cœur y est et nous essayons de



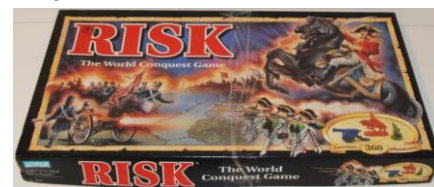


compenser cette distance tant que possible. Merci infiniment Thomas pour cette précieuse amitié, pour ces précieuses années, pour ton précieux soutien, pour tout, je suis fier de t'avoir pour ami, j'ai beaucoup de chance, c'est aussi grâce à toi que je suis là où j'en suis et que j'ai fait ce que j'ai fait ! Je profite de ce paragraphe pour remercier ta sœur *Agathe* pour sa curiosité, sa gentillesse, son intérêt pour ce que je fais et les discussions très intéressantes qui m'ont poussées dans mes derniers retranchements pédagogiques et réflexifs comme savent si bien le faire les bons littéraires ! Merci Agathe, ta contribution fut précieuse pour moi pendant ma thèse. Je souhaite également te dire, Thomas, dans ce court hommage que je suis de tout cœur avec toi et ta famille pour la douloureuse perte de ton papa, il restera dans nos mémoires et nos cœurs et il est important pour moi de souligner que ta maman et ton papa, *Sylvie* et *Patrick*, ont fortement contribué au développement de notre amitié à travers leur gentillesse, leur générosité et l'ensemble de leurs autres qualités. Ils ont toute ma plus sincère gratitude pour cela.

Alexandre Maurin ■ Ici aussi, je vais rester dans les grandes lignes et ce sera très peu exhaustif... Très cher Alexandre, un jour en l'an de grâce 2005, alors que nous étions dans la même classe de 3^{ème} depuis plus de 8 mois, nous nous sommes croisés pour la première fois – Eh oui ! – dans la cour de récréation du Collège Jean-Racine de Viroflay et nous avons commencé à discuter religion, espèce humaine et compagnie ce qui a initié notre amitié. Il serait vraiment très peu approprié d'évoquer plus avant cet échange sur la place publique, toujours est-il que nos opinions de l'époque et nos structures réflexives respectives ont initié notre amitié, qui perdure à ce jour. Nous étions très souvent ensemble, nous avons beaucoup discuté métaphysique, philosophie, religion, politique, sociologie, sciences dures, littérature, mais nous étions également férus de jeux vidéo et de jeux de société, notamment

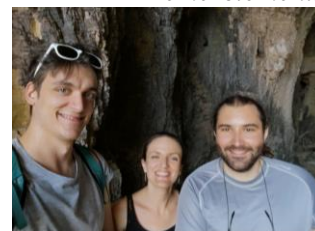


Risk lorsque nous trouvions des compagnons de jeux, nous - nous sommes aussi émulés sur des affinités réciproques plus précises comme l'heroic-fantasy entre autres. J'ai également pris plaisir à te transmettre mon goût pour la cuisine – on commence toujours par faire revenir les oignons et on réfléchit après ! Plus tard, lorsque tu étais à Centrale Lyon, tu m'as transmis ta passion du développement personnel conscient, volontaire, que je continue de creuser tous les jours et qui m'a beaucoup aidée. Lorsque je suis entré en 3^{ème}, je me suis épris du montage d'ordinateurs et de la maintenance informatique et un peu plus tard, lorsque nous étions au lycée, j'ai monté avec toi et pour toi un ordinateur statique, à l'époque tu as trouvé ça compliqué et tu étais impressionné... aujourd'hui ça fait partie intégrante de ton métier, tu es devenu très bon et tu diriges une entreprise d'informatique durable, de remise à neuf d'ordinateurs, de montage de maintenance entre autres que je trouve géniale, notamment pour son éthique (allez,

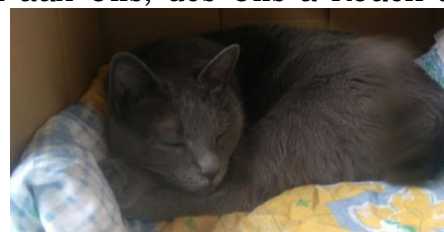


deux fois n'est pas coutume, encore de la pub avec une super bonne visibilité (ironie zéro), l'entreprise s'appelle M² : <https://www.mcarre.fr/> (le 31/10/2018) ! Durant toutes ces années, tu m'as bien soutenu et tu as eu une totale confiance en moi en me louant toutes mes qualités et même celles que je ne voyais pas, ce qui m'a beaucoup aidé ! Aujourd'hui, tu es à Lyon, je suis en Ile-de-France, nous nous voyons moins mais nous faisons au mieux et notre amitié est intacte ! Que dire de plus ?... on verra IRL :-P ! Merci infiniment Alexandre pour ta précieuse amitié, pour ta

précieuse présence, pour tout, je suis très heureux et j'ai beaucoup de chance de t'avoir comme ami, sache que tu as énormément contribué à me faire arriver là où j'en suis et à être ce que je suis ! Je souhaite aussi bien sûr remercier Cécile, un grand Merci Cécile pour ta contribution significative, j'ai passé de super moments avec vous deux, ça m'a fait beaucoup de bien et ça a compté pour moi ;-) ! Vous êtes bientôt papa et maman : beaucoup de nouvelles aventures en perspectives ! :-D



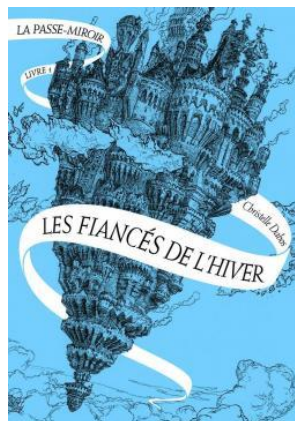
Caroline Conchon ▪ Là encore je vais rester superficiel... Très chère Caroline, cela fait maintenant 4 ans que nous nous connaissons. Peu de temps après, nous sommes devenus amis, nous discutons énormément de tout, du plus impersonnel au plus personnel. Nous avons et avons encore, la protection des animaux et l'amour de la nature en commun. Nous en avons vécu beaucoup des choses en 4 ans, du plus joyeux au moins joyeux, de la Clio à la Twingo à la Rover à la C2, du CAP au DAEU, de Saint-Jean aux Ulis, des Ulis à Rouen à Gometz... à Saint-Jean, de Penmarc'h à Beaugency à Honfleur à Saint-Valery-en-Caux... à Saint-Jean, de Saint-Jean à Janvry... à Saint-Jean... (...tu ne voudrais pas faire un tour ou deux (ou trois) de Saint-Jean par hasard ? Voir un tour de Saint-Jean, vu que je ne l'ai pas encore proposé !?...) ! Plus particulièrement, tu m'as énormément appris concernant la tolérance, le respect d'autrui et l'humilité. Plus simplement, tu m'as fait découvrir de nombreux endroits, fait rencontrer de nombreuses personnes, toujours dans la plus grande simplicité et humilité. Tu as vécu et tu vis encore des choses difficiles, ce qui t'a notamment forgé ce caractère, cette force intérieure dont tu ne sembles pas avoir conscience mais qui est évidente extérieurement pour qui cherche à te connaître un peu mieux ! Tu vas t'en sortir j'en reste persuadé et je te le souhaite du fond du cœur. Tu fus mon exutoire de secours, notamment, mais pas seulement, dans le sens où tu as souvent eu besoin d'aide et que dès que j'ai eu la possibilité de t'aider je l'ai fait, (même pour des trucs dingue du genre faire un aller-retour Paris-Rouen juste pour démarrer une voiture), parce que ça me fait plaisir et que ça m'enrichit et me libère de le faire et je pense que tu le mérites. Tu réussis aussi à me faire sortir régulièrement de la complexité de ma science et de ma vie, ce qui n'est pas une mince affaire comme tu le sais !! Tu es une très belle personne



Caroline, tu m'as toujours soutenu et conseillé dans ce que je faisais et ça m'a beaucoup aidé. Un énorme Merci Caroline pour tout ce que tu m'as apporté et qui fut et reste si précieux pour moi ! Tu dis que tu as de la chance d'avoir tes ami(e)s, sache que nous avons et en particulier que j'ai beaucoup de chance de t'avoir comme amie !

Gaëtan Damour ▪ Très cher Gaëtan, je t'ai connu via Caroline et initialement je pensais que tu étais du genre fantomatique dans la mesure où pendant un an j'ai essayé de te voir et jamais je n'ai réussi ! Puis, en 2016, j'ai réussi à te croiser, nous sommes ensuite partis en vacances à Penmarc'h ensemble, c'était super sympa de t'avoir à mes côtés, mais tes problèmes personnels t'ont rattrapé et la suite fut compliquée. Plus tard, nous avons eu l'occasion de discuter beaucoup plus personnellement, au nouvel an notamment et à d'autres occasions et encore plus récemment de nos points de vue respectifs sur le fonctionnement psychologique de l'être humain. Tu es quelqu'un de vraiment gentil, qui cogite bien, qui se remet en question, avec qui je peux et j'aime parler de tout de façon totalement désinhibée, ce qui est inhabituel et très difficile pour moi et ça me fait réellement plaisir de te connaître ! Peut-être un petit tour d'ULM ou de Cessna 172 un de ces 4 ?! ;-)

Un énorme Merci à toutes celles et ceux qui m'ont très fortement soutenu et dont la contribution a été significative même si je ne la développerai pas ici de façon détaillée parce que ce serait trop long : Merci à *Caroline Dubois* et



l'association et refuge GroinGroin, qui m'ont apporté un soutien extrêmement important pendant ma thèse, notamment en me faisant une entière confiance qui fait chaud au cœur. GroinGroin est une association et un refuge extrêmement important pour moi (allez, encore un peu de pub, trois fois n'est pas coutume ! : <http://www.groingroin.org>. Eh oui, j'ose même dans ma thèse !). Merci à *Marion Dupuy* bien sûr, pour tout ce qu'elle m'a apporté qui est trop long pour être cité ici ; Marion, tu resteras toujours très chaleureusement dans mon cœur et tu as tout mon soutien à vie. Merci à ta famille, ta maman *Sonia* et sa mère et son père, ton papa



Fabrice, ta sœur *Estelle*, ton frère *Mathieu*... qui m'ont aussi appris beaucoup sur certains aspects de la vie (eh si, c'est très sincère !) et j'offre tout mon soutien et mon empathie pour la dure perte de *Fabrice*. Merci à *Julie Tosi* pour sa gentillesse et de m'avoir notamment tant appris sur moi-même en si peu de temps. Merci à *Typhaine Richini* pour sa tolérance, sa gentillesse, sa générosité et ses leçons de vie. Merci à *Amandine Negroni* pour tous ces moments magiques et d'avoir été une si belle personne que j'ai été très heureux de connaître. Merci à *Pierre Lefebvre* d'avoir été un si bon ami entre Versailles, Vélizy et Penmarc'h, de m'avoir ouvert l'esprit grâce à ta curiosité exacerbée et tes centres d'intérêt, notamment de m'avoir initié à l'Aïkibudo ; même si nous nous sommes perdus de vue, sache Pierre que je pense chaleureusement à toi régulièrement pour ce que tu m'as apporté. Merci *Pauline Ah Lung* pour ta gentillesse, ta tolérance et ton soutien notamment en classe de 3^{ème}. Merci à *Hugo Pfefer* pour les bons moments passés notamment sur Risk en compagnie d'Alexandre et ceux passés en Bretagne. Merci à *Maxent Vandeville* et *Hervé Rivière* pour les bons moments et nos discussions souvent enrichissantes qui ont contribué à me façonner depuis le collège. Enfin, Merci à *Adrien Steines* d'avoir été un si magnifique ami pendant de nombreuses années dès le CM2 pendant lesquelles nous avons passé de forts moments enrichissants et bien que nous nous soyons perdus de vue depuis quelques années, je me souviendrai toujours de toi très chaleureusement (et qui sait ce que nous réserve le futur ;-)!). Je souhaite également remercier ta famille, en particulier *Brigitte*, *Olivier* et *Florian* avec qui j'ai aussi passé de super moments et qui ont aussi contribué à la force de cette amitié avec Adrien et à leur façon à ce que je suis aujourd'hui.

La difficulté est de prendre du recul et de n'oublier personne... Il est possible que j'oublie des gens, parce que « Avec le temps, avec le temps va, tout s'en va, on oublie le visage et on oublie la voix... » (Léo Ferré), il n'empêche que la contribution de l'époque elle, a bien existé et, le cas échéant, j'ai de la gratitude de me l'avoir fournie pour le ce que cela m'a apporté.

➤ **Côté perso, Pour conclure : À ma famille**

C'est l'histoire de 29 ans de vie, je serai donc probablement le plus bref ici, dans la mesure où les détails n'en sont plus et qu'ils nécessiteraient plusieurs milliers de pages pour être contés. L'exhaustivité de cette partie tend donc vers zéro, mais elle a le mérite d'exister.

A mes Frères, *François Serfaty* et *Jean-Yves Serfaty* ■ Là encore je ne peux pas résumer toute une vie en quelques lignes et je me contenterai d'exemples très limités. Mes très chers frères, de la balle au prisonnier au vélo, aux jeux de rôles sur tableau, au bricolage, à la mécanique auto, à la chorale, aux jeux-vidéos, aux jeux de société, aux échanges en tous genres, aux virées en Bretagne, aux tournées musicales... Aussi loin que je m'en souviens, vous avez toujours été

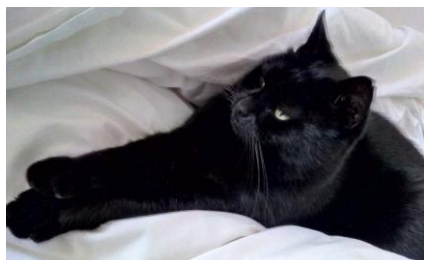
là pour moi, vous avez toujours eu confiance en moi et m'avez porté en grande estime. J'ai eu beaucoup de plaisir à vivre sous le même toit que vous pendant toutes ces années et encore aujourd'hui de savoir que vous êtes là ! J'ai aussi beaucoup appris à vos côtés. Sachez que vous m'avez beaucoup soutenu moralement pendant mes études et ma thèse mais aussi dans ma vie privée et ça m'a beaucoup aidé de savoir que vous étiez là ! Merci Jean-Yves et François d'être ce que vous êtes et merci de votre estime, de votre confiance, de votre aide, de votre soutien, tout cela était extrêmement précieux pour moi d'un point de vue personnel mais aussi pour mes études et ma réussite, votre contribution était exceptionnelle ! Je suis très heureux de vous avoir comme frères !

A feu mes grands-mères, *Maternelle Maria Le Garrec née Le Lay* et *Paternelle Blanche Serfaty née Emsellem* ■ Il est important pour moi de vous remercier à titre posthume. Très chères *Mamie Maria* et *Mamie Blanche* vous m'avez donné des leçons de vie incroyablement nombreuses, beaucoup contribué à mon éducation, à ma culture, à diversifier mes centres d'intérêts. Vous vous êtes beaucoup occupées de moi, vous m'avez appris la cuisine, initié à la science, vous m'avez fourni beaucoup d'affection et nous avons partagé d'innombrables bons moments. Vous m'avez aussi soutenu dans mes études jusqu'au bac, je n'ai malheureusement pas eu la chance de vous avoir plus longtemps à mes côtés. Merci infiniment *Mamie Maria* et *Mamie Blanche* d'avoir été ce que vous avez été et merci infiniment pour tous ces précieux cadeaux qui ont contribué de façon très importante à ce que je suis aujourd'hui !

Merci à tous les autres membres de ma famille qui ont contribué, quel que soit le niveau !

Et pour conclure la conclusion avec une conclusion concluante,

À mes Parents, *Maman, Liliane Le Garrec Serfaty* et *Papa, René Serfaty* ■ Mes très chers parents, vous vous êtes incroyablement démenés pour que moi et mes frères soyons comblés sur tous les plans et j'estime que nous avons eu de la chance de vous avoir. Comme je ne peux



pas être exhaustif, je vais simplement donner quelques exemples, qui montrent seulement une part infinitésimale de la réalité. Déjà, vous avez initié en moi cette curiosité qui m'a fait aller vers la science en répondant à mes questions lorsque j'étais petit, mais aussi en me laissant tester ce que je voulais tester – je suis un testeur depuis tout petit ! – et en me faisant tester de nombreuses choses à travers des visites culturelles et des activités, dont la majoritaire a bien entendu été la chorale qui m'a rendue incroyablement autonome et m'a beaucoup endurcie.

Que dire ?... Ça ne s'arrête pas là, l'éducation bien entendu, mais aussi, vous m'avez initié à la cuisine, à la mécanique, au bricolage, à l'humour, à la bienveillance... Tout simplement, vous vous êtes occupés de moi du mieux que vous pouviez et c'était déjà beaucoup ! Vous m'avez aussi fait confiance et j'ai notamment fait ces études grâce à cette confiance que vous m'avez confiée, en me laissant faire exactement ce que je voulais sans intervenir, mais aussi en m'encourageant, en étant là pour moi quand j'en avais besoin. Je n'en dirai pas plus, vous êtes les mieux placés pour savoir tout ce que vous avez fait ! Merci infiniment Maman et Papa pour ce que vous êtes et tout ce que vous avez fait et que vous faites encore qui est incroyablement précieux pour moi et je ne peux rédiger en une phrase toute la gratitude que j'ai ! Je ne serais pas là et je n'en serais pas là sans cela.

----- FIN REELLE (c R) -----

Heureusement que j'ai choisi de numéroter les pages de A à Z (finalement seulement Y !)

Excellente lecture à toutes et à tous. Tous mes plus chaleureux remerciements pour l'intérêt que vous avez porté à ces remerciements et pour l'intérêt, le cas échéant, que vous porterez à mon travail de thèse si vous le lisez. J'espère du fond du cœur qu'il vous plaira et qu'il vous sera utile, ne serait-ce que d'une façon infinitésimale.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I – PROLOGUE	1
A. DE L'APPROCHE FONDAMENTALE AUX APPLICATIONS	1
B. ASPECTS ETHIQUES DE MA THESE	4
CHAPITRE II – INTRODUCTION	7
A. CONTEXTE BIOMEDICAL	7
1. Les fonctions physiologiques de la NADPH oxydase	7
2. Les maladies graves liées à un dysfonctionnement de la NADPH oxydase NOX2	8
3. Le contexte médical de NOX2 en lien avec le sujet de ma thèse	8
B. LA NADPH OXYDASE DU NEUTROPHILE 'NOX2'	10
1. Les membranes biologiques	11
1.1. DEFINITION DES LIPIDES.....	12
1.2. LES ACIDES GRAS	12
1.2.1. LA NOMENCLATURE DES ACIDES GRAS LINEAIRES	13
a. Nomenclature fondamentale sans stéréochimie.....	13
b. Stéréochimie des acides gras insaturés	14
1.2.2. EXEMPLES D'ACIDES GRAS CHEZ LES ANIMAUX	15
1.3. LES LIPIDES MEMBRANAIRES	15
1.3.1. PHOSPHOLIPIDES.....	15
a. Nomenclature des glycérophospholipides	16
b. Structure des glycérophospholipides.....	16
1.3.2. LES SPHINGOLIPIDES	18
1.3.3. LES STEROLS.....	20
1.4. FONDAMENTAUX STRUCTURAUX DES MEMBRANES BIOLOGIQUES	20
2. La NADPH oxydase NOX2 du neutrophile à l'échelle moléculaire	24
2.1. LE FLAVOCYTOCHROME (CYTB ₅₅₈) EST UN HETERODIMERE TRANSMEMBRANAIRE	24
2.1.1. LE COSUBSTRAT NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE PHOSPHATE (NADPH) DE NOX2	27
2.1.2. LE COFACTEUR FLAVINE ADENINE DINUCLEOTIDE (FAD) DE NOX2.....	28
2.1.3. LES DEUX HEMES, GROUPEMENTS PROSTHETIQUES DU CYTB ₅₅₈	30
2.1.4. LE DIOXYGENE SUBSTRAT DE NOX2 EST REDUIT EN ANION SUPEROXYDE.....	31
2.2. LES PROTEINES CYTOSOLIQUES MAJORITAIRES IMPLIQUEES DANS LA FONCTION DE NOX2.....	32
2.2.1. LA PROTEINE CYTOSOLIQUE SPECIALISEE p67 ^{PHOX}	32
2.2.2. LA PROTEINE CYTOSOLIQUE SPECIALISEE p47 ^{PHOX}	32
2.2.3. LA PROTEINE CYTOSOLIQUE SPECIALISEE p40 ^{PHOX}	33
2.2.4. LA PETITE PROTEINE CYTOSOLIQUE G RAC1/2, COMPOSANT NON SPECIALISE INDISPENSABLE	33
2.3. QUELQUES ASPECTS DE LA REGULATION DE NOX2 A L'ECHELLE DE LA CELLULE.....	34
2.3.1. LES INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE(S) ET PROTEINE-LIPIDE(S).....	34
a. Interactions de p67 ^{phox} avec Nox2 et avec p47 ^{phox} et, ou p40 ^{phox}	34
b. Interactions de p47 ^{phox} et, ou p40 ^{phox} avec les lipides et avec le Cytb ₅₅₈	34
c. Interactions de Rac1/2 avec les lipides et avec les autres protéines impliquées.....	35
2.3.2. BILAN DES INTERACTIONS DU COMPLEXE NADPH OXYDASE ACTIF	36
2.3.3. IMPLICATION SIMPLIFIEE DE NOX2 DANS LA PHAGOCYTOSE.....	37
2.3.4. QUELQUES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DE NOX2	37
CHAPITRE III – INFLUENCE DE LA COMPARTIMENTATION SUR LA MESURE DE L'ACTIVITE DE LA NADPH OXYDASE DU NEUTROPHILE	43
A. INTRODUCTION	43
B. METHODES EMPLOYEES	47
1. Préparation et caractérisation des constituants du système acellulaire	47
1.1. PREPARATION ET CARACTERISATION DES FRACTIONS MEMBRANAIRES DE NEUTROPHILES HUMAINS	47
1.1.1. OBTENTION DES FRACTIONS MEMBRANAIRES DE NEUTROPHILES HUMAINS	47
1.1.2. QUANTIFICATION DU CYTB ₅₅₈ DANS LES FM PAR SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION.....	52
a. Spectres d'absorption UV-Visible des fractions membranaires de neutrophiles.....	53
b. Traitements post-expérimentaux des spectres UV-Visibles de FM de neutrophiles.....	54
1.2. PREPARATION DES PROTEINES CYTOSOLIQUES RECOMBINANTES p67 ^{PHOX} , p47 ^{PHOX} ET RAC1Q61L	56
1.2.1. PRODUCTION DANS E. COLI DES PROTEINES CYTOSOLIQUES HUMAINES RECOMBINANTES.....	56
1.2.2. PURIFICATION DES PROTEINES CYTOSOLIQUES HUMAINES RECOMBINANTES	57
2. Suivi de la cinétique de la réaction catalysée par NOX2	58
2.1. PRINCIPES DE LA QUANTIFICATION DE LA VITESSE DE CATALYSE ET CONVENTIONS D'ECRITURE	58
2.2. PRINCIPES DES TECHNIQUES DE MESURE DE LA PROGRESSION DE LA REACTION	59
2.2.1. MESURE DES ANIONS SUPEROXYDE : OBSERVABLE CYTOCHROME C	59
2.2.2. MESURE DE LA CONSOMMATION DU NADPH : OBSERVABLE NADPH.....	60
2.2.3. MESURE DE LA CONSOMMATION DU DIOXYGENE : OBSERVABLE O ₂	61
2.3. DEROULEMENT D'UNE EXPERIENCE DE MESURE DE LA CINETIQUE DE LA REACTION	63
2.3.1. PAR SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION	63
2.3.2. PAR OXYMETRIE	64
3. Mesures électrochimiques de la concentration en peroxyde d'hydrogène	65

C. RESULTATS ET DISCUSSION	68
1. Caractéristiques spectrales UV-Visible des FM et concentration en Cytb₅₅₈/NOX2.....	68
1.1. CARACTERISTIQUES SPECTRALES UV-VISIBLE DES FM AVANT OU APRES CORRECTION.....	69
1.1.1. DESCRIPTION GENERALE DES SPECTRES UV-VISIBLE DES FM	69
1.1.2. IMPACT DE LA CORRECTION DE LA TURBIDITE SUR LA CONCENTRATION EN CYTB ₅₅₈	71
2. Mesure de l'activité de NOX2 en fonction de l'observable : Cytc, NADPH, O₂.....	71
2.1. VARIATIONS DES FONCTIONS F([AA])=ASM.....	72
2.1.1. ETUDES DES FONCTIONS ASM=F([AA]).....	73
2.1.2. INTERPRETATIONS	75
a. Les caractéristiques du Cytb ₅₅₈ pouvant influencer les mesures	75
b. Les caractéristiques de la membrane (lipides) des FM pouvant influencer les mesures	76
c. Les caractéristiques des protéines cytosoliques pouvant influencer les mesures	78
d. Les caractéristiques de l'AA, du NADPH et de l'anion superoxyde pouvant influencer les mesures.....	79
e. Les caractéristiques du Cytc pouvant influencer les mesures.....	80
2.1.3. HYPOTHESES DE TRAVAIL	81
2.2. VARIATION DES FONCTIONS F([NADPH])=ASM.....	82
2.2.1. PRESENTATION DES DONNEES ET DU TRAITEMENT MATHEMATIQUE	82
2.2.2. MISES EN GARDE. LES LIMITES DE CE MODELE. L'ORIGINE DES PARAMETRES.	84
2.2.3. OBSERVATIONS	86
2.2.4. INTERPRETATIONS	86
3. Etude de la saturabilité du système par le Cytochrome c.....	87
3.1. ETUDE CINETIQUE, SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION A 550 NM : ASM = F([CYTC])	88
3.2. UNE ETUDE SPECTRALE UV-VIS A=F(A) DU CYTC DANS LE CONTEXTE DE LA DETECTION D'O ₂ · -	89
3.2.1. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION ET DU TAUX DE REDUCTION SPONTANEE DU CYTC	89
3.2.2. EFFET DE LA PRESENCE DE FM, P67 ^{PHOX} , P47 ^{PHOX} , RAC1Q61L ET AA SUR LE SPECTRE DU CYTC	91
3.3. LA COURBE D'ETALONNAGE DU SPECTROPHOTOMETRE ΔA=A _{RED} -A _{OX} =F([CYTC])	93
3.4. ETUDE PAR OXYMETRIE. EFFET DU CYTC SUR LA CONSOMMATION D'O ₂ : O ₂ =F(T)	96
4. Etude de la cinétique globale de la réaction catalysée par NOX2.....	98
4.1. CINETIQUE DE REDUCTION DU CYTC PAR LES ANIONS SUPEROXYDE.....	99
4.1.1. CINETIQUES GLOBALES DE REDUCTION DU CYTC EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN AA	99
4.1.2. ALLURE DES CINETIQUES EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION.....	102
4.1.3. ALLURE DES CINETIQUES AVEC CYTC EN EXCES EN VARIANT LA CONCENTRATION DU NADPH	103
4.1.4. COMPARAISON DE ASM=F([NADPH]) EN EXCES OU EN DEFAUT DE CYTC	105
4.1.5. ETUDE DE LA PHASE D'EQUILIBRE (PLATEAU), OU DE QUASI-EQUILIBRE (PSEUDO-PLATEAU).....	106
4.1.6. BILAN DES RESULTATS OBTENUS SUR LA CINETIQUE DE REDUCTION DU CYTC.....	109
4.2. CINETIQUE DE CONSOMMATION DU NADPH.....	109
4.3. ETUDE DE LA STOECHIOMETRIE MESUREE O ₂ :NADPH	111
4.4. CINETIQUE DE CONSOMMATION DU DIOXYGENE PAR ELECTROCHIMIE	114
4.4.1. LES CONTRAINTES TECHNIQUES.....	114
4.4.2. LES RESULTATS	116
4.4.3. LE BILAN DES MESURES D'OXYMETRIE.....	118
4.5. CONCLUSION DE L'ETUDE DES CINETIQUES GLOBALES	118
5. Effet de la température.....	119
5.1. LES CONTRAINTES TECHNIQUES ET LIEES AU SYSTEME DE MESURE.....	119
5.2. LES RESULTATS	121
6. Effet d'un détergent, le désoxycholate, sur l'activité de NOX2	123
7. Effet de molécules formant des pores dans les membranes.....	125
8. Effet du temps d'incubation.....	126
9. Mesures préliminaires des réactions secondaires perturbant les mesures d'activité.....	128
D. CONCLUSION.....	135
CHAPITRE IV – DEVELOPPEMENT ET ETUDES DE NOX-GUV	141
A. INTRODUCTION	141
B. MATERIELS ET METHODES	143
1. Préparation des composants du complexe NADPH oxydase.....	143
1.1. PREPARATION DES FRACTIONS MEMBRANAIRES DE NEUTROPHILE	143
1.2. PREPARATION DES PROTEINES CYTOSOLIQUES FLUORESCENTES	143
1.3. PREPARATION DES PROTEINES NON FLUORESCENTES	143
1.4. MARQUAGE DES PROTEINES NON FLUORESCENTES AVEC DE L'ALEXA FLUOR®	143
1.4.1. PRESENTATION ET PREPARATION DE L'ALEXA FLUOR®	143
1.4.2. OPTIMISATION DU RAPPORT DE CONCENTRATION ALEXA FLUOR®/PROTEINE.....	144
1.4.3. PROTOCOLE DE MARQUAGE DE P47 ^{PHOX} AVEC L'ALEXA FLUOR® 647 MALEIMIDE.....	145
1.5. MARQUAGE DES PROTEINES DES FM AVEC DE L'ALEXA FLUOR®.....	145
2. Préparation des GUV par réhydratation de vésicules multilamellaires.....	145
2.1. PRESENTATION DES GUV FORMEES PAR REHYDRATATION DE VESICULES MULTILAMELLAIRES.....	145
2.2. LES LIPIDES POLAIRES EXTRAITS DE GRAINES DE SOJA (SBL/SPE).....	147
2.3. PROTOCOLE	147
2.3.1. FORMATION DU STOCK DE SUV-MLV.....	147
2.3.2. FORMATION DES GUV PAR REHYDRATATION DE SUV-MLV.....	148

a. En absence de FM.....	149
b. En présence de FM.....	149
3. Microscopie confocale.....	152
3.1. TRAITEMENT DES IMAGES	153
4. Microinjection	154
4.1. FABRICATION DES MICROPIPETTES	156
4.2. REMPLISSAGE DES MICROPIPETTES	156
5. Microélectrochimie	156
C. RESULTATS ET DISCUSSION.....	158
1. Préalables sur la forme des résultats de microscopie présentés.....	158
2. Elaboration de NOX-GUV	159
2.1. INJECTION D'UNE SUSPENSION DE FM	159
2.2. REHYDRATATION DES SUV MULTILAMELLAIRES EN PRESENCE DE FM488	160
2.2.1. REHYDRATATION.....	161
2.2.2. FIXATION DES GUV SUR UNE LAMELLE ET LAVAGE	162
2.2.3. TESTS D'INTEGRATION DES FM A LA MEMBRANE DES GUV	165
2.2.4. BILAN : ETAT D'AVANCEMENT DE L'ELABORATION DE NOX-GUV	166
3. Interactions des protéines cytosoliques avec la face externe de la membrane.....	167
3.1. INTERACTIONS DE TP67, P47A ET CHRAC AVEC LA MEMBRANE DES GUV OU FM-GUV	167
3.1.1. VISUALISATION DE L'INTERACTION PROTEINES-GUV : PREMIERS ESSAIS	167
3.1.2. FIXATION A L'EXTERIEUR DE LA MEMBRANE DES GUV : LES TROIS PROTEINES ENSEMBLE ('TRIO') ±AA	169
a. Sur FM-GUV en présence d'AA.....	169
b. Sur GUV (sans FM) en présence d'AA.....	171
c. Sur GUV (sans FM) en absence d'AA	172
d. Contrôle de l'autofluorescence d'une GUV sans FM, sans AA, sans protéine.....	173
3.1.3. FIXATION A L'EXTERIEUR DE LA MEMBRANE DES GUV EN PRESENCE D'AA : LES 'DUOS'	174
a. ChRac & p47A	174
b. ChRac & Tp67.....	176
c. p47A & Tp67	176
3.1.4. FIXATION A L'EXTERIEUR DE LA MEMBRANE DES GUV SANS FM AVEC AA : LES PROTEINES SEULES ('SOLO').....	178
a. Tp67 seule	178
b. p47A seule	178
c. ChRac seule.....	179
3.2. INTERACTIONS DU GFP-TRIMERE AVEC LA FACE EXTERNE DE LA MEMBRANE DES GUV	180
3.2.1. EN PRESENCE D'AA	180
3.2.2. EN ABSENCE D'AA	181
3.3. BILAN DES NEBULISATIONS EXTERNES DE TP67, P47A, CHRAC ET DU GFP-TRIMERE	181
3.3.1. RECAPITULATIF DES EXPERIENCES REALISEES ET DES RESULTATS OBTENUS.....	182
3.3.2. LES CONDITIONS A TESTER DANS LE FUTUR.....	184
4. Interactions des protéines cytosoliques avec la face interne de la membrane	185
4.1. INJECTION DE TP67, CHRAC ET P47A A 300 NM EN PRESENCE DE 60 µM D'AA.....	186
4.2. INJECTION DE TP67, CHRAC ET P47A A 900 NM EN PRESENCE DE 60 OU 180 µM AA	188
4.3. BILAN DES RESULTATS DE NEBULISATIONS INTERNES	189
5. Tests d'activité de NOX2 sous microscope	190
5.1. PAR MICROELECTROCHIMIE	190
5.1.1. TESTS D'INSERTION DE NOX2 ET P22 ^{PHOX} DANS LA MEMBRANE DES GUV PAR ELECTROCHIMIE	190
5.1.2. DETECTION DES ROS PRODUITES PAR NOX2 EN MICROREACTEUR PAR ELECTROCHIMIE.....	191
5.2. PAR FLUORESCENCE (AMPLEX-RED).....	192
5.2.1. SUR GUV SANS FM	192
5.2.2. SUR GUV AVEC FM.....	194
D. CONCLUSION.....	196
E. REPARTITION DU TRAVAIL	197
CHAPITRE V – CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	201
A. CONCLUSIONS	201
1. La compartimentation limite la mesure des O₂ · – produits par NOX2 avec le Cytc	201
2. La formation de FM-GUV permet l'étude des interactions protéine-protéine et protéine-lipides	202
B. PERSPECTIVES.....	204
1. Mesures de l'activité des NADPH oxydases en système acellulaire.....	204
2. Elaboration de NOX-GUV	204
CHAPITRE VI – ANNEXES.....	207

TABLE DES FIGURES

Figure II-1. Schéma simplifié de la phagocytose et de la destruction d'un objet étranger par un neutrophile.	10
Figure II-2. Localisations subcellulaires majoritaires de la NADPH oxydase du phagocyte (NOX2) dans un neutrophile au repos.	11
Figure II-3. Structures générales et nomenclature sans stéréochimie des acides gras simples saturés (à gauche) ou insaturés (à droite).	13
Figure II-4. Schéma des deux diastéréoisoméris possibles pour les doubles liaisons des acides gras simples insaturés.	14
Figure II-5. Numérotation et notation stéréochimique conventionnelles du glycérol et des phospholipides dérivés.	16
Figure II-6. Exemple de constituants de base d'un diacylglycérophospholipide et exemple de <i>sn</i> -diacylglycérophosphatidylcholine.	17
Figure II-7. Sphingosine et ses dérivés majoritaires trouvés dans les membranes cellulaires.	19
Figure II-8. Structure et numérotation du cycle de base des stérols (à gauche) et du cholestérol (à droite).	20
Figure II-9. Description simplifiée de la structure de base d'une membrane biologique hypothétique purement lipidique.	21
Figure II-10. Schéma bilan très simplifié des différents aspects membranaires évoqués et utiles pour la compréhension de la thèse.	23
Figure II-11. Les composants du flavocytochrome <i>b</i> ₅₅₈ (<i>Cytb</i> ₅₅₈) et la chaîne de transport d'électrons transmembranaire de Nox2.	26
Figure II-12. Structure chimique du NADPH à pH 7,4.	27
Figure II-13. Noyau nicotinamide réduit à gauche et oxydé à droite.	28
Figure II-14. Structure chimique du FAD à pH 7,4.	29
Figure II-15. Les trois formes redox du noyau isoalloxazine à pH 7,4.	30
Figure II-16. Structure chimique de l'hème <i>b</i> et schéma simplifié de la sphère de coordination du Fe ²⁺	31
Figure II-17. Conventions de Lewis modifiées pour représenter la nature biradicalaire du dioxygène et sa réduction monoélectronique.	31
Figure II-18. Parties de p67 ^{phox} importantes ou potentiellement importantes dans l'assemblage et, ou, l'activation de NOX2.	32
Figure II-19. Parties de p47 ^{phox} importantes ou potentiellement importantes dans l'assemblage et, ou, l'activation de NOX2.	32
Figure II-20. Parties de p40 ^{phox} importantes ou potentiellement importantes dans l'assemblage et, ou, l'activation de NOX2.	33
Figure II-21. Prénylation géranylgeranyl sur la dernière cystéine C-terminale de Rac.	35
Figure II-22. Schéma bilan simplifié des interactions et transfert d'électrons dans le complexe NADPH oxydase du neutrophile actif.	36
Figure II-23. Schéma simplifié prenant en compte NOX2 de la phagocytose et de la destruction d'un objet étranger par un neutrophile.	37
Figure II-24. Schéma d'un glycérophospholipide et des sites d'hydrolyse (en vert) par les différentes phospholipases (en rouge).	38
Figure III-1. Illustration des trois cas hypothétiques d'orientation des <i>Cytb</i> ₅₅₈ dans une membrane de FM.	44
Figure III-2. Schéma de NOX2 fonctionnelle présentant les contraintes de mesures liées au contexte fraction membranaire.	45
Figure III-3. Schéma de principe d'obtention des fractions membranaires de neutrophiles primaires <i>Homo sapiens</i>	48
Figure III-4. Noyau nicotinamide réduit à gauche et oxydé à droite.	61
Figure III-5. Schémas de principe et photos du système de mesure du dioxygène par électrochimie.	62
Figure III-6. Schéma simplifié du dispositif expérimental.	66
Figure III-7. Spectres corrigés ou non des fractions membranaires oxydées ou réduites.	69
Figure III-8. Dépendance de l'ASM de NOX2 en fonction de la concentration en AA. 5' incubation, NADPH/ <i>Cytc</i>	73
Figure III-9. Schéma bilan des contraintes hypothétiques liées aux mesures d'activité de NOX2 en fractions membranaires.	81
Figure III-10. Dépendance de l'ASM de NOX2 en fonction de la concentration en substrat NADPH.	83
Figure III-11. Dépendance de l'ASM de NOX2 en fonction de la concentration en <i>Cytc</i> (observable).	88
Figure III-12. Détermination de la concentration et du taux de réduction spontanée du <i>Cytc</i> par spectrophotométrie d'absorption.	89
Figure III-13. Effet de l'AA sur le spectre d'absorption UV-Visible du <i>Cytc</i> entre 500 et 600 nm et sur la turbidité du milieu.	92
Figure III-14. Effet de l'ensemble des composants du système acellulaire sur le spectre de différence du <i>Cytc</i> à 70 μM.	93
Figure III-15. Etalonnage du spectrophotomètre à 550 nm avec du <i>Cytc</i> (Fe ²⁺) en échantillon et <i>Cytc</i> (Fe ³⁺) en référence.	94
Figure III-16. Cinétiques de consommation du dioxygène par NOX2 à différentes concentrations en <i>Cytc</i>	97
Figure III-17. Cinétique globale de la réaction de réduction du <i>Cytc</i> à différentes concentrations en AA.	99
Figure III-18. Cinétique globale de la réaction de réduction du <i>Cytc</i> à différents temps d'incubation.	102
Figure III-19. Etude de la réduction du <i>Cytc</i> couplée à l'activité de NOX2 en concentration saturante en <i>Cytc</i> devant le NADPH.	104
Figure III-20. Effet de l'excès de <i>Cytc</i> sur la dépendance d'ASM en fonction de la concentration en NADPH.	105
Figure III-21. Etude du plateau par ajout, au plateau, de <i>Cytc</i> ou NADPH ou dithionite de sodium au plateau.	107
Figure III-22. Caractérisation du plateau dans des conditions multiples.	108
Figure III-23. Etude de la cinétique globale de consommation du NADPH par NOX2.	110
Figure III-24. Cinétiques globales de transformation par NOX2 d'un excès de NADPH en cuvette fermée ou ouverte.	111
Figure III-25. Allure des cinétiques de consommation du dioxygène par NOX2 à différentes concentrations en AA.	116
Figure III-26. Cinétiques de consommation du dioxygène par NOX2 à différentes concentrations en NADPH.	117

Figure III-27. Dépendance de l'ASM de NOX2 en fonction de la température et rapport entre l'observable NADPH et Cytc.	122
Figure III-28. Effet du désoxycholate de sodium (DOC) sur l'ASM de NOX2 en fonction de l'observable NADPH ou Cytc.	123
Figure III-29. Allure des phases initiales des cinétiques de réduction du Cytc à différentes concentrations en DOC sans incubation.	125
Figure III-30. Effet de l'alaméthicine sur l'ASM de NOX2 en fonction des observables Cytc et NADPH.	126
Figure III-31. Dépendance de l'ASM de NOX2 en fonction de la concentration en AA. 1h30 d'incubation.	127
Figure III-32. Voltamogramme cyclique du H ₂ O ₂ 250 μM en bleu, du PBS en noir et du NADPH 500 mM en rouge.	128
Figure III-33. Mesure de la concentration du NADPH et du H ₂ O ₂ par électrochimie lors de la catalyse réalisée par NOX2.	129
Figure III-34. Mesure de la consommation du H ₂ O ₂ par électrochimie par les différents constituants du système acellulaire.	130
Figure III-35. Mesure de la concentration en H ₂ O ₂ par électrochimie lors de la catalyse réalisée par NOX2.	131
Figure III-36. Mesure de la consommation du H ₂ O ₂ par électrochimie par la fraction membranaire.	132
Figure III-37. Etude d'un produit de décomposition du peroxyde d'hydrogène par la FM.	133
Figure IV-1. Schéma du système d'étude et des techniques théoriques pour l'étude de la NADPH oxydase en liposomes géants.	142
Figure IV-2. Schéma d'illustration du marquage d'une fonction thiol d'une protéine par l'Alexa Fluor® 647 Maléimide.	144
Figure IV-3. Image de GUV en transmission par microscopie confocale avec contraste interférentiel différentiel (DIC).	146
Figure IV-4. Schéma de principe de la formation du stock de SUV-MLV.	148
Figure IV-5. Schéma de principe de formation (gonflement) des GUV par réhydratation à partir d'un dépôt séché de SUV-MLV.	148
Figure IV-6. Système de chambres de microscopie permettant le lavage du milieu et la comparaison de 3 conditions simultanées.	150
Figure IV-7. Coupe transversale vue de trois-quarts de la chambre de microscopie LUDIN de type 1 de Life Imaging Services.	151
Figure IV-8. Schémas illustrant la nébulisation externe à gauche, ou l'injection (nébulisation interne) à droite.	155
Figure IV-9. Schéma du dispositif expérimental utilisé pour l'électrochimie sous microscope et l'électroportation.	157
Figure IV-10. Conventions d'affichage des images de microscopie de fluorescence.	158
Figure IV-11. Effet de l'injection dans une GUV d'une suspension de FM488 en fonction du temps.	159
Figure IV-12. SUV multilamellaires réhydratées en présence de FM488.	161
Figure IV-13. Effet du lavage de la suspension observée, sur une GUV fixée sur lamelle fonctionnalisée poly-L-lysine.	163
Figure IV-14. Schéma des trois hypothèses de FM-GUV pouvant être faites suite à la visualisation des FM488 à la membrane des GUV.	164
Figure IV-15. Interaction d'un mélange de Tp67, p47C en présence de Rac1Q61L sans ou avec 50 μM AA sur l'extérieur des GUV avec ou sans FM.	168
Figure IV-16. Interaction de Tp67, p47A et ChRac1Q61L en présence de 50 μM AA sur l'extérieur des GUV avec FM488.	170
Figure IV-17. Interaction de Tp67, p47A et ChRac1Q61L ensemble en présence de 50 μM AA sur l'extérieur des GUV sans FM.	171
Figure IV-18. Interaction de Tp67, p47A et ChRac1Q61L ensemble en absence d'AA sur l'extérieur des GUV sans FM.	172
Figure IV-19. Autofluorescence en microscopie confocale des GUV formées en absence de FM et fixées sur résine SU8.	174
Figure IV-20. Interaction de p47A et ChRac avec la face externe de la membrane d'une GUV en présence d'AA et avec ou sans FM.	175
Figure IV-21. Interaction de ChRac et Tp67 avec la face externe de la membrane d'une GUV en présence d'AA et en présence ou en absence de FM.	176
Figure IV-22. Interaction de p47A et Tp67 avec la face externe de la membrane d'une GUV en présence d'AA et avec ou sans FM.	177
Figure IV-23. Interaction de Tp67 avec la face externe de la membrane d'une GUV en présence d'AA et en absence de FM.	178
Figure IV-24. Interaction de p47A avec la face externe de la membrane d'une GUV en présence d'AA et en absence de FM.	179
Figure IV-25. Interaction de ChRac avec la face externe de la membrane d'une GUV en présence d'AA et en absence de FM.	179
Figure IV-26. Interaction du GFP-Trimère avec la face externe de la membrane d'une GUV sans FM en présence d'AA.	180
Figure IV-27. Interaction du GFP-Trimère avec la face externe de la membrane d'une GUV sans FM en absence d'AA.	181
Figure IV-28. Bilan des résultats des expériences de nébulisation avec AA des protéines cytosoliques sur l'extérieur de la membrane des GUV.	183
Figure IV-29. Localisation de Tp67, ChRac et p47A à 300 nM chacune, injectées ensemble en présence de 60 μM d'AA dans une GUV sans FM.	186
Figure IV-30. Localisation de Tp67, ChRac et p47A à 900 nM chacune, injectées ensemble en présence de 60 μM ou 180 μM d'AA dans une GUV sans FM.	188
Figure IV-31. Dispositif expérimental de microélectrochimie sous microscope plein champ sur une FM-GUV injectée avec NADPH, p67 ^{phox} , p47 ^{phox} , Rac1Q61L et AA. En transmission et avec Fluorescence du NADPH.	190
Figure IV-32. Mesure de la sortie de ROS produites en microréacteurs par NOX2 à travers une membrane de GUV par chronoampérométrie.	191

Figure IV-33. Mesure du peroxyde d'hydrogène, des anions superoxyde et du NADPH dans un flux de nébulisation d'un mélange de NOX2 fonctionnelle.	192
Figure IV-34. Mesure de la production de peroxyde d'hydrogène par NOX2 en microréacteur GUV.....	193
Figure IV-35. Mesure de la présence de H ₂ O ₂ dans une FM-GUV via une activation externe de NOX2.....	194
Figure VI-1. Schéma récapitulant les structures électroniques de valence d'un Fe ²⁺ Oh bas spin et d'un Fe ²⁺ Oh haut spin.	207
Figure VI-2. Description schématique de la nomenclature et de la numérotation des porphyrines, exemple de l'hème <i>b</i>	209
Figure VI-3. Schéma simplifié des OM frontières des métalloporphyrines selon Martin Gouterman. Echelle non respectée...210	
Figure VI-4. Evaporation progressive du chloroforme pour obtenir le film de lipides homogène, fin, transparent, incolore, symétrique.	218
Figure VI-5. Aspect final du film de lipides obtenu.	218
Figure VI-6. Photo du ballon bouché contenant le tampon de réhydratation au-dessus du film de lipides, conditionnés sous atmosphère inerte	219

TABLE DES TABLEAUX

Tableau II-1. Glycérophospholipides les plus courants variant seulement par la molécule liée au phosphate en <i>sn</i> 3.	18
Tableau II-2. Structures de la céramide, des glycosphingolipides et des sphingomyélines à base de choline ou d'éthanolamine de d'acide palmitique.	19
Tableau II-3. Mouvements et diffusion des lipides membranaires latéralement ou transversalement.	22
Tableau II-4. Les trois grands types de géométrie des lipides membranaires, courbures favorisées et quelques phospholipides associés.	22
Tableau II-5. Potentiels standards en conditions physiologiques des constituants redox de Nox2 et des substrats.	27
Tableau III-1. Paramètres enzymatiques de NOX2 vis-à-vis du NADPH à 239 μ M (255 μ M) de dioxygène.	87
Tableau III-2. Paramètres enzymatiques de NOX2 vis-à-vis du NADPH à 239 (255) μ M de dioxygène avec excès ou défaut de Cyt _c	106
Tableau III-3. Potentiels standards d'oxydoréduction E^0 de couples d'oxydoréduction contre ENH. (182)	113
Tableau III-4. Concentration en dioxygène dans le tampon de mesure (conductivité calculée 22062 μ S/cm) entre 0 et 40 °C à 1 atm.	120
Tableau IV-1. Bilan des interactions des protéines cytosoliques ou du trimère avec la face externe de la membrane de la GUV \pm FM et, ou \pm AA	182
Tableau VI-1. Exemples d'acides gras monoinsaturés et d'acides gras polyinsaturés fréquemment retrouvés chez les animaux.	212
Tableau VI-2. Exemples d'acides gras saturés fréquemment retrouvés chez les animaux.	213
Tableau VI-3. Tableau des appareils.	214
Tableau VI-4. Tableau des produits.	214

TABLE DES ABREVIATIONS

(E)	Configuration Entgegen, ou <i>trans</i> , d'une double liaison	MAPKAP	Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase
(Pi)	Phosphate inorganique	MLV	MultiLamellar Vesicle(s)
(Z)	Configuration Zusammen, ou <i>cis</i> , d'une double liaison	MMH	Michaelis-Menten-Henri
3D	Tridimensionnel	MPO	MyéloPerOxydase
AA	tout- <i>cis</i> -Acide Arachidonique	NAD[•]	Nicotinamide Adénine Dinucléotide forme oxydée monoélectroniquement
aa	acide(s) aminé(s)	NAD⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide forme oxydée biélectroniquement
AD	Activator Domain	NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide forme réduite
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	NADP[•]	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate forme oxydée monoélectroniquement
AG	Acide Gras	NADP⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate forme oxydée biélectroniquement
AIR	Région d'AutoInhibition	NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate forme réduite
AOBS	Acousto-Optic Beam Splitter	NBT	Nitro Blue Tetrazolium
AOTF	Acousto-Optic Tunable Filter	NCF	Neutrophil Cytosolic Factor
AR	Amplex Red	NFA	Acide NiFlumique
ASM	Activité Spécifique Moléculaire	NN_{ox}	Dimère de NADP Oxydé
Asn	Asparagine	NN_{red}	Dimère de NADP Réduit
ATM kinase	Ataxia-Telangiectasia Mutated kinase	NOX	Enzyme NADPH OXYdase
ATP	Adénosine TriPhosphates	Nox	Protéine centre catalytique membranaire de l'enzyme NOX
CGD	malaDie Granulomatose sceptique Chronique	NSysA	NanoSystèmes Analytiques
CL	CardioLipine	N-ter	extrémité amino-terminale d'une chaîne polypeptidique
CMC	Concentration Micellaire Critique	N-terminal	extrémité amino-terminale d'une chaîne polypeptidique
C-ter	Extrémité carboxy-terminale d'une chaîne polypeptidique	OA	Orbitale Atomique
C-terminale	Extrémité carboxy-terminale d'une chaîne polypeptidique	OM	Orbitale Moléculaire
Cytb₅₅₈	Flavocytochrome b558	PA	Acide Phosphatidique
Cytc	Cytochrome <i>c</i>	PB	domaine Phagocyte oxidase and Bud emergence protein
Cytc(Fe²⁺)	FerroCytochrome <i>c</i>	PBS	Tampon Phosphate Salin
Cytc(Fe³⁺)	FerriCytochrome <i>c</i>	PBSD	Tampon Phosphate Salin Dulbecco
DAG	diacylglycérine	PC	PhosphatidylCholine
DDM	<i>n</i> -Dodecyl β -D-Maltoside	PDB	Protein Data Bank
ddp	Différence de potentiel	PE	PhosphatidylEthanolamine
ddps	Différence de potentiel saturante	PEA	Pipeteur Electrique Automatique
DFO	DesFerriOxamine	PG	PhosphatidylGlycérol
DG	diacylglycérine	phox	phagocyte oxidase
DIC	Differential Interferential Contrast	PI	PhosphatidylInositol
DIDS	acide 4,4'-DiIsothiocyano-2,2'-stilbeneDiSulfonique	Pii	Point Isoionique
DLS	Dynamic Light Scattering	PIP	PhosphatidylInositide monophosphate
DMSO	DiMéthyl SulfOxyde	PIP₂	PhosphatidylInositide diphosphate
DOC	DésOxyCholate	PIP₃	PhosphatidylInositide triphosphate
DOI	Digital Object Identifier	PKC	Protéine Kinase C
DPI	DiPhenyleneIodonium	PL	Phospholipide
DTT	DiThioThréitol	PL⁻	Phospholipide Anionique
DUOX	Enzyme Dual OXYdase	PLA	Phospholipase A
Duox	Protéine centre catalytique membranaire de l'enzyme DUOX	PLC	Phospholipase C
e[•]	électron	PLD	Phospholipase D
E. coli	Escherichia coli	PMID	PubMed ID
EDTA	Ethylène Diamine Tétraacétate	PMMA	PolyMéthylMétAcrylate
EFS	Etablissement Français du Sang	PMSF	Fluorure de PhénylMéthylSulfonyle
ENH	Electrode Normale à Hydrogène	PMT	PhotoMultipliCaTeur
EXAFS	Extended X-ray Absorption Fine Structure	Poly+	Région Polybasique
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide forme oxydée	POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine
FADH[•]	Flavine Adénine Dinucléotide forme réduite biélectroniquement et monoprotinée	PPS	Pipette en Polypropylène Stérile
FADH⁺	Flavine Adénine Dinucléotide forme réduite monoélectroniquement et monoprotinée	PRR	Région Riche en Prolines
FF	Fast Flow	PS	PhosphatidylSérine
FM	Fraction(s) Membranaire(s)	PTFE	PolyTetraFluoroEthylène
FMN	Flavine Mononucléotide	PX	domaine Phagocyte Oxidase
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer	ROS	eSpèces Réactives de l'Oxygène
GDI	Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitor	RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
GDP	Guanosine DiPhosphate	rpm	rotations par minute
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor	SBL	SoyBean Polar Lipids Extract
GFP	Green Fluorescent Protein	SDS	DodécylSulfate de Sodium
GTP	Guanosine TriPhosphate	Ser	Sérine
GUV	Giant Unilamellar Vesicle(s)	SH	domaine Sarcoma Homologue
HEPES	acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique	SM	sphyngoMyéline
His	Histidine	sn	stereospecific numbering
HRP	HorseRadish Peroxidase	SOD	SuperOxyde Dismutase
I.B.G.C.	Institut de Biochimie et Génétique Cellulaire	SU-8	Résine étalée par spin-coating, permettant de fixer les GUV
INT	4-IodoNiumTetrazolium violet	SUV	Small Unilamellar Vesicle(s)
IRM(N)	Imagerie par Résonance Magnétique (Nucléaire)	TB	Terrific Broth
ISBN	International Standard Book Number	TBARS	ThioBARbituric Reactive Substances
ISM	Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux	Thr	Thréonine
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	TOC	Carbone Organique Total
LB	Lysogeny Broth	TPR	Répétition Tétratricopeptide
LCP	Laboratoire de Chimie Physique	UME	UltraMicroElectrode
LCV	LeucoCrystal Violet	UV	Ultraviolets
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	Vis	Visible

CHAPITRE I – Prologue

Dans ce prologue, j'évoque certaines réflexions et opinions personnelles liées à la recherche scientifique. A la suite de la rédaction de ma thèse, j'ai reçu certaines remarques concernant ce prologue, qui arguaient que des opinions et réflexions personnelles n'ont rien à faire dans une thèse de doctorat scientifique qui devrait, selon ces remarques, ne contenir que de la « science objective ». Je me sens donc obligé d'ajouter ces trois paragraphes d'introduction à ce prologue. Il est important pour moi de remercier les sources de ces remarques qui deviennent automatiquement une source d'inspiration pour des réflexions personnelles et donc une source d'enrichissement. Je souhaite d'ailleurs préciser de prime abord que les remises en question sont une précieuse source d'enrichissement, elles font partie de la science et sont donc très importantes et toujours les bienvenues.

Dans certains pays, un docteur en sciences est aussi un « *Philosophiae Doctor* », ou « PhD » et je pense en effet, au risque de faire une lapalissade, qu'il est bon que les détenteurs du plus haut diplôme Universitaire soient aussi capables de réfléchir, d'avoir des opinions personnelles et également capables de s'engager en les partageant, même lorsque le titre est simplement « Docteur » au lieu de « PhD ». Je défends de plus que nous devrions être capables de discuter légitimement de sujets autres que scientifiques.

Pour un scientifique, considérant que la thèse est le travail personnel majoritaire d'un 'jeune' docteur, j'affirme que la thèse est justement le meilleur – et quasiment le seul – 'lieu' pour partager ses opinions, ses réflexions, ses engagements à un instant t – même si cela implique de sortir transitoirement de la « science objective » normalisée. De manière générale, la thèse est selon moi un travail personnel et je tiens ici à remercier ma directrice de thèse de m'avoir laissé une très grande liberté pour ma rédaction. Ma thèse montre donc la réalité de mes capacités, de mes compétences et de ma personnalité. Ce prologue faisant partie intégrante de ma thèse, je le défends donc comme l'ensemble de ma thèse.

A. DE L'APPROCHE FONDAMENTALE AUX APPLICATIONS

Le contexte actuel de la recherche en France me pousse moralement à donner brièvement, dans cette partie, *mon opinion* sur l'opposition *faite* entre la recherche dite appliquée et la recherche dite fondamentale, en lien avec mon domaine de recherche. Pour illustrer ce contexte, je donne l'exemple concret d'un groupe scientifique, qui prône lui-même que pour améliorer ses recherches fondamentales, il faudrait les rendre plus appliquées, ce qui sonne pour moi comme une dissonance cognitive au sens psychologique du concept, bien que je comprenne les enjeux politico-financiers qui sont derrière cette dissonance.

La compréhension du fonctionnement d'un système biologique ou biochimique est pour moi d'une importance *égale* à ses implications médicales, tant nous pouvons seulement imaginer de façon bornée et à un instant t les applications des recherches fondamentales. Aussi, je trouve crucial qu'il existe une dualité synergique – et je trouve ceci réaliste – entre la recherche appliquée, dans le présent cas la recherche médicale, et la recherche fondamentale, sur laquelle cette thèse repose. Alors que les résultats de recherche fondamentale vont être généralement utiles à la

recherche médicale pour faire des interprétations et des hypothèses, la recherche fondamentale peut s'appuyer complémentirement sur la recherche médicale pour valider ses hypothèses à l'échelle de l'individu ou à l'échelle d'une population d'individus ou d'une société et éventuellement orienter ses axes de recherche. Cependant, il serait, je pense, dommage et probablement dommageable, de limiter nos recherches aux seules applications imaginables à un instant t , donc nécessairement limitées, par une personne ou par une communauté.

Pour ne citer qu'un seul exemple, qui aurait pu imaginer les retombées colossales des recherches de l'étude du spectre électromagnétique émis par un corps noir en fonction de la température ? Pour l'imager de façon simple, cette expérience consiste à chauffer un morceau de métal et à observer le rayonnement, (longueurs d'ondes et intensité), qu'il émet en fonction de sa température. Si nous lisons cette simple explication de texte passivement, sans y réfléchir, l'œil profane dénué de curiosité trouvera probablement cette étude dénuée d'intérêt, générant un gâchis d'argent et d'énergie. Et pourtant, les retombées sont énormes ! Cette expérience a permis de démontrer que les niveaux d'énergie d'un atome sont quantifiés en faisant le lien mathématique entre l'énergie d'un photon et sa fréquence via la constante de Planck. La découverte de la quantification des niveaux d'énergie d'un atome a été nécessaire, (mais pas forcément suffisante), par exemple à l'avènement de techniques d'analyses spectrophotométriques pour la détermination de la composition atomique des matériaux, ou encore la compréhension des phénomènes d'excitation et d'émission de photons dont nous nous servons en Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM(N)) et dans pléthore d'autres domaines. Mon humble opinion est que personne, à l'époque, n'imaginait toute l'étendue de ce qu'impliquait une telle découverte de recherche fondamentale, tout simplement parce qu'il y a une limite à notre capacité de modélisation mentale.

Pour donner un exemple extrême, une recherche qui paraîtrait *à priori* aberrante, (par exemple « l'étude de la résistance à l'étirement d'un spaghetti en fonction du taux d'humidité et de la température »), pourrait, potentiellement, donner une idée à, par exemple un autre chercheur, qui lui permettrait de faire une trouvaille intéressante, ou ne serait-ce que d'avancer dans ses recherches en débloquent un point qui nécessitait une approche différente ou une idée potentiellement saugrenue. Que ce soit dans son contenu ou dans sa méthode, personne ne peut prétendre être capable de prédire l'impact d'une recherche, ni même son utilité. Juger de la *pertinence* d'une recherche – ce qui est *très différent de sa qualité* – n'a donc pas de sens. Juger de la *faisabilité d'une recherche* en fonction des moyens disponibles est en revanche légitime, mais ceci est un tout autre débat. D'un point de vue maintenant purement lexical et de son retentissement sur la vision de la recherche par le public, l'adjectif « fondamentale » renvoie à la notion d'essentialité, alors que l'adjectif « appliquée » renvoie à la notion de technicité. Discuter de la recherche en ces termes est donc péjoratif pour la recherche appliquée qui est tout autant fondamentale selon mon point de vue que la recherche dite fondamentale. En outre, cela est négatif pour la recherche fondamentale pour laquelle cela suggère de prime abord qu'aucune application n'est possible. Ces dénominations sont pour moi imprécises et peuvent induire la confusion pour des oreilles profanes.

Ainsi, en tant que chercheurs, nous pouvons choisir un objectif appliqué, (médical dans le cas du présent sujet), ou lucratif mais nous conservons l'obligation *morale* d'enrichir les connaissances de l'Homme avec des résultats originaux, des réflexions originales et de transmettre ces savoirs, quels qu'ils soient. Par conséquent, le choix d'une

recherche, fondamentale, dont les applications sont seulement hypothétiques et temporellement potentiellement lointaines est d’égale ambition, d’identique intérêt et donc de même légitimité, que toute autre recherche menée avec un objectif plus direct temporellement et matériellement au sens de la société ou de l’individu. Dans tous les cas, je suis persuadé qu’un travail *commun* entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée, qu’il s’agisse de sciences « dures » ou « douces », est indispensable non seulement pour une synergie dans l’obtention et la qualité des résultats, mais aussi plus largement dans la vision que le public et donc le pays, a de la recherche. Par extension, j’aimerais particulièrement voir se développer les liens entre la recherche et la médecine, qui sont pour moi indissociables. Anecdotiquement, un chercheur en physique des solides qui collabore avec une équipe du LCP ainsi qu’avec des médecins et travaille notamment sur la caractérisation des calcifications, (notamment rénales), a raconté, lors d’un séminaire, qu’un médecin avec qui il collabore lui avait dit que la médecine était du « bricolage » et qu’il était excessif d’analyser les échantillons au Synchrotron Soleil. Le fait est que les techniques de « bricolage », parfois vieillissantes, utilisées à l’hôpital, (hôpitaux franciliens), n’étaient pas suffisantes pour déterminer que les reins de la patiente, catégorisée en insuffisance rénale chronique et sur liste d’attente pour une greffe, contenaient non pas des calcifications, mais des cristaux de 2,8-dihydroxyadenine. La patiente a alors été sauvée par un traitement adéquat, sans nécessité de greffe de rein et ceci a été uniquement permis grâce au travail commun entre la recherche et la médecine (1). Je laisse le lecteur juger de l’impact colossal sur la qualité de vie et ainsi que sur la société, (donneurs, coûts...), que de telles synergies peuvent apporter.

En conclusion, il y a pour moi une seule recherche, il n’y a pas de recherche plus importante qu’une autre, simplement des urgences différentes, à priori et donc des priorités différentes, essentiellement mues par des aspects financiers, politiques, médicaux et plus généralement sociétaux.

Cette thèse relate des recherches dites fondamentales qui me permettent d’ajouter ma pierre à l’édifice et je suis heureux d’avoir le privilège d’y contribuer à ma façon, le plus scientifiquement possible à cet instant t et j’espère qu’elles seront utiles, quel que soit le niveau, le temps ou l’amplitude.

B. ASPECTS ETHIQUES DE MA THESE

A l'heure du « publish or perish », les pressions de publication tendent à ronger, et je le déplore, la qualité de la science. En effet, un résultat est un fait et si un problème, (par exemple une incohérence), est constaté il s'agit aussi d'un résultat intéressant, parce qu'il nous indique que nous avons mal compris, mal fait quelque chose, ou encore que nous ne maîtrisons pas ce qu'il se passe. Cette donnée est cruciale et, bien qu'elle ne soit pas valorisable sur la place publique, profite à tout le monde. Les thèses de doctorat ne sont pas soumises aux pressions de publication et sont néanmoins des publications scientifiques à part entière, ce qui leur confère la capacité d'être un excellent refuge pour aborder l'ensemble des faits expérimentaux, seules données qui, par essence, méritent l'impartialité totale.

Je souhaite aussi succinctement aborder le sujet de l'ère de la statistique dans laquelle nous sommes. La statistique, (au singulier puisqu'il s'agit d'un domaine d'étude), est un domaine en plein essor à juste titre puisqu'il permet de définir des seuils de confiance à attribuer à un ensemble de données comparativement à un autre. Les seuils de confiance sont arbitraires, mais ils ont le mérite de quantifier la reproductibilité et dans une certaine mesure la pertinence de résultats à la condition mathématique de respecter scrupuleusement les règles des tests statistiques appliqués. Mais à cet aspect très positif se confronte la réalité des faits. D'une part, le respect rigoureux des règles des tests statistiques requiert généralement des échantillons statistiques de taille irréalisable en pratique, faute de moyens humains, matériels, financiers ou simplement temporels. D'autre part, la statistique n'est qu'une quantification mathématique qui donnera toujours un résultat, quelles que soient les données et leur qualité. Aussi, il faut rappeler que la statistique rigoureusement appliquée dans les règles de l'art sur un système mal compris ou mal connu, ou sur des jeux de données de mauvaise qualité, a une valeur nulle ou presque, de même que les interprétations que nous en tirons. Ainsi, il est fondamental de connaître et de comprendre le plus largement possible à l'instant de l'étude les différents aspects de la physique, de la chimie, de la biophysique, de la biochimie et de la biologie à toutes les échelles impactant le système d'étude. Ces connaissances forment la base de la pertinence des statistiques et la réciproque est fautive, même si les statistiques peuvent dans certains cas permettre d'orienter les recherches permettant de comprendre ces aspects concrets.

Mon objectif est la compréhension phénoménologique et la compréhension de la quantification de ces phénomènes. Pour ces raisons et aussi parce que mes données ne se prêtent pas aux études statistiques (échantillons faibles, répliques essentiellement techniques...), dans ma thèse je ne présenterai pas d'analyses statistiques poussées.

En revanche, je détaillerai mes résultats et leurs interprétations, que je pousserai à leurs limites pour les éprouver et je tendrai à respecter au maximum l'impartialité requise pour des déductions rigoureuses. Je lutterai contre les partis-pris, les idées préconçues, les préjugés qui fleurissent spontanément et accepterai toute critique argumentée sans dogmatisme et je place la remise en question constructive de mes propres résultats et des résultats préexistants au centre de la discussion. Afin d'ouvrir la réflexion, je ferai aussi de nombreuses hypothèses et proposerai des expériences supplémentaires. De la même façon, afin que le lecteur puisse critiquer rigoureusement par lui-même mes résultats et enrichir mon travail et donc, à travers lui, les connaissances scientifiques, je présenterai beaucoup de contrôles, dans le texte ou dans les figures et tableaux, que ceux-ci valident ou invalident mes hypothèses. Je

m'appuierai aussi beaucoup sur la littérature et dans la mesure du possible, je citerai un maximum de publications soutenant ou contredisant mes propos de façon indifférenciée, afin que le lecteur et moi-même puissions réfléchir sur les points abordés et seulement après réflexion, forger une opinion argumentée, sans a priori. Je ne serai cependant pas, et j'en suis désolé, en mesure de citer l'ensemble des articles évoquant de façon pertinente tous les sujets abordés ici pour des raisons de temps, de place et parfois de compétence, (dans des domaines peu ou pas maîtrisés), mais j'invite fortement le lecteur souhaitant creuser un sujet en particulier de s'appuyer sur les références présentes ici pour faciliter ses propres recherches.

Je remercie d'avance le lecteur de me faire l'honneur de lire ma thèse et j'espère que ce sera avec plaisir. De plus, j'ai l'espoir que celle-ci soit un vecteur d'enrichissement sur des plans scientifiques et plus largement sur des plans réflexifs et cognitifs.

CHAPITRE II – Introduction

A. CONTEXTE BIOMEDICAL

Afin de mettre à l'honneur le lien entre la recherche dite fondamentale et la recherche dite appliquée, mais aussi pour souligner l'importance sociétale de mon système d'étude et parce qu'une des motivations du sujet de ma thèse est la meilleure compréhension de ce système afin d'aider, à mon niveau, la recherche médicale, j'ouvre mon sujet de thèse en abordant, très brièvement, son contexte biomédical.

La NADPH oxydase, dont l'abréviation est NOX, est une enzyme présente dans le règne animal, dans le règne végétal et dans le règne des mycètes (2). Son existence a également été récemment démontrée *in silico* et expérimentalement chez la bactérie *Staphylococcus pneumoniae*, ce qui signifie qu'elle est aussi présente chez les procaryotes ou à minima chez certains procaryotes (3).

Ma thèse est centrée sur des études relatives à la NADPH oxydase du phagocyte, ou plus précisément la NADPH oxydase du neutrophile, un leucocyte de la lignée myéloïde et aussi le leucocyte circulant dans le sang le plus abondant chez l'Homme. Cette enzyme, aussi appelée NOX2, fait partie, chez les mammifères, d'une famille de sept isoenzymes notées NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, et DUOX1 et DUOX2, où DUOX est un acronyme pour « Dual OXydase », ces dernières possédant l'ensemble des critères communs aux NADPH oxydases, (centres catalytiques homologues, possédant les mêmes cofacteurs, catalysant la même réaction), font partie intégrante de cette famille (2).

Dans cette partie, je donnerai, non exhaustivement, des fonctions physiologiques identifiées des NADPH oxydases de l'Homme ainsi que les conséquences d'un défaut d'activité ou d'un excès d'activité de ces enzymes. J'aborderai ensuite le lien existant entre les recherches dites fondamentales faites dans cette thèse et le contexte biomédical.

1. Les fonctions physiologiques de la NADPH oxydase

Je présente ici quelques exemples de fonctions physiologiques normales (non pathologiques) aux échelles de la cellule à l'organisme, dans lesquelles les enzymes de la famille des NADPH oxydase sont impliquées. Pour des revues relatant l'ensemble de ces sujets, voir les références (4–11).

Les enzymes de la famille des NADPH oxydase sont impliquées dans : la réponse immunitaire en contribuant à la destruction des pathogènes à la suite de la phagocytose ou de leur séquestration dans un piège extracellulaire, les réactions inflammatoires, la régulation de la production de l'insuline, la synthèse des hormones thyroïdiennes, la détection de l'étirement des tissus, toutes les étapes de la cicatrisation (réparation tissulaire), la détection de la concentration locale en dioxygène à l'échelle des tissus ou de la cellule, l'homéostasie redox, la régulation des flux d'électrolytes, la différenciation cellulaire, l'activation de l'apoptose ou de la sénescence cellulaire, la régulation du

cycle cellulaire, l'activation de certaines kinases, la réponse aux stress cellulaires, la signalisation cellulaire, la mobilité cellulaire (par exemple à travers le chimiotactisme), la croissance cellulaire...

La NADPH oxydase du phagocyte, que je nommerai NOX2 dans mon manuscrit, est fortement exprimée dans les neutrophiles et plus généralement dans les phagocytes dont elle tire son nom. Elle est particulièrement impliquée dans la défense immunitaire innée et les réactions inflammatoires. Il s'agit de l'isotype le mieux connu et historiquement le plus étudié, de la famille des NADPH oxydases.

2. Les maladies graves liées à un dysfonctionnement de la NADPH oxydase NOX2

Afin de faciliter l'accès rapide des références au lecteur désireux d'en savoir davantage, celles-ci ont été détaillées lorsque cela me semblait important, mais la majorité sont issues de l'article de revue de Giardino *et al.* 2017 (12).

Dans le monde, entre 1 nouveau-né sur 200000 et 1 nouveau-né sur 250000 naît avec une maladie génétique appelée granulomatose septique chronique, (CGD pour Chronic Granulomatous Disease), dont la forme de transmission principale est celle liée à l'X et dont le phénotype est dû à un défaut fonctionnel de la NADPH oxydase du phagocyte (NOX2). Un déficit de fonction de NOX2 peut jouer un rôle négatif dans de nombreux problèmes inflammatoires comme l'arthrite (13–16), la polyarthrite rhumatoïde (17), la maladie de Crohn (18, 19), ou encore l'inflammation de la moelle osseuse (20–22). De graves problèmes immunitaires sont plus directement liés au dysfonctionnement de NOX2 comme des infections bactériennes ou fongiques dont beaucoup n'existent pas chez un patient sain, non-CGD (23–38), ou d'autres syndromes auto-immuns comme le lupus érythémateux systémique (13, 14, 39–41) et la purpura thrombopénique idiopathique (13, 15, 39–43). En outre, l'absence d'activité de NOX2 peut aussi être impliquée dans des maladies neurodégénératives, myodégénératives (12)... Il semblerait de plus que le défaut fonctionnel de la NADPH oxydase ne soit pas nécessairement une maladie génétique innée, mais qu'elle puisse aussi être une maladie génétique acquise par le biais de rétrotransposons qui pourraient, en cas d'insertion inopinée à un locus important, provoquer une mutation dans un gène déterminant pour le fonctionnement de la NADPH oxydase (44). Aujourd'hui, le seul traitement curatif efficace des CGD repose sur une transplantation de cellules hématopoïétiques (45–48).

D'autre part, NOX2 peut aussi être sur-régulée, ce qui peut induire des maladies graves comme les maladies neurodégénératives (49) par exemple la sclérose latérale amyotrophique dans laquelle NOX2 peut produire 60 fois trop d'anions superoxyde (50–53), des croissances anormales de tissus appelés néoplasmes (54), des cancers (7), des maladies cardiovasculaires (55–58), ou encore possiblement favoriser l'athérosclérose par le biais de la vasoconstriction (59–64).

3. Le contexte médical de NOX2 en lien avec le sujet de ma thèse

L'apport de la compréhension des mécanismes moléculaires permettant le bon fonctionnement de NOX2, n'aurait qu'un intérêt clinique limité en regard du succès de la transplantation de moelle osseuse et de la relative rareté des patients CGD. En revanche, d'un point de vue médical, la compréhension moléculaire de la régulation de NOX2

pourrait permettre le développement pharmaceutique d'inhibiteurs spécifiques de la NADPH oxydase qui, à défaut d'être curatifs, pourraient être un traitement à long terme empêchant la progression d'une maladie, ou d'un symptôme, issu d'une sur-régulation de NOX2 (65).

B. LA NADPH OXYDASE DU NEUTROPHILE ‘NOX2’

J’ai choisi d’illustrer une fonction cellulaire de La NADPH oxydase du phagocyte NOX2 à travers sa contribution dans la défense immunitaire innée. Je vais donc succinctement décrire le lien qui existe entre le neutrophile, NOX2 et cette fonction biologique précise.

Le système tégumentaire est composé de la peau, des muqueuses et des phanères, (ongles, poils, dents). Il sépare le milieu extérieur du corps humain de l’intérieur du corps humain. Si un objet étranger provenant du milieu extérieur, traverse cette barrière tégumentaire, il se retrouve dans un milieu dans lequel seuls les composants appartenant, au sens biologique du terme, à l’individu sont tolérés par l’organisme. L’ensemble des composants appartenant à l’individu au sens biologique du terme forment ce qui est appelé le « soi ». Tous les autres composants de l’univers sont dits appartenant au « non-soi ». Lorsque l’organisme détecte l’invasion d’un tel objet étranger, une réponse immunitaire se met en place, impliquant notamment le recrutement de cellules spécialisées d’abord localement, (essentiellement les macrophages), puis plus lointaines provenant du sang ou de la lymphe canalisée. Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires circulantes à arriver sur le site de l’infection (sans y être initialement présentes). Les neutrophiles sont aussi celles qui arrivent en plus grand nombre et qui seront donc rapidement prépondérantes au site de l’infection, (environ 50 % des cellules présentes au niveau de l’entrée du corps étranger). La réponse des neutrophiles dure environ 12 heures après l’invasion (revues (66–71)). Cette réponse fait partie de la réponse immunitaire innée, aussi appelée non spécifique, parce qu’elle a pour fonction d’éliminer du corps humain tout objet étranger sans discrimination et sans stratégie spécifique à un objet étranger particulier.

Lorsque le neutrophile arrive sur le site de l’invasion, il reconnaît l’objet étranger préalablement ‘opsonisé’ par des récepteurs spécifiques (aux immunoglobulines, dérivés du complément...). Cette reconnaissance spécifique déclenche la phagocytose de l’objet étranger (revues (72–74)), ce qui consiste en la formation de pseudopodes et l’internalisation de cet objet à l’intérieur d’une vésicule appelée phagosome, située dans le cytoplasme du neutrophile (**Figure II-1**).

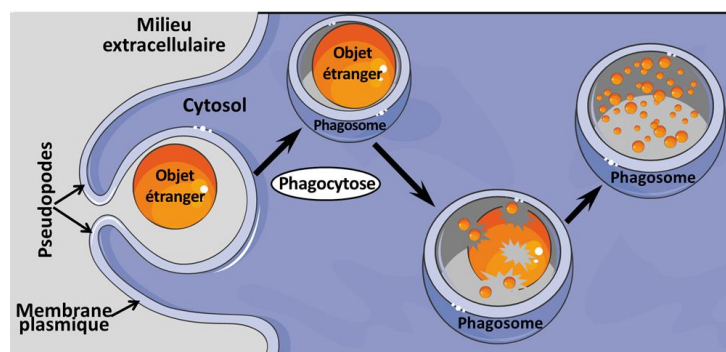


Figure II-1. Schéma simplifié de la phagocytose et de la destruction d’un objet étranger par un neutrophile.

L’objet étranger est d’abord internalisé via l’extension puis la fusion des pseudopodes, puis le phagosome est enrichi en protéases, puis des espèces réactives de l’oxygène sont produites à l’intérieur par la NADPH oxydase ce qui cause la destruction de l’objet étranger.

La phagocytose implique différents processus conduisant normalement à la destruction de l’objet phagocyté, présent à l’intérieur du phagosome. D’une part, l’action chimique de protéases et de peptides antimicrobiens permettra de détruire spécifiquement les protéines et de perturber l’intégrité des membranes de l’objet étranger s’il

contient des molécules biologiques. D’autre part, la destruction sera complétée par l’action d’espèces réactives de l’oxygène (ROS, **E.Réaction III-1, p43**), produites par la NADPH oxydase du phagocyte (75–79) et des produits dérivant des espèces réactives de l’oxygène qui sont essentiellement, dans le cas de la phagocytose, des espèces réactives des halogènes (80–85), comme l’acide hypochloreux et des espèces réactives des amines (86–89).

Dans le neutrophile au repos, l’enzyme NADPH oxydase NOX2 est inactive (elle ne catalyse pas la production de ROS) et se trouve à la membrane plasmique ainsi qu’à la membrane de granules spécialisées du neutrophile. Plus précisément, NOX2 se trouve pour 60 à 70 % dans les granules spécifiques (granules secondaires), pour 20 à 25 % dans les granules de gélatinase (granules tertiaires) et le reste est majoritairement à la membrane plasmique et éventuellement dans une bien moindre mesure à la membrane d’autres compartiments comme les vésicules sécrétoires, le réticulum endoplasmique, l’enveloppe nucléaire ou l’appareil de Golgi. Consécutivement à l’activation du neutrophile, NOX2 est recrutée à la membrane plasmique et, ou à la membrane du phagosome et produit alors des ROS (90–112).

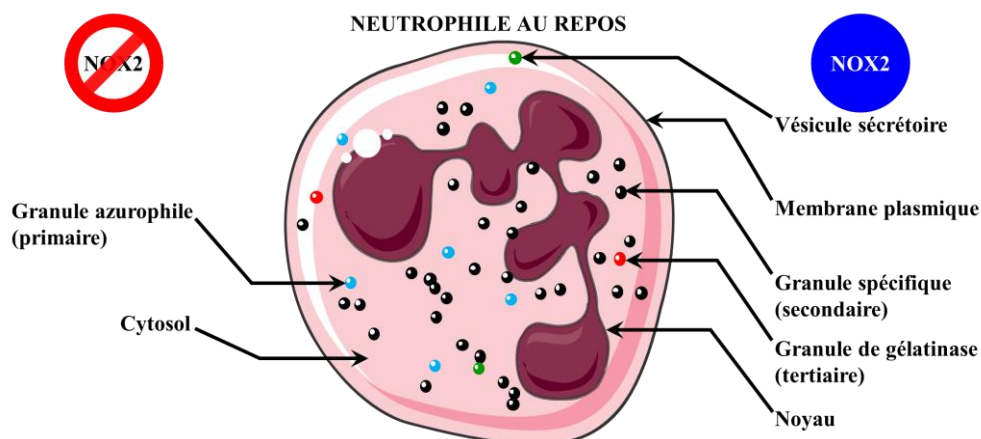


Figure II-2. Localisations subcellulaires majoritaires de la NADPH oxydase du phagocyte (NOX2) dans un neutrophile au repos.
A droite les membranes des composants cités contiennent NOX2. A gauche les composants cités ne contiennent pas NOX2.

Ainsi, NOX2 est une enzyme membranaire activable, donc régulée, à plurilocalisations dans le neutrophile. Dans la suite de cette introduction, seront donc données des informations essentielles pour la compréhension des travaux réalisés dans cette thèse. Je débiterai par la description de la structure fondamentale des membranes biologiques, puis seront détaillés les aspects structuraux et fonctionnels connus de la NADPH oxydase du neutrophile et quelques aspects de sa régulation seront abordés.

1. Les membranes biologiques

En préambule, il me semble important de noter, et je trouve ça fort dommageable considérant leur importance, que je n’ai jamais entendu parler de lipides en 7 ans d’études supérieures dans la biochimie et la chimie. Cela est en très bonne corrélation avec des discussions que j’ai pu avoir avec d’autres étudiants franciliens qui reportaient que les lipides (et similairement les glucides) sont rarement, voire dans certains cas jamais, enseignés dans l’enseignement supérieur francilien, ce que je trouve fort regrettable considérant leur place centrale en biologie. Par conséquent, je souhaite dédier cette partie aux fondamentaux de la biochimie des lipides et à la description des bases structurales des membranes biologique. En outre, j’ai eu d’excellents et très complets cours sur les protides et les acides

nucléiques et je n'ai pas entendu de récriminations envers ces enseignements. Par conséquent, je ne donnerai pas de fondamentaux sur ces sujets et me restreindrai à discuter des cas particuliers correspondant aux protéines étudiées.

1.1. DEFINITION DES LIPIDES

Les membranes biologiques sont constituées majoritairement de molécules de la classe biochimique des lipides. Les lipides sont un ensemble de molécules fabriquées par tous les êtres vivants et qui ont des structures chimiques, physiques ainsi que des fonctions extrêmement variées à l'intérieur d'une même cellule, à l'intérieur d'un même organisme ou encore entre les différents organismes. A cause de ces grandes diversités structurales et fonctionnelles, il est très compliqué de définir rigoureusement ce que sont les lipides. La définition officielle donnée par l'Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée, IUPAC, (site internet vu le 1^{er} juin 2018, <https://doi.org/10.1351/goldbook.L03571>), consiste à dire que les lipides sont des molécules d'origine biologique qui sont solubles dans les solvants apolaires.

Or, certains lipides glyqués sont insolubles dans les solvants apolaires et beaucoup d'autres composés que les lipides synthétisés par le vivant sont solubles dans les solvants apolaires. De plus, la solubilité est une notion précise, en principe quantifiable et il est donc extrêmement vague de définir un ensemble de molécules en évoquant qualitativement ce concept. Par conséquent, cette définition est évidemment limitée, comme le sous-entendent d'ailleurs leurs rédacteurs, et la meilleure façon de définir les lipides selon moi revient, justement, à souligner la difficulté de les définir de façon classique, mais aussi à discuter de leur diversité. En majorité, leur caractéristique commune est de posséder à l'échelle moléculaire une partie apolaire bien distincte et une partie polaire bien distincte, souvent beaucoup plus restreinte que la partie apolaire. Autrement dit, il s'agit majoritairement, (mais non exclusivement selon le point de vue des auteurs), d'amphiphiles.

Cette partie a donc pour objectif de donner les fondamentaux en biochimie des lipides indispensables à la compréhension de ma thèse, donc sans prétention d'exhaustivité. J'y évoquerai plusieurs types de lipides fréquemment rencontrés, présenterai des notions essentielles de nomenclature (113–115) et discuterai de la structure des membranes biologiques. Pour un approfondissement de ce sujet, je renvoie le lecteur vers des ouvrages spécialisés (ISBN 978-94-010-5360-0), ou encore (116–119).

1.2. LES ACIDES GRAS

Les acides gras sont, d'après l'IUPAC (site internet vu le 1^{er} juin 2018. <https://doi.org/10.1351/goldbook.F02330>), des molécules « dérivées d'acides monocarboxyliques aliphatiques contenues sous forme estérifiée dans la matière grasse, l'huile ou la cire présentes chez les animaux ou les végétaux. Les acides gras naturels communs ont une chaîne carbonée de 4 à 28 carbones (le plus souvent non substituée et en nombre paires), laquelle peut être soit saturée, soit insaturée. Par extension, le terme est parfois utilisé pour désigner tous les acides carboxyliques aliphatiques acycliques. »

Je considère pour ma part que cette définition est trop restreinte à certains égards ou trop large pour d'autres. En effet, la première phrase de la définition IUPAC évoque la présence des acides gras (AG) chez les végétaux ou les

animaux ce qui est vrai mais insuffisant, les AG existant dans l'ensemble des êtres vivants. La dernière phrase ne retient, en revanche, pas la notion de molécule biologique, ce qui n'impose pas de limite entre les AG naturels et les AG synthétisés par l'Homme. D'autre part, cette phrase stipule qu'il n'y a pas d'AG cycliques, alors que certains le sont (120).

Par conséquent, je considère *dans ma thèse* que les acides gras constituent l'ensemble des acides carboxyliques aliphatiques, (donc ne contenant que des hydrogènes et des carbones), d'origine biologique, dont la solubilité est majoritairement beaucoup plus grande dans des solvants apolaires que dans des solvants polaires et qui se retrouvent souvent combinés sous forme estérifiée à d'autres molécules dans des structures complexes, ou sous forme d'acides gras non estérifiés, parfois appelés acides gras libres.

Il existe non exhaustivement des acides gras linéaires, des acides gras ramifiés, des acides gras cycliques, des acides gras saturés ou insaturés (avec doubles liaisons conjuguées ou non), ou encore des dérivés d'acides gras oxygénés, dits « oxy-acides », qui sont des alcools gras, des aldéhydes gras et des époxydes gras, des cétones gras ; donc contenant un ou plusieurs hétéroatomes, (*i.e.* élément chimique autre que le carbone et l'hydrogène), en plus de leur fonction carboxyle. Je ne discuterai ici que d'acides gras linéaires non branchés et non cycliques ne possédant pas d'hétéroatomes en plus de leur fonction carboxylique. L'ensemble des données présentées, sauf mention contraire, font donc référence aux acides gras linéaires aliphatiques mais il me semble indispensable d'avoir conscience de cette vaste diversité.

1.2.1. LA NOMENCLATURE DES ACIDES GRAS LINEAIRES

a. Nomenclature fondamentale sans stéréochimie

Les acides gras linéaires non ramifiés, non substitués et non conjugués, que j'appellerai simplement acides gras lorsqu'il n'y a pas d'ambiguïté, ou acides gras simples dans le cas contraire, peuvent être classés dans deux sous-ensembles : d'une part les acides gras saturés ne comportant que des liaisons carbone-carbone simples, d'autre part les acides gras insaturés comportant une ou plusieurs double liaisons carbone-carbone (**Figure II-3**).

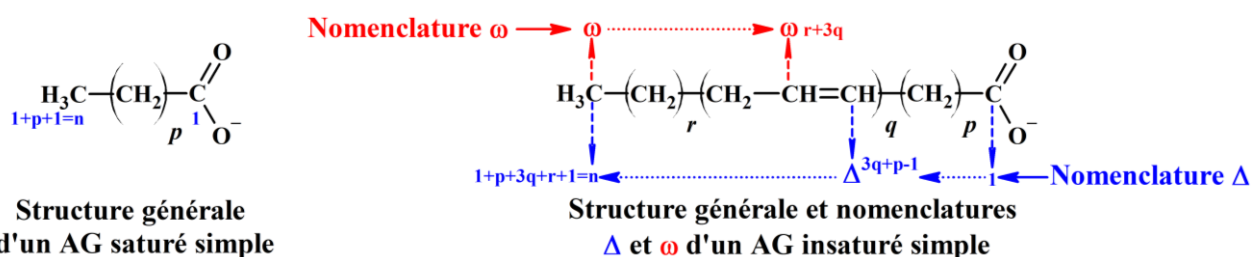


Figure II-3. Structures générales et nomenclature sans stéréochimie des acides gras simples saturés (à gauche) ou insaturés (à droite).

La nomenclature de l'acide gras saturé simple est fidèle aux règles de nomenclatures usuelles en chimie organique, le premier carbone correspond à la fonction prioritaire, donc celui de l'acide carboxylique. La nomenclature de l'acide gras insaturé simple peut aussi être traduite de cette façon, mais deux autres nomenclatures ont été définies pour simplifier la description des doubles-liaisons, il s'agit de la nomenclature Δ et de la nomenclature ω .

La nomenclature Δ des doubles liaisons revient à compter les carbones en partant de celui de l'acide carboxylique (numéro 1), jusqu'au groupement méthyle terminal (numéro n) et à numéroter les doubles liaisons par leur carbone de plus faible indice en mettant cet indice en exposant de la lettre grecque Δ . Par exemple ici, le premier carbone de la q-ième double liaison à partir de l'acide carboxylique est le carbone numéroté $3q+p-1$ ce qui correspond à une double liaison numérotée Δ^{3q+p-1} , (si $p=3$ et $q=4$, alors il s'agira de la double liaison Δ^{14}). L'avantage de cette numérotation est qu'elle est facile à relier aux règles normalisées de nomenclature internationale.

Dans la nomenclature ω , (où ω est parfois remplacé par « n »), des doubles liaisons, il faut considérer que le groupement méthyle terminal est le ω -ième (ou le n-ième) carbone. Dans cette nomenclature, il faut compter les carbones en partant du méthyle terminal, dont le carbone sera donc numéroté 1. Afin de signaler l'utilisation de cette nomenclature, dont la seule utilité est la numérotation des doubles liaisons, le sigle ω sera affublé à une double liaison, suivi du numéro du carbone engagé dans cette double liaison et le plus proche du méthyle terminal numéroté selon la convention de la nomenclature ω . Par exemple ici, le premier carbone de la q-ième double liaison à partir du méthyle terminal est le carbone numéroté $r+3q$, ce qui correspond à une double liaison numérotée $\omega r+3q$, (si $r=3$ et $q=4$, alors il s'agira de la double liaison $\omega 15$). La numérotation ω est liée à la numérotation standardisée par différence entre le nombre de carbone total (n) et le numéro du premier carbone de la double liaison en partant de l'acide carboxylique.

b. Stéréochimie des acides gras insaturés

La stéréochimie des acides gras insaturés, a un très fort impact sur leurs relations structure-fonction, je tiens donc à faire un rappel à ce propos. Les doubles liaisons des acides gras possèdent un seul substituant autre que l'hydrogène sur chacun des carbones impliqués, or les doubles liaisons sont rigides et il ne peut y avoir de rotation facile des substituants d'un carbone par rapport aux substituants du deuxième carbone. Par conséquent, la caractérisation d'un acide gras insaturé nécessite de définir la diastéréoisomérisation de chacune des doubles liaisons (**Figure II-4**).

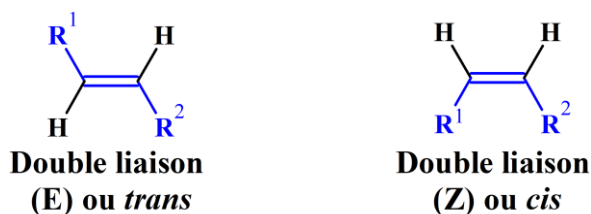


Figure II-4. Schéma des deux diastéréoisomérisations possibles pour les doubles liaisons des acides gras simples insaturés.

Ainsi, une double liaison d'un acide gras linéaire insaturé simple peut avoir deux configurations. D'une part une configuration dans laquelle les substituants (R^1 et R^2) de chacun des carbones sont opposés par rapport à la liaison double, ce qui est appelé configuration (E), avec les parenthèses, (initiale issue de l'allemand 'Entgegen'), ou configuration *trans*, en italique. D'autre part une configuration dans laquelle les substituants (R^1 et R^2) de chacun des carbones sont du même côté par rapport à la liaison double, ce qui est appelé configuration (Z), avec les parenthèses, (initiale issue de l'allemand 'Zusammen'), ou configuration *cis*, en italique. La nouvelle nomenclature normalisée en chimie organique impose l'utilisation de la nomenclature (Z) et (E), mais en biochimie des lipides la nomenclature *cis* et *trans* est préférée et encore très majoritairement utilisée, ce qui a, de plus, le fort avantage d'être une

nomenclature connue par le grand public donc avec laquelle la communication est beaucoup plus facile. J'utiliserai donc la nomenclature *cis* et *trans* dans la suite.

1.2.2. EXEMPLES D'ACIDES GRAS CHEZ LES ANIMAUX

Afin d'aborder la suite de façon pertinente et en particulier la structure des membranes biologiques, il me semble important de donner quelques exemples d'acides gras fréquemment rencontrés chez les animaux (mais pas nécessairement exclusivement). Les tableaux sont donnés en **ANNEXE 4**.

Les acides gras peuvent donc être saturés ou insaturés et plus précisément monoinsaturés ou polyinsaturés. Les acides gras monoinsaturés sont soit en configuration *cis*, soit en configuration *trans*, alors que les acides gras polyinsaturés peuvent être ‘tout-*cis*’, ou ‘tout-*trans*’, ou encore toutes les combinaisons de stéréoisomérisation *cis-trans* possibles. Dans la nature, la majorité des acides gras monoinsaturés ou polyinsaturés sont tout-*cis*. Dans ma thèse, sauf mention contraire, les acides gras insaturés cités sont en configuration tout-*cis*. L'acide gras monoinsaturé le plus fréquent chez les animaux et les plantes est l'acide oléique (18 carbones, ω 9), alors que l'acide gras polyinsaturé le plus fréquent chez certains animaux et chez les algues marines est un omega 6, le tout-*cis* acide arachidonique (AA, 20 carbones, ω 6, ω 9, ω 12, ω 15), qui a une place très importante dans cette thèse. En outre, l'acide docosahexaénoïque, DHA (22 carbones, ω 3, ω 6, ω 9, ω 12, ω 15, ω 18), est un omega 3 abondant chez les animaux, notamment sous forme estérifiée. Les acides gras saturés les plus fréquents chez les animaux sont l'acide palmitique et l'acide stéarique, notamment sous forme estérifiée.

1.3. LES LIPIDES MEMBRANAIRES

Dans cette partie, je présente les trois grandes classes majoritaires de lipides membranaires qui sont les phospholipides, les sphingolipides et les stéroïdes. Je me limiterai aux stricts fondamentaux nécessaires pour la suite.

1.3.1. PHOSPHOLIPIDES

Les phospholipides sont l'ensemble des lipides qui contiennent un, au moins, élément chimique phosphore, comme dans un groupement phosphate ou dans un groupement dérivé du groupement phosphate (phosphonolipides par exemple). La base chimique de la quasi-totalité des phospholipides repose sur la combinaison d'une ou de plusieurs molécules polaires, majoritairement glycérol et dans une moindre mesure une sphingosine, (ou ses dérivés), si ce dernier est lié à une molécule phosphorée et d'une ou de plusieurs molécules apolaires, en grande majorité des acides gras estérifiés (le glycérol est alors dit mono- ou di-acylé), mais aussi parfois des alcools aliphatiques liés par liaison éther au glycérol (le glycérol est alors dit mono- ou di-alkylé si la chaîne carbonée est saturée ou alcénylé si la chaîne carbonée possède des doubles liaisons).

Les phospholipides sont les principaux constituants des membranes biologiques. Je présenterai ici uniquement les phospholipides dont la partie polaire est une molécule de glycérol acylée, les mono-/di-acylglycérophospholipides.

a. Nomenclature des glycérophospholipides

La molécule de glycérol est un triol linéaire, (propane 1,2,3-triol). Dans les lipides membranaires, les fonctions alcool du glycérol sont estérifiées ou étherifiées, conférant au deuxième carbone du glycérol un caractère asymétrique (quatre substituants différents). La nomenclature des phospholipides nécessite la précision de la stéréochimie du glycérol et pour faciliter les appellations, une convention historique a été choisie, qui est présentée en **Figure II-5**.

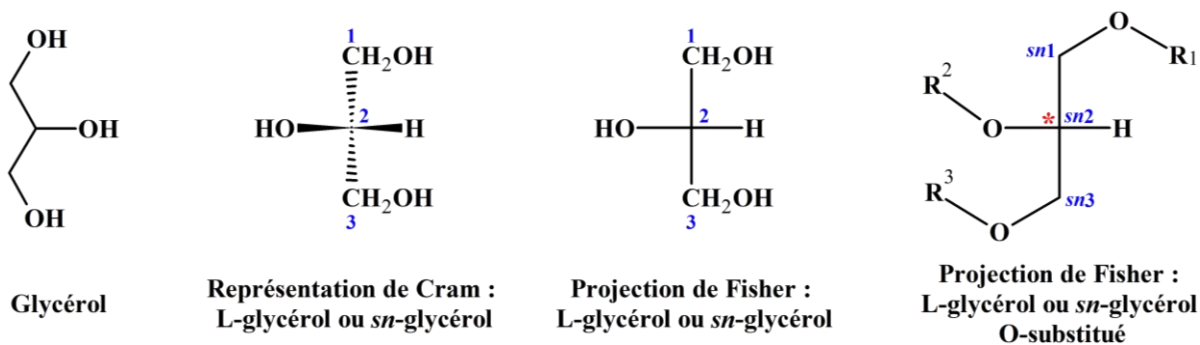


Figure II-5. Numérotation et notation stéréochimique conventionnelles du glycérol et des phospholipides dérivés.

Il a été décidé qu'un acide gras qui a, en projection de Fisher, son hydroxyle du carbone chiral à gauche, (L-glycérol), aura son carbone du haut numéroté 1, son carbone central numéroté 2 et son carbone du bas numéroté 3. Lorsque cette convention de numérotation est utilisée, le glycérol est alors appelé *sn*-glycérol, (*sn* pour 'stereospecific numbering'), sans davantage de précision sur la configuration absolue du carbone asymétrique. Par conséquent, l'utilisation de la nomenclature *sn* dans le nom des glycérophospholipides et devant le numéro de ses carbones aura la même signification.

b. Structure des glycérophospholipides

A présent, la structure d'un phospholipide va être décrite à travers un exemple. Un phospholipide très courant, le diacylglycérophosphatidylcholine (**Figure II-6**), contient une molécule de glycérol, une molécule de phosphate, faisant une liaison éther avec l'alcool terminal du carbone *sn3* du glycérol et liée aussi par liaison éther à une molécule de choline. D'autre part, les deux groupement hydroxyles restants, sur les carbones *sn1* et *sn2* du glycérol, sont estérifiés avec deux acides gras, en l'occurrence deux parmi les plus présents dans les membranes biologiques, l'acide arachidonique et l'acide palmitique.

L'acide gras insaturé est estérifié avec le groupement hydroxyle du deuxième carbone (*sn2*) du glycérol et ceci est, sauf exception, toujours le cas. L'acide arachidonique est l'acide gras polyinsaturé majoritaire à cette position dans les diacylglycérophosphatidylcholines et similairement pour l'acide palmitique en *sn1*. Cependant, ces acides gras peuvent être interchangeés à l'aide notamment de lipases et de phospholipases qui coupent la liaison ester qu'ils forment avec le glycérol, ou encore de transacétylases qui transfèrent des chaînes acyles par exemple d'un phospholipide à un autre (121–123).

Comme présenté précédemment, tous les glycérophospholipides possèdent un phosphate étherifié avec le groupement hydroxyle du troisième carbone (*sn3*) du glycérol et ce phosphate peut être lié par liaison éther avec une choline, mais aussi avec à diverses autres molécules comme l'éthanolamine, la choline, la sérine, le glycérol, le *myo*-inositol ou encore des phosphoinositol (**Tableau II-1**).

Ainsi, selon la molécule liée au phosphate du glycérol, le phosphoglycéride pourra prendre différents noms et lorsque le type d’acide gras n’est pas requis pour la discussion, il est d’usage d’omettre leur nom dans celui des phospholipides afin d’éviter les lourdeurs. Lorsque nécessaire, deux lettres traduisant le type d’acides gras estérifiés peuvent être ajoutées avant l’acronyme de la tête polaire, par exemple ‘POPC’ signifie ‘1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine’ traduisant qu’il s’agit d’une phosphatidylcholine (PC) estérifiée avec un acide palmitique et un acide oléique (PO). Pour la suite de ma thèse qui ne nécessite pas l’utilisation de beaucoup d’abréviations similaires, je donnerai le nom des acides gras en entier séparément, le cas échéant.

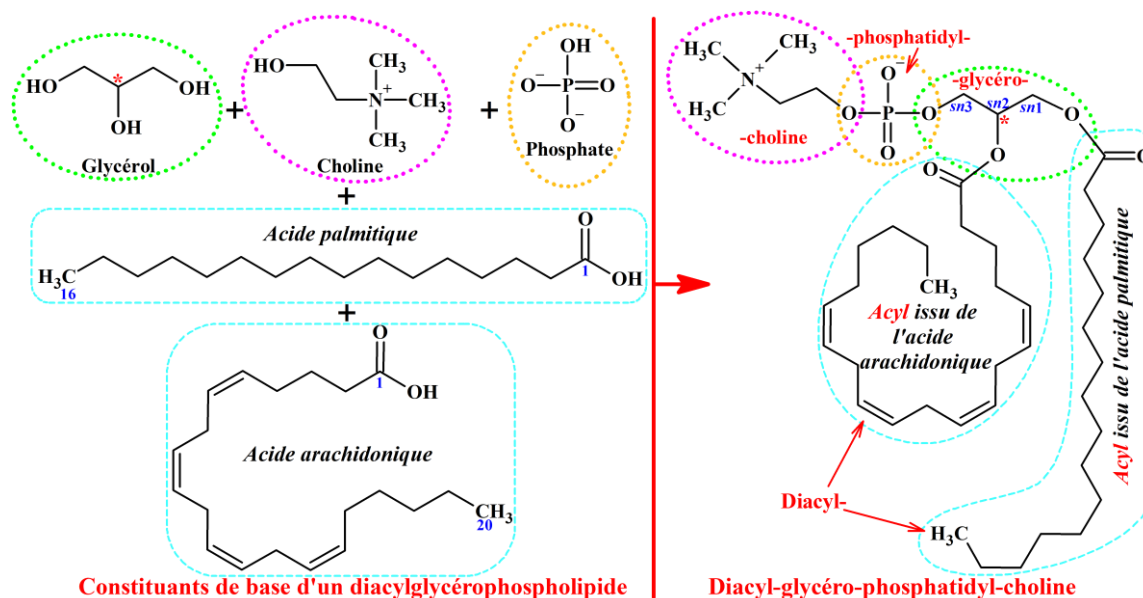


Figure II-6. Exemple de constituants de base d’un diacylglycérophospholipide et exemple de *sn*-diacylglycérophosphatidylcholine.

La base de tout diacylglycérophospholipide sont un glycérol, un phosphate et deux acides gras. En présence de choline, peut être formé un diacylglycérophosphatidylcholine comme dans ce cas particulier. Ici les acides gras sont l’acide arachidonique et l’acide palmitique, deux acides gras très présents dans les membranes.

En plus des diacylglycérophospholipides, il existe des monoacylglycérophospholipides issus par exemple de la désacylation d’un diacylglycérophospholipide par une phospholipase ou une lipase. Dans ce cas, le phospholipide est plutôt qualifié de lysophospholipide. Les lysophospholipides peuvent, eux aussi, jouer des rôles structuraux et fonctionnels.

Tous les phosphatidylinositides dérivent du phosphatidylinositol par phosphorylation. Ainsi, il existe de nombreux phosphoinositides, issus de la combinaison d’un ou deux ou trois phosphates liés à l’inositol et la proportion de ces phosphoinositides est régulée par la voie, ou cycle, des phosphatidylinositides.

La partie polaire des glycérophospholipides peut être globalement neutre ou globalement chargée négativement. La charge des têtes polaires ainsi que la nature des molécules substituant le groupe phosphatidyl- sont d’une importance cruciale pour la régulation des interactions entre les protéines et la membrane, voire pour la régulation des fonctions des protéines transmembranaires elles-mêmes, ainsi que pour les flux transmembranaires et le gradient électrochimique transmembranaire.

En particulier, les phosphatidylinositides jouent un rôle fondamental dans la charge surfacique des membranes, influençant notamment énormément l’adhésion de certaines protéines à la membrane et pouvant contribuer à la

régulation de cette fixation via des kinases qui peuvent rapidement enlever ou ajouter des phosphates et donc changer la charge des phosphatidylinositides. La dynamique des phosphatidylinositides contrôle aussi en partie la dynamique des membranes, fission, fusion, endocytose, exocytose, fluidité membranaire, autophagie, division cellulaire, migration cellulaire (124)...

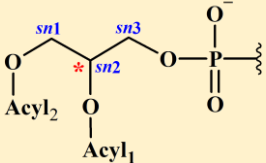

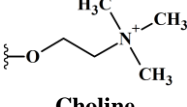
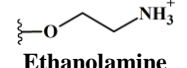
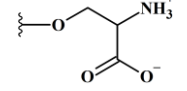
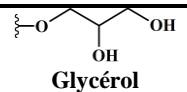
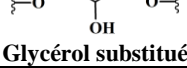

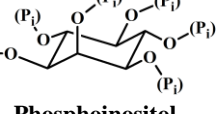
Squelette	Molécule	Nom du phospholipide (PL) associé	Charge
 <p>(Glycéro)Phosphatidyl- (1,2-diacyl-<i>sn</i>-glycero-3-phospho-)</p>	 <p>Hydroxylate</p>	Acide Phosphatidique (PA) (1,2-diacyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphate)	-2
	 <p>Choline</p>	Phosphatidylcholine (PC) (1,2-diacyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine)	0
	 <p>Ethanolamine</p>	Phosphatidyléthanolamine (PE) (1,2-diacyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoéthanolamine)	0
	 <p>Sérine</p>	Phosphatidylsérine (PS) (1,2-diacyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphosérine)	-1
	 <p>Glycérol</p>	Phosphatidylglycérol (PG) (1,2-diacyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycérol)	-1
	 <p>Glycérol substitué</p>	Cardiolipine (CL) (1,3-bis(1,2-diacyl- <i>sn</i> -3'-phosphatidyl)- <i>sn</i> -glycerol)	-2
	 <p>Myo-inositol</p>	Phosphatidylinositol (PI) (1,2-diacyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoinositol)	-1
	 <p>Phosphoinositol</p>	Phosphatidylinositides, appelés Phosphatidylinositol mono- / di- / tri- phosphate (resp. PIP / PIP₂ / PIP₃) (1,2-diacyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoinositol monophosphate/ diphosphate/triphosphate)	-3 (PIP) -5 (PIP₂) -7 (PIP₃)

Tableau II-1. Glycérophospholipides les plus courants variant seulement par la molécule liée au phosphate en *sn3*.

(Pi)=phosphate lié par liaison éther au groupe hydroxyle du myo-inositol.

Certaines phospholipases peuvent aussi séparer le phosphate du glycérol, ce qui induit la formation de diacylglycérides (DAG ou DG), qui ne sont plus des phospholipides mais ont eux aussi des fonctions dans une membrane.

1.3.2. LES SPHINGOLIPIDES

Les sphingolipides sont une classe importante de lipides membranaires. Par exemple, les lipides membranaires glyqués, (dont la tête polaire contient notamment un ou des oses), pouvant notamment jouer un rôle de récepteurs membranaires, sont majoritairement des sphingolipides. D'autre part, les sphingolipides phosphorylés, qui sont en fait des phospholipides appelés sphingomyélines, peuvent jouer un rôle dans la transduction d'un signal transmembranaire en libérant un second messager, après clivage et phosphorylation enzymatique.

Une des particularités structurales des sphingolipides, (**Figure II-7**), est qu'ils ont une tête polaire basée sur la sphingénine, (ou sphingosine), qui est un aminodiol à longue chaîne apolaire. En pratique, la base des sphingolipides peut majoritairement être la sphingosine ou bien l'icosasphingénine, ou encore la sphinganine, (dihydrosphingosine),

ou la 4-D-hydroxysphinganine, (phytosphingosine, qui se retrouve aussi chez les animaux dont l'Homme, contrairement à ce que semble indiquer ce nom).

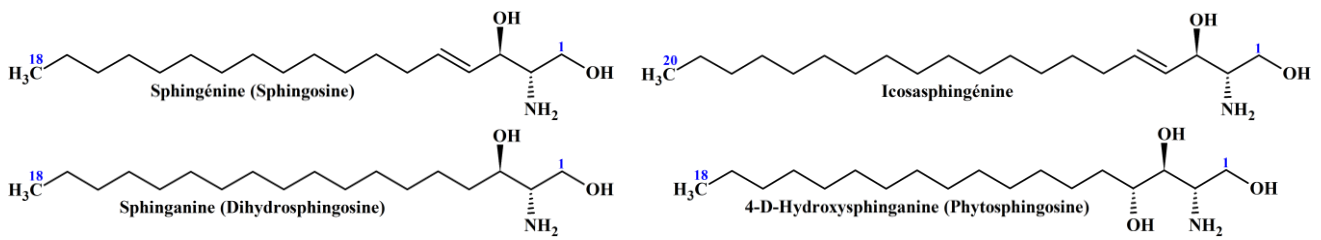


Figure II-7. Sphingosine et ses dérivés majoritaires trouvés dans les membranes cellulaires.

Lorsque la sphingosine, (ou un de ses dérivés), est liée en position 2 par liaison amide à un acide gras, la molécule s'appelle alors acylsphingosine et il s'agit de la molécule la plus simple et de la base moléculaire de la famille des céramides (**Tableau II-2**). En plus de l'acide gras, l'hydroxyle en position 1 peut former une liaison éther-oside et lier un ou plusieurs oses, formant ainsi un glycosphingolipide. Enfin, l'hydroxyle en position 1 peut aussi être phosphorylé et le phosphate peut alors être lié soit à une choline, soit à une éthanolamine, ce qui dans les deux cas forme une sphingomyéline utile dans la transduction de certains signaux cellulaires.

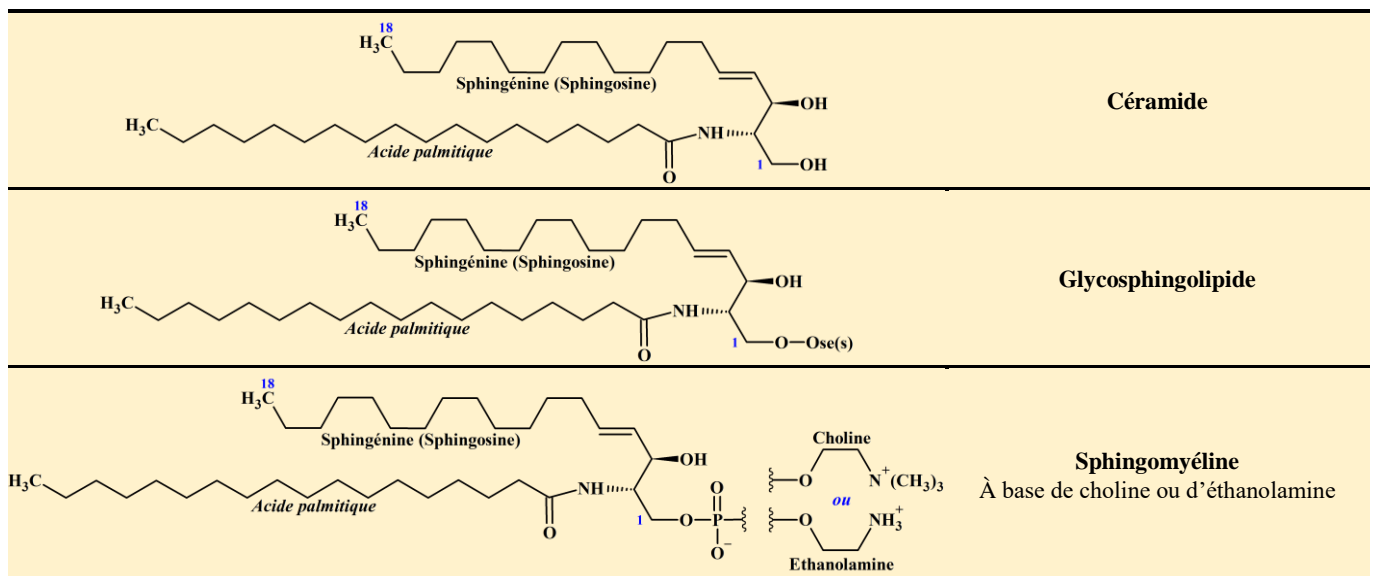


Tableau II-2. Structures de la céramide, des glycosphingolipides et des sphingomyélines à base de choline ou d'éthanolamine de d'acide palmitique.

Les sphingolipides sont des lipides dont la partie apolaire est très hydrophobe, ce qui leur confère la capacité d'augmenter l'ordre, (l'arrangement), des acides gras saturés et insaturés, ce qui induit une très forte augmentation de l'organisation générale d'une membrane. La base céramide en particulier semble aussi avoir la possibilité de changer de feuillet via un « flip-flop », (**Tableau II-3**), de l'ordre de la minute, alors que les autres lipides membranaires réalisent ce même phénomène en une durée de l'ordre de la dizaine de minutes au moins.

Ces propriétés permettraient aux sphingolipides de transmettre facilement des signaux de part et d'autre de la membrane. Leur forte hydrophobicité leur permet aussi de facilement se déplacer latéralement dans la membrane ce qui leur confère la possibilité de se rassembler en microdomaines membranaires, ou au contraire de se disperser à la surface de la membrane selon le contexte.

1.3.3. LES STEROLS

Les membranes biologiques contiennent aussi des stérols, qui sont de façon restrictive des molécules possédant une structure dérivée des stéroïdes, ou du cyclopenta[u]phenanthrene, (**Figure II-8**), ou d'une structure issue de celle-ci par clivage de certaines liaisons carbone-carbone ou par modification de la taille de certains cycles. Ces cycles peuvent être porteurs de groupements méthyles sur les carbones 10 et 13 et une chaîne alkyle devrait aussi être présente sur le carbone 17. Un groupe hydroxyle est normalement présent sur le carbone 3 et il n'est pas exclu qu'il y ait des carbones en plus ou en moins dans la structure. Le cholestérol fait partie de la famille des stérols, il est muni d'une fonction alcool sur le carbone 3.

Les stérols varient selon les espèces et il est ainsi possible de retrouver, par exemple, de l'ergostérol chez les plantes et pas chez les animaux, alors que les animaux possèdent du cholestérol, (**Figure II-8**), qui n'existe pas chez les plantes (125–127). Il est souvent d'usage de numéroter les cycles des stérols et donc du cholestérol de A à D.

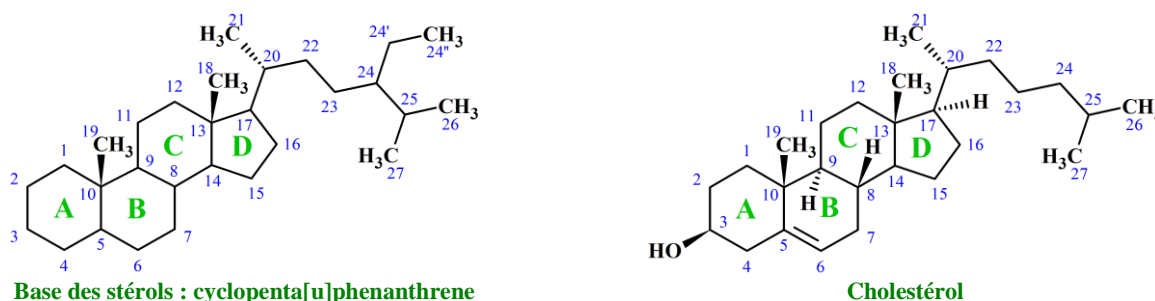


Figure II-8. Structure et numérotation du cycle de base des stérols (à gauche) et du cholestérol (à droite).

Le cholestérol possède une grande partie apolaire, (les cycles, les méthyles et la chaîne alkyle), et une petite partie polaire, la fonction alcool. Ainsi, de la même façon que les lipides présentés précédemment, le cholestérol pourra s'insérer dans les membranes biologiques. Le cholestérol inséré dans une membrane biologique aura tendance à augmenter son ordonnancement ce qui va contribuer à diminuer sa fluidité et donc à la rigidifier (128).

D'autre part, le cholestérol se regroupe spontanément avec les sphingolipides et en particulier avec la sphingomyéline, et forment ensemble, en tant que constituants principaux, des microdomaines lipidiques membranaires qui consistent en un regroupement spontané dans la membrane de différents lipides membranaires d'affinité réciproque particulière. Ces microdomaines, en équilibre dynamique avec le reste de la membrane, sont aussi appelés radeaux, (ou rafts), lipidiques parce qu'il s'agit de structures beaucoup plus organisées et donc plus rigides que le reste de la membrane. Ces radeaux lipidiques peuvent jouer un rôle structurant et favoriser la colocalisation des protéines transmembranaires. Certaines protéines comme la NADPH oxydase du phagocyte sont retrouvées de façon enrichie dans les radeaux lipidiques, ce qui suggère une importance toute particulière de ces derniers dans la fonctionnalité des protéines membranaires.

1.4. FONDAMENTAUX STRUCTURAUX DES MEMBRANES BIOLOGIQUES

Les lipides présentés jusqu'à maintenant possèdent tous une partie polaire et une partie apolaire. Dans un milieu aqueux, les lipides peuvent dans certaines conditions s'organiser en bicouches et former des membranes. Les

membranes biologiques sont des bicouches de lipides et contiennent majoritairement des phospholipides, mais aussi notamment des sphingolipides et du cholestérol, (**Figure II-9**). Les phospholipides étant majoritaires, lorsqu'il n'y a pas d'ambiguïté, pour simplifier j'utiliserai la notion de « bicouche de phospholipides » pour évoquer la structure en bicouche d'une membrane biologique. Le terme « couche » étant très utilisé dans son sens général, chacune des couches de la bicouche sera qualifiée de « feuillet ». Dans une membrane biologique, un feuillet de phospholipides est une structure organisée où, d'une part l'ensemble des parties polaires/hydrophiles des phospholipides sont adjacentes et forment une fine couche continue et d'autre part l'ensemble des parties apolaires/hydrophobes sont adjacentes et forment une couche continue plus épaisse que la couche polaire, (à cause de la longueur des chaînes carbonées).

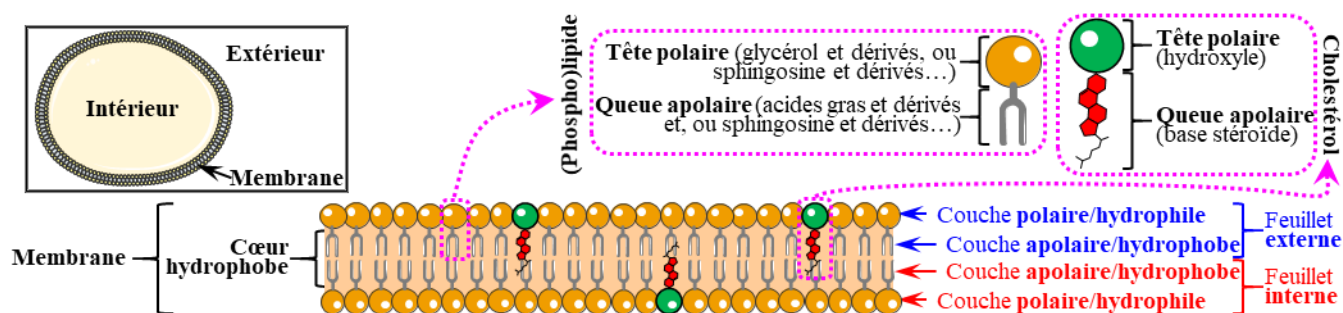


Figure II-9. Description simplifiée de la structure de base d'une membrane biologique hypothétique purement lipidique.

Encart en noir en haut à gauche : vue schématique d'une coupe transversale orientée d'un compartiment délimité par une membrane.

Encarts en rose en haut à droite : explication de la représentation utilisée des composants membranaires.

Reste du schéma : vue schématique d'une hypothétique coupe transversale d'une zone très restreinte d'une membrane biologique.

En dessous du schéma de la membrane=intérieur du compartiment et au-dessus du schéma de la membrane=extérieur du compartiment.

Spontanément, une membrane biologique est fermée, (sauf transitoirement), ce qui signifie qu'elle délimite un compartiment (clos) et qu'elle possède donc seulement deux faces impliquant l'existence d'une orientation intérieur-extérieur réciproque. La membrane comporte ainsi une face interne et une face externe, donc un feuillet de phospholipides interne et un feuillet de phospholipides externe.

La couche polaire de chacun des feuillets, interne et externe, est en contact direct avec le milieu aqueux. Les couches hydrophobes de chacun des feuillets sont l'une en face de l'autre. Ceci forme donc un cœur hydrophobe épais borné par les deux couches hydrophiles. La composition en lipides de ces deux feuillets peut être différente ou similaire. La différence entre les deux feuillets peut être passive, simplement due à la géométrie globale des lipides de chacun des feuillets en accord avec la courbure de la membrane, ou bien cette différence peut être maintenue activement par la cellule à travers des mécanismes d'exocytose et potentiellement d'autres mécanismes enzymatiques. La différence de composition entre les deux feuillets peut donc être cruciale pour la structure de la membrane, mais aussi pour sa fonction. Dans une membrane, les lipides peuvent se déplacer (**Tableau II-3**) latéralement (même feuillet) et transversalement (implique les deux feuillets) et les chaînes carbonées d'un même phospholipide peuvent réaliser des mouvements de balancier.

Ces mouvements caractérisent la fluidité membranaire et signent le caractère dynamique d'une membrane lipidique. La fluidité membranaire est notamment fortement influencée par certains paramètres physicochimiques comme la température, mais aussi par la proportion de chacun des lipides ainsi que des acides gras qui constituent les phospho/sphingolipides.

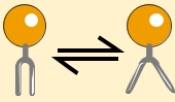
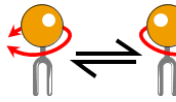
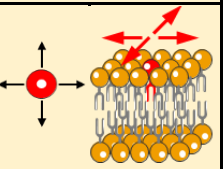
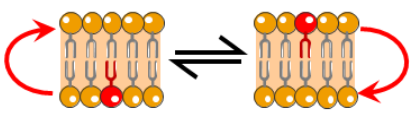
Mouvements latéraux (Intra-feuillet)			Mouvements transversaux (Inter-feuillets)
			
Balancier des chaînes carbonées de la queue apolaire/hydrophobe	Rotation	Diffusion latérale	Diffusion transversale ‘flip-flop’

Tableau II-3. Mouvements et diffusion des lipides membranaires latéralement ou transversalement.

Ainsi, les acides gras saturés ont une chaîne carbonée flexible permettant un assemblage ajusté entre les acides gras d’un phospholipide et ceux des phospholipides adjacents, ce qui entraîne l’augmentation de la rigidité, (diminution de la fluidité), de la membrane par augmentation des interactions de Van der Waals entre les différentes chaînes carbonées adjacentes. Au contraire, les acides gras insaturés ont une chaîne carbonée beaucoup moins flexible, (pas de rotation libre le long des doubles liaisons et configuration *trans/cis* imposée), ce qui limite les degrés de libertés donc borne la maximisation des interactions avec les chaînes carbonées adjacentes et implique une augmentation de la fluidité, (diminution de la rigidité), de la membrane. Il est important de rappeler que certains lipides comme le cholestérol et les sphingolipides augmentent fortement la rigidité, des membranes.


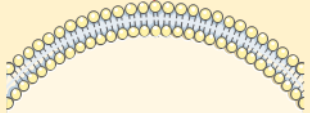

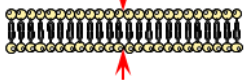

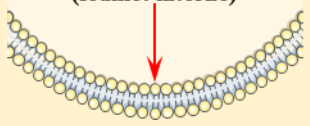
Géométrie physique du lipide	Nom de quelques lipides associés	Courbure et feuillet préférentiels
 CONIQUE INVERSEE	Lysophospholipides Détergents anioniques Phosphatidylinositides (PI) (Sphingomyéline (SM))	Courbure positive favorisée (feuillet externe) 
	Phosphatidylcholine (PC) (Sphingomyéline (SM)) Phosphatidylsérine (PS) Phosphatidylinositol (PI) Phosphatidylglycérol (PG) Acide phosphatidique (PA) Cardiolipine (CL) Céramide	Pas de courbure. Plan. (feuillets interne et externe) 
 CONIQUE	Digalactosyl diacylglycérol (glycolipide) Diglucosyl diacylglycérol (glycolipide) Phosphatidyléthanolamine (PE) Cardiolipine – Ca ²⁺ (CL chélatant Ca ²⁺) Acide phosphatidique – Ca ²⁺ (PA – Ca ²⁺) Acide phosphatidique pH<3.0 Phosphatidylsérine pH<4.0 Monogalactosyl diacylglycérol (glycolipide) Monoglucosyl diacylglycérol (glycolipide)	Courbure négative favorisée (feuillet interne) 

Tableau II-4. Les trois grands types de géométrie des lipides membranaires, courbures favorisées et quelques phospholipides associés.

D’autre part, l’organisation de la membrane dépend aussi de l’ajustement relatif des différents lipides membranaires entre eux. Meilleur est l’ajustement, mieux la membrane est ordonnée. L’ajustement dépend aussi de la géométrie des phospholipides. En effet, les représentations précédentes ne sont que des modèles simplifiés et la forme physique des phospholipides peut être très différente de cette représentation et également très variable (Tableau II-4).

L'ensemble de ces paramètres influencent la fluidité de la membrane, mais peuvent aussi influencer de façon significative sur sa structure et notamment sa courbure. Dans tous les cas, l'existence d'une membrane nécessite un ordre relatif des lipides, suffisant pour l'adoption d'une phase de bicouche lipidique. Une bicouche phospholipidique nécessite donc une grande proportion de lipides de géométrie cylindrique, mais en pratique, elle peut contenir une certaine proportion de phospholipides de géométrie conique qui joue sur la fluidité, l'organisation et la courbure de la membrane (**Tableau II-4**).

La géométrie conique de ces phospholipides peut aussi être compensée par des protéines compensatrices ou par d'autres phospholipides dont la forme est un cône inversé (129–131). Il existe deux phases principales de bicouches phospholipidiques, la phase α , notée $L\alpha$, et la phase β , notée $L\beta$. La phase $L\beta$ est très ordonnée et qualifiée de « gel solide », alors que la phase $L\alpha$ est beaucoup plus fluide et qualifiée de cristal liquide, ou de liquide désordonné (117, 118, 129, 132–145). Enfin, les membranes biologiques contiennent aussi une proportion importante de protéines insérées dans la bicouche de phospholipides et qui contribuent à sa stabilité. Les protéines transmembranaires ont également des fonctions clés, pouvant catalyser des réactions, ou permettre des transports actifs ou passifs de molécules à travers la membrane, ou permettant des interactions, des transmissions de signaux cellulaires... Un schéma bilan très simplifié des différents aspects des membranes biologiques évoqués dans cette partie et utiles pour la compréhension de ma thèse est présenté en **Figure II-10**.

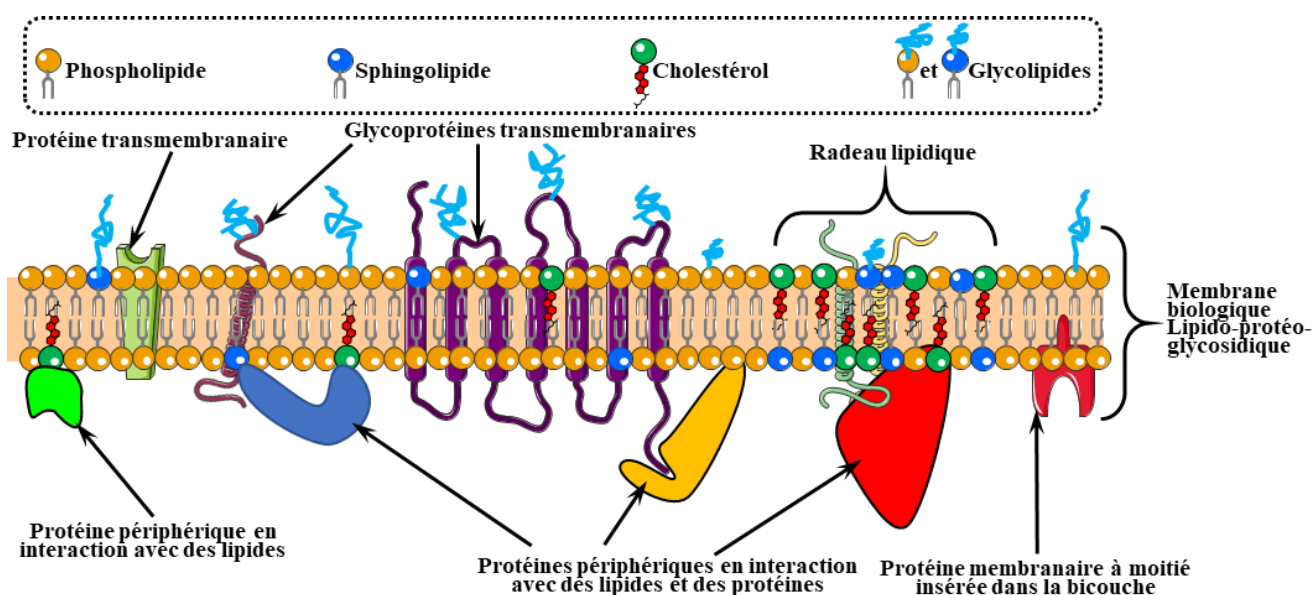


Figure II-10. Schéma bilan très simplifié des différents aspects membranaires évoqués et utiles pour la compréhension de la thèse.

La NADPH oxydase du phagocyte, NOX2, inclut une glycoprotéine transmembranaire qui permet de catalyser la formation de ROS par réduction monoélectronique du dioxygène travers un processus de transport d'électrons transmembranaire. De plus, NOX2 est activée et régulée par des protéines solubles en milieu aqueux, dites cytosoliques, qui interagissent avec la surface de la membrane, via des interactions protéine-protéine et, ou, protéine-lipides.

L'activité de la NADPH oxydase du phagocyte étant très liée à la matrice lipidique membranaire de l'enzyme, il est indispensable de bien comprendre les membranes biologiques pour aborder ma thèse. Je vais maintenant décrire la NADPH oxydase du phagocyte, avant de présenter les résultats expérimentaux.

2. La NADPH oxydase NOX2 du neutrophile à l’échelle moléculaire

Comme expliqué précédemment, NOX2 est une enzyme membranaire catalysant la production d’espèces réactives de l’oxygène. Elle implique en fait deux protéines transmembranaires : une protéine transmembranaire appelée anciennement gp91^{phox} ou nouvellement Nox2 et une protéine transmembranaire appelée p22^{phox}. Les deux protéines p22^{phox} et Nox2 hétérooligomérisées forment ce qui est appelé le flavocytochrome *b*₅₅₈ (Cytb₅₅₈).

La réalisation des fonctions biologiques de NOX2 nécessite son activation à un endroit précis dans la cellule (membrane plasmique et, ou membrane du phagosome principalement) et à un moment précis (*e.g.* pendant la phagocytose ou en lien avec un processus de signalisation cellulaire temporisé). Cette régulation spatiotemporelle précise est permise par le recrutement, au niveau du Cytb₅₅₈, de protéines solubles dans le cytosol (protéines cytosoliques), formant consécutivement un assemblage macromoléculaire qualifié de « complexe NADPH oxydase actif ». Ainsi, comme la catalyse enzymatique requiert la formation du complexe NADPH oxydase, ce complexe est en fait l’enzyme elle-même et je l’appelle NOX2. La nouvelle appellation du centre catalytique de NOX2 étant confusionnelle, j’insiste sur le fait que, dans ma thèse, ce centre catalytique est noté Nox2 (anciennement gp91^{phox}) alors que l’enzyme entière (le complexe fonctionnel) est notée NOX2. Pour qualifier la NADPH oxydase du phagocyte de façon générale, outre l’aspect moléculaire, j’utilise aussi la notation NOX2, (ou encore NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 ou DUOX2 le cas échéant).

Parmi les protéines cytosoliques formant le complexe dynamique NADPH oxydase actif, sont présentes trois protéines spécifiques à NOX2 appelées protéines *phox*, pour « phagocyte oxidase », incluant une protéine appelée p67^{phox}, seule protéine *phox* absolument indispensable au fonctionnement de l’enzyme *in vitro* donc qualifiée de ‘protéine activatrice’ ainsi que deux protéines dites ‘protéines régulatrices’, appelées p47^{phox} et p40^{phox} permettant de moduler l’activité de l’enzyme et qui ne sont pas forcément assemblées en permanence au reste du complexe NADPH oxydase, (146, 147). Il faut noter que *in vivo* la protéine p47^{phox} est aussi indispensable. En outre, la petite protéine G Rac1 (ou Rac2) est aussi indispensable pour que le complexe soit fonctionnel (148, 149).

Cette partie a pour objectifs *i*) de détailler chaque constituant du complexe NADPH oxydase du phagocyte (NOX2) incluant donc le flavocytochrome *b*₅₅₈ (Cytb₅₅₈) constitué des protéines transmembranaires Nox2 et p22^{phox}, ainsi que les protéines cytosoliques p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} et Rac1/2. *ii*) de présenter quelques aspects de la régulation de NOX2 dans le neutrophile en lien avec les protéines cytosoliques et utiles pour la suite de la thèse.

2.1. LE FLAVOCYTOCHROME (CYTB₅₅₈) EST UN HÉTÉRODIMÈRE TRANSMEMBRANAIRE

Le Cytb₅₅₈ contient les protéines transmembranaires Nox2 et p22^{phox} (2, 150), respectivement appelées sous-unité α et sous unité β de la NADPH oxydase du phagocyte. La protéine Nox2, anciennement gp91^{phox}, (570 acides aminés (aa), UniProtKB – P04839 (CY24B_HUMAN), gène *CYBB*), contient les sites de fixation, (zones de la protéine où sont fixés les substrats à l’échelle moléculaire), et les sites catalytiques, ou sites actifs, (lieux précis de transformation des substrats au sein du site de fixation de la protéine), des substrats de l’enzyme, ainsi qu’une chaîne de transport d’électrons transmembranaire, elle est donc la seule protéine du complexe à avoir une activité catalytique au sens

strict et est appelée **centre catalytique**. La protéine p22^{phox}, (195 aa, UniProtKB – P13498 (CY24A_HUMAN), gène *CYBA*), a un rôle régulateur de l’enzyme et permet aussi la maturation de Nox2 à la suite de sa synthèse. Elle possède trois hélices alpha transmembranaires d’après une étude *in silico* compilée avec les données empiriques contemporaines à 2012 (151) et son extrémité C-terminale est côté cytosolique (**Figure II-11** (151–157)).

La protéine transmembranaire Nox2, est *notamment* constituée par six hélices α transmembranaires numérotées de 1 à 6 de l’extrémité N-terminale vers l’extrémité C-terminale (**Figure II-11**). Ses extrémités N et C-terminales sont toujours localisées dans le cytosol et les hélices α transmembranaires sont reliées deux à deux par des boucles soit intracytosoliques, soit extracellulaires (ou intraphagosomales). Il existe trois boucles extracellulaires (ou intraphagosomales) qui sont ici notées 1-2, 3-4 et 5-6 et qui peuvent être très glycosylées de façon variable, (sites de glycosylation : Asn132, Asn149 et Asn240 (152, 158–160)). Nox2 comporte également deux boucles intracytosoliques ici notées 2-3 et 4-5 (161). L’extrémité N-terminale cytosolique (8 aa) va du premier au huitième aa alors que l’extrémité C-terminale cytosolique est beaucoup plus longue (287 aa) et est comprise entre les aa 283 et 570. La structure de l’homologue Nox5 de Nox2 exprimée dans *Cylindrospermum stagnale* a récemment permis d’obtenir et de confirmer beaucoup d’informations structurales sur la famille des NOX, comme le nombre d’hélices transmembranaires et leurs orientations relatives, la position des hèmes et leurs sphères de coordination et notamment les histidines impliquées, le site de fixation du FAD, le site de fixation du NADPH, la position probable de fixation du dioxygène (162, 163).

Dans les membranes biologiques, le *Cytb*₅₅₈ a tendance à se regrouper dans des microdomaines membranaires, qui sont des zones restreintes de la membrane de composition très particulière, en l’occurrence des radeaux lipidiques (164–171) dont quelques caractéristiques ont été décrites dans la partie sur les membranes biologiques. Il est bien connu que les phospholipides de la membrane jouent un rôle crucial dans la stabilité des protéines membranaires (172). Dans le cas du *Cytb*₅₅₈, il a été montré, que l’environnement lipidique structuré en bicouches phospholipidiques est indispensable au fonctionnement de l’enzyme et que sa composition influe fortement sur l’activité de l’enzyme ou encore sur la structure secondaire de cet hétéro-oligomère, notamment lors de l’ajout de molécules comme des amphiphiles anioniques comme le dodécyl-sulfate de sodium (SDS), ou encore certains stéréoisomères d’acides gras comme l’acide arachidonique (173–179).

En plus de l’importance des phospholipides de la membrane sur la structure et la fonction du *Cytb*₅₅₈, la détermination par diffraction des rayons X de la première structure d’un centre catalytique de la famille des Nox, la protéine Nox5 homologue de Nox2, a récemment montré que des lipides de type acides gras pouvaient exister au cœur de la protéine en interaction avec les hélices alpha transmembranaires (162). Ainsi, des lipides insérés dans la protéine Nox2 et ne faisant pas partie des phospholipides membranaires pourraient aussi avoir un rôle dans la structure de la protéine et dans l’activité de l’enzyme.

Nox2 (**Figure II-11**) contient une chaîne de transport d’électrons transmembranaire incluant, d’une face à l’autre de la membrane, (de la face cytosolique à la face externe, ou du phagosome), trois cofacteurs.

Côté cytosolique, est présente une flavine adénine dinucléotide (FAD), un cosubstrat labile fixé par liaisons faibles à la partie C-terminale cytosolique de la protéine. Dans la partie transmembranaire, deux hèmes, (groupements prosthétiques), sont fixés aux hélices 3 et 5 par des liaisons de coordination (datives), perpendiculairement à la surface de la membrane, les plans des deux hèmes étant également quasiment perpendiculaires. L’hème plus proche de la face cytosolique est appelé ‘hème interne’ ou encore ‘hème1’ et l’hème plus proche de l’autre face est appelé ‘hème externe’ ou ‘hème2’. Le fer de l’hème1 lie l’histidine 101 de l’hélice 3 et l’histidine 209 de l’hélice 3 alors que le fer de l’Hème2 lie l’histidine 115 de l’hélice 3 et l’histidine 222 de l’hélice 5 (162, 180). Afin de passer d’un cofacteur à un autre, les électrons peuvent être transportés par effet tunnel entre deux cofacteurs, mais ce processus étant généralement très rapide en comparaison de la vitesse de transformation d’une espèce chimique et les études réalisés ici étant essentiellement cinétiques, je ne décrirai pas ce processus.

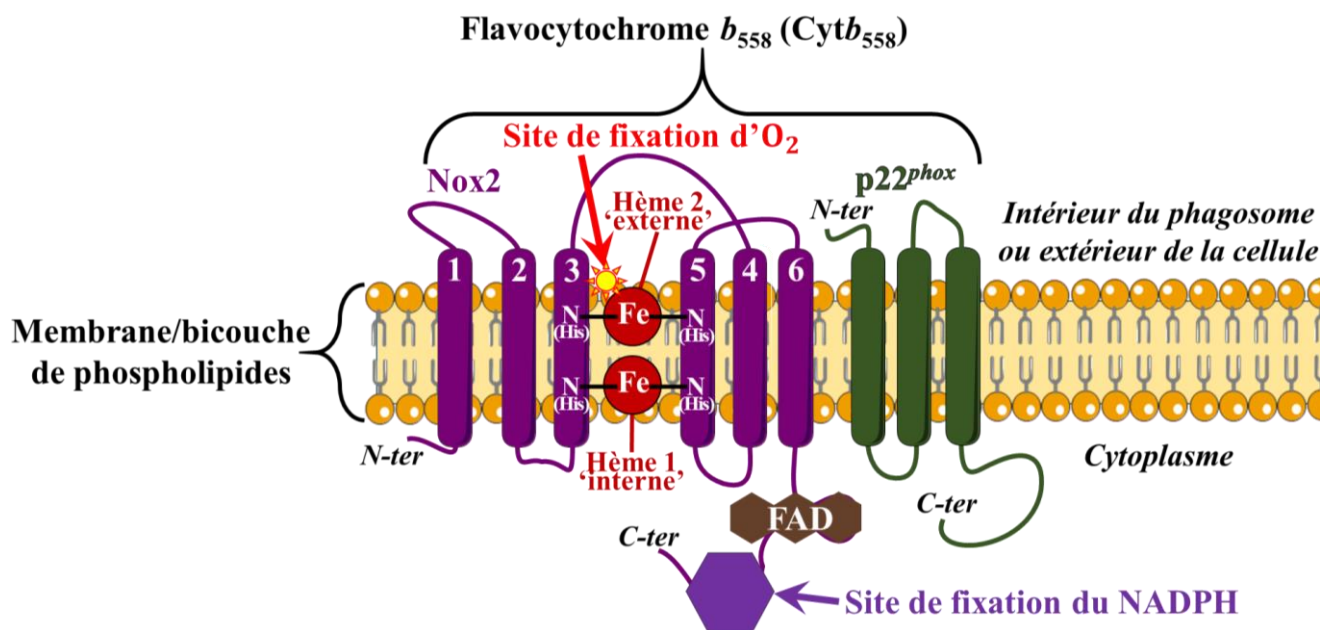


Figure II-11. Les composants du flavocytochrome b_{558} (Cyt b_{558}) et la chaîne de transport d'électrons transmembranaire de Nox2.

Une molécule de NADPH, le substrat réducteur de l'enzyme, peut être fixée à l'extrémité cytosolique C-terminale de la protéine, plus proche du C-terminal de la protéine que le FAD (PDB : 3A1F et (162)). De l'autre côté de la membrane elle peut fixer une molécule de dioxygène, (162, 163), le substrat oxydant de l'enzyme, à proximité de l'hème2 (Figure II-11). Un transfert d'électrons peut alors avoir lieu : du NADPH réducteur (donneur) au dioxygène oxydant (accepteur).

Ainsi, l'appellation « NADPH oxydase » historique représente seulement la moitié de la fonction catalytique de l'enzyme et est vecteur de confusion dans la mesure où d'autres enzymes catalysent l'oxydation du NADPH. La NADPH du phagocyte étant la seule enzyme connue à ce jour ayant pour fonction chimique première de catalyser la production des anions superoxyde, le nom de « NADPH oxydase-oxygène monoréductase », ou plus simplement « oxygène monoréductase » serait plus approprié.

Afin que ce transfert se passe, il est indispensable d'avoir un gradient de potentiel d'oxydoréduction. Les potentiels redox standards des couples impliqués ont été mesurés en conditions physiologiques, sur NOX2 et sont donnés dans le Tableau II-5 (181).

Couple oxydant/réducteur	Potentiels standards en conditions physiologiques (E^0 en V)	Références
NADP ⁺ /NADPH	-0,323	(182–184)
FAD/FAD [•]	-0,256	(185)
FAD [•] /FADH ⁻	-0,304	(185)
FAD/FADH ⁻	-0,280	(185)
Heme1(Fe ³⁺)/Heme1(Fe ²⁺)	-0,225	(186, 187)
Heme2(Fe ³⁺)/Heme2(Fe ²⁺)	-0,265	(186, 187)
O _{2(aq)} /O ₂ ⁻	-0,16	(188, 189)

Tableau II-5. Potentiels standards en conditions physiologiques des constituants redox de Nox2 et des substrats.

Ainsi, $E^0(\text{NADP}^+/\text{NADPH}) < E^0(\text{FAD}/\text{FADH}_2) < E^0(\text{Heme1}(\text{Fe}^{3+})/\text{Heme1}(\text{Fe}^{2+})) < E^0(\text{Heme2}(\text{Fe}^{3+})/\text{Heme2}(\text{Fe}^{2+})) < E^0(\text{O}_{2(aq)}/\text{O}_2^-)$, ce qui implique que les électrons vont bien, dans les conditions standards, de l'espèce la plus réductrice, (potentiel du couple redox impliqué le plus bas), à l'espèce la plus oxydante, (potentiel du couple redox impliqué le plus haut).

Dans la suite de cette partie sur le Cytb₅₅₈, je décrirai successivement, dans l'ordre de déplacement des électrons, les caractéristiques prépondérantes connues à ce jour des différents composants de la chaîne transmembranaire de transport d'électrons ainsi que des deux substrats de l'enzyme.

2.1.1. LE COSUBSTRAT NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE PHOSPHATE (NADPH) DE NOX2

Le Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, (NADPH), dont la structure est présentée en **Figure II-12**, est le premier cosubstrat réducteur de l'enzyme, et sa présence est donc obligatoire au fonctionnement de NOX2. Il se fixe dans une poche de spécificité, (dont la superstructure secondaire est classique, de type Rossmann), de l'extrémité cytosolique C-terminale (PDB : 3A1F et (162, 163)).

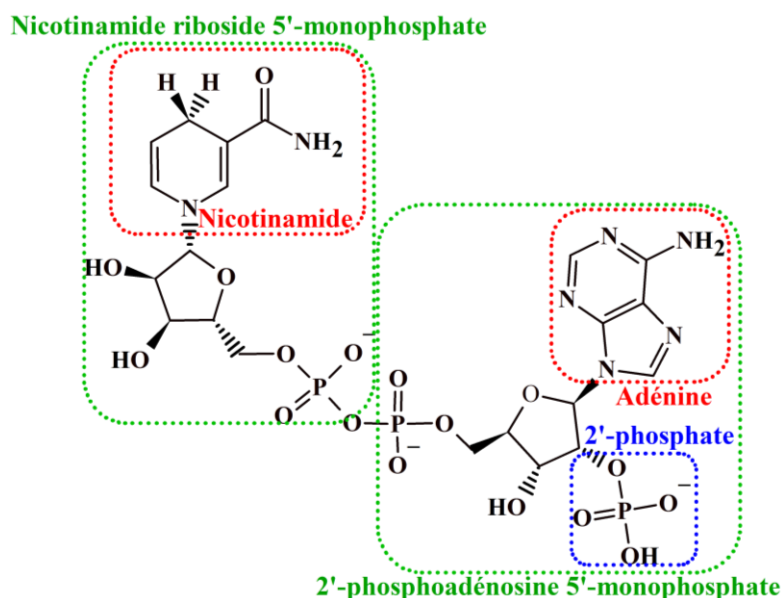


Figure II-12. Structure chimique du NADPH à pH 7,4.

Les deux nucléotides du NADPH sont entourés en vert. Le phosphate spécifique du NADPH est entouré en bleu. L'adénine et le Nicotinamide, entourés en rouge, sont les parties de la molécule qui absorbent la lumière dans le domaine des ultraviolets 190-400 nm.

En cellule, le NADP⁺ est produit via la phosphorylation du NAD⁺ par la NAD kinase (190, 191), puis le NADP⁺ est réduit en NADPH majoritairement par la voie des pentoses phosphates cytosolique (192–194). Les besoins en NADPH pouvant varier en fonction du compartiment, il existe d'autres voies de réduction importantes du NADP⁺ en

NADPH comme le métabolisme d’inter-conversion réciproque de la sérine en glycine qui se passe en partie dans la mitochondrie et en partie dans le cytosol (193, 195, 196).

Le K_m du NADPH pour NOX2 a été mesuré en système acellulaire entre 10 μM et 60 μM selon les mesures (162, 173, 174, 197–203) ce qui peut paraître beaucoup pour une enzyme si cruciale, mais la concentration locale dans une cellule est à considérer différemment de la concentration dans un réacteur biochimique, d’autant que la concentration en NADPH peut varier rapidement, voire même de façon localisée, dans une cellule notamment grâce à la NAD kinase (191). De plus, les organismes sont adaptés à survivre avec cette caractéristique, ce qui peut signifier qu’elle participe au contrôle de l’activité qui est elle aussi adaptée au contexte biologique.

Le noyau nicotinamide du NADPH peut être oxydé biélectroniquement selon l’équation présentée en **Figure II-13**.

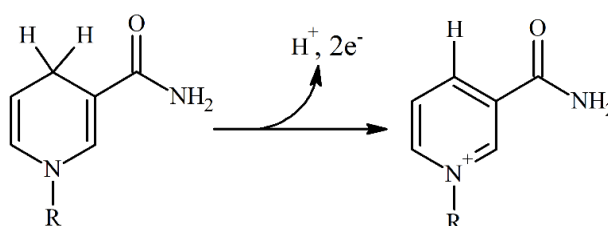


Figure II-13. Noyau nicotinamide réduit à gauche et oxydé à droite.

La lettre R correspond au reste de la molécule de NADPH.

Même si ce mécanisme est réputé exceptionnel, certaines enzymes, comme la catalase, peuvent aussi catalyser l’oxydation monoélectronique du NADPH avec libération d’anions superoxyde (204–208). Le couple redox $\text{NADP}^{\bullet}/\text{NADPH}$ possède un potentiel redox standard $E^0(\text{NADP}^{\bullet}/\text{NADPH})=+0,3\text{ V}$ et le couple redox $\text{NADP}^+/\text{NADP}^{\bullet}$ possède un potentiel redox standard $E^0(\text{NADP}^+/\text{NADP}^{\bullet})=-0,9\text{ V}$ (209, 210) mais l’espèce NADP^{\bullet} est très instable et dimérise rapidement en une espèce (notée NN_{red}) impliquée dans un couple redox $\text{NN}_{\text{ox}}/\text{NN}_{\text{red}}$ de potentiel redox standard $E^0(\text{NN}_{\text{ox}}/\text{NN}_{\text{red}})=-0,4\text{ V}$ (211–214).

Dans le cas de la NADPH oxydase, les espèces pouvant *potentiellement* réduire le FAD sont donc le NADPH, le NADP^{\bullet} et le NN_{red} . Il est admis que le NADPH réalise un transfert biélectronique et est donc directement converti en NADP^+ , ce qui est défendable considérant la rareté de l’oxydation monoélectronique du NADPH d’une part, mais aussi la géométrie de la poche de spécificité qui ne pourrait pas accueillir facilement le dimère (PDB : 3A1F et (162, 163)). Je considérerai donc que l’oxydation du NADPH par NOX2 est biélectronique.

2.1.2. LE COFACTEUR FLAVINE ADENINE DINUCLEOTIDE (FAD) DE NOX2

La Flavine Adénine Dinucléotide, (FAD), dont la structure est présentée en **Figure II-14**, est un cosubstrat de l’enzyme, il est fixé avec des liaisons faibles à la protéine (non covalentes), mais avec une faible constante de pseudo-affinité apparente ($K_m^{\text{app}}(\text{FAD})$), ce qui est probablement dû à la structure de la protéine et donc à la poche de spécificité du FAD (dont la superstructure secondaire est classique, de type Tonneau β ; (162, 163)), qui la maintient en place. La constante de pseudo-affinité apparente varie selon les auteurs et les protéines cytosoliques utilisées entre 13 nM et 89 nM, (215, 216), ce qui reste faible, donc traduit une forte pseudo-affinité apparente. Par conséquent,

même si le FAD peut être déplacé et si Nox2 peut perdre son FAD (par exemple classiquement par dilution, son affinité est telle qu'il peut être considéré comme un cofacteur enzymatique à part entière, notamment dans les conditions utilisées dans ma thèse. En cellule, le FAD est synthétisé à partir de la riboflavine, (vitamine B2, apportée uniquement par l'alimentation), et la dernière étape de sa synthèse implique la FAD synthase présente dans le cytosol, dans la mitochondrie et dans le noyau (217).

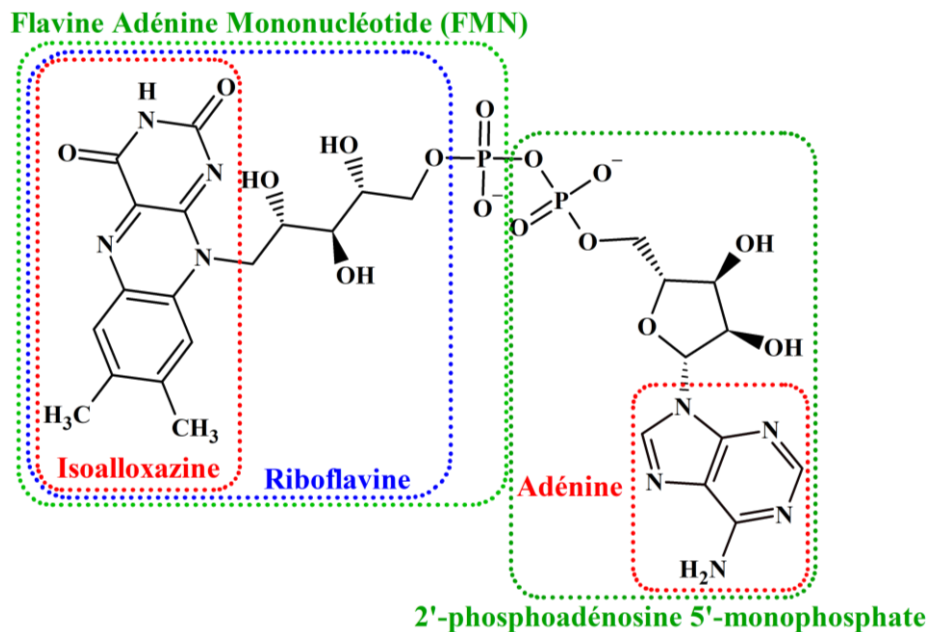


Figure II-14. Structure chimique du FAD à pH 7,4.

Les deux nucléotides du FAD sont entourés en vert. L'isoalloxazine et l'adénine spécifiques respectivement à chacun des nucléotides sont entourés en rouge. La riboflavine, ou vitamine B2, précurseur du FMN et du FAD, est encadré en bleu.

Le FAD peut être réduit par un ou par deux électrons et il est classique qu'il libère les électrons successivement, l'un après l'autre. La **Figure II-15** présente les trois formes redox majoritaires du FAD à pH 7.4. Dans une protéine, l'environnement chimique du FAD imposé par la protéine peut déplacer les équilibres acidobasiques imposant une protonation ou une déprotonation supplémentaire du FAD dont je ne discute pas ici.

Le FAD fait partie de la chaîne de transport d'électrons transmembranaire de Nox2 et il a été suggéré plusieurs fois qu'il pouvait arriver qu'une certaine proportion d'électrons sortent de la chaîne avant d'arriver de l'autre côté de la membrane. En fait, les électrons sortiraient de la chaîne transmembranaire au niveau du FAD, ou entre le FAD et l'hème1. Ce phénomène est appelé « activité diaphorase ». La mesure de l'activité diaphora implique l'utilisation d'un accepteur d'électrons comme le *p*-iodonitrotetrazolium violet (INT) ou le dichlorophénol indophénol et dépend de la présence d'un réducteur comme le NADPH (146, 218–225).

Cependant, une équipe qui s'est elle-même servie de l'INT dans des publications précédentes a montré de façon très rigoureuse que cette sonde n'était pas pertinente (226) pour la mesure de l'activité diaphorase, excepté, peut-être, dans des conditions très particulières qui sont difficilement utilisables pour des mesures sur NOX2 avec des protéines sauvages. Ces auteurs ont bien montré que si l'INT peut en effet être réduit par le FAD sous forme réduite, ou en présence d'un réducteur adapté, la forme réduite de l'INT est aussi capable de réduire les hèmes oxydés du Cyt_b₅₅₈ et les hèmes réduits sont capables de réduire la forme oxydée de l'INT. De plus, l'INT est réduit par l'anion superoxyde et rentre en compétition avec l'O₂ pour capter l'électron. Donc l'INT, censé mesurer l'activité diaphorase,

réalise beaucoup d'autres réactions parasites et lorsque l'ensemble des réactions secondaires ne sont pas prises en compte, les résultats obtenus avec cette sonde ne sont donc pas interprétables de façon rigoureuse.

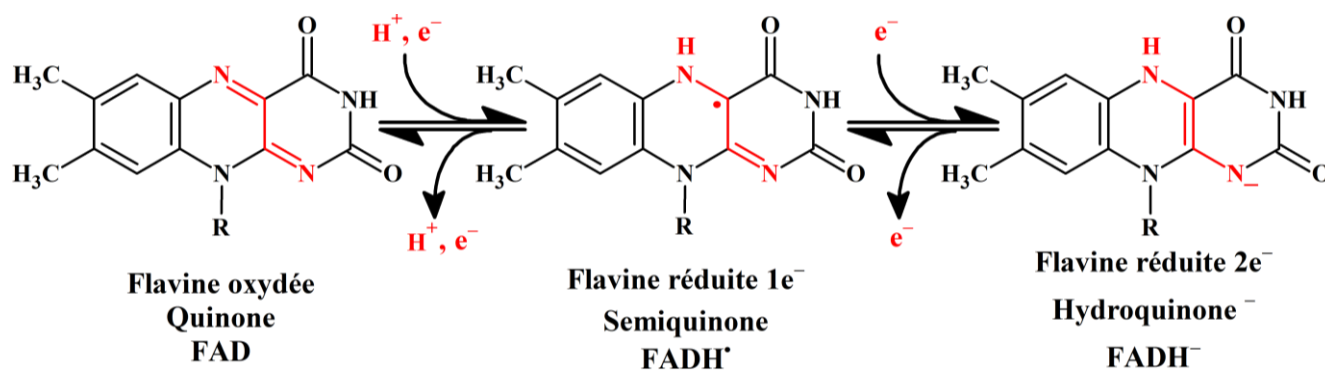


Figure II-15. Les trois formes redox du noyau isoalloxazine à pH 7,4.

La lettre R correspond au reste de la molécule de FAD. En rouge sont mises en valeur les liaisons et atomes subissant des changements.
 $pK_a(\text{FADH}_2/\text{FADH}^-) = 6,7$

D'autre part, ajouter une sonde qui interagit directement avec un composant de l'enzyme suggère la modification de la structure locale de la protéine, ce qui influe nécessairement sur le transfert d'électrons. Ainsi, l'activité diaphorase mesurée pourrait être simplement un artefact dû à l'interaction de l'INT avec Nox2 et au déplacement de l'équilibre en faveur de cette activité qui n'aurait pas, ou seulement peu, lieu en absence d'INT. Par conséquent, essayer de différencier l'activité diaphorase d'une activité NADPH oxydase couplée à une activité oxygène-réductase est très compliqué avec une sonde moléculaire en utilisant des protéines sauvages. De plus, si Nox2 réalise réellement une activité diaphorase, l'accepteur, en absence d'INT, serait très probablement le dioxygène et en système acellulaire nous ne verrions a priori pas de différence entre l'activité diaphorase et l'activité oxygène-réductase, à moins que les cinétiques soient très différentes. Des utilisateurs de l'INT m'ont rétorqué que l'activité diaphorase pouvait être mesurée en absence de dioxygène et en présence d'INT. Or, retirer le substrat de l'enzyme et le remplacer par un autre substrat, l'INT, pour mesurer l'activité diaphorase, donne en fait un résultat purement artefactuel d'un point de vue chimique, (la réaction catalysée est simplement différente). Dans la suite, je prendrai donc en compte qu'il pourrait hypothétiquement exister une activité diaphorase, mais jusqu'à preuve du contraire, je considère que l'activité diaphorase mesurée avec l'INT jusqu'alors, est un artefact.

2.1.3. LES DEUX HEMES, GROUPEMENTS PROSTHETIQUES DU CYTB₅₅₈

Les notions fondamentales de chimie inorganique nécessaires pour la compréhension de cette partie sont reportées en ANNEXE 1 et des informations complémentaires pourront être trouvées en ANNEXE 2.

Les hèmes présents dans le Cytb₅₅₈ sont des hèmes *b*, constitués d'une protoporphyrine de type IX, présentant quatre ligands équatoriaux chélatant un cation du fer *via*, dans le cas du Fe²⁺, deux liaisons datives (de coordination), et deux liaisons covalentes. Dans le cas du Cytb₅₅₈, le Fe²⁺ est aussi chélaté par deux ligands histidine axiaux (Figure II-16).

Il est montré depuis longtemps par résonance Raman et par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE), ou plus récemment par diffraction des rayons X après cristallisation, que le fer des hèmes du Cytb₅₅₈ oxydé est

hexacoordiné (il possède six ligands), avec un champ de ligands à géométrie octaédrique, notée **Oh** et dans un état bas-spin, qui suggère que les deux ligands axiaux sont peu déplaçables (162, 227–229).

Cependant, l'ajout de certaines molécules comme le tout-*cis*-acide arachidonique (AA) induirait l'apparition réversible d'un équilibre entre l'existence de fer bas-spin et haut-spin, permettant notamment une transition entre un fer Oh hexacoordiné (favorisé en bas-spin), et un fer pentacoordiné (favorisé en haut spin), mais l'implication de ces modifications sur l'activité de l'enzyme n'est pas encore pleinement comprise (230, 231). Notamment, les ligands histidine axiaux sont difficiles à déplacer et même le CO, le CN⁻ ou encore le N₃⁻ ne peuvent pas former de liaison avec le fer en déplaçant les histidines. Il est donc peu probable que le dioxygène s'y fixe (228, 229, 232–234).

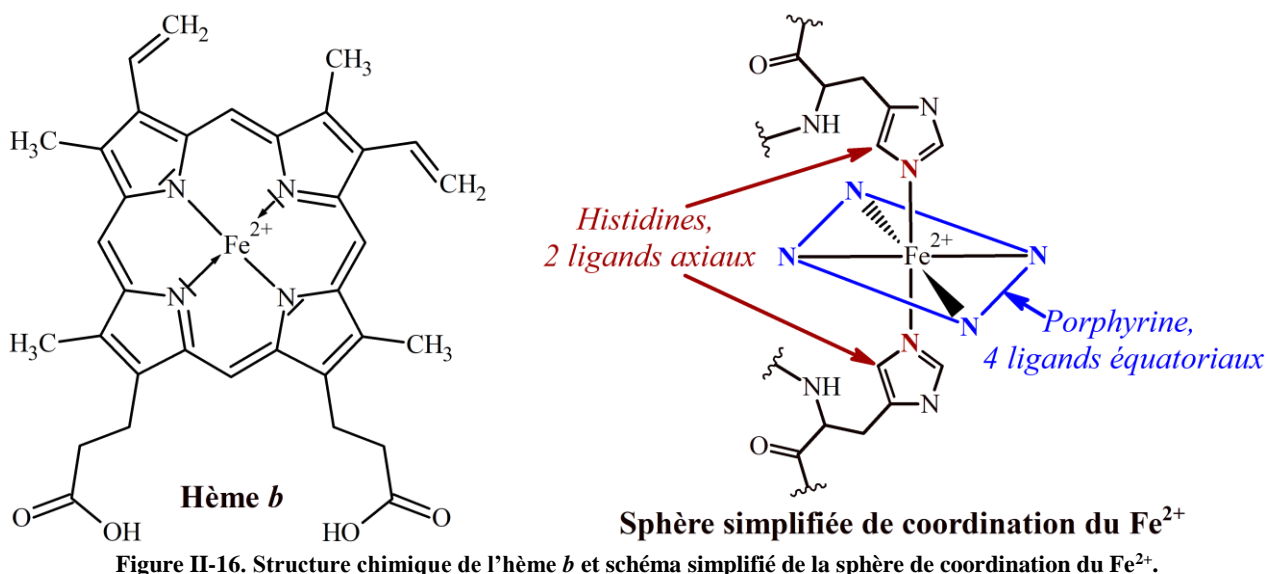


Figure II-16. Structure chimique de l'hème b et schéma simplifié de la sphère de coordination du Fe²⁺.

2.1.4. LE DIOXYGÈNE SUBSTRAT DE NOX2 EST REDUIT EN ANION SUPEROXYDE

Le dioxygène est une molécule qui a la particularité d'être un biradical stable dans son état triplet, ce qui correspond à son état majoritaire dans l'atmosphère. Lorsque le dioxygène gagne un électron, il est transformé en anion superoxyde (**Figure II-17**), qui est instable et réagit rapidement. L'anion superoxyde est le précurseur de toutes les autres espèces réactives de l'oxygène utiles pour contribuer à la destruction de l'objet étranger dans le cas de la phagocytose.

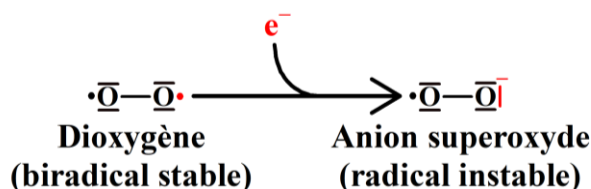


Figure II-17. Conventions de Lewis modifiées pour représenter la nature biradicalaire du dioxygène et sa réduction monoélectronique.

Alors que la question du site de fixation du dioxygène sur Nox2 était complète, l'obtention de la structure de Nox5 a permis de suggérer une position plutôt précise pour la fixation du dioxygène. Ainsi, si je suppose que cette position est la même dans Nox2, cela signifie que l'O₂ capte les électrons via un réseau de liaisons hydrogène impliquant les propionates de l'hème2 ainsi que des molécules d'eau (162, 163).

2.2. LES PROTEINES CYTOSOLIQUES MAJORITAIRES IMPLIQUEES DANS LA FONCTION DE NOX2

L’activation et la régulation de NOX2 nécessitent beaucoup d’interactions protéine-protéine(s) et protéine-lipide(s) et le schéma des interactions est compliqué. Or, la compréhension des aspects fonctionnels de la régulation de NOX2 est à mon avis beaucoup facilitée par une vue d’ensemble préalable des fondamentaux biochimiques des différents domaines des protéines cytosoliques impliquées dans la régulation de la NADPH oxydase du phagocyte. Ainsi, cette partie a pour objectif de décrire les différents sites d’interactions et quelques données biochimiques de chacune des protéines cytosoliques.

2.2.1. LA PROTEINE CYTOSOLIQUE SPECIALISEE P67^{PHOX}

La protéine p67^{phox} est cytosolique et possède 526 acides aminés (aa, UniProtKB – P19878 (NCF2_HUMAN), gène *NCF2*). Elle est aussi appelée Neutrophil Cytosolic Factor 2 ou NCF2 (**Figure II-18**).

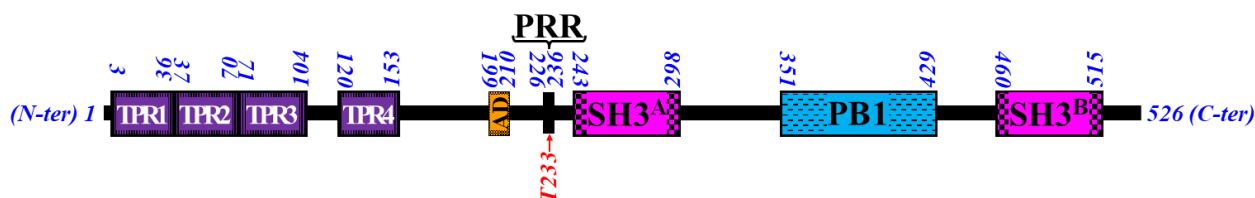


Figure II-18. Parties de p67^{phox} importantes ou potentiellement importantes dans l’assemblage et, ou, l’activation de NOX2.

AD=Activator Domain. SH3=Sarcoma Homolog 3 domain. PB1=Phagocyte oxidase and Bud Emergence Protein 1. TPR=Tetratricopeptide Repeat. PRR=Proline Rich Region. En rouge est fléché le site de phosphorylation potentiel.

La protéine p67^{phox} porte quatre répétitions tétratricopeptides (TPR) en N-terminal, deux domaines Sarcome-homologue 3 (SH3), respectivement notés SH3^A et SH3^B ainsi qu’un domaine Phagocyte Oxidase and Bud Emergence Protein 1, noté PB1 et une région riche en proline (PRR). Ces segments protéiques particuliers sont en fait des sites d’interactions avec les autres protéines du complexe. La thréonine 223 de p67^{phox} est phosphorylable et pourrait jouer un rôle dans l’assemblage et, ou, dans l’activation de NOX2. Le domaine d’activation (AD) de p67^{phox} est indispensable pour que NOX2 soit active.

2.2.2. LA PROTEINE CYTOSOLIQUE SPECIALISEE P47^{PHOX}

La protéine p47^{phox} est cytosolique et possède 390 aa (UniProtKB – P14598 (NCF1_HUMAN), gène *NCF1*). Elle est aussi appelée NCF1 (**Figure II-19**).

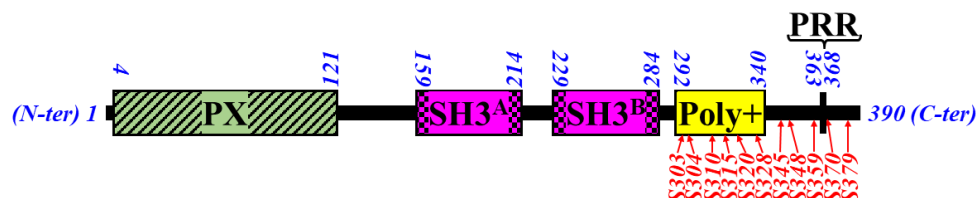


Figure II-19. Parties de p47^{phox} importantes ou potentiellement importantes dans l’assemblage et, ou, l’activation de NOX2.

PX=Phagocyte Oxidase Domain. SH3=Sarcoma Homolog 3 domain. PRR=Proline Rich Region. Poly+=polybasic region. En rouge sont fléchés les sites de phosphorylation potentiels.

La protéine p47^{phox} porte un domaine Phagocyte Oxidase (PX), deux domaines SH3 respectivement notés SH3^A et SH3^B ainsi qu’une région polybasique et une région PRR. Ces segments protéiques particuliers sont en fait des sites d’interactions avec les autres protéines du complexe et, ou, avec des lipides de la membrane. Lorsque p47^{phox}

n'est pas impliquée dans la fonction de la NADPH oxydase, c'est-à-dire lorsque la NADPH oxydase n'est pas fonctionnelle, la région polybasique interagit avec les deux domaines SH3 et éventuellement avec le domaine PX et ainsi inhibe l'interaction de p47^{phox} avec la partie membranaire de NOX2 et avec les lipides membranaires (235, 236). Dans ce cas, la région polybasique est aussi appelée région d'autoinhibition (AIR).

De nombreuses phosphorylations sont possibles entre la sérine 303 et la sérine 379 et contribuent de façon très importante à l'activation de p47^{phox} en modifiant sa structure et donc contribuent à l'assemblage du complexe fonctionnel NADPH oxydase. En particulier, la phosphorylation de la sérine 379 est la seule à être nécessaire, mais non suffisante, à l'activation de NOX2 (237, 238).

2.2.3. LA PROTEINE CYTOSOLIQUE SPECIALISEE P40^{PHOX}

La protéine p40^{phox} est cytosolique et possède 339 aa (UniProtKB – Q15080 (NCF4_HUMAN), gène *NCF4*). Elle est aussi appelée NCF4 (**Figure II-20**).

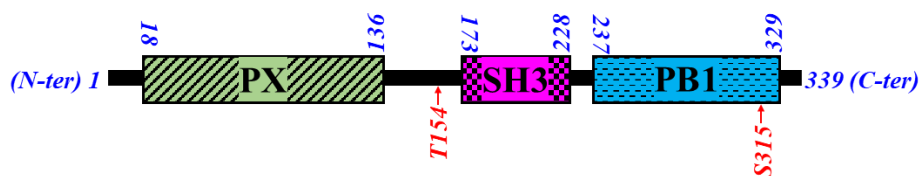


Figure II-20. Parties de p40^{phox} importantes ou potentiellement importantes dans l'assemblage et, ou, l'activation de NOX2.

PX=Phagocyte Oxidase Domain. SH3=Sarcoma Homolog 3 domain. PB1=Phagocyte oxidase and Bud Emergence Protein 1. En rouge sont fléchés les sites de phosphorylation potentiels.

La protéine p40^{phox} porte un domaine PX, un domaine SH3 et un domaine PB1 contribuant aux interactions avec les autres protéines du complexe et, ou, avec des lipides membranaires. En outre, lorsque p40^{phox} n'est pas impliquée dans l'activation de la NADPH oxydase, le domaine PB1 interagit avec le domaine PX ce qui autoinhibe la protéine. L'activation de p40^{phox} peut aussi impliquer la phosphorylation de la thréonine 154 et, ou, de la sérine 315.

2.2.4. LA PETITE PROTEINE CYTOSOLIQUE G RAC1/2, COMPOSANT NON SPECIALISE INDISPENSABLE

Les protéines Rac1 (UniProtKB – P63000 (RAC1_HUMAN)) et Rac2 (gène RAC1 UniProtKB – P15153 (RAC2_HUMAN), gène RAC2) possèdent entre 190 et 192 acides aminés dans leur forme non mature, puis les acides aminés au-delà de 189 sont retirés et une prénylation (groupe géranylgeranyl, utile pour l'ancrage membranaire) est ajoutée sur la cystéine C-terminale. Les acides aminés 10 à 17 et 57 à 61 et 115 à 118 forment un site de fixation de la Guanosine di- ou triphosphate, (respectivement GDP ou GTP). Une région SWITCH1 située en N-terminal entre les acides aminés 29 et 40 permet l'interaction de Rac avec p67^{phox}. Lorsque la NADPH oxydase est inactive, la protéine Rac est liée à la protéine Rho-GTP dissociation inhibitor (Rho-GDI), qui maintient le nucléotide sous forme GDP et donc empêche le changement conformationnel permettant l'activation de Rac. Lors de l'activation de la NADPH oxydase, Rho-GDI se dissocie de Rac et la protéine Guanine Exchange Factor (GEX) échange le GDP de Rac par un GTP, ce qui permet à Rac d'adopter une conformation active permettant son recrutement pour former le complexe NADPH oxydase actif (108, 239, 240).

2.3. QUELQUES ASPECTS DE LA REGULATION DE NOX2 A L'ECHELLE DE LA CELLULE

Je décrirai dans un premier temps les interactions connues entre les différents protagonistes décrits ci-avant. Ces interactions sont de nature protéine-protéine(s) ou protéine-lipide(s). Puis, quelques voies de signalisation cellulaires permettant de réguler l'activation de NOX2 seront abordées afin de mettre en place les études réalisées dans la suite. Pour cette partie, la Figure II-22 pourra servir de support avantageux au lecteur.

2.3.1. LES INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE(S) ET PROTEINE-LIPIDE(S)

a. Interactions de p67^{phox} avec Nox2 et avec p47^{phox} et, ou p40^{phox}

Il existe une interaction directe entre la protéine p67^{phox} et la protéine Nox2 et cette interaction est plus forte lorsque le C-terminal est coupé (241, 242). En effet, p67^{phox} tronquée dont il ne reste que les aa 1-210 (p67^{phox}(1-210)) ou encore p67^{phox} dont il ne reste que les aa 1-199 (p67^{phox}(1-199)) se fixent toutes les deux plus fortement à Nox2 que la protéine entière. Cependant, alors que p67^{phox}(1-210) se fixe et permet l'activation de l'enzyme, p67^{phox}(1-199) se fixe mais ne permet pas l'activation de l'enzyme. Par conséquent, il existe un domaine d'activation sur p67^{phox} compris au moins entre les aa 199 et 210. Ce domaine d'activation pourrait soit contribuer à l'adoption par p67^{phox} d'une conformation favorable à l'activation de l'enzyme, soit se fixer à Nox2 et ainsi favoriser directement un changement conformationnel permettant l'activation de l'enzyme. Chez *Homo sapiens*, l'existence de ce domaine d'activation a été confirmée et la séquence correspondante est estimée entre l'aa 190 et l'aa 210 (241, 243–246). En outre, il a été suggéré que la phosphorylation de la sérine 486 de Nox2 par une protéine kinase C (PKC) augmenterait l'activité de NOX2 et pourrait donc avoir un rôle dans l'assemblage du système (237, 247). Cela reste à clarifier, d'autant qu'une étude récente montre que l'Ataxia Telangiectasia Mutated kinase, (ATM kinase), diminue l'activité de la NADPH oxydase en influant sur la phosphorylation de la sérine 486 de Nox2 qui serait alors un switch permettant d'arrêter la catalyse (248).

Par ailleurs, p67^{phox} peut, via son domaine SH3^B, interagir avec le domaine riche en prolines, noté PRR de p47^{phox}. La PRR de p67^{phox} pourrait aussi être en interaction avec le deuxième SH3 de p47^{phox}. De plus, le domaine PB1 de p67^{phox} peut aussi interagir avec le PB1 de p40^{phox} (249–252).

b. Interactions de p47^{phox} et, ou p40^{phox} avec les lipides et avec le Cytb₅₅₈

Les protéines p47^{phox} et p40^{phox} phosphorylées permettent de renforcer l'interaction entre p67^{phox} et Nox2, ce qui n'est pas le cas lorsque p47^{phox} et p40^{phox} ne sont pas phosphorylées (241, 242). Alors qu'aucune interaction de p40^{phox} avec le Cytb₅₅₈ n'avait été observée, il a été montré que dans certaines conditions le domaine SH3, de p40^{phox} phosphorylé peut interagir avec le PRR de la partie C-terminale cytosolique de p22^{phox} et qu'il serait capable de partiellement remplacer p47^{phox} (253). En effet, p47^{phox} peut, suite à certains stimuli comme des phosphorylations ou l'exposition à une molécule activatrice, se fixer au PRR (proline 156 à proline 159) du C-terminal cytosolique de p22^{phox} via un SH3 (222, 254–261), notamment lorsque la thréonine 147 de p22^{phox} est phosphorylée (favorise l'interaction de p47^{phox} et augmente l'activité enzymatique (154)). En outre, p47^{phox}, suite à une stimulation, peut se fixer à la majorité des phosphoinositides naturels avec une affinité non négligeable via son domaine d'homologie phagocyte-oxydase, noté PX (236, 262–266).

Il est aussi connu que p40^{phox} peut se fixer aux phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P) présents dans les feuilletts cytosoliques des membranes biologiques. Plus précisément, p40^{phox} se lie aux PI(3)P via son domaine PX à la membrane plasmique ainsi qu'à la membrane des endosomes (249, 262, 263, 266–268). De plus, le domaine PX de la protéine p40^{phox} peut servir d'ancrage aux filaments d'actine du cytosquelette (269) et les domaines PX des deux protéines p40^{phox} et de p47^{phox} peuvent aussi servir de site de fixation à la moésine, une protéine impliquée dans la fixation du cytosquelette aux membranes biologiques (270). Ces interactions avec des protéines du cytosquelette pourraient contribuer à la vectorisation et donc à la translocation précise et rapide des protéines cytosoliques vers le Cytb₅₅₈ dans le cas d'une nécessité d'activation de NOX2.

Il est démontré que l'augmentation de l'interaction de p67^{phox} avec Nox2 est due à une translocation synergique de p47^{phox} avec p67^{phox} et l'interaction de p40^{phox} avec p67^{phox} suggère aussi une translocation commune. En plus des translocations synergiques, ces interactions pourraient provoquer des modifications conformationnelles réciproques facilitant la fixation de p67^{phox} au Cytb₅₅₈ (271–273).

La protéine p47^{phox} contient une région d'autoinhibition (AIR) qui implique qu'en absence de phosphorylation ou autre stimulus activateur de p47^{phox}, les sites de fixation importants pour l'activation de NOX2 sont masqués par la structure particulière de la protéine qui est repliée, un SH3 étant en interaction avec l'AIR (235, 274–276) ; p47^{phox} est alors dite inactive. Cette autoinhibition implique notamment une séquence appelée région polybasique d'environ 48 aa riche en acides aminés chargés positivement, donc acides aminés basiques (lysine et arginine), mais aussi en sérines phosphorylables, et qui peut contribuer à l'interaction de p47^{phox} avec des phospholipides (155, 237, 274–280) à tête polaire chargée négativement (essentiellement PA, PS, PG, PI). La protéine p40^{phox} présente également une forme inactive liée à une interaction entre son PB1 et son domaine PX (267, 280) qui l'empêche d'interagir avec les autres composants du système sans activation préalable.

c. Interactions de Rac1/2 avec les lipides et avec les autres protéines impliquées

La protéine Rac1, ou Rac2, contient un GDP sous forme inactive dans le cytosol et un GTP sous forme active lorsqu'elle est recrutée, par exemple, au niveau du Cytb₅₅₈. Lorsque Rac participe à la fonction de NOX2, elle est liée à p67^{phox} via une séquence SWITCH1 correspondant aux acides aminés 29 à 40 qui interagissent avec la répétition de tétratricopeptique (TPR) en N-terminal de p67^{phox} (281, 282). Cette interaction peut induire un changement de conformation de p67^{phox}, potentiellement réciproque, qui pourrait être nécessaire à l'activation de NOX2.

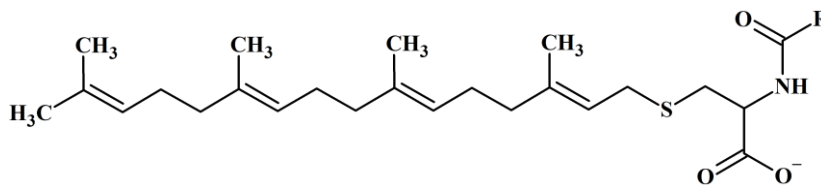


Figure II-21. Prénylation géranylgeranyl sur la dernière cystéine C-terminale de Rac.

R correspond au reste de la protéine Rac1 ou Rac2.

D'autre part, en cellule eucaryote, la dernière cystéine de Rac en C-terminal est géranylgeranylée, ce qui correspond à ce qui est appelé une prénylation. La structure chimique de la prénylation (**Figure II-21**) rend son

insertion dans la bicouche phospholipidique particulièrement facile et il a d’ailleurs été montré *in vitro* que la seule prénylation de Rac suffisait à maintenir p67^{phox} à la membrane (239, 283–286).

La protéine Rac1, possède dans sa partie C-terminale, (aa 183 à 188), une région polybasique riche en lysine et en arginine qui contribue à sa fixation membranaire sur des phospholipides anioniques (287, 288). Il a aussi été suggéré que Rac peut interagir directement avec Nox2 (237, 289–291). La protéine Rac2 possède aussi une région polybasique mais beaucoup moins riche en résidus basiques (284).

Dans certaines conditions, Rac1-GTP peut être liée à SOD1 alors que Rac1-GDP n’est jamais liée à la superoxyde dismutase 1, (SOD1), mais l’implication de cette interaction sur la fonction de la NADPH oxydase n’est pas encore pleinement comprise (50).

2.3.2. BILAN DES INTERACTIONS DU COMPLEXE NADPH OXYDASE ACTIF

Afin de faire un bilan des interactions connues ou supposées à ce jour entre les différents composants du complexe actif NADPH oxydase du phagocyte, la **Figure II-22** présente un schéma simplifié du complexe actif.

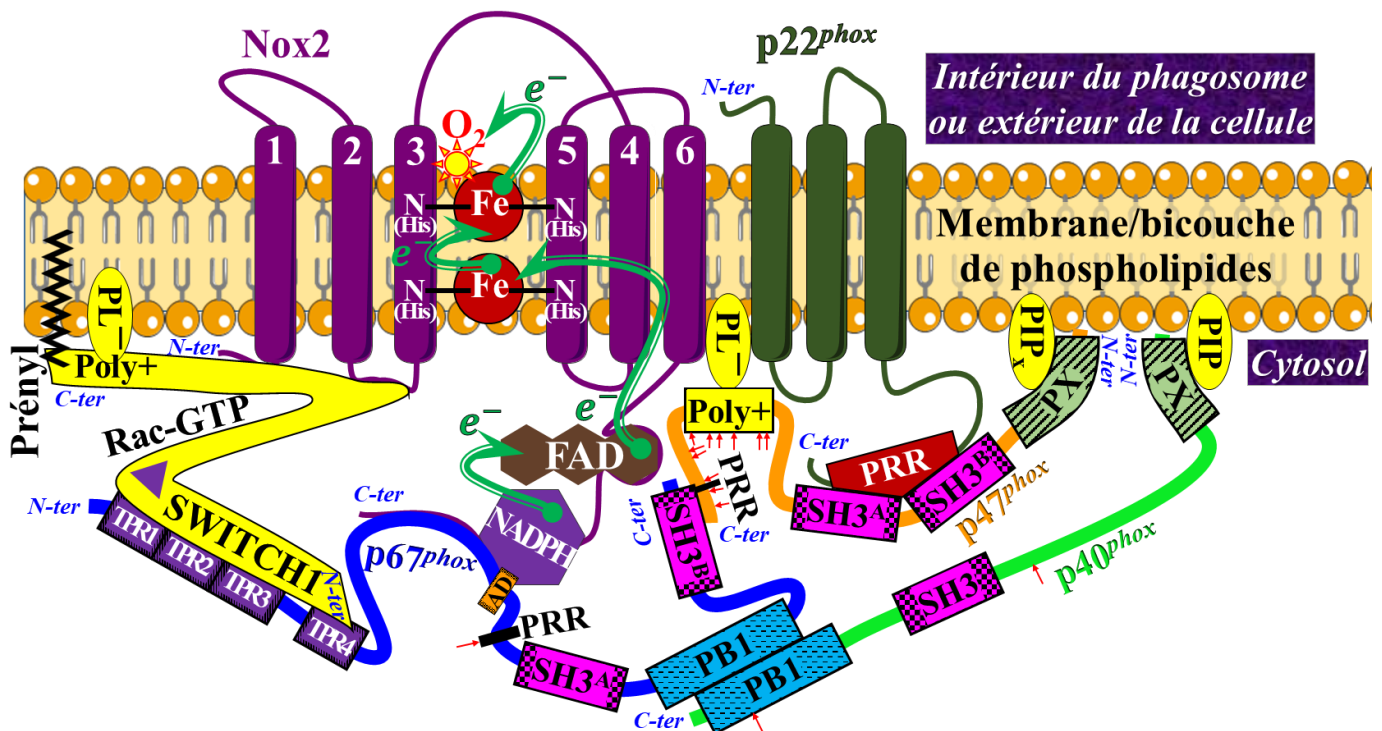


Figure II-22. Schéma bilan simplifié des interactions et transfert d’électrons dans le complexe NADPH oxydase du neutrophile actif. AD=Activator Domain. SH3=Sarcoma Homolog 3 domain. PB1=Phagocyte oxidase and Bud Emergence Protein 1. TPR=TetratricoPeptide Repeat. PRR=Proline Rich Region. PX=Phagocyte Oxidase. PL⁻=Phospholipide anionique. Poly+=région polybasique riche en charges positives. Triangle violet dans RacGTP. Le mouvement supposé des électrons est représenté avec des flèches vertes à un seul pan et ligne double.

Considérant la complexité des interactions, dans la suite, lorsque nécessaire, les complexes NADPH oxydase seront représentés de façon très simplifiée en sous-entendant les interactions.

2.3.3. IMPLICATION SIMPLIFIÉE DE NOX2 DANS LA PHAGOCYTOSE

La **Figure II-1** présentait de façon très simple le principe de la phagocytose. A la suite de la description des différents protagonistes permettant à la NADPH oxydase du phagocyte d'être fonctionnelle, il est possible de faire une mise à jour de ce mécanisme en prenant en compte l'activation de NOX2 de façon simplifiée mais utile pour introduire le caractère crucial de la régulation de NOX2. Ce mécanisme simplifié est présenté en **Figure II-23**.

Lorsqu'un objet étranger est détecté dans l'organisme, les neutrophiles sont activés et recrutés sur la zone de l'intrusion, puis réalisent la phagocytose de l'objet. La phagocytose implique la formation de pseudopodes permettant d'enfermer l'objet étranger dans un phagosome. Une fois le phagosome formé, il a été supposé qu'il fusionne avec des granules de stockage du Cytb₅₅₈, donc les granules secondaires, (spécifiques), et tertiaires, (gélatinase), ainsi qu'avec des granules qui contiennent de la myéloperoxydase, les granules primaires, (azurophiles).

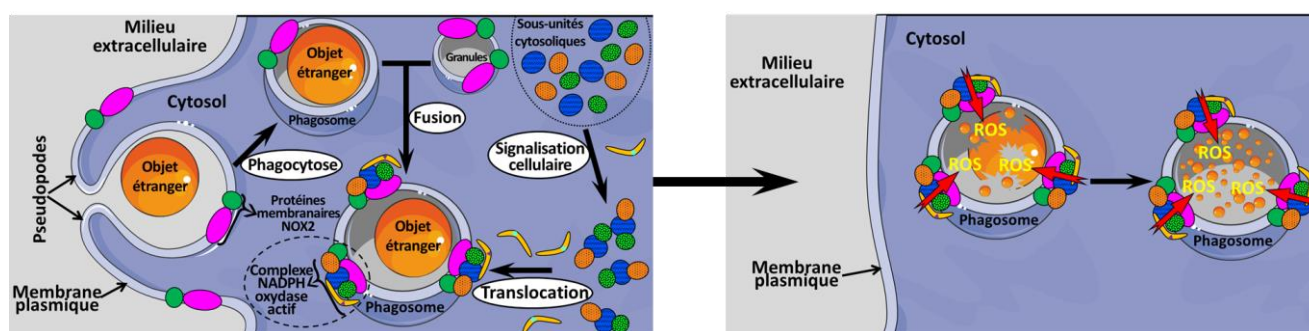


Figure II-23. Schéma simplifié prenant en compte NOX2 de la phagocytose et de la destruction d'un objet étranger par un neutrophile.

La protéine membranaire rose correspond à Nox2, la protéine membranaire verte correspond à p22^{phox}, la protéine cytosolique verte tachetée est p40^{phox}, la protéine cytosolique bleue striée est p67^{phox}, la protéine cytosolique orange tachetée est p47^{phox}, la protéine cytosolique jaune en virgule correspond à Rac1 ou Rac2 portant soit un GDP en bleu, (dans le cytosol), soit un GTP en violet, (lorsque recruté au complexe NADPH oxydase actif).

Cette fusion, dont la séquence n'est pas bien connue, provoque d'une part l'enrichissement de la membrane du phagosome en Cytb₅₅₈, (entre autres protéines membranaires), et d'autre part la mise en présence de nombreuses protéases et de la myéloperoxydase, (entre autres protéines solubles), à l'intérieur du phagosome. Les protéases, (entre autres), vont contribuer à la destruction de l'objet étranger si celui-ci a une nature protéique. En parallèle de ce processus de détection de l'objet étranger et de son internalisation, des voies de signalisation cellulaires permettent d'induire un préassemblage des protéines cytosoliques p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox}, en supposant que les trois protéines sont initialement séparées dans le cytosol, ce qui est controversé, puis ce complexe des trois protéines est transloqué avec Rac-GTP simultanément à la membrane du phagosome et plus précisément au Cytb₅₅₈. La NADPH oxydase est ainsi activée et catalyse la production des espèces réactives de l'oxygène, (ROS), qui contribuent à la destruction du corps étranger, notamment via la formation d'acide hypochloreux HOCl par la myéloperoxydase qui utilise un ROS particulier, le peroxyde d'hydrogène, (H₂O₂), sous-produit des anions superoxyde issus de NOX2.

2.3.4. QUELQUES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE IMPLIQUÉES DANS LA RÉGULATION DE NOX2

L'acide arachidonique est un acide gras ω 6, (voir introduction), possédant quatre insaturations et présent dans les membranes des neutrophiles sous forme estérifiée presque systématiquement au groupe hydroxyle du deuxième carbone (*sn*2) du glycérol des phospholipides (117).

La phagocytose est un processus cellulaire impliquant de nombreuses voies de signalisation cellulaire incluant notamment l’activation des protéines kinase de type C (PKC) ainsi que plusieurs phospholipases. Il existe de nombreuses isoformes de PKC dont je ne discuterai pas ici. J’utiliserai donc l’acronyme PKC indifféremment de l’isoforme.

Les phospholipases (117) sont des enzymes de classe hydrolases capables de réaliser l’hydrolyse de certaines liaisons des glycérophospholipides. Notamment, les phospholipases A2, A1 et B peuvent hydrolyser une liaison ester entre un acide gras et le glycérol alors que les phospholipases C et D peuvent hydrolyser des liaisons éther-phosphate (Figure II-24).

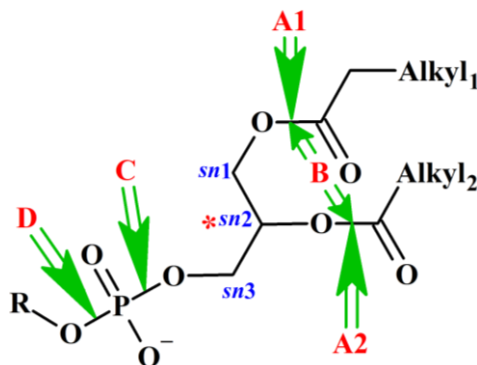


Figure II-24. Schéma d’un glycérophospholipide et des sites d’hydrolyse (en vert) par les différentes phospholipases (en rouge).

Les phospholipases A2, (PLA2, (292)), coupent la liaison ester positionnée sur le carbone *sn2* du glycérol (117) et libèrent donc un lysoglycérophospholipide, (glycérophospholipide avec zéro ou un seul acide gras estérifié au lieu de deux). Ce lysoglycérophospholipide est en l’occurrence encore estérifié en *sn1* et sont acide gras estérifié en *sn2*, majoritairement le tout-*cis*-acide arachidonique (AA), a été libéré. Les glycérophosphoinositol (PI) sont les phospholipides qui contribuent en majorité à la libération d’AA par les PLA2 et dans une bien moindre mesure mais néanmoins significative les phosphatidylcholines, (PC), aussi alors qu’elle est marginale ou nulle avec les autres phospholipides (PL) (293–295).

Il existe plusieurs groupes de PLA2, incluant notamment, (non exhaustif), les grosses PLA2 cytosoliques (cPLA2), les petites PLA2 sécrétées (sPLA2) et les grosses PLA2 calcium-indépendantes (iPLA2) (117). iPLA2 est constitutivement active en absence de calcium et cPLA2 est majoritairement activée par des concentrations en Ca²⁺ de l’ordre du nanomolaire alors que sPLA2 nécessite des concentrations de l’ordre du micromolaire (117, 296).

La cPLA2 α est un type de PLA2 cytosolique impliqué dans l’amplification de la réponse des neutrophiles aux infections bactériennes. En particulier, l’activation de la cPLA2 α est nécessaire mais pas suffisante à l’activation de la NADPH oxydase (237, 260, 297–303). Alors que de nombreux résultats soulignent l’importance de la cPLA2 α dans l’activation et la régulation de la NADPH oxydase, une étude semble montrer que la cPLA2 α n’a aucun impact sur la régulation de la NADPH oxydase (304). Il est bon de prendre note des résultats contraires, mais dans ce cas particulier j’estime que ce dernier n’est pas significatif.

La cPLA2 α peut être activée par plusieurs stimuli dont le plus important est le Ca²⁺, mais il a été reporté que la présence d’AA seule, (fourni par la cPLA2 α elle-même, par une sPLA2 ou par une iPLA2), qu’elle fixe, lui permet

d'être activée en absence d'autre stimulus (296, 305). L'activation de la cPLA2 α nécessite sa fixation sur une membrane contenant beaucoup de phospholipides neutres électriquement, ce qui n'est pas le cas pour la membrane plasmique qui contient beaucoup de phospholipides chargés négativement, (296), au contraire de l'enveloppe nucléaire. La régulation des interactions de la cPLA2 α avec les compartiments membranaires intracellulaires contenant beaucoup de lipides neutres est dépendante de la présence de céramide-1-phosphate qui peut être modulée par certains stimuli dans les neutrophiles (306, 307).

Je rappelle que les phosphoinositides sont en faibles proportions dans la membrane plasmique et que leur apparition et transformation sont soumises à la voie des phosphoinositides, qui leur confère une dynamique très importante, permettant notamment de fines régulations des interactions entre les protéines fixant les phosphoinositides et la membrane plasmique. Ainsi, dans certains cas, cPLA2 α peut se fixer avec une haute spécificité et une haute affinité au phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂, à ce que nous savons, le seul phosphoinositide auquel il se fixe) et donc à la membrane plasmique (306).

De plus, une interaction entre p47^{phox} et la cPLA2 α a été observée (308). Je rappelle que p47^{phox} se fixe à la majorité des phosphoinositides naturels, (dont le recrutement direct ou indirect est contrôlé par l'activité phosphatidylinositol 3-kinase), incluant une fixation faible pour PI(4,5)P₂, (262, 264), seul phosphatidylinositide connu auquel la cPLA2 α peut se fixer à la membrane plasmique (306). Par conséquent, j'hypothétise que la cPLA2 α et la p47^{phox} se conduisent réciproquement à la membrane, à moins que cette interaction se passe de façon bidimensionnelle après attachement à la membrane des deux protéines. Il est donc possible d'évoquer l'existence d'un lien direct entre l'activité de la cPLA2 α , la libération conséquente d'AA et la régulation de la NADPH oxydase.

Les Protéines Kinase C (PKC, (309, 310)) sont des protéines impliquées dans la transduction ainsi que dans la transmission de beaucoup de signaux cellulaires ou extracellulaires. Elles jouent souvent le rôle de premier acteur d'une cascade de phosphorylations permettant de transmettre et d'amplifier ces signaux. Les signaux cellulaires liés à PLA2 et aux PKC sont très fortement intriqués (296).

L'AA libérée par la cPLA2 α permet notamment l'activation et la stabilisation de PKC en absence de Ca²⁺ et même en absence de la phosphatidylsérine, cofacteur habituellement obligatoire de l'activation des PKC (309) et pouvant aussi activer NOX2 (203). Ainsi, l'AA non estérifié peut diffuser dans la cellule et activer les PKC à distance de la membrane plasmique, processus nécessitant seulement de très faibles concentrations en AA (311, 312). La cascade de signalisation issue de l'activation des PKC active d'autres kinases (MAPK et MAPKAP) qui suractivent cPLA2 α , qui peut ainsi atteindre son activation maximale (306). Il faut cependant noter que cette voie d'activation des MAPK et des MAPKAP n'est pas la plus importante et qu'il en existe d'autres prépondérantes.

D'un point de vue physicochimique, l'AA libéré peut aussi modifier la perméabilité et la structure des membranes cellulaires ainsi que modifier leur état de polarisation (313, 314). Les lysophospholipides libérés par la cPLA2 α , quant à eux, peuvent de manière générale augmenter le taux de formation des canaux ioniques, augmenter la géométrie, la perméabilité et la fluidité des membranes ainsi que le taux de conversion des phospholipides (296, 315).

Par conséquent, il est possible que l'impact indirect de la cPLA2 α via l'AA sur la structure de la membrane joue un rôle dans les signaux cellulaires liés à l'AA.

La phospholipase D (PLD, (316)) active réalise une hydrolyse des glycérophospholipides en acide phosphatidique (PA). Il a été montré que l'activation de la PLD par la PKC (317) après fixation au PIP₂ (117, 318, 319) contribue à activer la NADPH oxydase (280, 320). L'activation de la NADPH oxydase est aussi corrélée avec la phosphorylation de p22^{phox}, d'une part par une PKC dont l'activation ne dépend pas du PA et d'autre part par une PKC, ou autre kinase, dont l'activation dépend du PA néoformé par la PLD ou à partir de la phosphorylation du diacylglycérol (321). Je note aussi que la PLD est capable de se fixer à la petite protéine G Rac2 ce qui active l'échange de son GDP en GTP et par conséquent l'active via une activité « guanine-nucleotide exchange factor » (319, 322).

La Phospholipase C (PLC, (323)) réalise l'hydrolyse des glycérophospholipides en diacylglycérol (DAG) et le DAG peut être phosphorylé en acide phosphatidique (PA) par une kinase. En système acellulaire, un mélange d'acide phosphatidique (PA) et de diacylglycerol permet d'activer la NADPH oxydase via leur interaction directe aux protéines cytosoliques ou aux protéines membranaires du complexe, (324, 325), et il a été suggéré qu'une conversion du DAG seul en PA (phosphorylation) avait lieu et pourrait contribuer à cette activation (326). Or, les anions superoxyde produits par NOX2 dépendent aussi de l'activation de la PLC (327), qui est activée par une augmentation de la concentration en Ca²⁺ et sa liaison à des phosphoinositides (117), qui induit la production de DAG dont la présence en excès déstabilise les membranes (296, 328). Le DAG pourrait d'une part activer directement la PKC et d'autre part être phosphorylé en PA qui permettrait d'activer la kinase de phosphorylation de p22^{phox} ce qui dans les deux cas conduirait à une régulation positive de NOX2 (321).

Nous avons vu que p22^{phox} est activée par phosphorylation par la PKC et nous pouvons aussi noter que l'état de phosphorylation de p67^{phox} est régulée (329–331) par des kinases (MAPK ERK1/2) qui sont activées par l'AA (332) ainsi que par des phosphatases (MLC PP1/2A) qui sont inhibées par l'AA (333). La protéine p47^{phox} est, en cellule, obligatoirement phosphorylée par la PKC pour que la NADPH oxydase soit active (238, 334–339). Au contraire, p40^{phox} régulerait négativement NOX2 (340) en étant phosphorylée (341–343). La phosphorylation du centre catalytique Nox2 contribue aussi à la régulation de l'activité enzymatique (247). Les phosphorylations des sous-unités, notamment sur p47^{phox} et p22^{phox}, peuvent se révéler d'une importance thérapeutique cruciale (344).

Ainsi, l'activation de la NADPH oxydase nécessite la présence d'AA via des voies de signalisations cellulaires compliquées et interconnectées relativement bien décrites, dont les principales sont les différentes voies de phosphorylations. Ces voies de phosphorylation sont notamment activées par la présence d'AA libéré par la cPLA2 α . La PKC ainsi activée provoque une suractivation de cPLA2 α qui produisent de l'AA et il peut ainsi y avoir un phénomène d'auto-entretien. L'AA est nécessaire et joue donc un rôle important dans l'activation et la régulation de la NADPH oxydase via ces voies de signalisation. Il impose aussi aux membranes et aux protéines des conditions physicochimiques impliquées dans le contrôle de l'activation de la NADPH oxydase.

La littérature montre que 10⁹ plaquettes stimulées par de la thrombine libèrent entre 5 et 20 nmol d'AA en environ 30 secondes, (345–347), sachant qu'à l'état basal, 10⁹ plaquettes contient approximativement 100 nmol d'AA libre

et estérifié (348, 349). En considérant le rayon d'une plaquette à 4 μm et en considérant que la quantité minimale d'AA libérée est 5 nmol, je calcule donc que la concentration d'AA libérée en 30 secondes est de 19 μM . Par conséquent, en supposant qu'une activité similaire des PLA2 peut être retrouvée dans les neutrophiles, les concentrations que j'utilise pour mes expériences entre 0 et 100 μM d'AA, sont proches des réalités physiologiques dans le cas d'une activation de la PLA2. L'utilisation d'AA dans cette thèse a pour objectif l'étude des modifications physicochimiques provoquées par l'AA sur les membranes et sur les protéines impactant l'activité de la NADPH oxydase. Les aspects cellulaires n'ont pas été étudiés.

CHAPITRE III – Influence de la compartimentation sur la mesure de l'activité de la NADPH oxydase du neutrophile

A. INTRODUCTION

J'ai précédemment décrit que le contrôle de la production des anions superoxyde catalysée par NOX2 est lié à une fine régulation spatiotemporelle de la catalyse enzymatique à travers un contrôle de l'assemblage du complexe fonctionnel (**Figure II-22**), impliquant nécessairement des modifications post-traductionnelles de protéines du complexe, (phosphorylations, glycosylations, prénylation), et le concours obligatoire de petites molécules effectrices comme l'acide arachidonique, des phosphoinositides, des phospholipides... De plus, la structure et les propriétés physicochimiques de la membrane, ainsi que le gradient électrochimique membranaire, (350), ont aussi un rôle important dans l'activité de NOX2 .

L'étude des relations structure-fonction de la NADPH oxydase du phagocyte fait donc intervenir de nombreux paramètres physicochimiques, mais aussi d'un point de vue cellulaire de nombreuses voies de signalisation (voies des PKC, des MAPK, des phosphoinositides...). Les études de NOX2 en cellules permettent d'obtenir de nombreuses informations cruciales mais la complexité du système implique, malgré des contrôles rigoureux, des confusions d'effets significatifs empêchant de discriminer l'implication de la biochimie propre à l'enzyme des autres effets, (synthèse des protéines, effets secondaires des interventions humaines sur le système d'étude, méconnaissance probable de certaines molécules effectrices, modifications membranaires, modifications du gradient électrochimique membranaire...).

Ainsi, les relations structure-fonction purement liées à la biochimie et à la biophysique de la NADPH oxydase du phagocyte, donc décorréélées des interférences cellulaires non contrôlables, relèvent d'une étude à l'échelle moléculaire en système acellulaire, dit « cell-free ». En outre, l'étude de la réaction catalysée par NOX2 relève de la chimie. Le plus souvent, ces études nécessitent la mesure de la progression de la réaction catalysée par NOX2 (**E.Réaction III-1**) en fonction du temps (199–202, 351–358).



E.Réaction III-1

Le suivi de la progression de cette réaction catalysée par NOX2 peut se faire directement en mesurant la concentration en NADPH en fonction du temps par spectrophotométrie d'absorption à 340 nm, ou indirectement en mesurant par spectrophotométrie d'absorption à 550 nm la réduction du Cytochrome *c* (Cyt_c) par les anions superoxyde produits. Il est aussi possible de mesurer la concentration en dioxygène en fonction du temps par électrochimie, (ampérométrie), à l'aide d'une électrode de Clark. Les expériences que je présente dans ma thèse et qui sont basées sur la cinétique de la réaction catalysée par NOX2 utilisent donc ces **trois observables : le NADPH, le Cyt_c et le dioxygène.**

Cette étude de la NADPH oxydase du phagocyte en système acellulaire a été réalisée sur des fractions membranaires issues de la membrane plasmique et de la membrane des réticulums endoplasmiques des neutrophiles humains. Ces fractions membranaires (FM) sont des vésicules fermées (359–361), appelées petites vésicules unilamellaires, (ou Small Unilamellar Vesicles, SUV), d'environ 50 à 200 nm de diamètre (taille trouvée dans la littérature par microscopie électronique (359–361) et vérifiée au labo par diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) ainsi que par cryomicroscopie électronique à balayage), constituées hypothétiquement d'une bicouche de phospholipides et de toutes les protéines intégrées ou fortement adsorbées à cette bicouche phospholipidique. En pratique, les vésicules de FM pourraient être unilamellaires, (une seule bicouche de phospholipides), ou multilamellaires comme cela a pu être observé sur des fractions membranaires d'autres types cellulaires (362).

Comme cela a déjà été présenté, le $Cytb_{558}$ est orienté dans la membrane. L'orientation transmembranaire du $Cytb_{558}$, est supposée aléatoire à cause du mode de formation des FM par sonication, (comme expliqué dans la partie matériels et méthodes), ce qui signifie que la chaîne de transport d'électrons est, *en moyenne* soit orientée de l'extérieur vers l'intérieur pour 50 % des $Cytb_{558}$, soit orientée de l'intérieur vers l'extérieur pour 50 % des $Cytb_{558}$. En réalité, trois cas de figure limites peuvent se présenter, (je ne peux pas exclure l'infinité des cas intermédiaires potentiels), et cela dépend surtout de l'importance des perturbations membranaires engendrées par la sonication, comme le montre la **Figure III-1**.

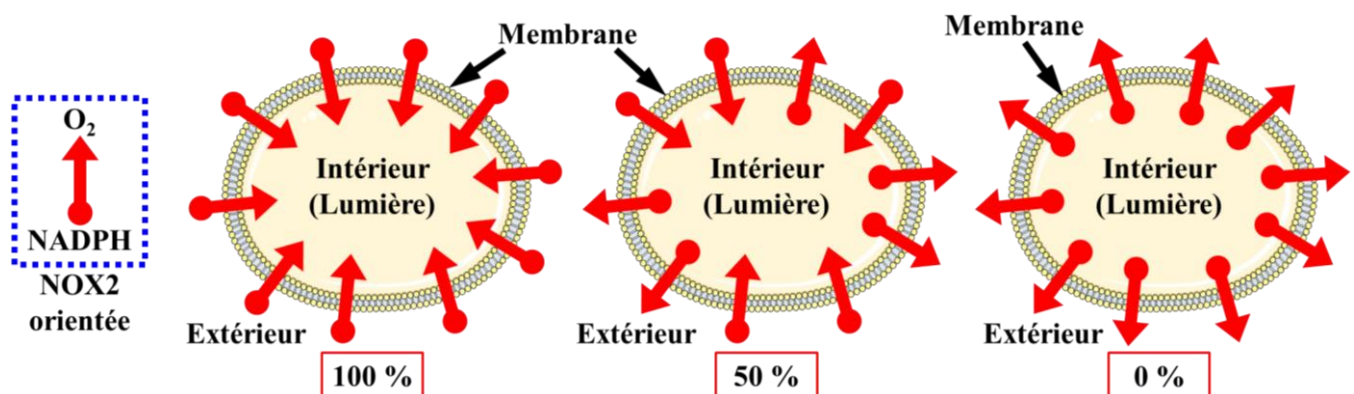


Figure III-1. Illustration des trois cas hypothétiques d'orientation des $Cytb_{558}$ dans une membrane de FM.

Les flèches rouges représentent le $Cytb_{558}$ et le sens de déplacement des électrons soit de l'intérieur vers l'extérieur, soit de l'extérieur vers l'intérieur. A gauche, 100 % des $Cytb_{558}$ sont orientées extérieur vers intérieur, au milieu 50 %, à droite 0 %.

Les mesures d'activité de la NADPH oxydase imposent de placer les FM dans un tampon et d'ajouter les protéines cytosoliques $p67^{phox}$, $p47^{phox}$ et Rac, ($p40^{phox}$ n'est pas nécessaire au fonctionnement de l'enzyme en système acellulaire (363, 364)), l'AA, puis de laisser incuber un temps donné et enfin d'ajouter le NADPH. Il est probable que la membrane des FM soit imperméable aux protéines cytosoliques, ainsi qu'au NADPH qui est chargé et assez gros pour ne pas traverser les membranes. Par conséquent, dans le cas d'une orientation du $Cytb_{558}$ totalement aléatoire, seules 50 % des NOX2 sont activées, l'assemblage ne pouvant être réalisé qu'à l'extérieur des FM. Ainsi, l'oxydation du NADPH a exclusivement lieu à l'extérieur des FM et la réduction du dioxygène en anions superoxyde se fait exclusivement à l'intérieur des FM. Or, la technique de mesure de l'activité de la NADPH oxydase du phagocyte en système acellulaire nécessite de détecter les anions superoxyde produits à l'aide d'une sonde protéique, le Cytochrome c (Cyt c) qui ne peut pas traverser les membranes biologiques natives.

La production des anions superoxyde se fait donc à l'intérieur des FM alors que leur détection se fait à l'extérieur. Ceci signifie que les anions superoxyde doivent traverser la membrane des FM pour être détectés par le Cytc (Figure III-2).

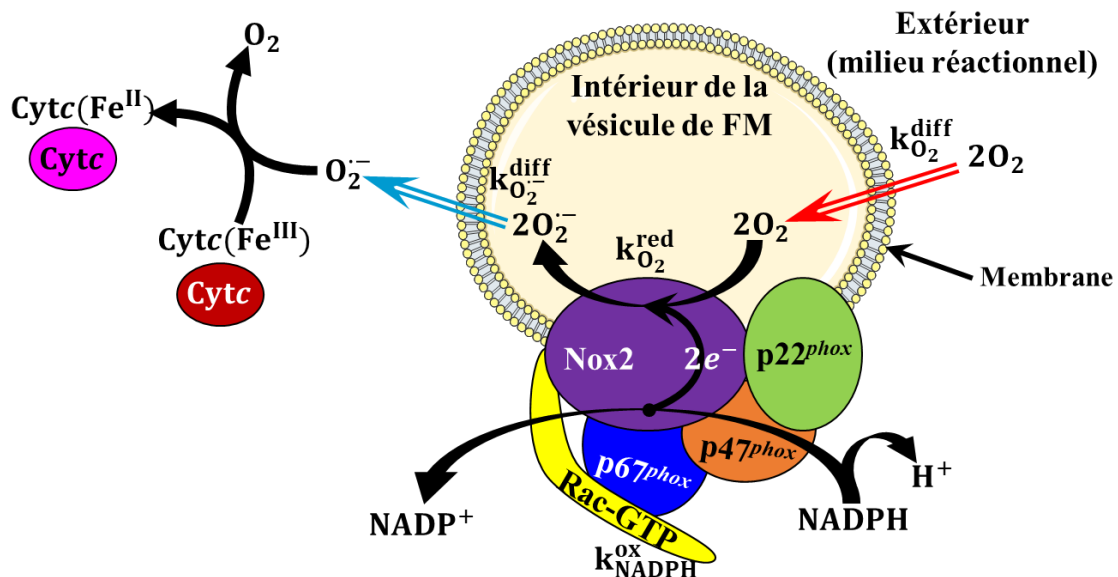


Figure III-2. Schéma de NOX2 fonctionnelle présentant les contraintes de mesures liées au contexte fraction membranaire.

Le NADPH est oxydé à l'extérieur de la vésicule avec une constante de vitesse k_{NADPH}^{ox} . Les anions superoxyde sont produits à l'intérieur de la vésicule avec une constante de vitesse $k_{O_2}^{red}$ via la réduction du dioxygène qui doit traverser la membrane avec une constante de diffusion $k_{O_2}^{diff}$ pour arriver sur le site de réduction. Les anions superoxyde doivent ensuite traverser la membrane avec une constante de diffusion $k_{O_2^{\cdot -}}^{diff}$ avant d'être détectés par le Cytc à l'extérieur de la vésicule.

Afin que les anions superoxyde soient détectés par le Cytc à la même vitesse que leur production par NOX2, il faudrait donc que la cinétique de diffusion de l'anion superoxyde à travers les membranes soit beaucoup plus rapide que leur vitesse de production. La mesure de la vitesse de production des anions superoxyde produits par NOX2 détectés par le Cytc pourrait donc être influencée par l'état physique et la composition de la membrane des FM alors que la mesure de la consommation du NADPH par NOX2 n'implique pas de traversée membranaire et n'est donc, a priori, pas influencée par des contraintes liées à la membrane. Comme l'indique l'équation **E.Réaction III-1**, pour un NADPH consommé, deux anions superoxyde sont produits. Or, si la détection des anions superoxyde par le Cytc est limitée par la perméabilité membranaire, cette stœchiométrie ne devrait pas être retrouvée dans les mesures de vitesse de la réaction.

Par conséquent, afin d'étudier la limite cinétique de diffusion des anions superoxyde à travers la membrane, j'ai mesuré la réaction globale ainsi que l'activité de l'enzyme en utilisant le NADPH et le Cytc. Les mesures par oxymétrie sont beaucoup plus longues et délicates à réaliser et je m'en servirai donc essentiellement comme contrôle pour compléter mes analyses relativement aux autres mesures plutôt que pour obtenir des grandeurs absolues.

Pour évaluer l'impact de la membrane sur ces mesures, j'ai fait varier différents paramètres incluant le temps d'incubation, la concentration en acide arachidonique, la concentration en Cytc ou la température. D'autres expériences m'ont conduit à ajouter des effecteurs membranaires comme des détergents, qui perturbent les membranes, ou encore des molécules formant des pores dans les membranes. Enfin, les anions superoxyde étant réactifs, ils peuvent facilement subir des réactions secondaires avant d'être captés par le Cytc. Par conséquent, j'ai essayé d'évaluer l'importance de ces réactions secondaires avec l'aide de mes collaborateurs Pauline Lefrançois et

Stéphane Arbault à l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux. Je fais l'hypothèse que la stœchiométrie admise dans la littérature et présentée en **E.Réaction III-1** est vraie et je me baserai dessus pour faire mes interprétations.

Certaines questions fondamentales à propos des problèmes de perméabilité membranaire ont déjà été explorées dans les années 80. Notamment, Light *et al.* en 1981 (358) ont montré que le NADPH est oxydé beaucoup plus rapidement que ne sont détectés les anions superoxyde et que cette différence augmente en fonction de l'augmentation du pH jusqu'à pH 7,5 puis diminue drastiquement. L'augmentation de la différence avec l'augmentation du pH est cohérente avec la diminution de la réactivité du Cyt_c vis-à-vis de l'anion superoxyde lorsque le pH augmente au-delà de 6,5 (365–367). En revanche, la diminution de la différence lorsque le pH diminue est en contradiction avec l'augmentation drastique de la vitesse de la réaction compétitive de dismutation de l'anion superoxyde lorsque le pH diminue (368, 369). Ces différences sont apparemment compensées par la présence de détergent comme du désoxycholate ou du Triton X-100 mais cela n'a pas été exploré plus avant à la suite de la grande quantité de nouvelles données obtenues notamment dans les années 90 sur NOX2. Une autre publication par Green et Wu en 1986 (355) présente plus en détail la dépendance de l'activité de NOX2 en fonction de la concentration en désoxycholate. Les auteurs déterminent une concentration précise en désoxycholate qui permet d'annihiler presque totalement les différences d'activité de l'enzyme mesurées via l'oxydation du NADPH ou la réduction du Cyt_c. Cependant, au-delà de cette concentration la différence entre les mesures augmente à nouveau. De surcroît, ils trouvent que le NADPH est toujours consommé deux fois plus rapidement que le dioxygène ce qui est en contradiction avec la stœchiométrie théorique. En outre, il est bien connu que les amphiphiles activateurs de la NADPH oxydase ont tous des comportements différents vis-à-vis de l'activation de l'enzyme (370).

Il est important de noter que la majorité des études fonctionnelles de NOX2 sont basées sur ces mesures d'activité et jusqu'à aujourd'hui les différentes études n'ont pas permis de déterminer précisément l'origine du problème, ce qui est pourtant déterminant pour l'ensemble des interprétations réalisées à partir des mesures de réduction du Cyt_c pour l'étude du fonctionnement de la NADPH oxydase. Par conséquent, l'objectif de ce chapitre est de comprendre très exactement ce qui est mesuré et cela nécessite de prendre en considération les connaissances acquises depuis sur la NADPH oxydase, sur les lipides et les membranes biologiques, mais aussi des connaissances de physicochimie sur le Cyt_c et sur les anions superoxyde.

B. METHODES EMPLOYEES

Cette partie a pour objectif de décrire les méthodes utilisées dans ce chapitre, afin que quiconque puisse refaire les expériences et qu'il soit possible de discuter objectivement des expériences réalisées et des dispositifs expérimentaux. J'insisterai cependant davantage sur certaines méthodes dont la compréhension est particulièrement importante pour mes interprétations des résultats, comme la préparation et la caractérisation des fractions membranaires, ou encore les techniques de mesure de l'activité enzymatique.

Il est important de noter que l'eau utilisée au laboratoire est de l'eau ultra pure ayant une conductivité de 18,2 M Ω ·cm et un taux de carbone organique total (TOC) inférieur à 3 parties par milliard (revient approximativement à 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). La vaisselle est lavée au lave-vaisselle dont le dernier rinçage est fait avec une eau à 15 M Ω ·cm. En ce qui me concerne, avant utilisation de la vaisselle, je réalise cinq rinçages supplémentaires à l'eau ultra pure afin de limiter les risques de traces de détergent utilisé dans le lave-vaisselle, ou encore de poussière liée au séchage de la vaisselle et je m'assure visuellement qu'il n'y a pas de traces ou de dépôts anormaux. Autant que possible, j'ai filtré l'ensemble des solutions aqueuses avec des filtres stériles dont le diamètre des pores est de 0,22 μm . Afin d'éviter les contaminations chimiques, les plastiques, (cônes et tubes), utilisés n'ont pas été autoclavés, sauf lorsque des conditions stériles sont requises. Lorsque requis, j'ai porté des gants non poudrés toujours en nitrile, que j'ai au préalable lavé avec de l'eau et du savon puis rincé à l'eau ultra-pure afin de limiter les risques de contamination de mes expériences par des résidus en surface des gants. Les références des produits et appareils importants sont données en ANNEXE 5.

1. Préparation et caractérisation des constituants du système acellulaire

1.1. PREPARATION ET CARACTERISATION DES FRACTIONS MEMBRANAIRES DE NEUTROPHILES HUMAINS

1.1.1. OBTENTION DES FRACTIONS MEMBRANAIRES DE NEUTROPHILES HUMAINS

Les fractions membranaires sont des vésicules d'environ 50 à 200 nm de diamètre constituées par la membrane plasmique et probablement la membrane du réticulum endoplasmique des neutrophiles. Les neutrophiles étant des cellules sanguines, le point de départ de l'expérience est l'obtention d'une poche de sang frais, (dit « non qualifié », donc sur lequel aucun test n'a été réalisé au moment de l'expérience), prélevé sur un donneur supposé sain, à l'établissement français du sang (EFS) de Paris dans le respect légal de l'anonymat total du donneur, (aucune information disponible sur ce dernier). Brièvement, les neutrophiles sont alors purifiés, (les autres composants du sang sont éliminés), puis cassés à l'aide d'ultrasons et les débris cellulaires obtenus subissent deux centrifugations différentes ce qui permet d'isoler les fractions membranaires. Le but de l'expérience est donc d'obtenir les fractions membranaires contenant l'ensemble des protéines membranaires du neutrophile, incluant Nox2 et p22^{phox} et de quantifier la quantité de Cytb₅₅₈ que contient la suspension finale.

S'agissant de matériel biologique qui plus est non qualifié, il est nécessaire de porter une blouse de laboratoire, des gants de protection et des lunettes de protection. De plus, les déchets solides seront placés dans une poubelle

jaune adaptée « danger biologique » contenant un sac plastique transparent adapté. Les déchets liquides seront placés dans un bidon en plastique de 2,5 L qui sera fermé par un bouchon adapté scellé avec de la colle et possédant un évier étanche aux liquides. Le bidon de liquide sera correctement annoté puis placé dans la poubelle jaune avec les déchets solides. L'ensemble du matériel réutilisable sera passé à l'eau de Javel, idéalement pendant 24 h puis idéalement autoclavé.

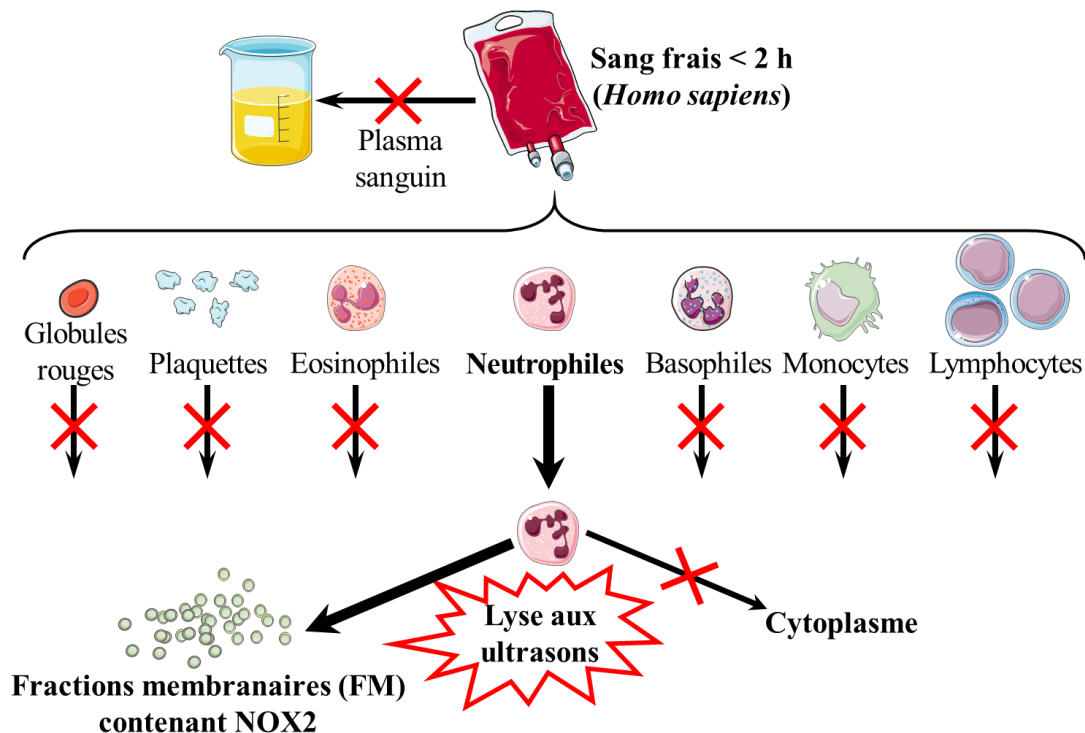


Figure III-3. Schéma de principe d'obtention des fractions membranaires de neutrophiles primaires *Homo sapiens*.

Les différentes étapes de l'expérience sont décrites ci-après (principe global présenté en **Figure III-3**) :

i) Une solution de Dextran 2 % est préparée extemporanément, dans une solution autoclavée à 0,9 % en masse de NaCl, dans une éprouvette graduée forme basse de 500 mL en polypropylène contenant un barreau aimanté autoclavé dont le revêtement externe est du polytetrafluoroéthylène (PTFE), l'éprouvette et le barreau aimanté ayant été préalablement autoclavés ensemble. Cette solubilisation peut prendre plusieurs heures, (en général entre 1 et 3 selon la température de la pièce et l'efficacité de l'agitation). Il est important de maintenir l'éprouvette couverte avec une feuille d'aluminium pour éviter la contamination par des particules, des aérosols...

ii) Dans une éprouvette graduée forme basse autoclavée de 1 L en polypropylène translucide (important), un volume de sang, (entre 400 et 500 mL en général), est versé doucement, (sans faire de bulle, le long de la paroi), puis un même volume de Dextran 2 % est ajouté doucement, (sans faire de bulle, le long de la paroi en penchant un peu l'éprouvette). L'ensemble est alors mélangé trois fois par retournement très lent de l'éprouvette fermée avec un Parafilm® fortement maintenu contre l'ouverture par une paume de main gantée. L'éprouvette fermée par le Parafilm® et contenant la suspension est alors posée sur la paillasse à un endroit où il sera facile de prélever son contenu à l'aide d'une pipette sans avoir besoin de la déplacer. L'éprouvette doit en effet être gardée immobile sur la paillasse pour que la sédimentation soit réussie. La sédimentation prend environ 40 minutes à température ambiante, sans

intervention extérieur. Ceci induit l'agrégation et donc la sédimentation des globules rouges. Cette étape permet d'éliminer la majorité des globules rouges et une partie du plasma.

iii) Au bout de 40 minutes, la suspension présente deux parties distinctes. Une partie basse opaque et sombre contenant les globules rouges en suspension dans du plasma et une partie haute translucide et jaunâtre contenant du plasma, les leucocytes, les plaquettes et des globules rouges résiduels. La partie haute est alors prélevée à l'aide d'une pipette en polypropylène stérile (PPS) de 25 mL, adaptée sur un pipeteur électrique automatique (PEA), puis répartie dans des tubes Falcon® stériles de 50 mL. Il est important de ne pas prélever les globules rouges agrégés de la partie basse, il est donc en général nécessaire de laisser une épaisseur de 5 mm de partie supérieure. Pour ne pas activer les neutrophiles, il est aussi important d'être précautionneux et suffisamment lent pour éviter de faire buller la suspension. La suspension ainsi prélevée est centrifugée à température ambiante pendant 8 minutes à 400 x g avec un rotor « swing out » (godets suspendus qui permettent d'avoir des tubes horizontaux lors d'une centrifugation). Cette étape permet de séparer l'ensemble des cellules du reste du plasma.

iv) Après la centrifugation, les surnageants sont prélevés à l'aide d'une PPS de 25 mL adaptée sur un PEA, puis jetés dans un bidon adapté. Il est important de laisser environ 2 mm de surnageant au-dessus de chaque culot pour éviter qu'ils sèchent et pour faciliter la resuspension des cellules. Pour faciliter l'explication, les tubes seront numérotés de **1** à **n** par incrément de 1. Il est important de noter que cette étape est beaucoup plus simple et rapide lorsqu'elle est réalisée à deux, voire trois expérimentateurs : en pratique les surnageants sont jetés par un ou deux expérimentateurs et le troisième s'occupe des culots. Le culot du tube **1** est resuspendu au fond du tube par agitation manuelle douce (typiquement : le tube est tenu verticalement par le bouchon, (bien fermé), entre l'index, le majeur et le pouce, la paume de la main vers la paillasse, la main pendante, le poignet relâché, l'avant-bras horizontal, et un mouvement de rotation pendulaire est appliqué avec le poignet), puis un peu de Tampon Phosphate Salin Dulbecco (PBSD, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) stérile à température ambiante est ajouté. Le culot du tube **2** est aussi resuspendu de la même façon, puis le contenu du tube **1** est versé dans le tube **2** et un peu de PBSD est ajouté dans le tube **1** qui est à nouveau mélangé doucement pour rincer les parois. Le culot du tube **3** est alors resuspendu comme pour les précédents, puis le contenu du tube **2** est versé dans le tube **3**, et le contenu du tube **1** est versé dans le tube **2**. A ce moment, il s'agit d'une procédure en boucle où le culot du tube **i** est resuspendu, puis le contenu du tube **i-1** est transféré dans le tube **i** et le contenu du tube **i-2** est versé dans le tube **i-1**. En pratique et au jugé de l'expérimentateur, du tampon peut être ajouté dans le tube **1** à tout moment puis transféré dans chacun des autres tubes jusqu'au tube **i-1** pour rincer l'ensemble des tubes. Lorsque le culot du tube **n** est resuspendu, le contenu du tube **n-1** est transféré dans le tube **n**, le contenu du tube **n-2** est transféré dans le tube **n-1** puis dans le tube **n** et les tubes **n-2** et **n-1** sont rincés une fois et le contenu transféré dans le tube **n**. En pratique, le volume final de la suspension de cellules est de 50 mL. Lorsque les neutrophiles sont activés, ce qu'il faut éviter, ils s'agrègent et cela est clairement visible à cette étape. Cette étape permet de mettre l'ensemble des cellules restantes dans un tampon pour s'affranchir de la majorité du plasma.

v) Pour cette étape, seront utilisés une PPS de 10 mL, adaptée sur un macro-pipeteur manuel, (propipette manuelle), ou sur un PEA permettant de délivrer du liquide par la seule attraction de la pesanteur mais de façon contrôlée, en ayant la possibilité d'ajuster le débit d'écoulement. Au préalable, auront été préparés stérilement deux tubes Falcon® stériles de 50 mL contenant chacun 15 mL de Ficoll stérile, (tout le Ficoll doit être au fond du tube, s'il y en a sur les

parois il faut centrifuger). La suspension de cellules est prélevée juste après homogénéisation par retournement doux, puis déposée à la surface du Ficoll très lentement, (la seule attraction de la pesanteur est trop importante, il faut qu'elle soit contrôlée), et le long de la paroi du tube gardé vertical. La phase la plus critique est le premier contact entre le Ficoll et la suspension cellulaire qui doit être particulièrement doux. Au total, 25 mL de suspension de cellules doivent être déposés à la surface du Ficoll de chacun des deux tubes. Chaque ajout de 10 mL prend entre 2 et 5 minutes selon l'expérience de l'expérimentateur. Un dépôt réussi consiste en l'obtention de deux phases très bien séparées, la phase inférieure étant le Ficoll transparent et incolore et la phase supérieure étant la suspension de cellules rouge-foncée et opaque. La délimitation entre les deux phases est très nette, il n'y a pas de mélange observable à l'œil nu. *Cette étape permet de préparer la centrifugation sur gradient de densité de Ficoll et il est nécessaire que la séparation soit nette afin que le gradient de densité s'établisse idéalement.*

vi) Le système biphasique Ficoll-suspension de cellules est alors centrifugé à 400 x g pendant 30 minutes à température ambiante dans un rotor « swing out ». A la fin de la centrifugation, il est nécessaire d'activer la réfrigération à 4 °C de la centrifugeuse. *Cette étape permet la séparation des cellules en fonction de leur densité qui dépend du type cellulaire. Les globules rouges et les leucocytes de la lignée myéloïdes sont les cellules les plus denses et se retrouvent dans le culot. Les lymphocytes ont une densité moindre et un anneau de lymphocytes est retrouvé flottant à peu près au milieu de la colonne de liquide. Les plaquettes étant issues du morcellement de la cellule mégacaryocyte thrombocyto-gène, il en existe différentes populations (taille polydispense) et elles vont donc se retrouver dispersées un peu en dessous et un peu au-dessus de l'anneau de lymphocytes.*

vii) Pour un seul des deux tubes*, le surnageant est prélevé à l'aide d'une PPS de 25 mL, adaptée sur un PEA puis jeté dans un bidon adapté. Lors du prélèvement, il faut faire très attention à récupérer l'ensemble des lymphocytes. Pour cela, il est nécessaire de plonger suffisamment l'extrémité de la pipette un peu en dessous de l'anneau de lymphocytes tout en réalisant une aspiration assez vive du milieu et en appliquant au tube une rotation simultanée via une rotation du poignet de la main qui tient le tube. Néanmoins, le culot se détache facilement du fond et il est très important de ne pas le toucher avec l'extrémité de la pipette, ni de réaliser une aspiration trop vive à proximité. Le volume étant supérieur à 25 mL, cette étape nécessite de prélever deux fois, la deuxième pouvant être mieux contrôlée, l'anneau ayant normalement été aspiré au premier prélèvement. Il est bon de laisser 1 mm de liquide au-dessus du culot et il peut être nécessaire, pour ajuster, de prélever la fin du liquide à l'aide d'un cône stérile de 200 µL ou de 1 mL adapté sur une micropipette. *Cette étape permet d'éliminer les plaquettes et les lymphocytes et de ne récupérer que les leucocytes de la lignée myéloïde et les globules rouges résiduels dans le culot.*

viii) Le culot est ensuite resuspendu dans le reste de surnageant par agitation douce par rotation pendulaire comme expliqué précédemment. L'étape suivante consiste en un *choc osmotique* visant à lyser les globules rouges et doit se faire immédiatement et de façon temporisée. **Le temps indiqué est à respecter à la seconde près et les mélanges doivent être rapides, précis, sans pour autant violenter les cellules. Sans ces précautions, la lyse peut être inefficace, ou pire, les neutrophiles peuvent éclater.** Au *temps zéro*, 12 mL d'eau froide ultra pure 18,2 MΩ·cm stérile préalablement préparés stérilement dans un tube Falcon® de 15 mL sont versés avec une main dans le tube contenant le culot tout en mélangeant rapidement, avec l'autre main, par mouvement pendulaire le tube contenant les cellules pour homogénéiser le plus rapidement possible la suspension et que toutes les cellules subissent le plus vite possible le même choc osmotique, (*peut durer entre 5 et 10 secondes*). Puis le tube est fermé et mélangé doucement

par retournement jusqu'à **30 secondes**, où le tube est alors déposé sur la glace. Un tube Falcon® de 15 mL stérile contenant 4 mL de KCl 0,6 M froid stérile est ouvert, ainsi que le tube contenant la suspension cellulaire qui vient d'être déposé sur la glace. A **40 secondes exactement** sont ajoutés les 4 mL de KCl à la suspension cellulaire dans l'eau tout en mélangeant comme expliqué précédemment, (d'abord en mouvement pendulaire, puis par retournement, au total entre 5 et 10 secondes), et le volume est immédiatement complété à 50 mL avec du PBSD froid puis le tube est réservé en glace. **Reprendre à l'étape précédente pour le deuxième tube***. Une fois que la procédure a été réalisée pour les deux tubes, ceux-ci sont centrifugés à 400 x g pendant 8 minutes à 4 °C. **Le surnageant d'un des deux tubes**** est alors jeté à l'aide d'une PPS de 25 mL adaptée sur un PEA et cette fois-ci, tout le surnageant doit être prélevé, le fond de surnageant sera donc obligatoirement enlevé à l'aide d'un cône stérile de 200 µL et d'une micropipette. Ensuite 200 µL de PBSD froid stérile sont ajoutés sur le culot qui est resuspendu par mélange à l'aide de ce même cône stérile en grattant l'extrémité du cône sur la paroi au fond du tube tout en faisant tourner le tube. Afin de ne pas perdre de cellules collées sur les parois internes du cône, ne surtout pas réaliser d'aspiration des cellules dans le cône. Ensuite, la procédure de choc osmotique est réalisée à nouveau comme précédemment. **Le deuxième tube**** est alors traité comme le premier et subit aussi la procédure de choc osmotique. Les deux tubes sont alors centrifugés pendant 8 minutes à 400 x g et 4 °C. *Cette étape a pour objectif d'éliminer tous les globules rouges résiduels par lyse différentielle.*

ix) Après la centrifugation, **pour un tube***** la totalité du surnageant est éliminé à l'aide d'une PPS adaptée sur une PEA, puis d'un cône stérile de 200 µL adapté sur une micropipette. Ensuite, sont ajoutés 200 µL de tampon de cassage qui consiste en une solution faite extemporanément en mélangeant 30 mL de Tampon Phosphate, (4 mM NaH₂PO₄, 16 mM K₂HPO₄ pH 7,4), stérile avec 3,5 g de saccharose, 52 mg de sulfate de magnésium heptahydraté, 2,8 mg de leupeptine et 5,22 mg de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF). Le culot est ensuite resuspendu à l'aide d'un cône stérile comme expliqué précédemment, le cône est réservé, retourné sur la pailleuse pour préserver la pointe, puis environ 500 µL de tampon de cassage sont ajoutés. **Appliquer la même procédure avec le deuxième culot*****, en reprenant le cône déjà utilisé pour mélanger le culot. A l'aide de ce même cône, transférer la suspension du premier tube dans le deuxième. Puis réaliser plusieurs rinçages, (en prélevant le tampon de cassage avec un cône stérile propre), au moins 3, en transférant le liquide de rinçage d'un tube à l'autre chaque fois avec le même cône utilisé précédemment pour limiter les pertes de cellules sur les parois du cône et du premier tube. Compléter le volume à environ 10 mL final avec du tampon de cassage. *Cette étape a pour objectif de mettre en commun les cellules présentes dans les deux tubes différents et de remplacer le PBSD avec un tampon permettant la lyse des cellules aux ultrasons en limitant la protéolyse.*

x) Une sonde fine de sonication et un générateur d'ultrasons permettent ensuite de casser les cellules. Il faut placer l'extrémité de la sonde à peu près au milieu de la colonne de liquide, puis réaliser 12 fois : 10 secondes de sonication contenant 10 cycles de 300 ms de sonication et 700 ms de pause à une puissance d'environ 3 à 4, (ajustée plus précisément au jugé en fonction du rendu sonore au moment de l'expérience), suivi de 1 minute d'incubation sur glace en agitant le tube pour refroidir la suspension. *Cette étape a pour objectif de casser les cellules et de former les fractions membranaires.*

xi) La suspension est ensuite centrifugée à 10000 x g et 5 °C pendant exactement 10 minutes (*i.e.* que le temps d'accélération est à ajouter à ces 10 minutes). Il est mieux de rincer le tube dans lequel la sonication a été faite avec

du tampon de cassage pour récupérer un maximum de matériel. Cette centrifugation permet d'éliminer les cellules potentiellement encore intactes mais aussi les granules et les plus gros débris membranaires.

xii) Enfin, le surnageant est transféré dans un tube d'ultracentrifugeuse, puis soumis à une ultracentrifugation à 200000 x g et 5 °C pendant 1h30 exactement. Cette centrifugation permet d'obtenir un culot contenant les fractions membranaires et un surnageant contenant le cytosol et du tampon de cassage.

xiii) Le surnageant est jeté (ou conservé selon les besoins), le culot rincé délicatement avec 500 µL de tampon de cassage, puis est ajouté 200 µL de tampon de cassage à l'aide d'un cône de 200 µL adapté sur une micropipette. Le culot est resuspendu d'abord par action mécanique de la pointe du cône, puis par aspiration-refoulement lents (il ne faut pas faire de bulles). Le cône est conservé **dans le tube** pour la suite. Ensuite, 2,8 mL de tampon de cassage sont ajoutés, (plus ou moins au jugé de l'expérimentateur en fonction de la taille du culot). Enfin, le fond du tube est soumis à des séries de 30 secondes d'ultrasons dans un bain à ultrasons, le cône restant dans le tube pendant la sonication, suivi d'une minute de pause sur la glace pendant laquelle la suspension est soumise à des aspirations-refoulements à l'aide du cône de 200 µL et de la micropipette. Habituellement, 10 à 15 séries de 30 secondes de sonication sont ainsi requises pour que l'aspect de la suspension soit homogène. Des expériences en microscopie électronique à balayage après cryofracture, (non présentées ici), montrent qu'il est extrêmement important de réaliser cette dernière étape de sonication avec beaucoup de soin.

xiv) La suspension de fractions membranaires est ensuite aliquotée (30 µL par aliquot) et stockée à -80 °C. Elle peut être conservée pendant environ 2 ans, après quoi il est fréquent d'observer l'apparition d'agrégats.

Cette technique de purification des neutrophiles a été éprouvée de nombreuses fois empiriquement et permet d'obtenir une haute pureté de leucocytes myéloïdes au repos. La technique de lyse des neutrophiles utilisée au laboratoire n'est pas la plus optimale puisqu'il y a un risque de lyse des granules, mais est une alternative efficace et économique, à défaut de posséder le matériel adéquat.

1.1.2. QUANTIFICATION DU CYTB₅₅₈ DANS LES FM PAR SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION

Connaître la concentration en Cytb₅₅₈ dans la suspension de fractions membranaires est nécessaire afin de normaliser sa quantité entre les différentes préparations, ce qui permet d'ajuster les concentrations relatives des autres constituants du système et comparer les résultats obtenus sur différentes préparations. La spectrophotométrie d'absorption UV-Visible, dont le principe est brièvement rappelé ci-après, est la technique utilisée pour déterminer cette concentration.

Un spectre d'absorption UV-Visible en solution correspond à l'absorbance de l'ensemble des constituants d'une solution, (*i.e.* le logarithme décimal du rapport entre l'intensité du faisceau incident et l'intensité du faisceau transmis), en fonction de l'énergie du faisceau incident, ou, (via la loi de Planck-Einstein et la simplification considérant que le milieu que traverse le faisceau est du vide), en fonction de sa longueur d'onde comprise entre environ 200 et 800 nm. Ainsi, par souci de simplicité, l'absorbance A sera représentée en fonction de la longueur d'onde λ tel que $A = f(\lambda)$, en précisant que le milieu d'étude est une solution aqueuse peu concentrée.

Comme indiqué précédemment, les fractions membranaires isolées des neutrophiles sont de petites vésicules d'environ 50 à 200 nm de diamètre contenant Nox2 et p22^{phox}. Ces vésicules étant de gros objets en suspension, ils rendent le milieu rapidement turbide par augmentation de leur nombre par unité de volume. Or, la concentration en Cytb₅₅₈ est déterminée par spectrophotométrie d'absorption UV-Visible à partir du spectre de différence du Cytb₅₅₈ réduit et du Cytb₅₅₈ oxydé. Par conséquent, le spectre d'absorption UV-Visible de la suspension, contenant du Cytb₅₅₈ réduit ou oxydé, contient la composante additionnelle liée à la turbidité. Le spectre de turbidité additionné au spectre du Cytb₅₅₈ réduit est, sauf coïncidence, toujours différent du spectre de turbidité additionné au spectre du Cytb₅₅₈ oxydé. De plus, la turbidité des suspensions varie en fonction des donneurs, des préparations et de l'expérimentateur. Ceci introduit potentiellement un biais important dans la mesure de la concentration en pouvant jouer sur l'**exactitude**, (i.e. la possibilité d'obtenir précisément une *valeur de concentration très proche de la concentration réelle dans l'absolu même avec un seul essai*), la **justesse** (i.e. la possibilité d'obtenir *en moyenne sur un nombre d'essais suffisamment grand une valeur moyenne proche de la concentration réelle dans l'absolu*) et la **fidélité**, (i.e. la possibilité d'obtenir *une valeur quelconque de la concentration, (proche ou pas de la concentration réelle), mais de façon reproductible sur un grand nombre d'essais*) des mesures.

Pour des mesures en système acellulaire, il est nécessaire de pouvoir comparer plusieurs préparations entre-elles, ce qui permet de déterminer des ratios similaires pour chaque préparation entre le Cytb₅₅₈ et les autres constituants du système, (protéines, AA, NADPH et éventuellement autres effecteurs). Par conséquent, **le point le plus important est la reproductibilité entre différentes préparations de fractions membranaires, (différents donneurs, différents expérimentateurs...), et donc la fidélité des mesures de concentration du Cytb₅₅₈.**

Dans un premier temps, sera succinctement donné le principe expérimental de la détermination de la concentration en Cytb₅₅₈ d'une suspension de FM en y introduisant ma façon de limiter expérimentalement la turbidité. Puis je détaillerai le traitement des spectres que j'ai instauré au laboratoire, permettant d'éliminer la turbidité des données et d'obtenir la concentration de façon fidèle entre les différentes préparations.

a. Spectres d'absorption UV-Visible des fractions membranaires de neutrophiles

Pour obtenir le spectre de différence du Cytb₅₅₈ réduit moins le Cytb₅₅₈ oxydé, nous utilisons des aliquots de fractions membranaires ayant subi un cycle de congélation-décongélation à -80 °C afin de se placer dans les mêmes conditions que n'importe quelle autre mesure sur ces FM. Les étapes suivantes sont réalisées :

- i)** La ligne de base du spectrophotomètre est faite entre 900 et 300 nm avec un pas de 0,25 nm sur des cuvettes en quartz de 200 µL contenant du PBS et 1 % final de détergent neutre *n*-dodécyl β-D-maltoside (DDM).
- ii)** Dans une cuvette identique, un volume choisi de PBS contenant le DDM doit être ajouté *au fond de la cuvette* pour éviter les biais liés aux pertes sur les parois de la cuvette. La FM doit être ajoutée directement dans la solution de PBS et de DDM en rinçant plusieurs fois le cône par aspiration-refoulement, ce qui permet aussi d'homogénéiser la suspension, dont l'homogénéité doit être vérifiée par mirage à travers la fenêtre de la cuvette. La FM doit être diluée au maximum deux fois pour obtenir des spectres de qualité suffisante. Le cône utilisé pour prélever la FM doit être conservé pour des mélanges futurs. Une incubation de 70 minutes à 22 °C cuvette close (Parafilm®) est ensuite

réalisée pour solubiliser les membranes et limiter la turbidité en mélangeant toutes les 10 minutes environ par aspiration-refoulement avec le même cône.

iii) Après avoir mélangé la suspension par aspiration-refoulement avec le même cône en évitant les bulles, le spectre d'absorption du Cyt_{b558} oxydé est alors réalisé entre 900 et 300 nm avec un pas de 0,25 nm.

iv) Quelques grains, (très peu, comptables facilement), de dithionite de sodium, permettant de réduire la FM, (371–375), sont alors ajoutés à la suspension de FM+DDM en faisant attention à ce qu'ils tombent directement dans la suspension. Un mélange par aspiration-refoulement avec le même cône que précédemment est alors nécessaire et la vérification de l'homogénéité par mirage à travers la fenêtre de la cuvette est indispensable. Ensuite le spectre d'absorption du Cyt_{b558} réduit est réalisé entre 900 et 300 nm avec un pas de 0,25 nm. Un deuxième ajout de dithionite de sodium peut être réalisé pour confirmer la réduction, mais en pratique cela a été montré comme étant inutile voire nuisible, causant une forte augmentation de la turbidité qui gêne les mesures.

Je détaillerai ensuite les traitements post-expérimentaux utilisés pour obtenir une concentration de façon fidèle à chaque nouvelle préparation de FM.

b. Traitements post-expérimentaux des spectres UV-Visibles de FM de neutrophiles

Afin de faciliter la compréhension de ces traitements de données, le lecteur pourra s'aider de la **Figure III-7**, première figure de la partie résultats.

Par spectrophotométrie d'absorption UV-visible la composante spectrale turbidité d'un milieu a une allure caractéristique. En effet, dans un milieu turbide, la lumière transmise croît de plus en plus en fonction de l'augmentation de la longueur d'onde. Ce qui renvoie un spectre d'absorption de plus en plus décroissant avec l'augmentation de la longueur d'onde, additionné aux bandes d'absorptions spécifiques. Il faut noter que l'absorption UV-Visible en phase liquide n'est rigoureuse que pour des milieux homogènes non turbides, les suspensions nécessitant plutôt l'utilisation de la notion de turbidité mesurée par néphélométrie. La notion d'absorption est donc ici utilisée par souci de simplification.

En pratique, la composante turbidité des spectres d'absorption de la FM oxydée ou réduite est toujours très marquée. L'optimisation de la concentration en DDM à 1 % et du temps d'incubation à au moins 70 minutes a permis de réduire significativement la turbidité, mais pas totalement et il existe toujours des différences entre les différentes préparations et entre les spectres de la FM oxydée ou réduite. Ceci implique en pratique que l'incurvation liée à la turbidité se répercute dans le spectre de différence. Il est donc indispensable de minimiser au mieux cette différence de turbidité pour obtenir une valeur de concentration fidèle entre différentes préparations.

J'ai donc cherché par régression non linéaire un ajustement de la composante turbidité des spectres de FM réduites ou oxydées afin d'annuler l'effet de la turbidité et en particulier les différences qui existent entre les spectres des FM réduites ou oxydées. Compte-tenu de l'allure des courbes, il m'a semblé qu'une fonction proche de la fonction inverse serait adaptée. Après de nombreux essais, j'ai pu déterminer un protocole efficace qui nécessite cependant un ordinateur moderne afin que les ajustements soient faisables dans des temps raisonnables. J'ai utilisé le logiciel « Scientific Data Analysis and Visualization » (SciDAVis). Le protocole est décrit ci-après :

i) La turbidité des spectres des FM réduites ou oxydées a été ajustée par régression non linéaire à l'aide de la fonction f d'équation :

$$f(x) = a_0 + \frac{a_1}{x^{p_1}} + \frac{a_2}{x^{p_2}} + \dots + \frac{a_i}{x^{p_i}} + \dots + \frac{a_k}{x^{p_k}}$$

Où $a_i, p_i \in \mathbb{R}$ sont des paramètres. Les indices sont silencieux et tels que $i \in \mathbb{N}$ et $0 < 1 < 2 < \dots < i < \dots < k$.

La régression non linéaire est généralement faite entre 900 et environ 450 nm afin de maximiser la prise en compte de la turbidité tout en minimisant la prise en compte des bandes d'absorption spécifique. Cette régression peut se faire en utilisant différents algorithmes, en général les algorithmes Simplex Nelder-Mead ou Levenberg-Marquardt (non normalisé) ont permis d'obtenir de bons résultats. Le critère pour une régression réussie est un coefficient de régression non linéaire au moins égal à $r^2 = 0.99$ et une allure très proche de la turbidité observée visuellement sur le spectre et qui respecte au mieux la base, (par valeurs supérieures ou inférieures), des bandes d'absorption spécifique. En plus de l'ajustement de la turbidité globale, un soin particulier doit être apporté pour s'assurer que la courbe expérimentale est superposée au spectre avant et après les bandes d'absorption spécifique autour de 411 et 427 nm.

Comme l'ajustement doit être vérifié à l'œil, (et non mathématiquement), celle-ci dépend de l'échelle choisie et de la taille du graphique, donc pour pouvoir juger de la qualité de l'ajustement et donc de la pertinence des résultats, il est indispensable de préciser l'échelle utilisée et la taille de l'écran. J'ai systématiquement fait ces vérifications en gardant une échelle entre 370 et 900 nm en abscisse et l'échelle correspondante la mieux ajustée en ordonnée, dans une fenêtre ajustée sur un écran de taille approximative de 19,5 cm de haut et 34,5 cm de large.

Si la régression est difficile à réaliser, il peut être nécessaire de changer l'algorithme entre deux séries d'itérations, sachant qu'en général, entre 10000 et 150000 itérations peuvent être nécessaires pour obtenir un résultat acceptable. Il est aussi possible de changer les valeurs initiales des paramètres ou encore le nombre de termes, donc le nombre de paramètres. Habituellement, 2 à 8 termes peuvent être utilisés mais plus il y a de termes, plus cela prendra de temps pour atteindre la convergence, (le plus souvent, j'ai utilisé une valeur de k entre 2 et 8).

L'unique objectif de cette procédure est d'obtenir le meilleur ajustement possible de la composante turbidité pour l'éliminer des données expérimentales. Ceci en ignorant totalement la réalité physique de ces ajustements.

ii) La composante turbidité de chacun des spectres est soustraite afin d'obtenir le spectre corrigé de la FM oxydée et le spectre corrigé de la FM réduite.

iii) L'absorbance à 900 nm est soustraite, ('faire le zéro'), à chacun des spectres afin d'avoir une valeur d'absorbance nulle à 900 nm.

iv) Le spectre de différence est calculé en soustrayant le spectre corrigé de la FM oxydée au spectre corrigé de la FM réduite.

v) Sur ce spectre de différence 'Red-Ox', calculer la différence, $\Delta A_{\text{Red-Ox}}$, entre le maximum d'absorbance noté A_{Red} vers 427 nm et le minimum d'absorbance noté A_{Ox} vers 411 nm. Les bandes étant étroites, la longueur d'onde

du maximum et celle du minimum peuvent dépendre quelque peu du spectrophotomètre, notamment à cause de sa bande passante. Ainsi, dans ce cas particulier, je considère qu'une différence de 1 nm n'est pas significative à moins d'avoir un spectrophotomètre avec une bande passante strictement sous 0,5 nm.

vi) La concentration en Cyt_{b558}, notée [Cyt_{b558}] (mol·L⁻¹), dans la suspension de fractions membranaires est calculée en utilisant l'équation déduite de la loi de Beer-Lambert :

$$[\text{Cyt}_{b558}] = F_D \cdot \frac{\Delta A_{\text{Red-Ox}}}{\ell \cdot \Delta \epsilon_{\text{Red-Ox}}}$$

Où F_D, ici (F_D = 1,42), est le facteur de dilution de la suspension de FM, Δε_{Red-Ox} le coefficient d'extinction molaire du Cyt_{b558} égal à la différence entre le coefficient d'extinction molaire à 427 nm de la forme réduite et le coefficient d'extinction molaire à 411 nm de la forme oxydée. Soit, Δε_{Red-Ox} = 2.0 · 10⁵ M⁻¹ · cm⁻¹. ℓ est le trajet optique en cm, ici (ℓ = 1,0 cm).

L'utilisation des spectres d'absorption UV-Visible ainsi que des traitements expérimentaux seront détaillés dans la partie résultat à travers un exemple caractéristique (**Figure III-7**).

1.2. PREPARATION DES PROTEINES CYTOSOLIQUES RECOMBINANTES P67^{PHOX}, P47^{PHOX} ET RAC1Q61L

Les protéines cytosoliques p67^{phox}, p47^{phox} et Rac1Q61L utilisées sont toutes produites de façon recombinante, surexprimées par *Escherichia coli*. L'avantage de la mutation Q61L de Rac1 est qu'elle permet d'obtenir Rac1 dans sa conformation active, ce qui correspond à Rac1 ayant fixé un GTP, mais sans avoir besoin d'ajouter du GTP. Cela facilite beaucoup les expériences et au laboratoire nous utilisons donc la protéine Rac1Q61L. Dans cette partie, je décris brièvement les différentes étapes permettant de produire et de purifier ces protéines.

1.2.1. PRODUCTION DANS *E. COLI* DES PROTEINES CYTOSOLIQUES HUMAINES RECOMBINANTES

L'ensemble des milieux de culture solide ou liquide utilisés contiennent 100 µg·mL⁻¹ d'ampicilline, un antibiotique permettant la sélection clonale.

i) Les souches *Escherichia coli* BL21 ont été transformées avec le plasmide contenant le gène codant pour la protéine à produire ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline. Des suspensions stocks de bactéries transformées ont alors été aliquotées puis conservées à -80 °C dans du milieu de culture Lysogeny Broth (LB) contenant 50 % en volume de glycérol pour des productions futures plus rapides.

ii) Les bactéries transformées ont alors été isolées sur milieu LB solide et une sélection clonale a été réalisée après 20 h d'incubation à 37 °C.

iii) Une préculture dans 60 mL de milieu LB liquide à partir d'un clone unique bien isolé a été réalisée à 37 °C pendant environ 15 h avec une agitation elliptique à 180 rotations par minute (rpm).

iv) Ensuite, 1,5 L de milieu de culture liquide Terrific Broth (TB, dans un Erlenmeyer à encoches de 5 L), préchauffé à 37 °C, a été inoculé avec 15 mL de préculture, puis incubé à 37 °C avec une agitation elliptique à 140 rpm pendant

3 h, jusqu'à l'obtention d'une turbidité correspondant à une absorbance de 0,6 à 600 nm dans un spectrophotomètre d'absorption UV-visible avec un trajet optique de 1 cm à 37 °C avec comme référence le milieu de culture.

v) Lorsque la turbidité est suffisante, 0,5 mM d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside a été ajouté, permettant l'induction du promoteur de l'opéron lactose et donc l'expression de la protéine d'intérêt dont le gène codant est présent dans le plasmide avec lequel les bactéries ont été transfectées. Le milieu a été alors incubé à 20 °C pendant environ 20 h avec une agitation elliptique à 140 rpm.

vi) Une centrifugation, (6200 x g, 20 minutes, température ambiante), du milieu de culture a ensuite permis de collecter un culot de bactéries ayant exprimé la protéine d'intérêt. Ce culot est congelé à -20 °C dans un pot adapté pour stockage jusqu'à plusieurs années.

1.2.2. PURIFICATION DES PROTEINES CYTOSOLIQUES HUMAINES RECOMBINANTES

Les protéines cytosoliques p67^{phox}, p47^{phox} et Rac1Q61L ont toutes été purifiées par chromatographie échangeuse d'ions puis par chromatographie d'affinité en suivant les étapes ci-dessous qui se passent toutes à une température inférieure à 5 °C :

i) Le culot bactérien a été décongelé et resuspendu dans un tampon adapté pour l'extraction des protéines en limitant la protéolyse (Tampon : 50 mM acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique (HEPES), 200 mM NaCl, 1 mM éthylène diamine tétraacétate (EDTA) pH 7,5 supplémenté extemporanément avec 1 mg de DNase, 2 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) et 1 mg de dithiothreitol (DTT) dans 50 mL).

ii) Une pré-lyse des bactéries a été réalisée dans un broyeur Potter-Elvehjem, puis la lyse est achevée par sonication. Pour cela, les bactéries ont subi trois à quatre cycles de 2 minutes de sonication et 2 minutes de mélange sur glace. Les deux minutes de sonication consistent en 120 cycles de 500 ms de sonication à une puissance d'environ 5, (ajustée plus précisément au jugé en fonction du rendu sonore au moment de l'expérience), et de 500 ms de repos.

iii) Les débris bactériens et les corps d'inclusion ont ensuite été éliminés par ultracentrifugation (160000 x g, 90 minutes).

iv) Le surnageant a été filtré à travers un filtre stérile muni de pores de 0,22 μ m de diamètres pour éliminer les bactéries et autres composants insolubles potentiellement présents dans le surnageant.

v) La solution ainsi obtenue a ensuite été diluée deux fois dans du Tampon A : 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH 7,5 pour p67^{phox} (point isoionique, PI égal à 6,3) ou pH 7 pour p47^{phox} (PI égal à 9,2) et Rac1Q61L (PI égal à 7,9). Ensuite, a été réalisée une chromatographie échangeuse d'anions (Q-sepharose FF) pour p67^{phox} anionique à pH 7,5, ou échangeuse de cations (SP-Sepharose FF) pour p47^{phox} et Rac1Q61L qui sont cationiques à pH 7. L'élution a été réalisée en présence de 550 mM de NaCl en mélangeant un volume de tampon A et un volume de Tampon B : 20 mM HEPES, 1 M NaCl, 1 mM PMSF, pH 7,5 pour p67^{phox} ou pH 7 pour p47^{phox} et Rac1Q61L.

vi) La présence et la pureté de la protéine d'intérêt dans les fractions collectées a été rapidement contrôlée par électrophorèse Sodium Dodécyl Sulfate (SDS)-page. La concentration en protéines, ainsi que le rapport entre la quantité de protéines et d'Acide Désoxyribonucléique (ADN) ont été évalués approximativement par spectrophotométrie d'absorption UV à 280 nm et 260 nm à l'aide d'un Nanodrop.

vii) Pour p67^{phox} et p47^{phox} possédant un tag 6 histidines, l'éluât a ensuite été dilué deux fois dans du Tampon N1 : 30 mM phosphate de sodium, 0,7 M NaCl, 30 mM imidazole, 1 mM PMSF pH 7,5, puis a subi une chromatographie d'affinité à effecteur Nickel (Ni-Sepharose) avec un lavage en présence de 20 mM d'imidazole, (mélange d'un volume du tampon N1 et d'un volume du Tampon N2 : 30 mM phosphate de sodium, 0,1 M NaCl, 10 mM imidazole, 1 mM PMSF pH 7,5, et une élution en présence de 300 mM d'imidazole (30 mM phosphate de sodium, 0,1 M NaCl, 300 mM imidazole, 1 mM PMSF pH 7,5). Pour Rac1Q61L possédant un tag Glutation-S-Transférase (GST), l'éluât a été dilué deux fois dans du Tampon Phosphate Salin (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) contenant 1 mM PMSF, puis a subi une chromatographie d'affinité à effecteur glutathion (GST-Sepharose), avec un lavage par du PBS contenant 1 mM PMSF et une élution avec un tampon 50 mM tris(hydroxyméthyl)aminométhane-HCl, 10 mM glutathion réduit pH 8,0.

viii) La présence et la pureté de la protéine d'intérêt dans les fractions collectées a été rapidement contrôlée par électrophorèse SDS-page. La concentration, ainsi que le rapport entre la quantité de protéine et d'ADN ont été évalués approximativement par spectrophotométrie d'absorption UV à 280 nm et 260 nm à l'aide d'un Nanodrop.

ix) Les fractions protéiques intéressantes ont ensuite été choisies puis mises en commun, (entre 10 et 25 mL le plus souvent), et enfin dialysées dans 5 L de tampon 30 mM phosphate de sodium et 0,15 M NaCl pH 7,5.

x) Une évaluation de la pureté par SDS-page et une approximation de la concentration à 280 nm par spectrophotométrie d'absorption avec le Nanodrop ont été réalisées.

xi) Enfin, les solutions ont été aliquotées par fractions de 50 à 75 µL selon la concentration, (qui ne doit pas excéder 3 mg/mL pour éviter les risques de précipitation), puis stockées à -80 °C jusqu'à environ 2 ans, (après quoi certains stocks présentent des précipités protéiques).

2. Suivi de la cinétique de la réaction catalysée par NOX2

L'enzyme NOX2 étant un catalyseur, son étude nécessite obligatoirement de déterminer exactement, ou au moins de façon juste, la vitesse à laquelle elle réalise la catalyse de sa réaction. Il s'agit de l'élément central de ce chapitre. Je décrirai d'abord quelques aspects généraux permettant de comprendre cette quantification et de définir la nomenclature qui sera utilisée dans la suite. Enfin, je décrirai les différentes expériences réalisées et les traitements mathématiques systématiquement appliqués pour obtenir les résultats quantitatifs.

2.1. PRINCIPES DE LA QUANTIFICATION DE LA VITESSE DE CATALYSE ET CONVENTIONS D'ECRITURE

La mesure de la concentration molaire d'un réactif ou d'un produit à différents temps au cours d'une réaction permet de mesurer sa progression, aussi appelée cinétique. La définition de ce dernier terme est cependant mal décrite, certains parlent de cinétique pour évoquer la progression d'une réaction en fonction du temps, d'autres pour évoquer la progression de la vitesse de la réaction en fonction du temps. Ici, je choisis arbitrairement de définir le mot « cinétique » dans le sens de « progression » de la réaction. La cinétique de la réaction catalysée par NOX2 peut être suivie :

- i) En mesurant la concentration d'un réactif ou substrat de l'enzyme, en l'occurrence le NADPH ou le dioxygène,
- ii) En mesurant la concentration d'un produit, en l'occurrence le O₂⁻ ou le NADP⁺, (voire le H⁺).

Deux fonctions, f et g , découlent de ces mesures. Je les noterai $[S]=f(t)$ ou $[P]=g(t)$, où S est le substrat, P est le produit et t est le temps. Si la progression de la réaction a été mesurée jusqu'à consommation totale d'un substrat ou jusqu'à l'établissement d'un équilibre thermodynamique, la représentation graphique de l'ensemble des points en fonction du temps s'appelle la cinétique globale.

La dérivée de la fonction f par rapport au temps $\frac{d[S]}{dt} = f'(t)$ et la dérivée de la fonction g par rapport au temps $\frac{d[P]}{dt} = g'(t)$ donne respectivement la vitesse de transformation d'un substrat et la vitesse de formation d'un produit à chaque instant de la réaction.

La vitesse à un instant t d'une réaction chimique catalysée par une enzyme peut être rapportée à la concentration molaire en cette enzyme. Cette valeur est appelée activité spécifique moléculaire (ASM) et donnée en s^{-1} . **Lorsque la concentration de l'ensemble des substrats est infinie, (ou expérimentalement très grande par rapport à la pseudoconstante d'affinité de chacun des substrats pour l'enzyme), et qu'il n'y a pas de réaction retour, l'ASM correspond à la constante catalytique k_{cat} et s'exprime en s^{-1} . Sauf exception, j'utiliserai exclusivement l'activité spécifique moléculaire, notée ASM, pour quantifier l'activité de NOX2.**

2.2. PRINCIPES DES TECHNIQUES DE MESURE DE LA PROGRESSION DE LA REACTION

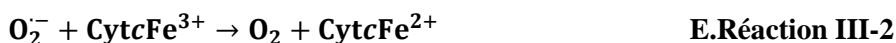
Comme décrit précédemment, trois observables ont été utilisées pour étudier la réaction catalysée par NOX2 : le Cyt c , (sonde pour O_2^-), le NADPH ou le O_2 . Je décris ici les différents principes de mesure de ces observables.

2.2.1. MESURE DES ANIONS SUPEROXYDE : OBSERVABLE CYTOCHROME C

Le Cytochrome c (Cyt c) est une protéine très hydrosoluble d'environ 12 kDa contenant un hème de type c dont la porphyrine de type IX a l'originalité d'être covalamment liée à l'apoprotéine via deux groupements thioéther, impliquant deux cystéines de l'apoprotéine et les deux groupements allyles de la porphyrine. Le Cyt c de forme oxydée, dit ferricytochrome c , noté Cyt $c(Fe^{3+})$ peut capter un électron pour donner le Cyt c de forme réduite, dit ferrocyclochrome c , noté Cyt $c(Fe^{2+})$. Le fer du Cyt $c(Fe^{3+})$ est hexacoordiné (octaédrique) et bas-spin, (en dessous de 60 °C), et ses ligands axiaux sont une histidine et une méthionine, cette dernière étant très stable pour le Cyt $c(Fe^{2+})$ mais labile pour le Cyt $c(Fe^{3+})$ par augmentation de la température ou du pH ou encore pouvant être facilement remplacée par CN^- , N_3^- ou l'imidazole (**Figure VI-2** et (376–379)). La forme réduite du Cyt c a une bande d'absorption spécifique à 550 nm, d'absorbance beaucoup plus importante que l'absorbance de la forme oxydée à la même longueur d'onde.

Le potentiel standard d'oxydoréduction du couple redox Cyt $cFe^{3+}/Cyt\ cFe^{2+}$ est $E^0(Cyt\ cFe^{3+}/Cyt\ cFe^{2+}) = 0,26$ V contre l'électrode normale à hydrogène (ENH), à 25 °C et pH 7 et force ionique 0,1 M (182, 380–385). Or, le potentiel standard d'oxydoréduction du couple redox O_2/O_2^- , est $E^0(O_{2(aq)}/O_2^-) = -0,16$ V contre ENH, à 25 °C et pH 7 (182, 188, 189, 368, 380, 381, 386). Donc $E^0(Cyt\ cFe^{3+}/Cyt\ cFe^{2+}) > E^0(O_{2(aq)}/O_2^-)$, et par conséquent, dans les conditions standards, la réaction de réduction de Cyt cFe^{3+} par O_2^- est thermodynamiquement possible et suit

l'équation **E.Réaction III-2**. Cette réaction est purement hypothétique et à ma connaissance son existence n'a jamais été démontrée dans la littérature ; il est donc seulement possible d'affirmer que les anions superoxyde réduisent effectivement le Cyt_c mais pas de donner le devenir de O₂⁻ (351, 365, 368, 378, 380, 387, 388). De plus, il a été montré que la constante cinétique d'ordre 2 de la réaction de Cyt_cFe³⁺ avec O₂⁻ a pour valeur $k = 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (365–368, 388) à pH 7,2, force ionique 4 mM et 21 °C. D'autre part, l'avantage du Cyt_c est qu'il est très spécifique des anions superoxyde comme cela est montré par l'ajout de superoxyde dismutase (SOD) qui capte les anions superoxyde plus vite que le Cyt_c et diminue d'au moins 95 % la vitesse de réduction du Cyt_c, (dépend de la concentration en SOD qui reste en compétition avec le Cyt_c).



Ainsi, la réduction du Cyt_c par les anions superoxyde permet en théorie de suivre la cinétique de production des anions superoxyde produits par NOX2. Ce suivi se fait à 550 nm en utilisant le coefficient d'extinction molaire différentiel à 550 nm du Cyt_c, égal à son coefficient d'extinction molaire sous forme réduite, $\epsilon_{\text{Cyt}_c\text{Fe}^{2+}}^{550\text{nm}}$, moins son coefficient d'extinction molaire sous forme oxydée, $\epsilon_{\text{Cyt}_c\text{Fe}^{3+}}^{550\text{nm}}$. Alors, $\Delta\epsilon_{\text{Red-Ox}}^{550\text{nm}} = \epsilon_{\text{Cyt}_c\text{Fe}^{2+}}^{550\text{nm}} - \epsilon_{\text{Cyt}_c\text{Fe}^{3+}}^{550\text{nm}} = 2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ mesuré dans du tampon phosphate 0,05 M pH 7,6 (température non fournie) (383, 388, 389). Dans la partie résultat, je donnerai quelques précisions sur l'origine des bandes d'absorption des porphyrines de fer, ce qui permettra au lecteur intéressé de mieux comprendre la raison des variations d'intensité et des décalages de longueurs d'ondes maximales des bandes d'absorption entre une forme oxydée et une forme réduite. La détermination de la concentration en Cyt_c fait intrinsèquement partie de l'étude méthodologique réalisée dans ce premier chapitre et sera donc décrit comme un résultat à part entière.

A tout instant, l'activité spécifique moléculaire (ASM) apparente de NOX2 déduite de la vitesse de réduction du Cyt_c par les anions superoxyde ($\text{ASM}_{\text{Cyt}_c}^{\text{app}}$) peut être calculée à l'aide de l'équation :

$$\text{ASM}_{\text{Cyt}_c}^{\text{app}} = \frac{d[\text{Cyt}_c]}{dt \cdot \ell \cdot [\text{Cyt}_{b558}]} = \frac{dA^{550}}{dt \cdot \Delta\epsilon_{\text{Red-Ox}}^{550} \cdot \ell \cdot [\text{Cyt}_{b558}]}$$

Avec [Cyt_c] la concentration en Cyt_c (M), t le temps (s), [Cyt_{b558}] la concentration en Cyt_{b558} (M), A⁵⁵⁰ l'absorbance à 550 nm, ℓ le trajet optique (m).

La valeur de l'ASM_{Cyt_c}^{app} correspond théoriquement au nombre d'électrons transférés par NOX2 par unité de temps si et seulement si la stœchiométrie de la réaction est réelle et qu'il n'y a pas de problème de détection.

2.2.2. MESURE DE LA CONSOMMATION DU NADPH : OBSERVABLE NADPH

Le NADPH est un des réactifs de la réaction catalysée, il s'agit encore d'un cosubstrat de NOX2, (*i.e.* un cofacteur enzymatique organique lié à l'enzyme par des interactions autres que covalentes en tant que coenzyme). Il possède une bande d'absorption spécifique à 340 nm que ne possède pas le NADP⁺, partenaire du couple redox biélectronique NADP⁺/NADPH. Cette absorption spécifique est due aux transitions électroniques que peut subir le système

d'électrons π (électrons impliqués dans les liaisons doubles) du noyau nicotinamide réduit, très différent du noyau nicotinamide oxydé (**Figure III-4**).

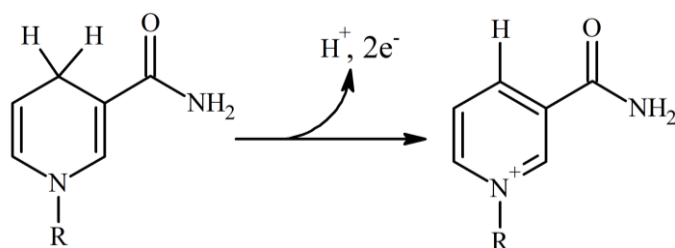


Figure III-4. Noyau nicotinamide réduit à gauche et oxydé à droite.
La lettre R correspond au reste de la molécule de NADPH.

Il est donc très facile de suivre la progression de la réaction en fonction du temps en mesurant la diminution de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps, en utilisant idéalement des cuvettes en quartz ou à défaut en polyméthacrylate de méthyle (PMMA). Le coefficient d'extinction molaire du NADPH à 340 nm est compris entre 6200 et 6300 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ (390, 391) et j'ai arbitrairement choisi d'utiliser 6300 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$. Les solutions de NADPH doivent être faites extemporanément dans l'eau ultra pure (et non pas dans du tampon), afin de maximiser sa stabilité (392). La concentration en NADPH de la solution doit être vérifiée par spectrophotométrie d'absorption et il est aussi nécessaire de vérifier la pureté du NADPH et en particulier son intégrité, (absence de dégradation), en mesurant le rapport entre l'absorbance à 260 nm et l'absorbance à 340 nm qui doit être proche de 2,33 (392, 393), en pratique je trouve entre 2,33 et 2,40 juste après la solubilisation et j'accepte d'utiliser le NADPH lorsque la solution est associée à cette fourchette de rapports.

A tout instant, l'ASM apparente de NOX2 déduite de la vitesse d'oxydation du NADPH (ASM_{NADPH}^{app}) est donnée par l'équation :

$$ASM_{NADPH}^{app} = -2 \cdot \frac{d[NADPH]}{dt \cdot \ell \cdot [Cytb_{558}]} = -2 \cdot \frac{dA^{340}}{dt \cdot \varepsilon^{340NADPH} \cdot \ell \cdot [Cytb_{558}]}$$

Avec [NADPH] la concentration en NADPH (M), t le temps (s), [Cytb₅₅₈] la concentration en Cytb₅₅₈ (M), A^{340} l'absorbance à 340 nm, ℓ le trajet optique (m).

Il est très important de noter que l'activité spécifique moléculaire calculée est ici multipliée par deux et correspond donc théoriquement au nombre d'électrons transférés par NOX2 par unité de temps si et seulement si la stœchiométrie de la réaction est réelle et qu'il n'y a pas de problème de détection. Ainsi, dans des conditions identiques, si la stœchiométrie de la réaction est réelle et qu'il n'y a pas de problème de détection, l' ASM_{NADPH}^{app} doit être égale à l' ASM_{Cytc}^{app} .

2.2.3. MESURE DE LA CONSOMMATION DU DIOXYGENE : OBSERVABLE O_2

Le dioxygène est un réactif de la réaction catalysée, il s'agit d'un substrat de NOX2. L'oxymétrie par électrochimie est une méthode facile à mettre en œuvre permettant de mesurer en continu la concentration en dioxygène en fonction du temps. Pour cela, j'utilise une chambre isotherme isochore contenant une électrode de

Clark combinant une électrode d'argent et une électrode de platine, l'électrode d'argent étant polarisée à 700 mV par rapport à l'électrode de platine. Le pont salin reliant les deux électrodes est constitué de chlorure de potassium 3 M, ce qui permet d'assimiler l'électrode d'argent à une électrode AgCl/Ag dont le potentiel redox standard est bien connu. Les couples redox impliqués sont notamment AgCl/Ag, avec un potentiel redox standard de $E^0(\text{AgCl}/\text{Ag}) = 209 \text{ mV}$ par rapport à l'Electrode Normale à Hydrogène (ENH) à 25 °C et à pH 7 ainsi que O_2/HO^- , avec un potentiel redox standard de $E^0(\text{O}_2/\text{HO}^-) = 0,401 \text{ mV}$ (182).

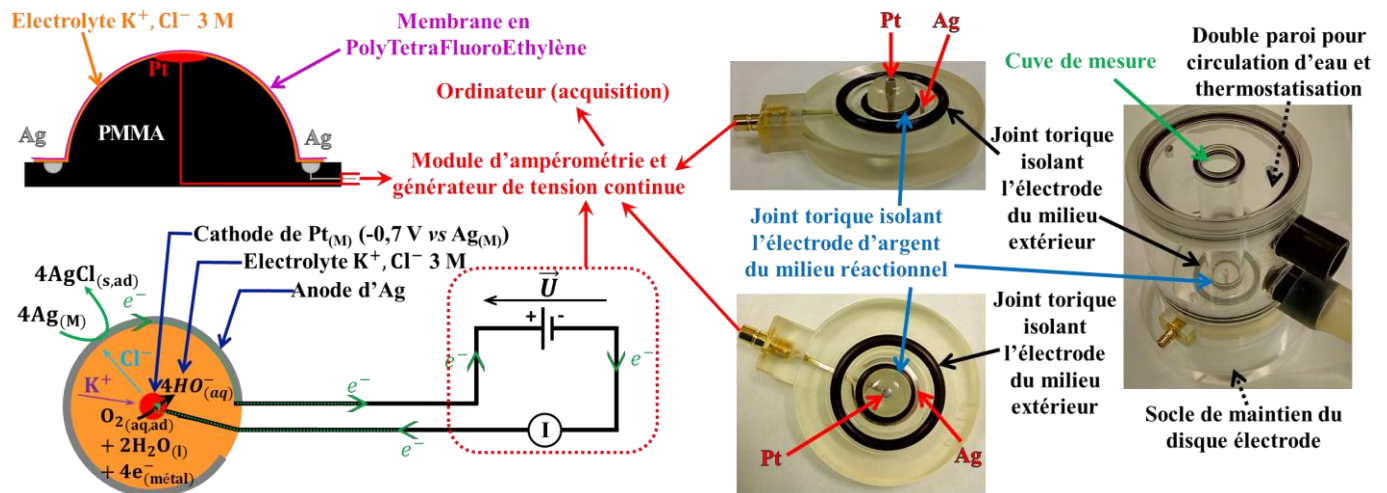


Figure III-5. Schémas de principe et photos du système de mesure du dioxygène par électrochimie.

Disque-Electrode de Clark coupe de profil, (en haut à gauche), schéma de principe de son fonctionnement vu de dessus, (en bas à gauche). Photo du disque-électrode de Clark vu de trois-quart en haut au milieu, vu du dessus en bas au milieu. Photo du disque-électrode de Clark associé à la cuve de mesure et à la chambre de thermostatisation à droite. Définition des indices : M : métal ; aq : aqueux ; ad : adsorbé ; l : liquide ; s : solide. \bar{U} est la différence de potentiel imposée aux électrodes d'Ag et de Pt. I est l'intensité mesurée.

Ainsi, la différence de potentiel de 700 mV ($\|\bar{U}\|$) entre l'électrode d'argent et l'électrode de platine permet de réaliser l'électrolyse du dioxygène, dont le courant résultant, I, est mesuré. Un schéma de l'électrode utilisée ainsi que le principe global de la mesure sont présentés en **Figure III-5**. Il est bon de noter que la consommation du dioxygène par l'électrode est extrêmement faible et non significative dans le cas de variations de l'ordre du micromolaire.

Le courant généré par l'électrolyse du dioxygène à ce potentiel est directement proportionnel à la concentration en dioxygène (394, 395). Ainsi, l'électrode de Clark peut être facilement étalonnée à une température donnée en utilisant : *i*) le tampon de mesure agité exempt de dioxygène, ce qui correspond au courant minimum mesuré par l'électrode de Clark, le zéro de dioxygène. *ii*) le tampon de mesure agité à l'équilibre avec l'atmosphère à une pression atmosphérique mesurée précisément, ce qui correspond à un courant constant mesuré par l'électrode de Clark. En effet, la concentration en dioxygène dans une solution aqueuse à une température donnée, une salinité donnée et en équilibre avec l'atmosphère à une pression atmosphérique donnée est bien connue (396, 396). L'électrode de Clark ainsi étalonnée renvoie directement la concentration en dioxygène du milieu à chaque instant.

A tout instant, l'ASM apparente de NOX2 déduite de la vitesse de réduction du dioxygène ($\text{ASM}_{\text{O}_2}^{\text{app}}$) est donnée par l'équation :

$$ASM_{O_2}^{app} = -\frac{d[O_2]}{dt \cdot [Cytb_{558}]}$$

Avec $[O_2]$ la concentration en O_2 (M), t le temps (s), $[Cytb_{558}]$ la concentration en $Cytb_{558}$ (M).

La valeur de $ASM_{O_2}^{app}$ correspond théoriquement au nombre d'électrons transférés par NOX2 par unité de temps si et seulement si la stœchiométrie de la réaction est réelle et qu'il n'y a pas de problème de détection. Ainsi, dans des conditions identiques, si la stœchiométrie de la réaction est réelle et qu'il n'y a pas de problème de détection, l' $ASM_{O_2}^{app}$ doit être égale à l' ASM_{Cytc}^{app} et à ASM_{NADPH}^{app} . Dans la suite, ces notations pourront être allégées, l'exposant 'app' pourra être sous-entendu et lorsqu'il n'y aura pas d'ambiguïté l'indice indiquant l'observable pourra aussi être sous-entendu.

2.3. DEROULEMENT D'UNE EXPERIENCE DE MESURE DE LA CINETIQUE DE LA REACTION

Avant une expérience, l'ensemble des solutions de protéines et des suspensions de FM doit être décongelé lentement sur la glace en étant protégé de la lumière.

2.3.1. PAR SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION

Le tampon de mesure est du PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) supplémenté avec 10 mM de $MgSO_4$ qui permet d'obtenir une meilleure activité enzymatique. Il est préparé jusqu'à 1 mois avant la mesure et filtré avec un filtre de diamètre de pores 0,22 μm avant d'être stocké à 4 °C dans une bouteille en verre, ou aliquoté par fractions de 30 mL dans des tubes Falcon® de 50 mL. Pendant la mesure, tous les produits, excepté le tampon, sont conservés dans la glace, protégés de la lumière par un papier d'aluminium. En effet, empiriquement le NADPH et l'AA se dégradent beaucoup plus vite lorsqu'ils sont exposés à la lumière. De plus, les tubes fluorescents utilisés au Laboratoire de Chimie Physique (LCP) pour l'éclairage des laboratoires sont des lampes à décharge à base de mercure, qui libèrent donc des ultraviolets, (UV), supposés être tous convertis en longueurs d'ondes du visible par le revêtement fluorescent. En pratique, tous les rayons UV ne sont pas filtrés et j'ai constaté que le NADPH et l'AA se dégradent plus vite, (activité moindre même en changeant tous les autres composants du système acellulaire), lorsqu'ils ne sont pas protégés. En outre, une autre équipe du laboratoire a constaté que certaines protéines sont très sensibles à ces rayons UV ce qui suggère que beaucoup de molécules pourraient en être altérées, même à travers le plastique d'un tube. De plus, au laboratoire nous évitons l'utilisation de cônes autoclavés pour limiter les risques de pollution de la surface du plastique liés au chauffage, par exemple par diffusion d'adjuvants utilisés pour la polymérisation du plastique.

i) Au minimum 30 minutes avant une mesure d'activité, il est indispensable de mettre le tampon à la température de mesure et de l'agiter fortement fréquemment pendant ce temps d'incubation à température de mesure. En effet, la température joue beaucoup sur la concentration en dioxygène ce qui pourrait introduire un biais dans les mesures. De plus, la température de mesure étant supérieure à la température du tampon stocké, des bulles ont tendance à se former

au cours du temps qui perturbent la mesure spectrophotométrique et cet effet n'existe pas si le tampon est à l'équilibre thermique et à l'équilibre gazeux avec l'atmosphère.

ii) Si les mesures prévoient de suivre la réduction du Cyt_c, la concentration désirée de Cyt_c est ajoutée extemporanément dans le tampon incubé à température de mesure.

iii) Après ajout du tampon supplémenté ou non avec du Cyt_c, sont ajoutés dans cet ordre et le plus rapidement possible, les différents constituants du système acellulaire : la FM (4 nM), p67^{phox} (200 nM), p47^{phox} (200 nM), Rac1Q61L (200 nM), AA (variable). Pour choisir les concentrations en protéines cytosoliques, il est possible de fixer la concentration en p67^{phox} et en Rac1Q61L, puis de faire varier la concentration en p47^{phox} jusqu'à atteindre une concentration saturante. L'inconvénient est que si la concentration de p67^{phox} est changée par rapport à la concentration de Rac1Q61L, la concentration saturante de p47^{phox} change. En outre, un excès de Rac1Q61L provoque une absence d'effet de p47^{phox} même à forte concentration. En pratique au laboratoire, le ratio 1:1:1 entre les trois protéines cytosoliques permet à p47^{phox} d'augmenter d'environ 30 % l'activité enzymatique de NOX2 en comparaison du système activé par les seules p67^{phox} et Rac1Q61L aux incertitudes près (pureté, concentration, nativité). Une concentration de 200 nM pour chaque protéine permet d'une part d'obtenir une activité enzymatique suffisante pour voir des variations provoquées par des effecteurs enzymatiques et d'autre part de ne pas subir trop de variabilités liées aux incertitudes de concentration des protéines cytosoliques (liées au pipetage essentiellement). Le Cyt_{b558} contenant le centre catalytique, il est intéressant de se baser sur sa concentration pour travailler en quantités catalytiques. Par conséquent, la concentration en Cyt_{b558} a été choisie arbitrairement à 4 nM pour travailler en concentrations catalytiques devant la concentration en ses substrats : NADPH et O₂.

iv) Un mélange du milieu est très rapidement réalisé par retournement de la cuvette fermée par un morceau de Parafilm[®] en faisant attention à mouiller les quatre faces de la cuvette de la même façon afin de limiter les problèmes de reproductibilité.

v) La cuvette est ensuite incubée à la température de mesure pendant une durée déterminée, en général égale à 5 minutes.

vi) Le NADPH est ajouté, en général 200 µM, et un mélange du milieu est très rapidement réalisé par retournement de la cuvette (deux fois) et la mesure démarrée immédiatement. La concentration en NADPH choisie est de 200 µM ce qui est au moins deux fois supérieur à sa pseudoconstante d'affinité d'apparente pour le Cyt_{b558} et ce qui permet d'en utiliser des quantités raisonnables (mesures d'économies, le NADPH étant cher). Le dioxygène est en concentration proche de 239 µM théoriques, (255 µM en pratique), et ne peut pas être variée facilement.

Lorsque nécessaire, les modifications de ce protocole seront précisées dans le texte ou dans les légendes des figures.

2.3.2. PAR OXYMETRIE

i) La mesure du courant se fait en continu.

ii) Le tampon de mesure à bonne température et conditionné idéalement comme décrit précédemment est ajouté dans la cuve thermostatée en permanence sous agitation constante (barreau aimanté).

- iii) Sont successivement et le plus rapidement possible ajoutés dans cet ordre la FM, p67^{phox}, p47^{phox}, Rac1Q61L, AA comme indiqué précédemment.
- iv) Une incubation du milieu est réalisée à une température donnée, (généralement la température de mesure), pendant une durée déterminée comme indiqué précédemment.
- v) Le NADPH est ajouté comme indiqué précédemment et il suffit de lire la mesure instantanée de la concentration en dioxygène.

Selon ce qui est cherché, il peut y avoir quelques variantes de ces expériences qui seront alors décrites au cas par cas.

3. Mesures électrochimiques de la concentration en peroxyde d'hydrogène

Les anions superoxyde produits par la réaction catalysée par NOX2 peuvent réagir ensemble et former ainsi du dioxygène et du peroxyde d'hydrogène, il s'agit de la dismutation des anions superoxyde dont la réaction la plus probable au pH 7,4, (davantage de détails dans la partie discussion de ce chapitre), est donnée par l'équation **E.Réaction III-3**.



Cette réaction étant favorable thermodynamiquement, (enthalpie libre standard de Gibbs de -134 kJ·mol⁻¹ à pH 7) et cinétiquement (constante cinétique d'ordre 2 à pH 7,4 de l'ordre de 2 10⁵ M⁻¹·s⁻¹) dans mes conditions (368, 369, 388, 397), j'ai souhaité mesurer l'évolution de la concentration en peroxyde d'hydrogène dans le milieu réactionnel au cours de la réaction catalysée par NOX2. A cause du manque de spécificité des sondes du peroxyde d'hydrogène, faire cette mesure quantitative en continu, (en temps réel), est loin d'être trivial. L'utilisation de la peroxydase du radis noir, (Horseradish Peroxidase, HRP), permettant de catalyser l'oxydation d'un substrat-sonde (Amplex Red par exemple) peut permettre de contourner le problème mais cela demande beaucoup de mise au point.

Pour pallier ce problème, la concentration en peroxyde d'hydrogène a été mesurée en fonction du temps par électrochimie avec le système d'ultramicroélectrodes, développées et validées expérimentalement par mes collaborateurs Pauline Lefrançois et Stéphane Arbault de l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux, dont l'expertise de pointe m'a été d'une très grande aide.

Plus précisément, le peroxyde d'hydrogène a été détecté par la mesure du courant, (ampérométrie), généré par l'oxydation électrolytique du peroxyde d'hydrogène en fonction du temps, ce qui est qualifié de « chronoampérométrie ». Je donne ici le principe d'une mesure de chronoampérométrie sans préciser les spécificités liées à la mesure du peroxyde d'hydrogène, qui seront discutées en parallèle des résultats. L'électrode de Clark avec laquelle j'ai mesuré le dioxygène par ampérométrie possède une membrane semiperméable permettant le passage du dioxygène et empêchant le passage de beaucoup d'autres espèces électroactives. L'électrolyse spécifique du dioxygène étant permise par une présélection membranaire, cette mesure ne nécessite que deux électrodes : une électrode de référence et une électrode de travail. Lorsqu'il est nécessaire de pouvoir visualiser la majorité des espèces

électroactives, une membrane réalisant une présélection de ces espèces n'est pas souhaitable. Pour généraliser la mesure, la chronoampérométrie nécessite trois électrodes (**Figure III-6**) : une électrode de travail (inerte par rapport à la solution), une électrode de référence (à potentiel fixe, toutes les différences de potentiel sont mesurées par rapport à elle), une électrode auxiliaire aussi appelée contre-électrode (inerte par rapport à la solution).

Une différence de potentiel est appliquée et maintenue le plus finement possible entre l'électrode de travail et l'électrode de référence à l'aide d'un potentiostat et il me semble important de noter que ce contrôle est délicat à courant non nul. Pour cela, un potentiostat fait intervenir des composants électroniques dont le principe de fonctionnement est bien au-delà de l'intérêt de cette thèse, notamment un amplificateur opérationnel qui a pour rôle l'amplification de la différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence jusqu'à une différence de potentiel saturante (ddps) permettant le maintien précis de cette ddps quel que soit le courant circulant entre l'électrode de référence et l'électrode de travail. Je me contenterai donc d'une explication simplifiée de ce qu'il mesure et de ce qu'il impose et me focaliserai sur les phénomènes qui se passent aux électrodes en fonction des paramètres du potentiostat et des espèces d'intérêt en solution.

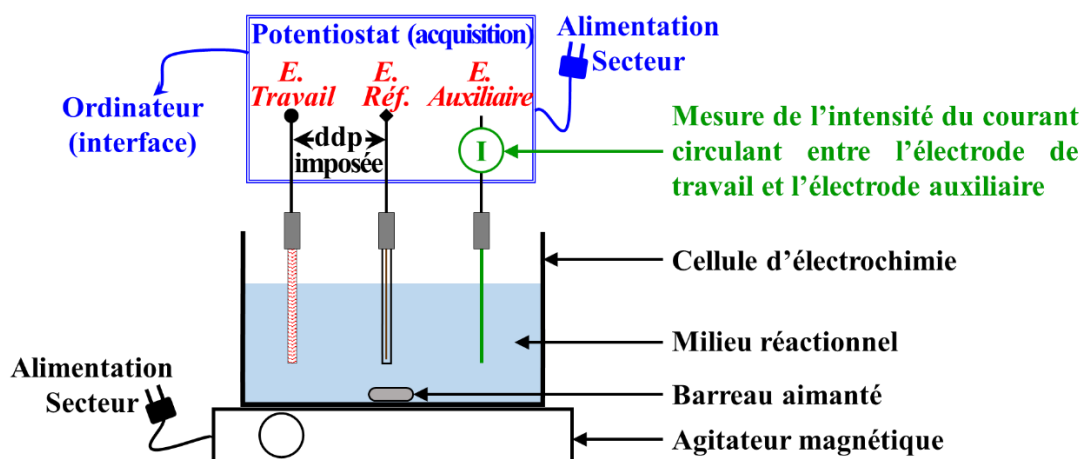


Figure III-6. Schéma simplifié du dispositif expérimental

E. Travail : électrode de travail ; E. Réf. : électrode de référence (ici AgCl/Ag) ; E. Auxiliaire : électrode auxiliaire ou contre-électrode en platine.

Si le potentiel de l'électrode de travail permet l'oxydation ou la réduction d'une espèce dans la solution, alors il y aura un flux d'électrons, un courant, entre la solution et l'électrode de travail. L'électroneutralité de la solution étant obligatoire et les électrodes de travail et auxiliaires étant inertes, l'oxydation d'une espèce en solution à l'électrode de travail va induire la réduction d'une autre espèce en solution à l'électrode auxiliaire, (contre-électrode), et réciproquement dans le cas où la réduction d'une espèce en solution se passe à l'électrode de travail. Le courant va donc circuler dans un circuit métallique (électrons) entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire, et le circuit est fermé par la solution dans laquelle le courant est transporté par les solutés électroactifs et les contre-ions associés. Lorsque l'oxydation d'un soluté se passe à l'électrode de travail, un (des) électron(s) du soluté, (de la solution), est (sont) transféré(s) à l'électrode de travail, le courant mesuré est positif selon les conventions françaises. Lorsque la réduction d'un soluté se passe à l'électrode de travail, un (des) électron(s) de l'électrode de travail est (sont) transféré(s) au soluté (à la solution), le courant mesuré est négatif selon les conventions françaises.

Un système à 3 électrodes a donc été utilisé (**Figure III-6**) : une ultramicroélectrode (UME) de travail à fibre de carbone platinée (10 μm de diamètre), une microélectrode de référence AgCl/Ag et une contre-électrode, ou électrode auxiliaire, en platine. L'UME de travail à fibre de carbone est l'électrode permettant de détecter le peroxyde d'hydrogène. La fibre de carbone est scellée dans un capillaire en verre borosilicate et la partie de la fibre qui dépasse a été isolée par électrodéposition de polyoxyphénylène. La pointe a ensuite été polie à 45° permettant de découvrir un disque de carbone (conducteur). Afin d'augmenter significativement la surface spécifique et d'augmenter en conséquence la sensibilité de l'électrode, un dépôt de noir de platine a enfin été réalisé sur ce disque jusqu'à obtention d'une charge coulométrique de 10 μC . L'ensemble des détails de conception de ces UME sont données dans la thèse de Pauline Lefrançois (398).

Les mesures ont été réalisées en réacteur de 2 à 6 mL, agité à vitesse constante. La première étape d'une mesure consiste en la polarisation de l'UME de travail contre l'électrode de référence. Ainsi, la différence de potentiel établie doit permettre la réduction ou l'oxydation de la molécule à détecter. L'étape de polarisation peut prendre beaucoup de temps, dans notre cas comme nous travaillons avec une microélectrode, ce temps est accru et prend au moins 1 h et jusqu'à quelques heures selon le potentiel appliqué. Cette étape est cruciale, elle permet d'établir une couche de diffusion d'épaisseur constante autour de l'électrode de mesure en présence d'une agitation constante. Ceci signifie que l'eau, les ions et éventuellement les autres espèces électroactives ou non vont s'organiser autour de l'électrode de travail. Cette organisation doit être constante au cours de la mesure afin cette dernière ne soit pas perturbée par des variations liées aux phénomènes de diffusion, convection, migration. Dans notre cas, la polarisation a été faite dans du PBS pH 7,4 en présence ou en absence d'autres espèces que je décrirai au cas par cas dans la partie résultats. (PBS : 3,9 mM NaH_2PO_4 - 6,1 mM Na_2HPO_4 - 2,7 mM KCl - 138 mM NaCl – Sigma référence P5368)

La mesure de l'intensité du courant en fonction du temps $i=f(t)$ étant faite en continue, nous savons que la polarisation est terminée lorsque le courant mesuré est constant (la consommation de l'espèce électroactive par l'électrode est négligeable). Une fois la polarisation terminée, le bruit de fond ne doit en général pas excéder 0,005 nA. Dans notre cas, la détection à l'électrode de travail se fait via l'oxydation biélectronique du peroxyde d'hydrogène (couple oxydant/réducteur : $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$), la différence de potentielle à appliquer à l'électrode de travail est donc positive et le courant mesuré sera aussi, par convention, positif, (les électrons passent de la solution à l'électrode de travail). Immédiatement après la polarisation, il est possible de commencer la mesure en ajoutant ce que nous souhaitons dans le milieu réactionnel sans déplacer les électrodes, (déplacer les électrodes risque d'annihiler leur polarisation).

C. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette partie, mon objectif est de comprendre précisément les mesures de l'activité de NOX2 en système acellulaire. La mesure d'une activité enzymatique est une quantification, elle doit donc être précise, ce qui nécessite d'aller bien au-delà de la simple reproductibilité ou de la simple significativité statistique des variations observées. J'ai ainsi cherché à révéler la face cachée des mesures de l'activité de NOX2 afin de comprendre la réalité de ce qui est mesuré.

La première partie concerne l'étude par spectrophotométrie d'absorption UV-Visible des FM de neutrophile, donc un composant central du système acellulaire puisqu'il contient Nox2, centre catalytique de la NADPH oxydase du phagocyte. Dans la deuxième partie, je discuterai de l'activité de NOX2 en fonction des différentes observables. La troisième partie discutera des contrôles fondamentaux sur la pertinence des mesures d'activité utilisant le Cyt_c. La cinétique globale de la réaction sera alors étudiée dans une quatrième partie avant de tester différents effecteurs sur l'enzyme, tout d'abord la température, puis des détergents, des molécules formant des pores dans les membranes et enfin le temps d'incubation, que j'inclus dans les effecteurs. Finalement, j'aborderai des tests quantitatifs et qualitatifs pour l'étude des réactions secondaires pouvant perturber les mesures d'activité de NOX2.

1. Caractéristiques spectrales UV-Visible des FM et concentration en Cyt_{b558}/NOX2

Dans cette partie, j'ai réalisé une étude spectrale des fractions membranaires de neutrophile permettant d'obtenir plusieurs informations physicochimiques sur le Cyt_{b558}, mais aussi de déterminer sa concentration et dans une certaine mesure d'évaluer sa contamination par d'autres enzymes.

L'étude de NOX2 en système acellulaire nécessite, afin d'avoir des grandeurs quantitatives comparables, de connaître obligatoirement précisément la concentration en Cyt_{b558} des FM. La détermination de la concentration est réalisée comme indiqué dans les matériels et méthodes par spectrophotométrie d'absorption UV-Visible.

L'interprétation rigoureuse de l'ensemble des résultats de ma thèse est notamment basée sur cette concentration, il me semble donc indispensable de discuter plus avant, à travers un exemple, la façon dont celle-ci a été déterminée mais aussi les avantages des traitements post-expérimentaux utilisés ainsi que les informations supplémentaires cruciales qu'apporte l'étude spectrale des FM.

La **Figure III-7** présente : *i*) en première ligne, les spectres d'absorption **sans traitement post-expérimental** des FM réduites (**A**) des FM oxydées (**B**), de la différence entre le spectre des FM réduites et le spectre des FM oxydées (**C**). *ii*) en deuxième ligne, les spectres d'absorption **corrigés après traitements post-expérimentaux** des FM réduites (**A'**), des FM oxydées (**B'**), de la différence entre le spectre corrigé des FM réduites et le spectre corrigé des FM oxydées (**C'**).

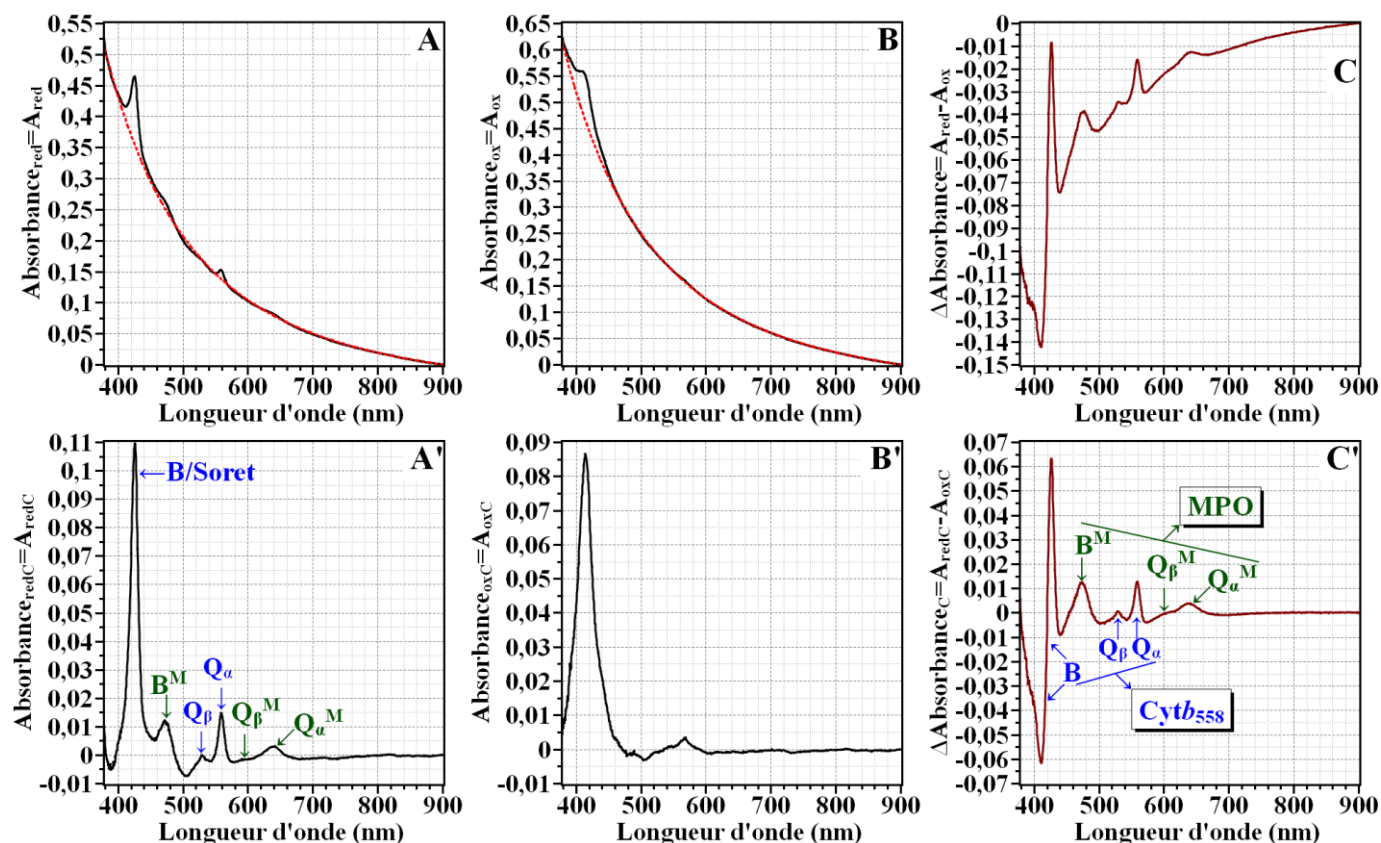


Figure III-7. Spectres corrigés ou non des fractions membranaires oxydées ou réduites.

La FM est diluée 1,42 fois en présence de 1 % de DDM avec 70 minutes d'incubation. Le dithionite de sodium est le réducteur utilisé. Trajet optique de 1 cm. **(A)** Spectre non corrigé de la FM réduite en noir. Ajustement non linéaire de la turbidité de la FM réduite en pointillés rouges. **(A')** Spectre de la FM réduite corrigé pour la turbidité. **(B)** Spectre non corrigé de la FM oxydée en noir. Ajustement non linéaire de la turbidité de la FM oxydée en pointillés rouges. **(B')** Spectre de la FM oxydée corrigé pour la turbidité. **(C)** Spectre de différence non corrigé de la FM réduite moins FM oxydée. **(C')** Spectre de différence corrigé de la FM réduite moins FM oxydée. MPO=Myéloperoxydase.

1.1. CARACTERISTIQUES SPECTRALES UV-VISIBLE DES FM AVANT OU APRES CORRECTION

1.1.1. DESCRIPTION GENERALE DES SPECTRES UV-VISIBLE DES FM

Les spectres non corrigés des FM réduites ou oxydées, **Figure III-7** respectivement **A** ou **B**, traduisent une turbidité du milieu très marquée, ce qui cache une partie des bandes d'absorptions spécifiques aux espèces absorbantes de la FM. De plus, il est évident qu'il existe une différence entre la composante turbidité de la FM réduite et celle de la FM oxydée (les suspensions ont des turbidités respectives différentes). Les ajustements de la composante turbidité, en rouge pointillés, ont été réalisés comme décrits dans la partie matériels et méthodes avec, ici, $k = 8$. Tous les critères, tant objectifs que subjectifs, définis précédemment sont respectés. Le spectre de différence non corrigé en **Figure III-7C** présente une incurvation globale signant que la composante turbidité du spectre de la FM oxydée et celle du spectre de la FM réduite sont en effet différentes. Ceci peut poser des problèmes de reproductibilité pour la détermination de la concentration entre deux préparations et entre plusieurs expérimentateurs différents.

Sur les spectres corrigés de la FM réduite ou oxydée **Figure III-7** respectivement **A'** ou **B'**, il est clair que la correction permet de mettre en exergue des bandes d'absorption spécifique d'espèces absorbantes de la FM et de supprimer la composante turbidité. L'ajustement a parfois rogné le spectre de la FM lui-même, notamment pour la forme réduite, ce qui implique l'observation, sur certains intervalles, d'absorptions négatives.

Je cherche à déterminer la concentration en $Cytb_{558}$ de façon reproductible, mes critères prennent donc en compte la turbidité globale et soulignent l'importance d'avoir un ajustement précis avant et après les bandes d'absorption utilisées pour la détermination de cette concentration. Après avoir rigoureusement appliqué ces critères, le reste des spectres, en dehors des bandes d'absorption qui m'intéressent pour la détermination de la concentration, est utile seulement de façon qualitative. Autrement dit, je prends en compte de façon **quantitative** les bandes d'absorption spécifique autour de 427 nm, forme réduite, et de 411 nm, forme oxydée, et de façon **qualitative** le reste du spectre. L'efficacité de la correction se retrouve significativement sur le spectre de différence corrigé présenté en **Figure III-7C'**, où la ligne de base est horizontale, sans incurvation. De plus, toutes les bandes d'absorption spécifiques sont, ici aussi, mises en exergue de façon significative.

La totalité des spectres corrigés apporte plusieurs informations importantes sur les fractions membranaires. Pour interpréter les observations et discuter de ces informations, il est nécessaire de se rappeler des bases de la structure chimique et de la nomenclature d'une porphyrine de fer et j'invite le lecteur qui n'est pas à l'aise sur ce sujet à se reporter à l'**ANNEXE 1** et à l'**ANNEXE 2**.

Les **Figure III-7A'** ou **B'** présentent le spectre corrigé de la FM respectivement réduite ou oxydée et la correction permet de mettre en exergue des bandes bien résolues caractéristiques d'espèces absorbantes de la suspension. Notamment, la **Figure III-7A'** présente, deux bandes entre 380 et 500 nm, (426 et 472 nm, dites « bandes B », ou « Bandes de Soret ») et trois bandes entre 500 et 750 nm, (529, 559 et 641 nm, dites « bandes Q »), ainsi qu'un épaulement vers 595 nm. Sur la **Figure III-7B'** une seule bande est observable entre 380 et 500 nm, (414,5 nm, « bande B/Soret »), et une seule bande entre 500 et 750 nm, (567 nm, « bande Q »).

Les bandes d'absorption UV-Visible caractéristiques du $Cytb_{558}$ sont bien connues et peuvent être facilement assignées. Le $Cytb_{558}$ réduit possède une bande B, ou bande de Soret, intense et bien résolue aux alentours de 427 nm et deux bandes Q, dont une bande Q_{α} à 558 nm, environ 6 fois moins intense que la bande B et une bande Q_{β} à 529 nm, environ 20 fois moins intense que la bande B (231). Par conséquent, sur le spectre présenté en **Figure III-7A'**, j'ai assigné à la transition B du $Cytb_{558}$ la bande à 426 nm, à la transition Q_{α} la bande à 559 nm et à la transition Q_{β} la bande à 529 nm de ce spectre.

Le problème concerne l'assignation des autres bandes dont la provenance est a priori inopinée. Je me suis demandé s'il s'agissait d'une modification du $Cytb_{558}$ liée à la purification des FM, d'autant que ce flavocytochrome contient deux hèmes, mais vu la façon d'obtenir les FM, incluant une sonication, il y a plus de risques qu'il s'agisse en fait d'une contamination. En effet, en plus des NOX2 membranaires, les neutrophiles possèdent des granules contenant des enzymes redox solubles appelées myéloperoxydases (MPO) en grande quantité dans les granules primaires, (ou azurophiles). Il est possible que la sonication abîme les granules et que certaines myéloperoxydases soient encapsulées dans les vésicules de FM.

La myéloperoxydase réduite possède un spectre d'absorption UV-Visible bien connu avec une bande B^M à 472 nm, environ 4 fois plus forte qu'une bande Q_{α}^M à 636 nm et 8 fois plus forte qu'un épaulement Q_{β}^M vers 590 nm. De plus, la myéloperoxydase oxydée a une bande B^M à 428 nm et une bande Q^M à 570 nm (229, 399). Je retrouve presque

exactement ce schéma spectroscopique sur le spectre des FM réduites, ainsi que sur des spectres de FM d'autres auteurs de la littérature (231). Par conséquent, les spectres montrent que ces fractions membranaires sont polluées par de la myéloperoxydase et il est indispensable de prendre ceci en compte dans les interprétations. De plus, selon la largeur de la bande de Soret à 428 nm de la myéloperoxydase oxydée, il faut noter qu'il y a un faible risque qu'elle contribue à la bande de Soret à 411 nm du Cytb₅₅₈ et perturbe la mesure de la concentration. Il est également nécessaire de noter que s'il y a lyse des granules pendant la sonication, comme le suggère la présence de MPO, il y a un risque de libération d'une grande quantité de protéases et donc de lésions des protéines, y compris les parties extramembranaires de Nox2 et p22^{phox} ; je suppose cependant que les antiprotéases ajoutés, (leupeptine et PMSF), suffisent pour limiter la protéolyse et donc avoir un système reproductible.

Pour éviter ces problèmes, il faudrait essayer d'optimiser la sonication ou d'utiliser une technique de dépressurisation brusque pour la lyse cellulaire, (cavitation au diazote), connue pour être plus respectueuse des granules. Pour confirmer qu'il s'agit bien de myéloperoxydase, il serait intéressant de réaliser un western-blot sur les FM avec un anticorps primaire anti-myéloperoxydase. Lors des mesures de cinétiques de la NADPH oxydase, des contrôles en présence d'azoture en tant qu'inhibiteur de la myéloperoxydase pourraient être réalisés. L'ajout de peroxyde d'hydrogène sur les FM pourra aussi être envisagé ainsi que le dosage consécutif des anions hypochlorites potentiellement produits.

1.1.2. IMPACT DE LA CORRECTION DE LA TURBIDITE SUR LA CONCENTRATION EN CYTB₅₅₈

Enfin, peuvent être comparées les concentrations obtenues à partir des spectres corrigé d'une part et non corrigé d'autre part. Dans l'exemple présenté ici, la concentration trouvée sans correction est [Cytb₅₅₈] = 0,88 µM alors que la concentration trouvée après la correction est de [Cytb₅₅₈] = 0,95 µM. Cette différence entre la valeur corrigée et la valeur non corrigée dépend de la préparation, elle est parfois moins importante, (plus faible différence de turbidité entre forme oxydée et réduite), parfois plus importante, (plus grande différence de turbidité entre forme oxydée et réduite).

La régression non linéaire me semble donc un moyen simple, relativement rapide, (de 10 minutes à environ 1h30 par spectre), et efficace de minimiser les incertitudes liées à la turbidité en plus de la solubilisation avec du DDM 1 % pendant au moins 70 minutes. Les algorithmes existants n'étant pas forcément bien adaptés pour ces ajustements, il est nécessaire pour réussir d'avoir pratiqué sur plusieurs spectres différents et d'avoir un ordinateur suffisamment puissant. Cette procédure est donc fonctionnelle mais vouée à être améliorée. Ce modèle m'a également permis de détecter la présence de MPO dans la majorité de mes préparations avec une grande variabilité. Il faudra prendre en compte ceci dans les interprétations des expériences.

2. Mesure de l'activité de NOX2 en fonction de l'observable : Cytc, NADPH, O₂

L'enzyme NOX2 catalyse une réaction à trois substrats, (deux O₂ et un NADPH) et quatre produits, (deux O₂⁻, un NADP⁺ et un H⁺). Dans le cas d'une enzyme à comportement Michaelien, n'impliquant donc pas d'allostérie, dans un état quasi-stationnaire, la vitesse au temps zéro, appelée vitesse initiale, est théoriquement la vitesse la plus

élevée pouvant être mesurée lors de la cinétique globale. Cependant, pour certaines enzymes ou dans des conditions particulières, la vitesse initiale n'est pas la vitesse maximale et le cas particulier de NOX2 dans ce système acellulaire sera notamment discuté dans cette partie.

Les expériences réalisées ont toutes eues pour objectif la meilleure compréhension de la mesure de l'activité de NOX2. Par conséquent, j'ai choisi de présenter l'ensemble des contrôles permettant de mettre en avant les difficultés de cette mesure. L'évaluation de la pertinence de la mesure elle-même relevant de la méthodologie, tous ces contrôles sont cruciaux pour l'analyse constructive de l'ensemble des résultats, même s'ils ne discutent pas directement de la NADPH oxydase, mais plutôt des méthodes associées.

Je présenterai d'abord des mesures d'activité de NOX2 en fonction de la concentration en AA, puis en fonction de la concentration en NADPH, dans les deux cas en utilisant les observables NADPH, Cyt c et, ou O $_2$.

2.1. VARIATIONS DES FONCTIONS F([AA])=ASM

L'importance du tout *cis*-acide arachidonique pour l'activation de la NADPH oxydase en cellule a précédemment été décrite en détail. En système acellulaire, une des conditions requises pour que la NADPH oxydase NOX2 fonctionne est la présence d'un détergent anionique, par exemple, le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) ou le Lithium Dodécyl Sulfate (LDS) ou le tout-*cis*-Acide Arachidonique (AA).

Les fractions membranaires (FM) de neutrophile au repos contenant Nox2, (expérimentalement 2 à 5 % en masse des protéines totales), contiennent aussi toutes les autres protéines de la membrane plasmique du neutrophile au repos.

L'allure de la dépendance de l'activité spécifique moléculaire (ASM) en fonction de la concentration en AA est caractéristique de l'activité enzymatique de NOX2 provenant des neutrophiles dans ce système acellulaire. À la suite de l'obtention de nouvelles FM, afin de vérifier que ce qui est mesuré est réellement dû à la NADPH oxydase du phagocyte, je réalise donc systématiquement une gamme de dépendance d'ASM en fonction de la concentration en AA. La technique la plus répandue pour réaliser une telle gamme est une mesure de la production des anions superoxyde à l'aide du Cytochrome *c* (Cyt c). Avant mon arrivée au Laboratoire de Chimie Physique, les mesures d'activité de NOX2 y étaient uniquement faites à l'aide du Cyt c .

Les mesures d'activité de NOX2 impliquent déjà de mélanger trois protéines cytosoliques différentes, les fractions membranaires, l'AA et le NADPH. Chaque composant introduit une erreur de mesure liée à la pureté du composé, à sa qualité et plus généralement au manipulateur et aux techniques expérimentales. Ainsi, contrairement à la mesure de consommation du NADPH, l'utilisation le Cyt c comme sonde des anions superoxyde introduit encore un paramètre supplémentaire.

D'autre part, même s'il existe vraisemblablement d'autres enzymes qui consomment le NADPH dans les FM, je ne peux pas exclure qu'il existe d'autres enzymes qui produisent fortuitement, (via des fuites dans des chaînes de transport d'électrons), des anions superoxyde. Toutefois, j'ai pu vérifier l'absence de production d'anions superoxyde

ou encore l'absence de consommation du NADPH en milieu dénué d'AA et, ou dénué de protéines cytosoliques. Cela signifie que la production des anions superoxyde et la consommation du NADPH sont dépendantes des activateurs spécifiques à NOX2. Ainsi, je considère dans un premier temps que les réactions parasites potentielles liées à d'autres enzymes sont négligeables, quelle que soit la concentration en protéines cytosoliques et en AA qui pourraient fortuitement activer d'autres enzymes. Dans mes interprétations, il faudra cependant prendre en compte la présence probable de myéloperoxydase dans les fractions membranaires.

2.1.1. ETUDES DES FONCTIONS $ASM=F([AA])$

Afin de vérifier la fiabilité des mesures réalisées à l'aide du Cyt_c, j'ai réalisé des mesures d'ASM en fonction de la concentration en AA en mesurant la réduction du Cyt_c par les anions superoxyde, (observable Cyt_c) et de façon concomitante en mesurant la consommation du NADPH, (observable NADPH) et ceci sur des FM issues de trois donneurs différents (Figure III-8A).

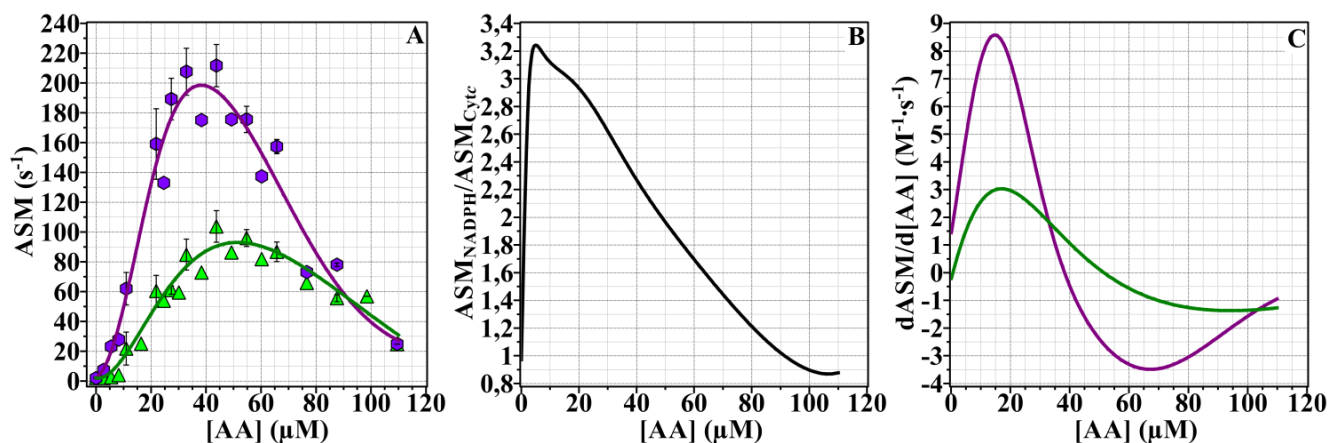


Figure III-8. Dépendance de l'ASM de NOX2 en fonction de la concentration en AA. 5' incubation, NADPH/Cyt_c.

Mesures faites à 25 °C en présence de 4 nM Cyt_{b558}, 200 nM de p67^{phox}, 200 nM de p47^{phox}, 200 nM de Rac1Q61L et de 200 μM de NADPH avec 5 minutes d'incubation. (A) Les hexagones violets représentent les mesures faites à partir de la consommation en NADPH dont le nuage de points est ajusté par la courbe violette. Les triangles verts représentent les mesures faites à partir de la réduction du Cyt_c, 70 μM, dont le nuage de points est ajusté par la courbe verte. Les points sans barre d'erreur standard sont issus d'une mesure unique. Les points avec barre d'écart type sont issus de la moyenne de trois mesures, chacune réalisée à partir d'un donneur différent (1 réplica technique). (B) Rapport des ajustements non linéaires du panneau A de l'observable NADPH et de l'observable Cyt_c. (C) Dérivée première par rapport à [AA] de l'ajustement non linéaire du panneau A pour l'observable NADPH d'un part (ligne violette) ou pour l'observable Cyt_c d'autre part (ligne verte).

La Figure III-8A montre que pour les deux observables (Cyt_c et NADPH), l'ASM est nulle ou quasi nulle en absence d'AA. De plus, quelle que soit la technique, l'ASM évolue approximativement de la même façon en fonction de la concentration en AA. Dans un premier temps, l'ASM augmente, puis atteint un maximum compris dans l'intervalle entre 35 et 60 μM en AA pour des fractions membranaires issues de neutrophiles *Homo sapiens*, (la concentration pour laquelle ce maximum est atteint peut beaucoup varier en fonction de l'espèce). Enfin, au-delà du maximum, l'ASM diminue jusqu'à atteindre des valeurs très faibles (tendent vers zéro si la concentration en AA est augmentée davantage). La représentation graphique de l'ASM en fonction de la concentration en AA est ainsi couramment appelée « courbe en cloche ». La concentration précise en AA pour laquelle l'ASM est maximale est généralement appelée « concentration optimale en AA ». Lorsqu'un autre paramètre que la concentration en AA est varié pour les besoins de l'étude de NOX2, le plus fréquent est de travailler en présence de la concentration optimale en AA en tant que référence. Il est nécessaire de prendre en compte que la variation d'un autre paramètre peut modifier cette référence, donc causer une confusion d'effets.

D'autre part, il est possible de constater dans la littérature que l'allure de cette dépendance est seulement peu modifiée par le changement d'espèce, (*e.g. Homo sapiens* ou *Bos taurus*), ou encore le fait que le Cytb₅₅₈ soit ou non purifié et recombinant ou non. Par exemple, en absence d'AA l'activité est toujours nulle et la dépendance de l'ASM en augmentant la concentration en AA est toujours une courbe en cloche. Cependant, la valeur de l'ASM, ou encore la concentration en AA pour laquelle le maximum d'activité est atteint, sont fortement impactés par l'espèce dont provient Nox2 toutes choses égales par ailleurs (173–175, 400). En système acellulaire, l'AA, (ou un autre activateur amphiphile anionique), est donc, dans tous les cas, indispensable à l'activation de NOX2 en présence des protéines cytosoliques et ceci indépendamment de la présence d'autres protéines membranaires que Nox2 et p22^{phox}. Ces faits expérimentaux suggèrent, sans toutefois le démontrer, que les autres protéines de la membrane impactent peu, ou pas, la mesure.

Au-delà de l'allure générale de la dépendance $ASM = f([AA])$, il est clair qu'il existe de fortes disparités entre les valeurs d'ASM obtenues en mesurant l'ASM via la progression de la consommation du NADPH (ASM_{NADPH}) ou en mesurant l'ASM via la progression de la formation de l'anion superoxyde détecté par le Cytc (ASM_{Cytc}). Ainsi, la **Figure III-8B** montre que le rapport ASM_{NADPH}/ASM_{Cytc} est égal à 1 pour $[AA] = 0 \mu M$ et augmente jusqu'à être multiplié par environ 3 pour $[AA] \approx 5 \mu M$, puis diminue de façon quasi linéaire jusqu'à un rapport de 1 obtenu pour $[AA] = 90 \mu M$, en passant par un rapport d'environ 2 aux alentours de la concentration optimale en AA. L'allure de cette courbe est très reproductible pour l'ensemble des fractions membranaires testées, mais la valeur maximale du rapport ASM_{NADPH}/ASM_{Cytc} obtenu aux alentours de $5 \mu M$ peut varier entre 3 et 8, alors que le rapport obtenu à la concentration optimale en AA est systématiquement aux alentours de 2 ± 0.4 (\pm amplitude maximale).

Pour expliquer l'allure de la courbe de la **Figure III-8B**, il est nécessaire de discuter plus précisément des allures relatives des courbes de la **Figure III-8A**. Afin d'analyser l'évolution de l'ASM en fonction de la concentration en AA pour l'observable NADPH et pour l'observable Cytc, il est utile de s'aider des dérivées premières par rapport à la concentration en AA, présentées en **Figure III-8C**, des ajustements non linéaires respectifs de l'observable NADPH et Cytc. Pour l'observable Cytc l'augmentation de ASM_{Cytc} en fonction de la concentration en AA se fait progressivement et de plus en plus vite jusqu'à un point d'inflexion à $[AA] = 17 \mu M$ (obtenue pour $\frac{d}{d[AA]} \left(\frac{dASM_{Cytc}}{d[AA]} \right) = 0$) ce qui donne une allure pseudo-sigmoïdale très marquée jusqu'à l'optimum de concentration. Pour l'observable NADPH, le même schéma est observé, avec une allure pseudo-sigmoïdale entre $0 \mu M$ et la concentration optimale en AA et un point d'inflexion à $[AA] = 15 \mu M$, (obtenue pour $\frac{d}{d[AA]} \left(\frac{dASM_{NADPH}}{d[AA]} \right) = 0$). La différence principale est que l'augmentation de l'ASM est beaucoup plus rapide pour l'observable NADPH que pour l'observable Cytc. De la même façon, au-delà de la concentration optimale en AA, la diminution de l'ASM pour l'observable NADPH est beaucoup plus rapide que pour l'observable Cytc. L'ASM maximale pour l'observable NADPH est de $200 s^{-1}$ atteinte pour une concentration optimale en AA de $38 \mu M$ (obtenue pour $\frac{dASM_{NADPH}}{d[AA]} = 0$) alors que pour l'observable Cytc il est égal à $95 s^{-1}$ et atteint pour une concentration optimale en AA de $51 \mu M$ (obtenue pour $\frac{dASM_{Cytc}}{d[AA]} = 0$). En plus des différences d'activité, il existe donc une différence de la concentration optimale en AA de $13 \mu M$. Indépendamment de la moyenne sur trois donneurs ici réalisée, la concentration optimale

en AA est toujours plus élevée pour l'observable Cyt_c que pour l'observable NADPH, quel que soit le donneur, mais la différence peut varier et se limiter parfois à seulement 5 µM.

La réduction du Cyt_c dans ces expériences est totalement inhibée par la présence en concentration suffisante de SuperOxyde Dismutase (SOD), ce qui signifie que la réduction du Cyt_c est entièrement due aux anions superoxyde. D'autre part, l'ajout de DiPhénylène Iodonium (DPI), un inhibiteur des flavoenzymes, inhibe totalement la réduction du Cyt_c ainsi que la consommation du NADPH, ce qui signifie que la réduction du Cyt_c et la consommation du NADPH sont toutes deux dues à l'activité d'une flavoenzyme, donc potentiellement de la NADPH oxydase. Combiné à la nécessité absolue d'avoir dans le milieu au moins p67^{phox} et Rac1Q61L, l'activité observée dans les deux cas est certainement due au moins à la NADPH oxydase.

Il existe donc une variation d'amplitude de l'ASM mesurée, qui dépend de l'observable et de la concentration en AA, ainsi qu'une variation de la concentration optimale en AA. A l'aide d'une recherche bibliographique détaillée, je vais maintenant interpréter ces résultats et faire des hypothèses que je tenterai de vérifier dans ce chapitre pour essayer de comprendre le phénomène ici observé.

2.1.2. INTERPRETATIONS

Avant d'interpréter ces résultats, il est bon de rappeler que le problème a déjà été montré par Light et al en 1981 en système acellulaire (358) et des difficultés de captation des anions superoxyde produits par des neutrophiles activés ont déjà été reportés (3, 401).

Afin d'interpréter ces différences, il faut en premier lieu faire des hypothèses sur les causes de l'allure « courbe en cloche » obtenue. Dans ces hypothèses concernant l'effet de l'AA sur l'ASM, il faut prendre en compte *i*) le Cyt_{b558}, *ii*) la membrane, *iii*) les protéines cytosoliques *iv*) le NADPH, *v*) les anions superoxyde et, le cas échéant, *vi*) le Cyt_c.

a. Les caractéristiques du Cyt_{b558} pouvant influencer les mesures

Dans l'introduction, j'ai présenté l'importance de l'environnement lipidique sur l'activité et la structure de NOX2 et relaté l'existence d'acides gras présents à l'intérieur même de la protéine Nox2 qui pourraient aussi contribuer à sa structure. Ainsi, l'AA pourrait modifier l'environnement membranaire de Nox2 et s'insérer dans la protéine, ce qui impacterait sa structure (179, 402) et changerait son activité. L'ajout d'AA modifie aussi le spin du fer, signe d'un changement de géométrie de coordination et donc probablement de réactivité. Il a aussi été démontré qu'une forte concentration en AA pouvait provoquer la perte du fer contenu dans Nox2 (231), ce qui induit nécessairement une impossibilité de transférer des électrons d'une face à l'autre de la membrane.

Par conséquent, les modifications induites au Cyt_{b558} par l'AA expliquent en partie la courbe en cloche. En absence d'AA la conformation de la protéine et l'état de spin du fer ne seraient pas adaptés, ce qui est corrélé à une absence d'activité enzymatique. L'augmentation de la concentration en AA suffirait à induire une conformation de plus en plus adaptée, corrélée à l'augmentation de l'activité enzymatique, jusqu'à un état de transfert optimal d'électrons correspondant au maximum d'activité donné pour une concentration optimale

en AA. Au-delà du maximum, l'AA pourrait induire une dénaturation de Nox2 ainsi que la libération du fer, ou des hèmes, en fonction de la concentration en AA, ce qui traduirait une diminution drastique du transfert d'électrons et donc de l'activité enzymatique.

b. Les caractéristiques de la membrane (lipides) des FM pouvant influencer les mesures

Les FM, outre les protéines et les glucides, (glycolipides membranaires), sont constituées par l'ensemble des lipides de la membrane plasmique des neutrophiles. En plus des lipides membranaires décrits dans l'introduction, des acides gras libres peuvent aussi traverser spontanément et relativement rapidement les bicouches phospholipidiques, notamment par diffusion passive à une vitesse comprise entre 0,1 et 1,0 cm·s⁻¹ et peuvent s'insérer dans la bicouche, (partition des acides gras entre la phase aqueuse et la membrane), et provoquer, notamment, des modifications de perméabilité, des modifications de fluidité ou encore de courbure (403–410).

Le tout-*cis*-acide arachidonique (AA) est un acide gras possédant 20 carbones et 4 insaturations, ce qui lui confère des propriétés physicochimiques adéquates pour une insertion spontanée dans un feuillet d'une bicouche lipidique, ainsi qu'une géométrie propice à l'augmentation de la fluidité membranaire, (les acides gras insaturés estérifiés aux lipides membranaires augmentent la fluidité de la membrane relativement à des acides gras saturés estérifiés aux lipides membranaires de longueur de chaîne carbonée équivalente (402, 411)). Comme je l'ai reporté dans l'introduction, le Cytb₅₅₈ est particulièrement présent dans les radeaux lipidiques. Or, ces microdomaines sont riches en cholestérol et en sphingolipides mais peuvent également être riches en AA dans certaines conditions (412).

Ainsi, comme les anions superoxyde sont produits à l'intérieur des FM et que le Cytochrome *c* (Cyt_c) se trouve à l'extérieur, si la perméabilité de la membrane augmente en fonction de la concentration en AA, les anions superoxyde pourraient passer d'autant plus facilement à travers la membrane et être ainsi mieux captés, détectés, par le Cyt_c.

Il est donc selon moi cohérent de supposer que la fluidité membranaire augmente en fonction de la concentration en AA jusqu'à un certain seuil à partir duquel la membrane est progressivement déstabilisée et les protéines qu'elle contient progressivement solubilisées voire dénaturées par l'AA. Dans le cas présent, l'optimum de concentration est assez proche de la concentration micellaire critique (CMC) de l'AA, qui est de 73 μM en milieux aqueux (413, 414). La CMC est la concentration autour, et à partir, de laquelle des lipides, (plus généralement des amphiphiles), forment des micelles facilement détectables. Cette limite est empirique et virtuelle dans la mesure où elle dépend de la sensibilité de détection des micelles, (<https://doi.org/10.1351/goldbook.C01395> vu le 19 juin 2018).

Même s'il est considéré par les différents auteurs cités ici qu'en dessous de la CMC un surfactant n'est pas un détergent des membranes et qu'au-delà il l'est, ce modèle est seulement vérifié pour certains amphiphiles et pour certaines membranes, cette description est donc imprécise. Pour décrire l'effet détergent d'un composé, la CMC est insuffisante et il faut aussi prendre en compte son partitionnement entre la phase aqueuse, la phase membranaire et le cas échéant la phase micellaire, mais aussi la composition de la membrane et le temps d'incubation en présence de l'amphiphile (415–417). En présence de protéines en quantité significative, il semble indispensable de prendre aussi en compte l'effet des protéines (418, 419). Ainsi, dû à l'hétérogénéité des membranes biologiques, j'estime que la seule façon correcte de vérifier la solubilisation de la membrane est de la tester expérimentalement : par exemple en

visualisant la modification de la turbidité en fonction de la concentration en surfactant et du temps d'incubation à une température donnée.

Sachant que l'AA peut être partitionné entre la phase aqueuse, la membrane des FM et potentiellement les micelles, la CMC de l'AA en présence de FM pourrait être modifiée et il serait intéressant de faire des mesures de CMC en présence de FM pour vérifier s'il existe une corrélation entre la CMC et la concentration optimale en AA relativement aux FM (414). S'il existe une telle corrélation, elle pourrait expliquer en partie les différences observées par notre équipe entre la dépendance à l'AA de l'ASM mesurée à partir de FM de neutrophiles humains et de neutrophiles bovins.

La littérature reporte que le SDS a un effet similaire à celui de l'AA sur l'activité de l'enzyme en système acellulaire avec des FM de neutrophiles humains (420). En mesurant la dépendance de l'ASM à la concentration en SDS, j'ai échoué à montrer l'activation de NOX2 en système acellulaire par le SDS. En outre, Shigenobu Umeki en 1990, qui utilisait cependant des conditions différentes, a lui aussi échoué à observer cette activation (421). La grande différence a été que le temps d'incubation en présence de SDS était dans mon cas de 90 minutes et dans leur cas de 5 minutes. Il faut de plus noter que l'effet d'un activateur amphiphile peut dépendre de la composition relative des lipides présents dans le milieu (325) et donc potentiellement de la composition relative des lipides présents dans la membrane des FM dont la fluidité membranaire et la perméabilité dépendent (118, 417). En outre, la composition en lipides de la membrane des neutrophiles dépend du donneur et pourrait même dépendre de l'ethnie et d'autres paramètres comme l'alimentation (402, 417, 422–425) d'autant que la composition des membranes peut apparemment dépendre de la composition en lipides dans le plasma sanguin (426). En outre, certains auteurs suggèrent que des micelles d'acide oléique pourraient rendre la membrane totalement perméable et nous permettre de nous affranchir de ces problèmes de perméabilité (352). *Pour l'étude de l'activité de NOX2 en tant qu'enzyme, il serait donc intéressant de réaliser l'ensemble des expériences sur des protéines purifiées et reconstituées dans des liposomes de composition connue. Pour étudier NOX2 dans son environnement membranaire naturel, il faudrait réaliser les expériences sur des échantillons statistiques très grands en ayant connaissance des paramètres du donneur, (âge, sexe, antécédents, alimentation, ethnie, mode de vie...), afin d'avoir des résultats comparables. Enfin, pour des expériences impliquant la présence d'une membrane biologique, il me semble indispensable de mettre en place une étude systématique de la composition en lipides de l'échantillon, par exemple par chromatographie liquide haute performance couplée avec un spectromètre de masse, des fractions membranaires que nous étudions. En outre, il serait intéressant de faire les expériences à partir de NOX2 exprimées en cellules eucaryotes de façon contrôlée.*

Les bicouches de phospholipides purs sont imperméables aux anions superoxyde alors que certaines membranes biologiques laissent passer les anions superoxyde par des canaux pouvant être inhibés par certaines molécules comme le 4-diisothiocyano-2,2-disulfonic acid stilbene (DIDS) ou l'acide niflumique (NFA) (427–429). Or, j'ai réalisé des tests au laboratoire en ajoutant du DIDS, ce qui provoque une diminution de la vitesse de réduction du Cyt_c mais aussi, proportionnellement, la diminution de la vitesse d'oxydation du NADPH. Pour les mesures, je me suis cependant limité à 10 µM de DIDS à cause de son absorbance importante à 340 nm. Néanmoins, en supposant que 10 µM de DIDS suffise pour une inhibition totale des canaux permettant aux anions superoxyde de sortir des

vésicules, leur détection par le CytC peut vouloir dire que sur la grande quantité produite, une certaine quantité passe à travers la membrane sous la forme O_2^- ou HO_2 (ce dernier passe facilement les membranes). Deuxième hypothèse, seuls sont détectés les anions superoxyde issus de l'activité diaphorase, même si je considère pour l'heure cette activité comme artefactuelle, et la totale séquestration des anions superoxyde à l'intérieur de la vésicule empêche le transfert d'électron à travers la membrane. Troisième hypothèse, le DIDS n'impacte pas du tout la sortie des anions superoxyde, tout se passe comme en son absence au niveau membranaire, mais il provoque une inhibition de NOX2.

Ainsi concernant uniquement l'influence des caractéristiques de la membrane sur les mesures, il est possible de supposer que l'activité mesurée augmente en fonction de la perméabilisation de la membrane par l'AA, puis diminue au-delà de la concentration optimale à cause d'une trop grande perturbation, voire une solubilisation, de la membrane et des protéines qu'elle contient, dont Nox2 et p22^{phox} qui pourraient être dénaturées, (lié au fait que Nox2 a tendance à libérer le fer qu'il contient à haute concentration en AA (231)). Il est nécessaire d'étudier plus avant ces hypothèses.

c. Les caractéristiques des protéines cytosoliques pouvant influencer les mesures

Il a été montré en système acellulaire que l'augmentation de la concentration en AA change la conformation de p47^{phox}. Ce changement de conformation de p47^{phox} en fonction de la concentration en AA est corrélé avec l'activation de plus en plus forte de NOX2 et il a été suggéré mais non démontré que la désactivation progressive de l'enzyme au-delà de la concentration optimale en AA, (ou en SDS), pourrait être due à une dénaturation de p47^{phox} ou d'une autre protéine du complexe NADPH oxydase, (254), comme la protéine p67^{phox} qui est très sensible, (beaucoup plus que p47^{phox}), à la dénaturation thermique à 46 °C, (mais peu à 41 °C) (430).

En cellules, la protéine p47^{phox} permet d'organiser l'assemblage du complexe après qu'elle a subi des phosphorylations ((236, 237, 431–437) et revues (237, 238)). Or, il a été montré qu'une phosphorylation inadaptée ou un excès de phosphorylation, (donc un excès de charges négatives, ou une configuration de charges négatives inadaptée), laisse p47^{phox} inactive vis-à-vis de la NADPH oxydase (438, 439), les mêmes auteurs qui ont fait l'hypothèse de la dénaturation à haute concentration en AA supposent **qu'un excès d'AA pourrait avoir le même effet qu'une hyperphosphorylation en conférant à p47^{phox} un excès de charges négatives dont l'impact sur la structure ou sur ses capacités d'interaction conduirait à inhiber son effet (254) et ceci pourrait contribuer à la désactivation de l'enzyme à haute concentration en AA.**

Lorsque p47^{phox} est préalablement phosphorylée *in vitro* à l'aide de la PKC, son ajout au reste du système acellulaire active significativement NOX2 (440). En outre, l'effet de ces phosphorylations sur l'environnement des tryptophanes (441), et donc probablement sur la structure locale, est très similaire à l'effet de la concentration optimale pour l'activation en SDS ou en AA (254, 440). Il a aussi été confirmé par dichroïsme circulaire que le SDS (254) ainsi que l'AA (442) modifient de la même façon la structure secondaire de p47^{phox} et qu'un excès d'AA la perturbe drastiquement.

Plusieurs hypothèses peuvent être faites : les queues hydrophobes de l'AA s'insèrent dans les parties hydrophobes de p47^{phox} et les charges négatives qui se retrouvent en surface pourraient alors interagir avec des acides aminés

positifs d'autres protéines ou des têtes polaires de phospholipides. Inversement, les charges négatives de l'AA pourraient se fixer sur des acides aminés positifs de p47^{phox} et les queues hydrophobes de l'AA iraient ainsi s'insérer dans le feuillet lipidique de la membrane des FM ou dans des zones hydrophobes de protéines partenaires et joueraient ainsi un rôle d'ancrage. Autrement, l'AA peut simplement provoquer des modifications conformationnelles permettant l'interaction consécutive de p47^{phox} indépendamment de l'AA (seules les régions d'interaction spécifiques de p47^{phox} seraient ainsi impliquées). Enfin, j'inclus la possibilité que les trois effets puissent exister.

J'ai présenté en introduction que toutes les autres protéines du complexe peuvent également être phosphorylées et je propose donc également ce type d'interprétations pour les autres protéines du complexe.

Ainsi, l'augmentation de la concentration en AA change la conformation de certaines protéines du complexe, ce qui pourrait conduire à l'activation de l'enzyme. La diminution de l'activité au-delà de l'optimum de concentration en AA pourrait être liée à la dénaturation d'une ou plusieurs protéines du complexe, (probablement p67^{phox}), en fonction de l'augmentation de la concentration en AA. En outre, une courbe en cloche est aussi observée en absence de p47^{phox}, (non présenté ici). De plus, lorsque le trimère de Pick est utilisé à la place des protéines cytosoliques séparées, l'ASM reste quasi constante bien au-delà de la concentration optimale en AA (370, 443). Ces deux résultats renforcent l'hypothèse de l'existence d'une dénaturation d'une autre protéine que p47^{phox}, conduisant à la désactivation de l'enzyme.

d. Les caractéristiques de l'AA, du NADPH et de l'anion superoxyde pouvant influencer les mesures

Outre le fait que les anions superoxyde sont dismutés, (**E.Réaction III-3**), avec une constante de vitesse de l'ordre de $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (368, 369, 388) au pH 7,4 leur réaction avec l'AA a une constante de vitesse négligeable alors que la réaction de HO₂ avec AA a une constante de vitesse de l'ordre de $3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (444).

La réaction des anions superoxyde avec le NADH est extrêmement lente, avec une constante de vitesse inférieure à $27 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ alors que les anions superoxyde réagissent très vite avec NAD[•] avec une constante de vitesse de l'ordre de $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (381). Si j'extrapole ces résultats au NADPH et suppose que le NADP[•] ne se forme pas, cette réaction n'entre pas en compétition avec la captation des anions superoxyde par le Cyt_c. Il a en outre été proposé arguments à l'appui, que certains dications comme le Mn²⁺, utilisent aussi les anions superoxyde pour catalyser l'oxydation non-enzymatique du NADPH selon une réaction en chaîne dont l'étape de propagation fait entrer en jeu les couples redox Mn³⁺/Mn²⁺ et NADP⁺/NADP[•] ainsi que NADP[•]/NADPH (445–447), contrairement à l'hypothèse de certains auteurs qui supposaient que le Mn²⁺ était un composant important du fonctionnement de l'enzyme elle-même (448). Bien qu'il n'y ait, a priori, pas de manganèse dans le milieu réactionnel, je pense qu'il est nécessaire d'évoquer les différentes voies potentielles d'utilisation du NADPH dans un tel milieu. De plus, dans le cas où du NADP[•] serait formé par la NADPH oxydase ou par une autre voie, il a été suggéré que celui-ci réduit le Cyt_c(Fe³⁺) (447). La même suggestion de réduction de la sonde de l'anion superoxyde réagissant avec le NADP[•] a été faite dans le cas de l'utilisation du Nitro Blue Tetrazolium, (NBT, une sonde qui fut très utilisée en recherche et abandonnée probablement à cause de sa difficulté d'utilisation, mais qui est encore utilisée aujourd'hui de façon qualitative pour

certain diagnostics cliniques), avec proposition d'une réaction en chaîne pouvant perturber la mesure (199), donc la possibilité de formation du NADP' a déjà été évoquée plusieurs fois dans le cadre de la NADPH oxydase.

Les anions superoxyde peuvent aussi être utilisés par certains cations métalliques induisant la catalyse de la peroxydation lipidique (449, 450). Ceci pourrait être évité en utilisant un chélatant comme la desferrioxamine (DFO) mais *je n'ai pas quantifié la peroxydation, ce qu'il serait intéressant de faire, par exemple en utilisant des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS)*. L'avantage de la DFO est qu'elle ne catalyse pas la production de ROS en présence de traces de cation fer ou de cation cuivre, contrairement à l'éthylène diamine tétraacétate (EDTA) et aux autres chélatants classiques. Des expériences avec ajout de DFO indiquent que celle-ci inhibe NOX2, de façon proportionnelle pour les deux observables, sans effet sur les différences observées en absence de DFO. L'absence d'effet n'implique pas une absence de peroxydation lipidique catalysée par du fer en solution, notamment parce que la DFO ne traverse pas, ou très peu, les membranes (451).

e. Les caractéristiques du Cytc pouvant influencer les mesures

Le Cytc peut interagir avec les acides gras, ce qui conduit à une modification du spin du fer de son hème (452–455). Ce même phénomène se passe lorsqu'il se lie aux lipides de la membrane, (notamment), par interactions électrostatiques, (rompues par une augmentation de la force ionique et des changements de pH), ou par effet hydrophobe ou encore via des liaisons hydrogènes, avec le concours supplémentaire de l'insertion d'un acide gras estérifié d'un phospholipide dans une crevasse hydrophobe du Cytc (456–459) ; il est en tout cas clair que les interactions entre le Cytc et la bicouche phospholipidique sont très importantes et de différentes natures (460). Le modèle d'ancrage du Cytc à la membrane, (vitesse d'ancrage de l'ordre de la milliseconde (459)), via l'insertion dans une crevasse hydrophobe d'un acide gras estérifié d'un phospholipide membranaire a été proposée comme pouvant s'appliquer à d'autres protéines périphériques, (461, 462), mais je n'ai pas trouvé de littérature parlant de ce type d'interaction pour les protéines cytosoliques *phox*.

Il est aussi important de noter que le CytcFe^{2+} peut aussi être oxydé par HO_2^- avec, à un pH de 5,3 une constante de vitesse comprise entre $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (366–368) et que ceci pourrait entrer en compétition avec la réduction du CytcFe^{3+} par l'anion superoxyde et son acide conjugué. En outre, la constante cinétique d'ordre 2 de la réaction de CytcFe^{3+} avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ est de $k = 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (366–368, 388) ce qui correspond à un facteur ≈ 5 seulement avec la constante de vitesse de dismutation des anions superoxyde. Je fais l'hypothèse que pour des faibles vitesses de production des anions superoxyde, ces derniers réagissent à l'intérieur de la vésicule de FM avant d'en sortir, d'autant plus que la concentration en AA est trop faible pour perméabiliser la membrane. Les anions superoxyde ne seraient donc pas détectés, ce qui expliquerait le fort rapport d'ASM à faibles concentrations en AA. Ainsi, la vitesse de réduction du Cytc par les anions superoxyde augmente lentement pour de faibles concentrations en AA, puis de plus en plus vite jusqu'au point d'inflexion décrit ci-avant. En revanche, la mesure du NADPH n'est pas soumise à des contraintes de perméabilité et l'augmentation de l'ASM est rapide même à basses concentrations en AA.

superoxyde. Les anions superoxyde peuvent subir de nombreuses réactions secondaires, principalement une dismutation. Le fait que la FM soit un système vésiculaire est un paramètre clé dans la complexité de la détection. De plus, la grande complexité du système rend indispensable de l'étudier dans son ensemble et pas seulement par parties.

L'ensemble de ces résultats et interprétations me permettent de faire plusieurs hypothèses :

- Pour une même concentration en AA, la différence d'ASM selon l'observable peut être due à une compétition entre la captation des anions superoxyde par le Cyt_c et la dismutation des anions superoxyde. Cet effet de dismutation serait augmenté par la séquestration des O₂⁻ dans les vésicules et donc très dépendant de la perméabilité des membranes pour le O₂⁻, perméabilité qui dépendrait de l'AA.
- Ces différences pourraient aussi être impactées par une combinaison des réactions secondaires sur le Cyt_c comme sa réoxydation par HO₂[•], ou encore H₂O₂. Il est aussi possible que la captation des anions superoxyde par le Cyt_c nécessite sa fixation à la membrane et donc la désorption des Cyt_c précédemment réduits, cet échange pourrait être une étape limitante.
- L'optimum de concentration en AA varie d'une observable à l'autre. Pour l'observable Cyt_c, cette concentration est supérieure à l'observable NADPH. Ceci pourrait être lié à la captation de l'AA par le Cyt_c qui diminue d'autant sa disponibilité pour la membrane des FM et pour les protéines du complexe et *il serait intéressant de tester cette hypothèse en réalisant des courbes dose-réponse à l'AA en présence de différentes concentrations en Cyt_c.*

2.2. VARIATION DES FONCTIONS F([NADPH])=ASM

Des différences d'ASM dépendant de la concentration en AA existent entre l'observable NADPH et l'observable Cyt_c. Je souhaite maintenant tester si ces différences varient en fonction de la concentration en substrat NADPH, notamment pour observer leur variation en fonction du niveau d'activité de NOX2. J'ai choisi d'ajouter la mesure de la consommation en dioxygène aux deux observables Cyt_c et NADPH afin d'avoir un paramètre supplémentaire à explorer. Ces mesures d'oxymétrie peuvent prendre du temps, notamment à cause de la durée de calibration de l'électrode ; le nombre de points obtenu est par conséquent très limité. Il est néanmoins possible d'en tirer des informations intéressantes, en restant toutefois conscient de la limite imposée par le faible nombre de mesures.

Je présente ici les mesures de l'ASM de NOX2 obtenue via la mesure de la consommation de dioxygène, de la consommation de NADPH et de la réduction du Cyt_c par NOX2 qui ont été réalisées en variant la concentration en NADPH. Les résultats sont présentés **Figure III-10A**.

2.2.1. PRESENTATION DES DONNEES ET DU TRAITEMENT MATHÉMATIQUE

De manière globale (**Figure III-10**), pour les trois observables, en absence de NADPH la vitesse est nulle, puis elle augmente de façon hyperbolique en fonction de l'augmentation de la concentration en NADPH, jusqu'à tendre vers une asymptote horizontale pour $[NADPH] \rightarrow +\infty$.

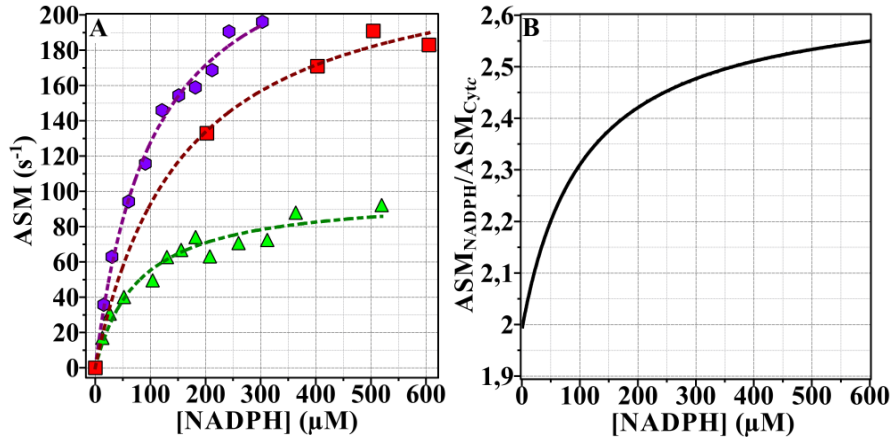


Figure III-10. Dépendance de l'ASM de NOX2 en fonction de la concentration en substrat NADPH.

Mesures faites à la concentration optimale en AA (46 μM) et à 25 $^{\circ}\text{C}$, en présence de 4 nM Cyt b_{558} , 200 nM p67 phox , 200 nM p47 phox , 200 nM Rac1Q61L avec 5 minutes d'incubation. **(A)** ASM en fonction de la concentration en NADPH par mesure de la consommation du NADPH (hexagone violet) ou par mesure de la réduction du Cyt c (50 μM) par les anions superoxyde (triangle vert) ou par mesure de la consommation du dioxygène (carré rouge). Les lignes pointillées violettes, vertes, ou rouges, correspondent respectivement aux ajustements non linéaires. **(B)** rapport des ajustements non linéaires de l'observable NADPH et de l'observable Cyt c .

En effet, chaque nuage de points correspondant chacun à une observable est facilement ajustable par une hyperbole rectangulaire dont l'équation correspond à l'équation de Michaelis-Menten-Henri, notée MMH, plus classiquement appelée équation de Michaelis-Menten, (**Équation III-1**, (468, 469)), utilisant des paramètres apparents, qui correspond en fait théoriquement à la dérivée de la fonction représentant l'évolution totale de la concentration en NADPH en fonction du temps, (jusqu'à consommation totale d'un des substrats), de la réaction globale catalysée par l'enzyme, (470), à une concentration constante saturante en dioxygène et en absence d'inhibition par les produits et d'inhibition par excès de substrat.

$$v = \frac{k_{\text{cat}}^{\text{app}} \cdot [\text{Cyt}b_{558}]_0 \cdot [\text{NADPH}]}{K_m^{\text{app}} + [\text{NADPH}]} \Leftrightarrow \frac{v}{[\text{Cyt}b_{558}]_0} = \frac{k_{\text{cat}}^{\text{app}} \cdot [\text{NADPH}]}{K_m^{\text{app}} + [\text{NADPH}]} \Leftrightarrow \boxed{\text{ASM} = \frac{k_{\text{cat}}^{\text{app}} \cdot [\text{NADPH}]}{K_m^{\text{app}} + [\text{NADPH}]}} \quad \text{Équation III-1}$$

Où v est la vitesse initiale mesurée ($\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$), $V_{\text{lim}}^{\text{app}} = k_{\text{cat}}^{\text{app}} \cdot [\text{Cyt}b_{558}]_0$ est la vitesse limite apparente extrapolée pour $[\text{NADPH}] \rightarrow +\infty$ (en absence d'inhibition par excès de substrat) ($\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$) pour une concentration constante donnée en dioxygène, ASM est l'activité spécifique moléculaire correspondant à la vitesse initiale mesurée à une concentration donnée en NADPH et à une concentration constante donnée en dioxygène rapportée à la concentration d'enzyme (s^{-1}), $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ est la constante catalytique apparente pour une concentration constante donnée de dioxygène correspondant à la vitesse limite extrapolée pour $[\text{NADPH}] \rightarrow +\infty$ (en absence d'inhibition par excès de substrat) et rapportée à la concentration d'enzyme totale (s^{-1}) et $[\text{Cyt}b_{558}]_0$ est la concentration en enzyme totale (M). K_m^{app} est la constante de Michaelis apparente du NADPH pour l'enzyme à une concentration fixe donnée en dioxygène (M). Les grandeurs K_m^{app} et $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ sont des paramètres obtenus par régression non linéaire d'un ensemble de points. Notons que la vitesse limite est extrapolée mathématiquement à l'asymptote horizontale de l'hyperbole pour une concentration saturante en substrat, (il s'agit d'une limite), donc je préfère utiliser « limite » plutôt que le traditionnel « maximum » pour qualifier la vitesse à substrat saturant, conformément aux arguments de Athel Cornish-Bowden (470).

2.2.2. MISES EN GARDE. LES LIMITES DE CE MODELE. L'ORIGINE DES PARAMETRES.

La mesure de l'activité d'une enzyme catalysant la transformation d'un **seul substrat** en fonction de la concentration en ce substrat permet, dans certaines conditions, la mesure de la constante de Michaelis (K_m) du substrat pour l'enzyme considérée. La constante de Michaelis du substrat d'une enzyme donnée dite Michaelienne, le K_m , est une **pseudo-constante de dissociation** qui peut dans un premier temps et de façon simpliste être considérée comme une quantification de l'affinité de ce substrat pour l'enzyme, ce qui conduit, considérant cette approximation, que le K_m est inversement proportionnel à l'affinité du substrat. En réalité, le K_m est une constante traduisant de façon simultanée plusieurs effets incluant notamment la réaction catalysée elle-même, (donc pas seulement l'affinité du substrat pour l'enzyme), et relier le K_m à l'affinité d'un substrat pour une enzyme nécessite obligatoirement d'évoquer qu'il s'agit seulement d'une approximation et potentiellement de discuter du bien-fondé des interprétations qui en sont issues en fonction de ces mises en garde. D'un point de vue algébrique, le K_m correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de la vitesse limite.

Le modèle présenté ci-dessus est valable dans le cas d'un schéma cinétique hypothétique tel que celui présenté en **E.Réaction III-4**, où E représente l'enzyme libre, A représente son substrat libre, EA représente le complexe enzyme-substrat et P représente le produit libre. k_1 représente la constante de vitesse de formation du complexe EA par association de A et de E, k_{-1} la constante de vitesse de dissociation du complexe EA en A et E, et k_2 la constante de vitesse correspondant de façon simultanée à la transformation de A en P et à la dissociation du complexe EP, ce modèle supposant l'absence de complexe EP ; k_2 étant aussi homogène à une constante de vitesse d'ordre 1 et égale à la constante catalytique limite k_{cat}^{app} (en condition de substrats en concentrations infinies, en absence d'inhibition par excès de substrat, en absence de catalyse de la réaction retour). En faisant l'hypothèse que l'étape cinétiquement déterminante est régie par k_2 , que la concentration en complexe EA est négligeable devant la concentration en A initiale et que le complexe EA est à l'état quasi stationnaire, (EQS) (concentration constante selon Bodenstein (471, 472)) il est facile de retrouver l'équation de MMH d'après le traitement de Briggs et Haldane (1925, (473)).



Sachant que le complexe EA est à l'EQS, $\frac{d[EA]}{dt} = k_1[E][A] - [EA](k_{-1} + k_2) = 0 \Rightarrow [EA] = \frac{k_1}{k_{-1}+k_2} [E][A]$

Sachant de plus que $[E]_0 = [E] + [EA]$ et comme $[E]_0 \ll [A]_0$, alors $[A]_0 = [A] + [EA] \approx [A]$

$$\text{Ainsi, } [E]_0 = [E] + \frac{k_1}{k_{-1}+k_2} [E][A]_0 \Rightarrow [E] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{k_1}{k_{-1}+k_2} [A]_0}$$

Comme $k_2 \ll k_1$, alors $v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EA] = k_2 \cdot \frac{k_1}{k_{-1}+k_2} \cdot [E][A]_0 = k_2 \cdot \frac{k_1}{k_{-1}+k_2} \cdot \frac{[E]_0[A]_0}{1 + \frac{k_1}{k_{-1}+k_2} [A]_0}$

$$\boxed{v = \frac{k_2[E]_0[A]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [A]_0}} \Leftrightarrow v = \frac{k_{cat}^{app} \cdot [E]_0[A]_0}{K_m^{app} + [A]_0} \Leftrightarrow \boxed{ASM^{app} = \frac{k_{cat}^{app} \cdot [A]_0}{K_m^{app} + [A]_0}}$$

La mesure du K_m des substrats d'une enzyme Michaelienne est donc généralement indispensable pour l'étude de cette enzyme. Il faut noter que la saturation d'une enzyme Michaelienne par son ou ses substrats est théorique et qu'il est en pratique impossible, mathématiquement, d'atteindre cette saturation (comportement asymptotique horizontal de l'activité enzymatique pour $[S] \rightarrow \infty$). Néanmoins, la vitesse limite correspondant à cette saturation en substrat est généralement approchée pour des concentrations en substrat supérieures à $100 \cdot K_m$, qui correspond à une ASM de $0,990 \cdot k_{cat}^{app}$ et non pas la valeur $10,0 \cdot K_m$ souvent utilisée, qui correspondrait à une ASM de seulement $0,909 \cdot k_{cat}^{app}$ (470).

Dans le présent cas, NOX2 catalyse une réaction à trois substrats et quatre produits, ce qui complique beaucoup l'équation. En pratique, la première simplification consiste à ignorer la libération du proton en tant que produit, le milieu étant tamponné, ce qui permet de simplifier la réaction alors approximée à trois substrats, deux substrats étant identiques et à trois produits, deux produits étant identiques. Les différentes étapes du cycle catalytique de NOX2 ne sont pas connues et les seules des hypothèses mécanistiques et les équations qui en découleraient n'ont qu'un sens limité sans être expérimentalement confirmées.

Il est connu, notamment depuis la confirmation par structure cristallographique de Nox5 (162, 163), qu'un seul dioxygène peut se fixer à l'enzyme, le deuxième s'y associant consécutivement après la dissociation de l'anion superoxyde. En revanche il n'est pas décrit s'il y a formation d'un complexe ternaire, (enzyme associée avec deux substrats), avec présence simultanée de NADPH et d' O_2 associés à l'enzyme, ou si toutes les étapes d'associations et de dissociations sont indépendantes. Il est donc possible d'avoir soit une succession de complexes binaires entre l'enzyme et un seul de ses substrats, soit une succession de complexes ternaires et de complexes binaires. En absence de ces informations, seule une approche purement théorique peut être faite. Néanmoins, si l'enzyme est Michaelienne et qu'il n'y a pas d'inhibition par les substrats, la dépendance de l'ASM en fonction de la concentration en NADPH ou en dioxygène, toutes choses égales par ailleurs, sera nécessairement hyperbolique (470).

Dans le cas de mes expériences, à une concentration donnée en dioxygène, (environ $239 \mu M$ d'après la théorie et plutôt $255 \mu M$ en pratique), la dépendance de l'ASM en fonction de la concentration en NADPH a une allure hyperbolique même à faibles concentration en NADPH et quelle que soit l'observable. Par conséquent, en intégrant l'ensemble des hypothèses et des mises en garde précédentes, la NADPH oxydase du phagocyte a un comportement purement Michaelien vis-à-vis du NADPH à une concentration de dioxygène de l'ordre de grandeur de $255 \mu M$ et il n'y a visiblement pas d'allostérie, dans les conditions de la mesure. S'il y avait un comportement allostérique de l'enzyme, la forme de la dépendance de l'ASM en fonction de la concentration en NADPH serait initialement sigmoïdale et il ne serait pas possible de réaliser un ajustement non linéaire pertinent basé sur une hyperbole rectangulaire.

Ainsi, les paramètres de l'hyperbole déterminés par régression non linéaire sont des paramètres apparents phénoménologiques, (pas réellement des constantes), pour une concentration donnée en dioxygène d'environ $255 \mu M$. Je les note donc k_{cat}^{app} et K_m^{app} et insiste sur le fait qu'il s'agit de paramètres enzymatiques apparents, le K_m^{app} donnant seulement une indication *relative* de l'affinité apparente du NADPH pour l'enzyme. Ces faits étant établis, je me servirai de ces paramètres en ayant pleinement conscience de leur limitation.

2.2.3. OBSERVATIONS

Ainsi, quelle que soit l'observable, l'ASM augmente selon une hyperbole en fonction de l'augmentation de la concentration en NADPH. Des différences sont cependant clairement visibles entre les trois observables, avec, comme précédemment, l'observable Cyt_c qui donne des valeurs d'ASM très inférieures aux valeurs de l'observable NADPH alors que l'observable O₂ a des valeurs d'ASM intermédiaires, plus proches, mais inférieures, des valeurs de l'observable NADPH.

Le rapport des ASM, ASM_{NADPH}/ASM_{Cyt_c} , dont le tracé en fonction de la concentration en NADPH est présenté en **Figure III-10B**, permet d'observer que même pour des faibles ASM avec des concentrations en NADPH tendant vers zéro, il existe un facteur 2 entre l'observable NADPH et l'observable Cyt_c, ce qui a précédemment été observé pour une concentration en AA de 1 μ M et de 49 μ M en présence de 200 μ M de NADPH (**Figure III-8B**). Il s'avère que le rapport entre les deux observables augmente en fonction de l'augmentation de la concentration en NADPH et donc en fonction de l'augmentation de l'activité de l'enzyme. Il est clair que plus l'activité est importante, plus la variation entre deux observables est grande, (même si cette variation est assez faible comparé à ce qui a été observé en **Figure III-8B**), ce qui peut signifier que plus vite les anions superoxyde sont produits, plus leur détection par le Cyt_c est difficile. A 200 μ M, dans les mêmes conditions que précédemment, il existe un facteur 2,42 entre ASM_{NADPH} et ASM_{Cyt_c} ce qui correspond à ce qui a été précédemment mesuré en présence de 36 μ M d'AA et 200 μ M de NADPH (**Figure III-8B**).

Les mesures de consommation du dioxygène par oxymétrie sont longues et la mise au point du dispositif expérimental est fastidieuse. C'est pourquoi le nombre de points des mesures de la consommation du dioxygène est très limité et insuffisant selon moi, par rapport aux autres techniques. Par exemple, il manque des points à faibles concentrations en NADPH pour pouvoir observer s'il y a ou non un comportement allostérique de l'enzyme vis-à-vis du dioxygène. Dans tous les cas, il aurait fallu que je réplique plusieurs fois ces expériences notamment avec d'autres préparations de FM pour pouvoir conclure rigoureusement. Cependant, je vais interpréter les données ici présentées pour en tirer le maximum d'informations, dont les conclusions seront à pondérer par le fait qu'un seul réplica par concentration a été fait.

2.2.4. INTERPRETATIONS

La réaction catalysée par NOX2 faisant intervenir NADPH et O₂, il est théoriquement possible de mesurer une constante de Michaelis pour le dioxygène, $K_m^{app}(O_2)$ et une constante de Michaelis pour le NADPH, $K_m^{app}(NADPH)$. Expérimentalement, il est possible de déterminer le K_m d'un substrat d'une enzyme en mesurant la vitesse initiale de la réaction catalysée à différentes concentrations d'un des substrats, les autres substrats étant en concentration saturante par rapport à l'enzyme, (si et seulement s'il n'y a pas d'inhibition par excès de substrat), toutes choses égales par ailleurs. Dans le cas de NOX2, il est techniquement compliqué de se placer dans des conditions particulières de gaz solubilisés et le LCP n'a pas la possibilité technique (mélangeur de gaz) de le faire. Par conséquent, la mesure du $K_m^{app}(O_2)$ n'a pas été réalisée. L'équation de MMH étant théoriquement la dérivée de la fonction représentant la cinétique de consommation du NADPH en concentration saturante constante en dioxygène,

j'ai néanmoins essayé de réaliser l'ajustement non linéaire des cinétiques inversées de consommation du NADPH via l'équation intégrée de MMH (ANNEXE 3) pour obtenir les paramètres de l'équation et donc déterminer le K_m^{app} (NADPH), mais les régressions que j'ai pu tester donnent de très mauvais résultats tant visuellement qu'au niveau du coefficient de régression. J'ai donc simplement admis que NOX2 a un comportement Michaélien. Cependant, ces résultats ont été obtenus sans contrôle de la concentration en dioxygène, ainsi ils ne sont valables que pour une concentration en dioxygène dans la solution d'environ 239 μM , (255 μM expérimentalement). J'ai donc estimé le K_m^{app} (NADPH) et la k_{cat}^{app} avec la technique des vitesses initiales uniquement et les résultats sont présentés dans le **Tableau III-1**.

	Cytc	O ₂	NADPH
K_m^{app} (NADPH) (μM)	79±16	158±39	106±11
k_{cat}^{app} (s^{-1})	99±6	239±17	262±10
R ²	0,96	0,995	0,994

Tableau III-1. Paramètres enzymatiques de NOX2 vis-à-vis du NADPH à 239 μM (255 μM) de dioxygène.

Mesures faites en présence de 4 nM de Cytb₅₅₈ et d'environ 200 nM de p67^{phox}, de p47^{phox} et de Rac1Q61L, ainsi que de 46 μM d'AA. K_m^{app} du NADPH (ligne 1) et k_{cat}^{app} de l'enzyme (ligne 2) mesurées par l'observable Cytc (colonne 1), l'observable dioxygène (colonne 2) ou l'observable NADPH (colonne 3). La troisième ligne correspond aux coefficients de régression hyperboliques associés selon l'équation apparente de MMH, ayant permis d'obtenir le K_m^{app} et le k_{cat}^{app} .

Il y a de fortes variabilités du K_m^{app} et du k_{cat}^{app} en fonction de l'observable. Ces résultats confirment qu'il y a bien un problème de mesure de la stœchiométrie théorique de la réaction catalysée par l'enzyme, comme cela a été précédemment constaté, en ajoutant la donnée de la mesure du dioxygène. Cela supporte l'hypothèse précédemment faite qu'il existe une perturbation de la mesure, possiblement liée à des réactions secondaires ou à un contexte physicochimiques particulier. En outre, selon moi, la seule façon pertinente de déterminer un K_m^{app} , (ou un K_m) dans un tel système peu caractérisé, est de mesurer la consommation du substrat lui-même de façon directe ou indirecte et il me semble incohérent, dans le présent cas, de déterminer un K_m^{app} , (ou un K_m), à partir de la mesure de la formation d'un produit ou de la consommation d'un autre substrat.

La mesure de la réduction du Cytc par les anions superoxyde est la technique la plus utilisée dans la communauté scientifique pour suivre la production des anions superoxyde produits par NOX2. La prochaine partie sera focalisée sur l'étude du Cytc afin de vérifier si le problème est intrinsèque au Cytc ou pas. Je chercherai notamment si le Cytc est bien en concentration saturante, ou encore si l'effet des constituants du système sur le Cytc perturbe ou pas sa capacité à capter des électrons et donc son efficacité en tant que sonde.

3. Etude de la saturabilité du système par le Cytochrome c

Cette partie vise à étudier la saturation du système par le Cytc ainsi que l'impact des composants du système acellulaire NADPH oxydase sur les capacités du Cytc à capter l'électron de l'anion superoxyde. Des études spectrales seront notamment réalisées, mais aussi des études fonctionnelles par spectrophotométrie d'absorption ou encore par oxymétrie. Le coefficient d'extinction molaire différentiel à 550 nm du Cytc de la littérature sera comparé au coefficient d'extinction molaire différentiel à 550 nm expérimental sur le spectrophotomètre utilisé, le coefficient d'extinction molaire d'une espèce chimique pouvant dépendre du spectrophotomètre.

3.1. ETUDE CINÉTIQUE, SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION A 550 NM : $ASM = F([CYTC])$

Dans un premier temps, une étude fonctionnelle a été réalisée en mesurant la vitesse de la production des anions superoxyde catalysée par NOX2 en suivant la réduction du Cyt_c en présence de différentes concentrations en Cyt_c. L'analyse sera complétée par une expérience de calibration du spectrophotomètre utilisé à 550 nm avec le Cyt_c. Ceci permettra d'établir s'il existe une saturabilité du système par le Cyt_c et quelle est la limite de concentration en Cyt_c qu'il est possible d'utiliser.

Afin de tester la saturation par le Cyt_c, j'ai mesuré l'ASM de NOX2 en faisant varier la concentration en Cyt_c toutes choses égales par ailleurs en présence de 200 μ M de NADPH, à la concentration optimale en AA (46 μ M) et à 25 °C. Les résultats, obtenus sur deux fractions membranaires issues de deux donneurs différents sont reportés dans la **Figure III-11**.

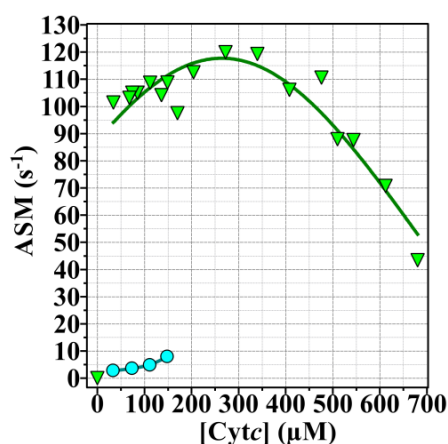


Figure III-11. Dépendance de l'ASM de NOX2 en fonction de la concentration en Cyt_c (observable).

Mesures par spectrophotométrie d'absorption à 550 nm à 25 °C, à la suite d'une incubation de 5 minutes, en présence de 200 μ M de NADPH, 4 nM de Cyt_{b558}, 200 nM p67^{phox}, 200 nM p47^{phox}, 200 nM de Rac1 Q61L et 46 μ M AA. Les mesures sont une compilation de deux donneurs distincts. Mesures en absence de SOD triangles inversés verts et mesures en présence de 500 nM de SOD cercles pleins cyan.

La **Figure III-11** montre que la quantité d'anions superoxyde détectée est nulle en absence de Cyt_c. En présence de 30 μ M à environ 300 μ M de Cyt_c, l'ASM augmente quasi linéaire de 100 s⁻¹ à 120 s⁻¹. Au-delà de 300 μ M, la détection des anions superoxyde chute drastiquement quasi-linéairement jusqu'à 700 μ M de Cyt_c. Il faut noter que la détection est inhibée par la SOD et il existe clairement une compétition de captation de l'anion superoxyde par le Cyt_c par rapport à la SOD, ce sont donc bien les anions superoxyde qui provoquent la réduction du Cyt_c. En considérant supplémentaires que plus l'ASM augmente, plus le rapport entre l'observable NADPH et l'observable Cyt_c augmente (**Figure III-10B**), j'en déduis que la détection des anions superoxyde par le Cyt_c n'est pas directement proportionnelle à la vitesse de production des anions superoxydes par NOX2.

Ainsi, cela montre directement que 100 μ M en Cyt_c n'est pas une concentration saturante pour la détection des anions superoxyde par NOX2 et donc que l'ASM mesurée ne correspond pas à la vitesse de production réelle des anions superoxyde. De plus, la vitesse de réduction du Cyt_c n'est pas directement proportionnelle à la vitesse de production des anions superoxyde par NOX2 et dépend donc de facteurs supplémentaires comme potentiellement la perméabilité membranaire, les réactions secondaires... Une ASM maximale est observée à 300 μ M de Cyt_c, puis une diminution, probablement due à la turbidité du milieu malgré la cuvette de 1 mm

de trajet optique, ce qui empêche de déterminer une concentration réellement saturante en Cyt_c vis-à-vis des anions superoxyde produits par NOX2, contrairement à la concentration saturante d'environ 100 μM qui a été déterminée en cellules (474). Je note cependant que vu la concentration importante en Cyt_c, il est possible que celui-ci interagisse directement avec le Cyt_{b558} et perturbe sa structure, ce qui donnerait à l'effet observé un caractère artefactuel.

J'ai attribué la diminution de détection des anions superoxyde produits à l'augmentation de la turbidité du milieu et donc à la modification du coefficient d'extinction molaire au-delà de cette concentration avec un trajet optique de 1 mm. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai réalisé une gamme d'étalonnage du spectrophotomètre dans les mêmes conditions. De plus, j'ai réalisé une brève étude spectrale pour déterminer différents paramètres du stock de Cyt_c ainsi que l'effet des autres constituants du système acellulaire, (AA, FM, protéines cytosoliques), sur la coordination du fer du Cyt_c.

3.2. UNE ETUDE SPECTRALE UV-VIS A=F(A) DU CYT_CDANS LE CONTEXTE DE LA DETECTION D'O₂⁻

3.2.1. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION ET DU TAUX DE REDUCTION SPONTANEE DU CYT_C

Dans cette partie seront présentés un exemple de détermination de la concentration du stock de Cyt_c par spectrophotométrie d'absorption UV-Visible ainsi qu'une vérification du taux de réduction spontanée du Cyt_c à la suite d'un stockage. Cela permettra également d'introduire une étude spectrale du Cyt_c en présence des autres composants du système acellulaire fonctionnel. Ces spectres réalisés sur une solution de Cyt_c diluée 1000 fois dans du PBS sont présentés en **Figure III-12**.

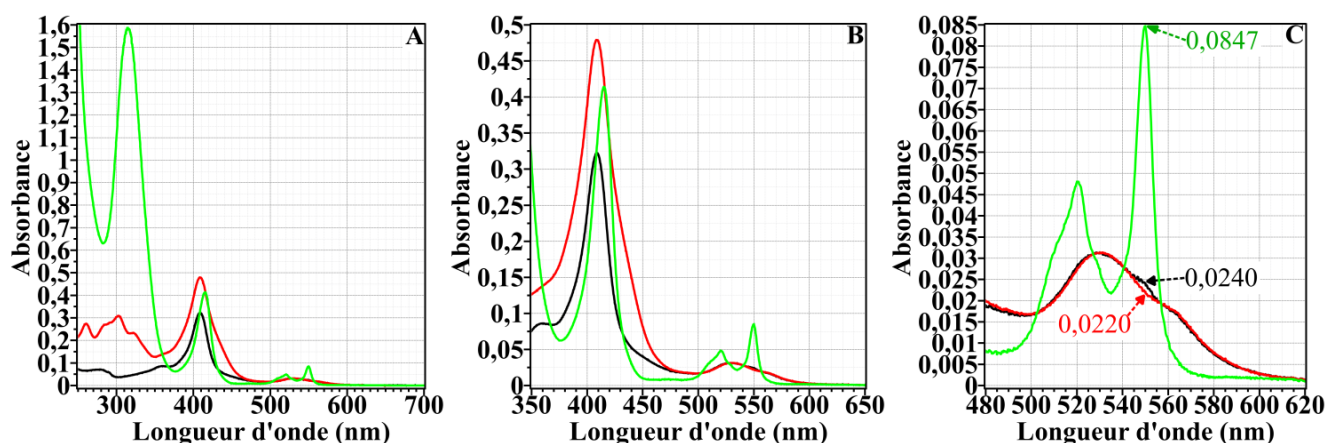


Figure III-12. Détermination de la concentration et du taux de réduction spontanée du Cyt_c par spectrophotométrie d'absorption. Spectres d'absorption UV-Visible. Zéro commun à 700 nm. Mesures en PBS Dulbecco à 25 °C à partir d'un stock de Cyt_c stocké 3 mois à -80 °C dilué 1000 fois. Spectres du Cyt_c sans modification en noir, oxydé avec 500 μM de ferricyanure de potassium en rouge ou réduit avec quelques grains de dithionite de sodium en vert. (A) Echelle de longueurs d'onde entre 250 et 700 nm. (B) Echelle de longueurs d'onde entre 350 et 650 nm. (C) Echelle de longueurs d'onde entre 480 et 620 nm. Sont fléchées les valeurs d'absorbance à 550 nm pour chacun des spectres.

Le spectre de la solution stock de Cyt_c sans adjonction d'oxydant ou de réducteur est présenté en noir dans la **Figure III-12**. Ce spectre présente deux bandes B/Soret, à 360 nm et 409 nm, ainsi qu'une bande Q à 529 nm possédant deux épaulements, à 550 nm et à 564 nm.

Le spectre du Cyt_c oxydé par du ferricyanure de potassium est présenté en rouge dans la **Figure III-12**. Il présente une bande B/Soret à 409 nm possédant un épaulement vers 425 nm. Est aussi visible un épaulement à 360 nm pouvant aussi correspondre à la deuxième bande B observée sur le spectre du Cyt_c non modifié. L'épaulement à 425 nm correspond ici à la bande d'absorption spécifique du ferricyanure de potassium additionnée à la bande B à 409 nm du Cyt_c oxydé. D'autres petites bandes d'absorption dues au ferricyanure de potassium sont visibles entre 250 et 350 nm. Le spectre du Cyt_c oxydé en rouge présente également une bande Q large beaucoup moins intense à 530 nm comprenant un épaulement à 564 nm. L'épaulement à 550 nm observé sur le spectre de la solution de Cyt_c non modifié n'est donc plus visible sur le spectre du Cyt_c oxydé. Comme la bande à 550 nm est spécifique de la forme réduite du Cyt_c, cela signifie que le stock contient une petite proportion de Cyt_c réduit.

Le spectre du Cyt_c réduit par le dithionite de sodium est présenté en vert dans la **Figure III-12**. Il présente une bande à 315 nm correspondant à une bande d'absorption spécifique du dithionite de sodium, ainsi que la bande de Soret du Cyt_c réduit à 415 nm. De plus, sont visibles deux bandes spécifiques Q, dont une à 520 nm et une autre plus intense à 550 nm ainsi qu'un épaulement à 529 nm.

Ainsi, une réduction du fer de l'hème du Cyt_c implique plusieurs changements spectraux, notamment le déplacement hyperchrome et bathochrome de 409 nm vers 415 nm de la bande de Soret, mais aussi l'apparition de nouvelles bandes Q plus intenses, incluant la bande à 550 nm, particulièrement utile pour déterminer spectralement la concentration en Cyt_c ou encore pour suivre la réduction du Cyt_c en fonction du temps lors des mesures de cinétique enzymatique. Il est nécessaire d'insister sur le fait que cette bande est très étroite, ce qui implique un risque important de variabilité des mesures dépendant de la bande passante du spectrophotomètre.

En absence d'oxydant ou de réducteur du Cyt_c, il n'y a à priori aucun moyen de déterminer la proportion de Cyt_c réduit ou oxydé donc il n'est pas possible de savoir quel coefficient d'extinction molaire utiliser directement pour la solution stock de Cyt_c. Il est donc nécessaire d'ajouter un oxydant pour obtenir du Cyt_c totalement oxydé de coefficient d'extinction molaire connu, ici j'ai utilisé le ferricyanure de potassium, (475), puis d'ajouter un réducteur pour obtenir du Cyt_c totalement réduit de coefficient d'extinction molaire connu, ici j'ai utilisé le dithionite de sodium (371–375, 476), afin de mesurer la différence d'absorbance à 550 nm pour déterminer la concentration réelle en Cyt_c.

La **Figure III-12C** présente la partie des spectres utilisée pour déterminer la concentration en Cyt_c ainsi que le taux de réduction spontanée du stock. A partir de l'absorbance à 550 nm du Cyt_c réduit : A_{Red}^{550} (vert) et de l'absorbance à 550 nm du Cyt_c oxydé : A_{Ox}^{550} (rouge), il est possible de remonter à la concentration en Cyt_c de la solution stock via la loi de Beer-Lambert en considérant le coefficient d'extinction molaire à 550 nm du Cyt_c réduit : $\epsilon_{\text{Red}}^{550}$, du Cyt_c oxydé : $\epsilon_{\text{Ox}}^{550}$, ainsi que le coefficient d'extinction molaire différentiel : $\Delta\epsilon_{\text{Cyt}c}^{550} = \epsilon_{\text{Red}}^{550} - \epsilon_{\text{Ox}}^{550} = 21 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et le trajet optique $\ell = 1 \text{ cm}$. Ainsi :

$$\Delta A_{\text{Cyt}c}^{550} = A_{\text{Red}}^{550} - A_{\text{Ox}}^{550} = \epsilon_{\text{Red}}^{550} \cdot \ell \cdot [\text{Cyt}c] - \epsilon_{\text{Ox}}^{550} \cdot \ell \cdot [\text{Cyt}c] = (\epsilon_{\text{Red}}^{550} - \epsilon_{\text{Ox}}^{550}) \cdot \ell \cdot [\text{Cyt}c] = \Delta\epsilon_{\text{Cyt}c}^{550} \cdot \ell \cdot [\text{Cyt}c]$$

Dans ce cas particulier (**Figure III-12C**), sachant que la solution de Cyt_c est diluée 1000 fois et que je trouve $\Delta A_{\text{Cyt}c}^{550} = 0,0627$, cela permet d'obtenir $[\text{Cyt}c] = 3,0 \text{ mM}$.

Dans mes expériences, deux ajouts successifs de ferricyanure ou deux ajouts successifs de dithionite de sodium ont été systématiquement réalisés pour s'assurer de la totalité de l'oxydation ou respectivement de la réduction du Cyt_c. En pratique, un seul ajout était systématiquement suffisant.

Il faut noter que le Cyt_c vendu par Sigma disponible au laboratoire contient de nombreux précipités blancs de nature inconnue, je suis donc dans l'impossibilité de peser une masse précise de ce Cyt_c ce qui implique de prendre des précautions particulières lors de la préparation de la solution stock. Cela aura des implications dans une prochaine partie sur la vérification du coefficient d'extinction molaire différentiel du Cyt_c sur le spectrophotomètre utilisé.

Afin de savoir précisément ce que nous utilisons pour sonder les anions superoxyde, il est important d'évaluer le taux de réduction spontané du Cyt_c dans la solution stock, après 3 mois à 80 °C. J'ai précédemment reporté un épaulement à 550 nm dans la solution stock de Cyt_c non modifié, épaulement qui n'existe plus dans la solution de Cyt_c oxydé par du ferricyanure de potassium. En outre, la bande d'absorption à 530 nm du Cyt_c oxydé a subi un décalage hypsochrome et hyperchrome très léger, (visible, mais possiblement non significatif), par rapport à la solution de Cyt_c stock non modifiée. Cela signifie qu'il y a un mélange entre du Cyt_c oxydé et du Cyt_c réduit dans le stock. L'absorbance différentielle à 550 nm nous permet de quantifier la concentration en Cyt_c réduit dans la solution stock, qui est de 95 µM. Il y a donc 3,2 % de Cyt_c réduit dans la solution stock de Cyt_c stockée à -80 °C pendant 3 mois.

Ainsi, il est facile de déterminer la concentration d'un stock de Cyt_c à condition de savoir que le Cyt_c réduit est en équilibre avec le Cyt_c oxydé. Il est nécessaire d'oxyder le Cyt_c, puis de le réduire pour déterminer la concentration d'un stock à partir du coefficient d'extinction molaire différentiel. Dans ce cas particulier, il y a 3,2 % de Cyt_c spontanément réduit dans le stock et en pratique, je trouve classiquement entre 3 et 6 % de Cyt_c réduit en fonction des stocks. Certaines caractéristiques spectrales du Cyt_c oxydé et du Cyt_c réduit qui seront utiles dans la suite ont aussi été décrites.

3.2.2. EFFET DE LA PRESENCE DE FM, P67^{PHOX}, P47^{PHOX}, RAC1Q61L ET AA SUR LE SPECTRE DU CYTC

Les mesures d'activité en système acellulaire nécessitent de mélanger le Cyt_c, les FM, les protéines cytosoliques, l'AA et le NADPH. Or, le coefficient d'extinction molaire d'une espèce dépend de l'environnement de cette espèce en solution et donc du solvant, des solutés et des éventuelles particules en suspension. Cette partie a donc pour objectif de vérifier l'effet de l'environnement sur le spectre du Cyt_c et donc potentiellement sur sa capacité à capter l'électron de l'anion superoxyde.

Comme le SDS est capable de diminuer la vitesse de réduction du Cyt_c par les anions superoxyde (467), j'ai préalablement cherché à déterminer si l'AA causait une des modifications du Cyt_c engendrant des changements spectraux. Des spectres du Cyt_c en présence de différentes concentrations en AA ainsi que des spectres en présence de différentes concentrations en AA seul ont donc été réalisés et sont présentés en **Figure III-13**.

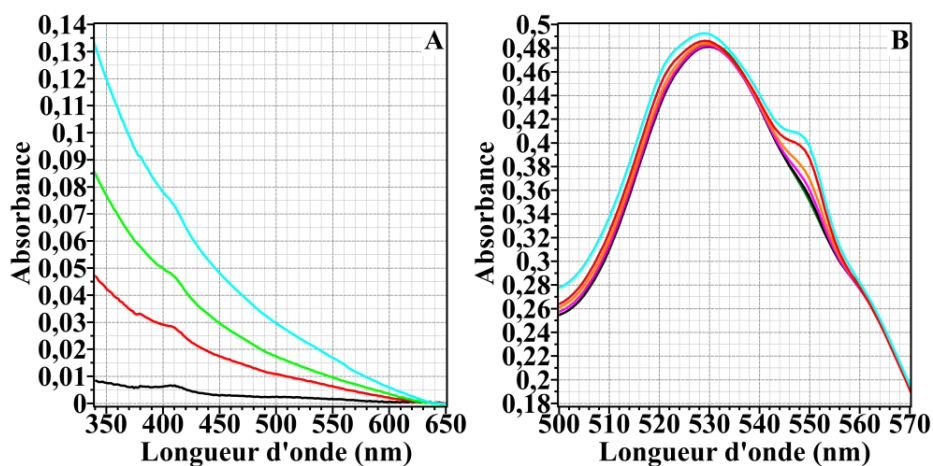


Figure III-13. Effet de l'AA sur le spectre d'absorption UV-Visible du Cytc entre 500 et 600 nm et sur la turbidité du milieu.

Trajet optique de 1 cm, en PBS pH 7,4 supplémenté avec 10 mM de $MgSO_4$, à 25 °C. Zéro commun à 650 nm. 5 min d'incubation avant de faire les spectres à 25 °C. (A) Spectres de l'AA seul. Courbe noire 28 μM , rouge 55 μM , vert clair 83 μM ou bleu clair 138 μM (B) Spectres du Cytc 40 μM en présence de différentes concentrations en AA. Courbe vert foncé 11 μM , courbe noire 22 μM , courbe rose 33 μM , courbe orange 44 μM , courbe rouge 55 μM ou courbe bleu clair 110 μM .

La **Figure III-13A** montre des spectres de différentes concentrations en AA seul. L'AA absorbe faiblement à 550 nm et 340 nm mais cette absorbance augmente en fonction de l'augmentation de la concentration à cause de l'augmentation de la turbidité du milieu. En effet, l'allure de ces courbes est typique d'un milieu turbide, (pour une description, voir précédemment l'analyse des spectres des FM). Une bande d'absorption qui semble spécifique est aussi observable vers 410 nm.

La **Figure III-13B** montre des spectres du Cytc (40 μM) en présence de différentes concentrations en AA. La bande caractéristique du Cytc réduit à 550 nm subit un effet hyperchrome et donc augmente faiblement en fonction de la concentration en AA, ce qui s'apparente curieusement à une faible réduction spontanée du Cytc par l'AA. Un léger effet hypsochrome vient s'ajouter à ceci, à 550 nm mais aussi au niveau de la bande à 530 nm. Ceci suggère que l'AA modifie potentiellement les propriétés de l'hème du Cytc, *mais je n'ai pas davantage poussé cette analyse, qu'il serait intéressant de faire plus en détails par spectrophotométrie d'absorption par exemple à l'aide d'un spectrophotomètre à barrettes de diodes pour visualiser l'effet de l'AA sur le spectre en fonction du temps d'incubation. Il serait aussi possible de faire des mesures d'EXAFS ou de RPE pour approfondir les changements éventuels sur la coordination du fer, sur son spin et sur le potentiel standard de l'hème.*

Par conséquent, l'AA a clairement un effet sur l'hème du Cytc et donc potentiellement sur sa capacité à capter les électrons de l'anions superoxyde, mais ceci reste à démontrer par exemple en radiolyse pulsée. J'ai aussi observé que cet effet est réversible par ajout d'un oxydant comme le ferricyanure de potassium. Dans une expérience complémentaire non présentée ici, j'ai observé qu'un léger décalage bathochrome et hyperchrome de la bande de Soret existe en présence d'AA et est dépendant de la concentration en AA, (22 μM ou 44 μM). Ceci suggère une modification des propriétés électroniques du fer du Cytc en présence d'AA.

Dans un deuxième temps, j'ai voulu déterminer l'impact de la présence des FM, des protéines cytosoliques et de l'AA sur le spectre du Cytc et en particulier sur la bande d'absorption à 550 nm, j'ai donc réalisé un spectre de différence du Cytc réduit moins oxydé en présence de 70 μM de Cytc, 4 nM de Cytb₅₅₈, 300 nM de p67^{phox}, 300 nM de p47^{phox}, 300 nM de Rac1Q61L et 50 μM d'AA comme présenté en **Figure III-14**.

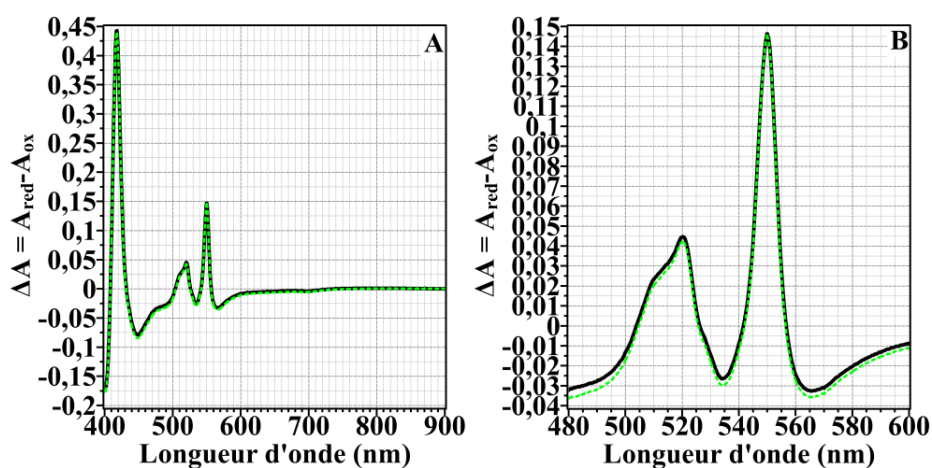


Figure III-14. Effet de l'ensemble des composants du système acellulaire sur le spectre de différence du Cyt c à 70 μ M.

Spectres de différence en présence (ligne noire continue) ou en absence (ligne verte pointillée) de 4 nM de Cyt_{b558}, 300 nM de p67^{phox}, 300 nM de p47^{phox}, 300 nM de Rac1Q61L et 50 μ M d'AA avec pour référence le Cyt c oxydé. Le trajet optique est de 0,2 cm, les mesures sont faites dans du PBS pH 7,4 supplémenté avec 10 mM de MgSO₄, à 25 °C, incubation de 5 minutes. Zéro commun à 1000 nm. (A) Spectres entre 400 et 900 nm. (B) Mêmes spectres mais zoomés entre 480 et 600 nm.

La présence des protéines cytosoliques, de la FM et de l'AA laisse intacte les propriétés spectrales différentielles du Cyt c à 550 nm, ce qui signifie que le coefficient d'extinction molaire différentiel du Cyt c à 550 nm est le même en présence ou en absence du reste du système acellulaire. Cependant, il existe de légères variations hyperchromes de l'ordre de 0,001 unité d'absorbance en présence de la FM, des protéines cytosoliques et de l'AA en dehors de la bande d'absorption différentielle à 550 nm et *l'implication de ces différences sur la vitesse de captation des électrons par le Cyt c restent à contrôler par radiolyse pulsée.*

Les différents constituants du système acellulaire ont un léger effet sur le spectre du Cyt c, l'AA étant le constituant qui semble avoir le plus d'impact. Cela n'impacte pas le coefficient d'extinction molaire du Cyt c à 550 nm mais je suis dans l'impossibilité de dire si ces changements spectraux traduisent une diminution de la vitesse de captation des électrons par le Cyt c.

3.3. LA COURBE D'ETALONNAGE DU SPECTROPHOTOMETRE $\Delta A = A_{RED} - A_{OX} = F([CYTC])$

L'objectif premier de cette partie est de vérifier la linéarité du spectrophotomètre à 550 nm avec une cuvette de 0,1 cm de trajet optique, mais aussi de vérifier le coefficient d'extinction molaire du Cyt c à 550 nm sur le spectrophotomètre utilisé pour réaliser les cinétiques enzymatiques. Ainsi, j'ai réalisé une gamme d'étalonnage du spectrophotomètre double faisceaux Uvikon XS en utilisant comme référence du Cyt c oxydé (Cyt cFe³⁺) avec du ferricyanure et comme échantillon la même solution de Cyt c mais réduit (Cyt cFe²⁺) avec du dithionite de sodium.

Je rappelle que le Cyt c vendu par Sigma est sale et je retrouve beaucoup de particules blanches qui ne sont pas du Cyt c lorsque je prépare la solution. Ces particules sont éliminées par plusieurs centrifugations successives de 10 minutes à 3200 x g, jusqu'à ce que je n'observe plus de culot, puis une dernière centrifugation de 30 minutes à 3200 x g est réalisée pour s'assurer d'éliminer même les particules non observables à l'œil. Cela empêche de peser une masse précise de Cyt c, ce qui implique que la concentration doit obligatoirement être déterminée par spectrophotométrie d'absorption en utilisant le coefficient d'extinction molaire de la littérature $\Delta \epsilon_{Cyt c}^{550} = 21 \cdot$

$10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Par conséquent, si ce coefficient d'extinction molaire est vraiment indépendant du spectrophotomètre, le même coefficient sera retrouvé expérimentalement.

La **Figure III-15** montre la possibilité de tracer une droite de régression linéaire 0 et 335 μM dont le coefficient de régression linéaire ($R^2 = 0,9994$) est satisfaisant. La droite de régression linéaire entre 0 et 445 μM est, quant à elle, non satisfaisante ($R^2 = 0,9985$). Par conséquent, la linéarité est conservée entre 0 μM et une concentration en Cytc comprise entre 335 μM et 445 μM , ou encore une absorbance d'environ 0,9 dans une cuvette de 1 mm de trajet optique à 550 nm. Or, j'ai précédemment montré que la vitesse de détection des anions superoxyde par le Cytc diminue au-delà d'une concentration d'environ 300 μM . Les deux résultats sont donc cohérents et la limite de détection des anions superoxyde avec ce dispositif est bien liée à la turbidité du milieu.

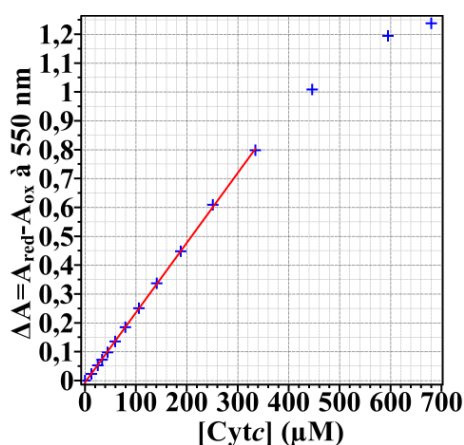


Figure III-15. Etalonnage du spectrophotomètre à 550 nm avec du Cytc(Fe^{2+}) en échantillon et Cytc(Fe^{3+}) en référence.

Le trajet optique est de 0,1 cm, les mesures sont faites dans du PBSd à 25 °C. Les croix (+) correspondent aux points de mesure et la droite rouge correspond à la droite de régression linéaire (affine) suivant l'équation $\Delta A = f([\text{Cytc}]) = a \cdot [\text{Cytc}]$, où a est un coefficient réel correspondant à la pente de la droite de régression linéaire. Ici, $a = 0,0024 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ avec un coefficient de régression linéaire $R^2 = 0,9994$.

La valeur de la pente de la droite de régression est : $a = \Delta \varepsilon_{\text{Cytc}_{\text{exp}}}^{550} \cdot \ell = 0,0024 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$, avec $\Delta \varepsilon_{\text{Cytc}_{\text{exp}}}^{550}$ le coefficient d'extinction molaire différentiel expérimental du Cytc à 550 nm et ℓ le trajet optique ici égal à 0,1 cm. Ceci permet d'obtenir $\Delta \varepsilon_{\text{Cytc}_{\text{exp}}}^{550} = 24 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Je ne retrouve donc pas exactement le coefficient d'extinction molaire marqué dans les tables dans ces conditions avec ce spectrophotomètre. Or, dans la mesure où la concentration de la solution stock a été déterminée à l'aide du coefficient d'extinction molaire tabulé, ($\Delta \varepsilon_{\text{Cytc}}^{550} = 21 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), je suis censé retrouver le même, sauf si celui-ci dépend du spectrophotomètre. Il est habituellement reporté dans l'enseignement supérieur que le coefficient d'extinction molaire d'une espèce donnée dépend à priori essentiellement de la longueur d'onde, de la température et du solvant et n'est pas supposée dépendre du spectrophotomètre.

En pratique, le coefficient d'extinction molaire d'une espèce dépend du spectrophotomètre. En effet, il dépend de l'exactitude de la longueur d'onde sélectionnée par le spectrophotomètre et de la bande passante du spectrophotomètre, (l'intervalle de longueurs d'ondes dans laquelle est comprise la longueur d'onde sélectionnée par le monochromateur du spectrophotomètre). Plus la bande passante est étroite, plus la longueur d'onde sélectionnée par le monochromateur du spectrophotomètre est fidèle et si le monochromateur du spectrophotomètre est *en plus*

correctement calibré, la longueur d'onde sélectionnée sera exacte. La dépendance du coefficient d'extinction molaire à la bande passante du spectrophotomètre utilisé augmente également lorsque la bande d'absorption spécifique de l'espèce mesurée à une longueur d'onde donnée est étroite, (variabilité plus importante). Plusieurs autres facteurs jouent aussi sur ce coefficient, par exemple l'exactitude de la perpendicularité du faisceau incident par rapport à la cuve, la forme de ce faisceau, ou encore la largeur de fente, l'exactitude du trajet optique ou bien l'exactitude du parallélisme des deux faces de la cuve (477).

Par conséquent, la dérive observée provient probablement de l'ensemble des paramètres, dont ceux liés au spectrophotomètre, qui diffèrent des paramètres utilisés pour obtenir les résultats de la littérature. Cependant, le coefficient d'extinction molaire trouvé empiriquement est plus fort que le coefficient d'extinction molaire de la littérature, donc ce dernier minimise les valeurs d'activités de NOX2 mesurées via l'observable Cytc et donc maximise les différences entre l'observable Cytc et l'observable NADPH. Ainsi, j'ai décidé de continuer à utiliser le coefficient d'extinction molaire de la littérature afin de limiter le risque d'exagérer les différences entre les deux observables. Néanmoins, j'insiste sur le fait que si j'utilisais en toute rigueur le coefficient d'extinction molaire expérimental, les différences entre les deux observables seraient encore plus importantes. Il est donc raisonnable de supposer et de garder en tête que je minimise potentiellement les différences réelles entre les deux observables.

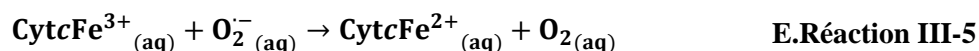
Il faut noter que des expériences similaires avec le Cytc sur ce spectrophotomètre avec un trajet optique de 1 cm à 550 nm renvoient une linéarité jusqu'à une absorbance d'environ 1,8. Ceci démontre bien que la courbure observée en **Figure III-15** au-delà de 335 μM est due à l'augmentation de la turbidité du milieu, dans la mesure où l'absorbance renvoyée par le spectrophotomètre à 550 nm au-delà de 335 μM de Cytc n'est plus linéairement dépendante du trajet optique.

Pour s'assurer de la réalité de ces résultats et notamment de l'implication de la cuvette dans la variabilité du coefficient d'extinction molaire tabulé et expérimental, il aurait été important de réaliser la dépendance de l'absorbance en fonction du trajet optique, à concentration constante en Cytc, pour vérifier rigoureusement que la linéarité est respectée comme le suggère la loi de Beer-Lambert et comme double-contrôle pour déterminer le coefficient d'extinction molaire différentiel expérimental .

La limitation de l'ASM mesurée à haute concentration en Cytc au-delà de 300 μM (Figure III-11) est donc bien due à une perte de linéarité du spectrophotomètre, causée par un excès de turbidité du milieu. Ainsi, les contraintes techniques empêchent, en l'état, de déterminer la concentration saturante en Cytc pour la détection des anions superoxyde et je peux raisonnablement dire que les concentrations habituellement utilisées (30 à 100 μM) sont loin d'être saturantes. Par ailleurs, je soupçonne que la dépendance de l'ASM à la concentration en AA peut être modifiée pour des concentrations variables en Cytc, pas seulement en valeurs absolues d'ASM mais aussi en concentration optimale en AA et il faudrait répliquer cette dépendance avec, par exemple, 300 μM de Cytc.

3.4. ETUDE PAR OXYMETRIE. EFFET DU CYTC SUR LA CONSOMMATION D'O₂ : O₂=F(T)

Cette partie permettra d'explorer partiellement l'implication du Cyt_c dans des réactions secondaires limitant son efficacité de captation des électrons des anions superoxyde, mais aussi, dans une certaine mesure, de tester la saturation en Cyt_c de la détection des O₂⁻ produits par le système acellulaire. Le principe est la mesure de la consommation du dioxygène par NOX2 en présence de différentes concentrations en Cyt_c. En effet, dans la littérature, il est généralement admis que le Cyt_c réagit avec l'anion superoxyde selon l'équation de réaction **E.Réaction III-5**, (351, 365, 368, 378, 380, 387, 388) :



Par conséquent, si tous les anions superoxyde sont bien captés par le Cyt_c et que celui-ci réalise réellement la réaction d'équation **E.Réaction III-5**, tout le dioxygène devrait être régénéré en présence de Cyt_c tant que celui-ci est en excès. Ainsi, je m'attends à avoir une concentration constante en dioxygène, qui est totalement régénéré jusqu'à ce que le Cyt_c soit au moins en partie consommé. Les résultats de l'expérience sont présentés en **Figure III-16**.

La **Figure III-16**, montre qu'en absence de Cyt_c, (courbe noire), le fonctionnement de la NADPH oxydase provoque, comme attendu, une consommation du dioxygène. En présence de Cyt_c, je m'attendais, selon l'équation de réaction **E.Réaction III-5**, à un plateau lié à la régénération totale du dioxygène par le Cyt_c, suivi d'une pente négative liée à la consommation du dioxygène par NOX2 qui serait visible une fois la totalité du Cyt_c réduit, ou au moins une fois que le Cyt_c deviendrait limitant par rapport à la production des anions superoxyde. Or, l'oxygène est consommé dès le temps zéro en présence de Cyt_c. Plus précisément, la vitesse de consommation du dioxygène au temps zéro diminue en fonction de la concentration en Cyt_c (de la courbe rouge 23 μM à la courbe verte 45 μM puis à la courbe bleue 90 μM).

Le Cyt_c qui était initialement supposé être en excès, (concentration usuelle entre 50 et 100 μM), régénère donc seulement une partie du dioxygène. Comme l'expérience a été reproduite à l'identique dans les différents cas, la vitesse de production des anions superoxyde et de consommation du dioxygène par NOX2 est environ toujours la même. Donc plus il y a de Cyt_c, plus la régénération du dioxygène est rapide, plus, hypothétiquement, les anions superoxyde sont captés rapidement. Dans la littérature, la réaction du Cyt_c oxydé avec l'anion superoxyde est déduite du caractère exergonique de la réaction, (*i.e.* spontané, enthalpie libre standard de réaction d'environ -41 kJ · mol⁻¹, calcul d'après les potentiels standard redox des couples O₂/O₂⁻ et Cyt_c(Fe³⁺)/Cyt_c(Fe²⁺) (367)). A ma connaissance, il n'y a cependant pas de démonstration expérimentale de la réalité de cette réaction. Il est donc possible de supposer dans un premier temps que le Cyt_c réalise des réactions secondaires avec l'anion superoxyde et que l'ordre cinétique pour le Cyt_c de ces réactions est plus faible que celui correspondant à **E.Réaction III-5**, donc l'augmentation de la concentration en Cyt_c favoriserait la réaction correspondant à **E.Réaction III-5**.

Une autre possibilité est que les anions superoxyde eux-mêmes subissent une dismutation, (368, 369, 388, 397), ce qui est une hypothèse raisonnable notamment à cause de leur séquestration probable dans la lumière de la vésicule. Une vésicule de FM a un diamètre compris entre 50 et 200 nm, donc en ignorant l'épaisseur de la membrane, son

volume est d'environ $4 \cdot 10^{-21} \text{ m}^3$. En supposant que cette vésicule est pleine d'eau, en considérant la masse moléculaire d'une molécule d'eau $18 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, le nombre d'Avogadro $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ et la masse volumique de l'eau de $1,0 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$, alors il est possible de calculer le volume approximatif d'une seule molécule d'eau et trouver que la vésicule de FM contient environ 10^8 molécules d'eau. Ce calcul est intéressant pour réfléchir à la pertinence d'utiliser les constantes tabulées, mesurées au-delà de la limite thermodynamique, dans un milieu contenant moins d'un milliard de molécules d'eau.

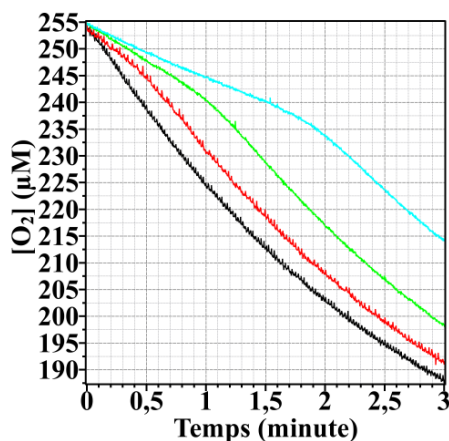


Figure III-16. Cinétiques de consommation du dioxygène par NOX2 à différentes concentrations en Cyt c.

Mesures à 25 °C en tampon PBS, 10 mM MgSO₄, pH 7,4, en présence de 4 nM Cytb₅₅₈, 200 nM p67^{phox}, 200 nM p47^{phox}, 200 nM Rac1Q61L, 46 µM AA et 200 µM NADPH. Ligne noire 0 µM Cyt c ; ligne rouge 23 µM Cyt c ; ligne verte 45 µM Cyt c ; ligne bleue 90 µM Cyt c.

Le lecteur pourra s'appuyer sur la **Figure III-9** et sur l'**E.Réaction III-3** pour réfléchir à ces calculs. Si je considère que 200 molécules de NADPH sont consommées par seconde par enzyme et que je fais l'hypothèse d'une seule enzyme par vésicule, alors 400 anions superoxyde sont produits par seconde ce qui revient à une concentration apparente théorique en anions superoxyde dans la vésicule de $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ si tous les anions superoxyde restent séquestrés pendant une seconde dans la vésicule. Deux anions superoxyde dismutent très lentement alors qu'un anion superoxyde et son acide conjugué ($\text{pKa}(\text{HO}_2^-/\text{O}_2^-)=4,8$) dismutent avec une constante de vitesse de l'ordre de $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 7,4 (368, 369, 388, 397). En prenant en compte l'équilibre acidobasique à pH 7,4 je calcule que $[\text{HO}_2^-] = 4,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ et donc à ce pH $[\text{O}_2^-] \approx 1,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Par conséquent, j'ai calculé que la dismutation se passe à une vitesse d'environ $13 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, soit environ 30 anions superoxyde qui dismutent par seconde, ce qui correspondrait à une perte d'activité d'environ 8 %, ou 16 % si je considère deux Cytb₅₅₈ par FM, 24 % avec trois Cytb₅₅₈ par FM, 32 % avec quatre, 40 % avec 5... En considérant cette hypothèse, si la dismutation est le seul facteur qui entre en jeu, il faudrait environ 6 NOX2 fonctionnelles par vésicule de FM pour avoir 50 % de perte d'activité comme cela a été observé précédemment. S'il y a 6 Cytb₅₅₈ par vésicule et une population monodisperse de vésicules de 200 nm de diamètre, il est facile de calculer qu'il y a environ $4 \cdot 10^{14}$ vésicules dans le milieu, soit environ 1 µL de vésicules.

De plus, il s'agit d'un cas de catalyse hétérogène compartimentée qui modifie nécessairement les probabilités de rencontre du NADPH et de l'enzyme par rapport à une situation en solution vraie et il me semble donc peu judicieux de considérer la concentration en Cytb₅₅₈ comme seule normalisation pour l'obtention de l'ASM de NOX2. La sonication pour l'obtention des vésicules de FM étant difficile à normaliser, il est cohérent d'avoir des variabilités

importantes en fonction des préparations. Néanmoins, la concentration réelle en vésicules n'est pas connue, cela est un argument supplémentaire pour affirmer que l'ASM mesurée est seulement apparente, en ayant bien conscience des limitations que le système acellulaire impose.

Il a été précédemment reporté que l'augmentation de la concentration en Cyt_c mène à une diminution de la vitesse de consommation du dioxygène, ce qui signifie que plus il y a de Cyt_c, plus le dioxygène est régénéré. Si le dioxygène ou l'anion superoxyde sont relargués lentement par le Cyt_c après avoir interagit avec lui, cela pourrait expliquer que le dioxygène régénéré par le Cyt_c n'est pas détecté par l'électrode. Cependant, comme l'augmentation de la concentration en Cyt_c augmente la quantité de dioxygène régénéré détecté, cette hypothèse n'est pas valable. Donc ni l'anion superoxyde ni le dioxygène ne semblent se fixer de façon pérenne sur Cyt_c, suffisamment longtemps pour perturber ces mesures.

Une autre hypothèse plus simple concordant avec les mesures par spectrophotométrie d'absorption est que le Cyt_c n'est pas en concentration saturante devant la vitesse de production des anions superoxyde. Il est aussi possible de supposer qu'un Cyt_c réagit avec plusieurs anions superoxyde au lieu d'un seul ce qui entraînerait que l'état redox du Cyt_c réduit est différent de celui réduit de façon monoélectronique. Ces hypothèses pourraient expliquer les différences dans les courbes de dépendance de l'ASM à la concentration en AA. Les auteurs Green et Shanguan en 1993 ont d'ailleurs observé des effets très similaires en oxymétrie, avec notamment une saturation du Cyt_c pour des concentrations en Cyt_c supérieures à 100 µM, bien que leur système ne soit pas totalement comparable à celui que j'utilise ici (351).

L'oxymétrie a permis de montrer que toutes les molécules de dioxygène consommées par NOX2 ne sont pas régénérées par le Cyt_c et donc de confirmer que le Cyt_c n'est en aucun cas en concentration saturante vis-à-vis de la captation des anions superoxyde produits par NOX2 dans les conditions usuelles de mesure (tous les anions superoxyde produits par NOX2 ne sont pas captés par le Cyt_c). Je pense en outre que l'oxymétrie permettrait de déterminer la concentration en Cyt_c saturante réelle, si elle existe, pour laquelle un vrai plateau initial est observé. Autrement dit, la concentration pour laquelle je suis certain qu'au temps zéro, tous les anions superoxyde sont réoxydés en dioxygène, donc la concentration assurément saturante en Cyt_c, qui signifie simplement que tous les anions superoxyde qui entrent en contact avec le Cyt_c sont détectés. L'oxymétrie serait donc la technique de choix pour connaître la concentration saturante en Cyt_c, i.e. la concentration minimale à laquelle il est indispensable de travailler pour avoir des résultats rigoureux, en considérant que l'importante concentration en Cyt_c ne perturbe pas d'autres aspects de la mesure, ce qui est loin d'être sûr. Cette expérience reste à faire en élargissant la gamme de concentration en Cyt_c.

4. Etude de la cinétique globale de la réaction catalysée par NOX2

L'étude de la vitesse de catalyse de NOX2 en fonction de différents paramètres et ainsi que l'évaluation du Cyt_c en tant que sonde des anions superoxyde produits par NOX2 a permis de mettre en exergue un important problème de mesure dépendant de la concentration en NADPH, de la concentration en AA et potentiellement de la concentration en Cyt_c. Il a aussi été possible de montrer que certains composants du système acellulaire,

principalement l'AA, provoquent des modifications spectrales du Cytc qui restent à expliquer et dont les implications dans les mesures cinétiques restent à explorer.

La présente partie a pour objectif l'étude de la cinétique globale de la réaction catalysée par NOX2, ce qui correspond à la mesure de la progression de la réaction jusqu'à l'absence d'évolution de l'observable en lien avec la réaction suivie, qui peut correspondre à l'épuisement d'une sonde ou d'un substrat, ou encore à l'arrêt de la catalyse par désactivation de l'enzyme. Seront ainsi particulièrement étudiées l'allure des cinétiques totales de réduction du Cytc par les anions superoxyde produits par NOX2, ainsi que l'allure des cinétiques totales de l'oxydation du NADPH et de consommation du dioxygène.

4.1. CINÉTIQUE DE RÉDUCTION DU CYTC PAR LES ANIONS SUPEROXYDE

Comme précédemment, la progression de la réaction de réduction du Cytc est suivie par spectrophotométrie d'absorption à 550 nm, il s'agit donc d'une détection indirecte impliquant le couplage de la réaction indicatrice (réduction du Cytc) avec la réaction mesurée (production des anions superoxyde). J'ai précédemment montré que le Cytc pose des problèmes de détection des anions superoxyde dont la production est catalysée par NOX2 et afin d'approfondir ces résultats, j'ai étudié la cinétique globale de la réduction du Cytc dans ces conditions en faisant varier certains paramètres clés comme la concentration en AA, la concentration en NADPH, le temps d'incubation...

4.1.1. CINÉTIQUES GLOBALES DE RÉDUCTION DU CYTC EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN AA

Dans cette partie sont présentées des cinétiques globales de réduction du Cytc par les anions superoxyde produits pas NOX2 en variant la concentration en AA, afin de déterminer l'effet de l'AA sur l'allure des cinétiques. Les résultats sont présentés en **Figure III-17**.

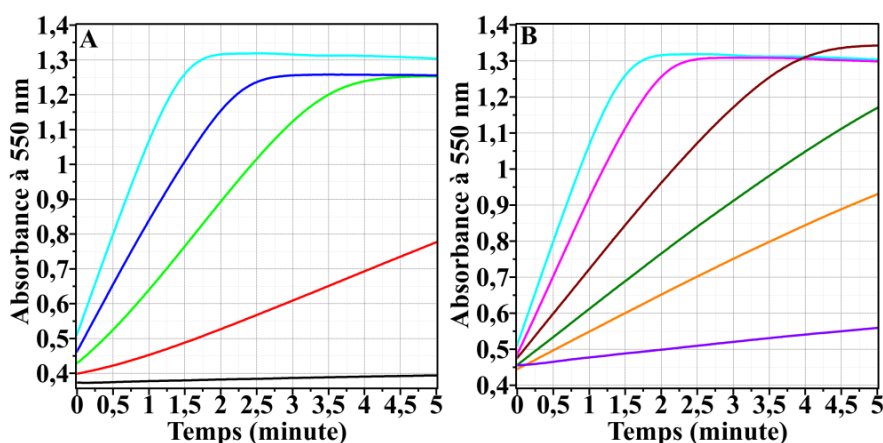


Figure III-17. Cinétique globale de la réaction de réduction du Cytc à différentes concentrations en AA.

Présence de 50 µM de Cytc, 4 nM Cytb₅₅₈, 200 nM p67^{phox}, 200 nM p47^{phox}, 200 nM Rac1Q61L et 200 µM de NADPH. Mesures à 25 °C avec un trajet optique de 1 cm et une incubation de 5 minutes. (A) De zéro à 22 µM AA. Courbe noire 0 µM, rouge 6 µM, vert clair 11 µM, bleu foncé 17 µM ou bleu clair 22 µM. (B) Courbe bleu clair 22 µM, rose 44 µM, marron 66 µM, vert foncé 77 µM, orange 88 µM ou violet 110 µM.

La **Figure III-17A** présente les cinétiques entre 0 et 5 minutes faites en présence de concentrations croissantes en AA entre 0 µM et 22 µM d'AA. La **Figure III-17B** présente les cinétiques entre 0 et 5 minutes faites en présence de concentrations croissantes en AA entre 22 et 110 µM d'AA.

La pente initiale des cinétiques est de plus en plus importante en fonction de l'augmentation de la concentration en AA entre 0 et 22 μM , (de la courbe noire à la courbe bleu clair **Figure III-17A**). D'autre part, la courbe noire (0 μM) semble être une portion de droite alors que les courbes rouge (6 μM) et vert clair (11 μM) ont une allure sigmoïdale à faibles concentrations en AA. De la courbe bleu clair (22 μM) à la courbe violette (110 μM), la pente initiale diminue beaucoup (**Figure III-17B**). Concernant les deux courbes bleues (17 μM et 22 μM) de la **Figure III-17A** ou encore les courbes bleu clair (22 μM), rose (44 μM) et marron (66 μM) de la **Figure III-17B**, l'absorbance augmente d'abord rapidement et linéairement en fonction du temps, il s'agit de la **phase initiale**, puis, l'absorbance augmente de moins en moins vite, il s'agit de la **phase de ralentissement**. Enfin, la courbe présente un plateau, ou plutôt, comme il semble y avoir une faible décroissance, je l'appellerai pseudo-plateau, il s'agit à priori d'une **phase d'équilibre** qui semble plutôt être une **phase de quasi-équilibre**. Ici, à l'instant initial, 200 μM de NADPH sont présents donc potentiellement en fin de réaction 400 μM d'anions superoxyde peuvent être produits. Il y a en revanche initialement seulement 50 μM de Cyt c , donc potentiellement 50 μM d'anions superoxyde captés. Par conséquent, le pseudo-plateau correspond à la fin de la réaction totale des anions superoxyde avec le Cyt c . Ce pseudo-plateau sera exploré dans la suite.

Sur la **Figure III-17B**, même pour de faibles vitesses équivalentes à celles observées à faibles concentrations en AA, la phase initiale comporte toujours une allure quasi-linéaire et l'allure sigmoïdale n'est jamais observée contrairement à la **Figure III-17A** à faibles concentrations en AA. La phase initiale indique donc que l'augmentation de la concentration en AA provoque la modification de l'allure de la phase initiale qui est sigmoïdale à basse concentration puis linéaire à plus haute concentration.

Au-delà de l'allure des courbes, la pente initiale augmente également en fonction de la concentration en AA jusqu'à 22 μM , (courbe bleu clair), et compte tenu de la nature du système enzymatique, de son environnement et de la détection indirecte par couplage, il est légitime de se demander si le changement d'allure est dû à l'augmentation de la vitesse de détection des anions superoxyde par le Cyt c , dans ce cas l'augmentation de la pente initiale serait dû à l'élimination, par l'AA, d'une étape cinétiquement déterminante, ou alors à l'augmentation de la vitesse de la catalyse. L'augmentation de la vitesse de catalyse pourrait causer l'absence d'observation de la partie sigmoïdale qui serait alors comprise dans le temps mort et donc trop courte pour être détectée avec cette technique. Pour tester l'existence de la sigmoïde pour de fortes pentes (de fortes ASM), *faire les expériences au stopped-flow en état pré-stationnaire serait alors idéal*. En outre, des expériences préliminaires faites au laboratoire à l'aide du stopped-flow dans les mêmes conditions suggèrent qu'en présence d'une concentration optimale en AA et avec 5 minutes de préincubation, il n'y a pas de sigmoïde en phase initiale. Par conséquent, la présence ou l'absence de la sigmoïde semble due à l'action de l'AA sur le système acellulaire et ne serait donc pas intrinsèque au début de la catalyse de production des anions superoxyde par NOX2. Ceci suggère que la sigmoïde est impactée par la concentration en AA plutôt que par la vitesse de détection des anions superoxyde.

L'absorbance au temps zéro des cinétiques augmente en fonction de l'augmentation de la concentration en AA (**Figure III-17A**), puis diminue en fonction de la concentration en AA, (**Figure III-17B**). Deux effets entrent en jeu ici, d'une part plus la vitesse est élevée, plus la quantité d'informations perdues pendant le temps mort est élevé, plus

l'absorbance risque d'être élevée à l'instant initial, d'autre part, j'ai montré que l'AA cause une augmentation de la bande d'absorption spécifique du Cytc à 550 nm proportionnelle à la concentration en AA (voir **Figure III-13**).

Je vais maintenant détailler certains aspects de ces cinétiques globales et je discuterai des points importants pour la détermination de la vitesse initiale. Comme précédemment, les deux cinétiques globales présentées en bleu en **Figure III-17A** mais aussi en bleu, rose et marron en **Figure III-17B**, comprennent un instant initial au temps zéro pour lequel la dérivée à la courbe, c'est-à-dire la vitesse initiale de catalyse, est maximale. Puis la dérivée à la courbe diminue d'abord lentement en fonction du temps, puis de plus en plus vite jusqu'à être nulle lorsque l'absorbance est maximale. Enfin, au pseudo-plateau, celle-ci devient négative.

La phase initiale des cinétiques présentées en rouge (6 μM) et en vert clair (11 μM) sur la **Figure III-17A**, sera détaillée ici. L'allure générale de ces courbes s'apparente cette fois à une sigmoïde. L'absorbance augmente d'abord de plus en plus vite, puis de plus en plus lentement et enfin atteint un maximum (la suite de la cinétique n'a pas été mesurée donc il n'est pas possible d'observer ni plateau, ni pseudo-plateau, ni même de voir la phase de ralentissement pour la courbe rouge). Ainsi, la vitesse mesurable est maximale au point d'inflexion de cette sigmoïde. Or, le présent cas est typique d'une réaction couplée à détection indirecte pour laquelle le couplage est l'étape cinétiquement déterminante (470) et la sigmoïde que ici observée correspond typiquement à phase d'accélération d'un couplage limitant (478). Par conséquent, des études d'enzymologie fondamentale nous apprennent qu'il serait judicieux de suspecter dans un premier temps un mauvais couplage, plutôt que de tenter d'attribuer ces effets à NOX2 elle-même.

En enzymologie, une étape critique de l'analyse des données est la détermination de la pente permettant de déterminer la vitesse dite initiale de la catalyse. La vitesse peut être déterminée soit en réalisant une régression linéaire sur les points d'un intervalle pertinent, soit en interpolant les points pour obtenir une courbe et en faisant la dérivée à cette courbe au point d'abscisse pertinent. En pratique, il n'y a pas de technique systématique pour toutes les cinétiques, quelle que soit la condition. Il est donc indispensable, quelle que soit la technique utilisée, de vérifier visuellement de façon critique le résultat obtenu en se posant la question de la pertinence de la mesure en fonction du système d'étude. Cela nécessite une expertise acquise par de nombreuses déterminations de vitesses initiales en ayant connaissance de la théorie sous-jacente et après une étude rigoureuse du système étudié en fonction des connaissances contemporaines. J'ai personnellement choisi de mesurer les vitesses en faisant une régression linéaire sur les points d'intérêts et en vérifiant à l'œil nu avec une échelle adaptée à l'intervalle d'ajustement si celle-ci est pertinente par rapport à l'ensemble de la cinétique en essayant de prendre un nombre de points suffisant pour éviter les dérives liées au bruit. Autant que possible, je mesure donc des cinétiques sur des temps assez importants pour avoir au moins une partie de la phase de ralentissement, afin de pouvoir critiquer mes ajustements linéaires et la juger la pertinence de la pente obtenue.

Ainsi, lorsque je suis dans le cas de sigmoïdes comme présentées ci-dessus, je détermine la vitesse de catalyse hypothétiquement la plus proche de la vitesse initiale exacte en réalisant une régression linéaire autour du point d'inflexion, (plus forte vitesse mesurable), et en vérifiant visuellement l'ajustement. Lorsqu'il y a lieu, j'utiliserai donc la vitesse mesurée au point d'inflexion qui sera assimilée à l'ASM apparente de l'enzyme dans ces conditions.

Pour de faibles concentrations en AA avec 5 minutes d'incubation, les cinétiques ont une allure sigmoïdale attribuée à un mauvais couplage de la réaction de production des anions superoxyde par NOX2 et de leur détection par le Cytc et la cause sera recherchée dans la suite. Cette sigmoïde n'est pas dépendante de la vitesse initiale. Lorsque la totalité du Cytc est réduit, il semble subir une réoxydation lente dont la cause sera recherchée dans la suite. En l'état, il est nécessaire de considérer la sigmoïde comme un strict problème de mesure et plus précisément de couplage entre la réaction à mesurer et la réaction indicatrice. Il n'est donc pas possible d'en tirer des interprétations sur le mécanisme d'activation de NOX2.

4.1.2. ALLURE DES CINÉTIQUES EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION

L'AA est un acide gras, (voir introduction), et peut donc jouer un rôle de détergent sur la membrane des vésicules de FM, ce qui pourrait notamment contribuer à augmenter la perméabilité membranaire et donc limiter la séquestration et donc la dismutation des anions superoxyde, effets déjà mentionnés. Or, les détergents ont des cinétiques de solubilisation sur les membranes qui peuvent être lentes, j'ai donc mesuré la progression de la réduction du Cytc par les anions superoxyde produits par NOX2 à différents temps d'incubation pour une même concentration en AA (46 μ M). Les résultats de ces mesures sont présentés en **Figure III-18**.

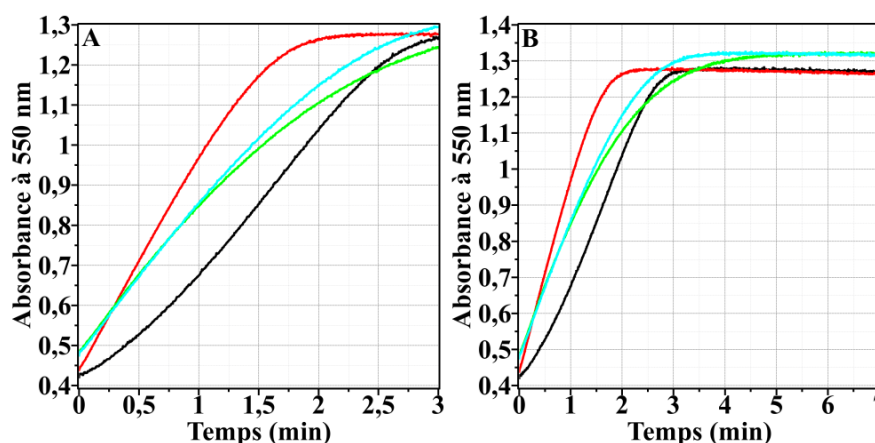


Figure III-18. Cinétique globale de la réaction de réduction du Cytc à différents temps d'incubation.

Présence de 50 μ M de Cytc, 4 nM Cyt_{b558}, 200 nM p67^{phox}, 200 nM p47^{phox}, 200 nM Rac1Q61L, 46 μ M d'AA et 200 μ M de NADPH. Mesures à 25 °C avec un trajet optique de 1 cm. Incubation : Courbe noire 0 min, courbe rouge 10 min, courbe verte 20 min, courbe bleue 60 min. (A) Cinétiques entre 0 et 3 min. (B) Cinétiques globales correspondant aux cinétiques du graphique A. mais entre 0 et 7 min.

La **Figure III-18A** se focalise sur la phase initiale de ces cinétiques. L'allure sigmoïdale précédemment discutée est retrouvée pour un temps d'incubation nul alors que la linéarité est retrouvée pour des temps d'incubation plus importants. Je fais donc l'hypothèse que l'AA pourrait effectivement avoir un effet sur la structure de la membrane des FM et, ou, la structure des protéines du complexe suivant une cinétique lente et permettant de perméabiliser la membrane aux anions superoxyde.

Au temps zéro, l'absorbance avec 0 min d'incubation ou 10 min d'incubation est presque la même malgré une grande différence de vitesse initiale, alors que l'absorbance au temps zéro pour les temps d'incubation de 20 ou 60 min est plus élevée malgré une vitesse initiale un peu plus faible que pour 10 minutes. Cette vitesse plus faible pourrait s'expliquer par une trop grande perturbation de la membrane et donc du complexe enzymatique, jouant un rôle inhibiteur, ou encore il est probable que la concentration optimale en AA soit modifiée en fonction du temps

d'incubation. Je rappelle aussi que l'AA modifie le spectre du Cytc (**Figure III-13B**) et *qu'il serait intéressant de faire une gamme de temps d'incubation en mélangeant seulement le Cytc et l'AA pour vérifier si l'impact de l'AA sur les propriétés spectrales et donc potentiellement sur les propriétés redox de l'hème du Cytc est dépendant du temps d'incubation et si cela impact la vitesse de réduction du Cytc par les anions superoxyde.*

Les cinétiques globales présentées en **Figure III-18B** montrent encore un pseudo plateau pour 0 ou 10 min d'incubation, alors qu'il semble qu'il y a un vrai plateau pour 20 ou 60 min d'incubation probablement à cause d'une mesure trop courte ; *cette expérience pourrait être reproduite en faisant des cinétiques plus longues pour le vérifier.* Après 20 ou 60 min d'incubation, j'observe aussi que la phase de ralentissement est plus longue, ce qui laisse penser que le Cytc détecte les anions superoxyde différemment lorsqu'il a été incubé moins de 10 minutes ou plus de 10 minutes et soutient la suggestion que l'AA provoque une modification des propriétés redox du Cytc, qui dépendrait du temps d'incubation et impacterait sa capacité à capter les anions superoxyde.

Par conséquent, le temps d'incubation est un facteur influençant fortement la progression temporelle de la réduction du Cytc par O_2^- et les résultats suggèrent un double effet de l'AA sur le Cytc et sur les FM. Afin de déterminer l'impact de la concentration en Cytc sur la forme sigmoïdale de la cinétique, il serait important de faire une gamme en Cytc jusqu'à des concentrations de l'ordre de 300 μM avec un temps d'incubation nul.

4.1.3. ALLURE DES CINÉTIQUES AVEC CYTC EN EXCES EN VARIANT LA CONCENTRATION DU NADPH

Les mesures de réduction du Cytc couplées avec NOX2 se font la plupart du temps en excès de NADPH devant la concentration en Cytc pour trois raisons, premièrement une question de coût, le Cytc est cher, d'autre part la variabilité sur la concentration en NADPH est plus faible au-delà du K_m^{app} et enfin le coefficient d'extinction molaire différentiel du Cytc à 550 nm en cuvettes conventionnelles de 1 cm de trajet optique est trop élevé et ne permet pas d'aller au-delà de 100 μM de Cytc. Dans cette partie, je présente au contraire des cinétiques globales de réduction du Cytc couplées à NOX2 en présence d'un défaut de NADPH et d'un excès de Cytc. Ceci avec pour objectif de visualiser s'il existe des différences sur l'allure des cinétiques mais aussi s'il est possible de retrouver la stœchiométrie théorique de la réaction catalysée par NOX2 en considérant la totalité du Cytc consommé.

Ainsi, la **Figure III-19** présente les cinétiques globales de production des anions superoxyde détectés par un excès de Cytc (360 μM) en présence d'une concentration variable limitante en NADPH (entre 25 μM et 175 μM), à concentration optimale en AA dans les conditions usuelles, (46 μM), dans une cuvette en quartz avec un trajet optique de 0,1 cm.

La **Figure III-19A** montre que la valeur de la pente initiale de la tangente à la courbe augmente en fonction de la concentration en NADPH, comme attendu, et que l'allure de la phase initiale est systématiquement dénuée de sigmoïde, même à faible vitesse. Par conséquent, cela soutient l'hypothèse précédemment avancée à propos des résultats présentés en **Figure III-17** et **Figure III-18**, qui indiquent que l'allure sigmoïdale est impactée par la concentration en AA et le temps d'incubation en présence d'AA et non par la vitesse de la réaction.

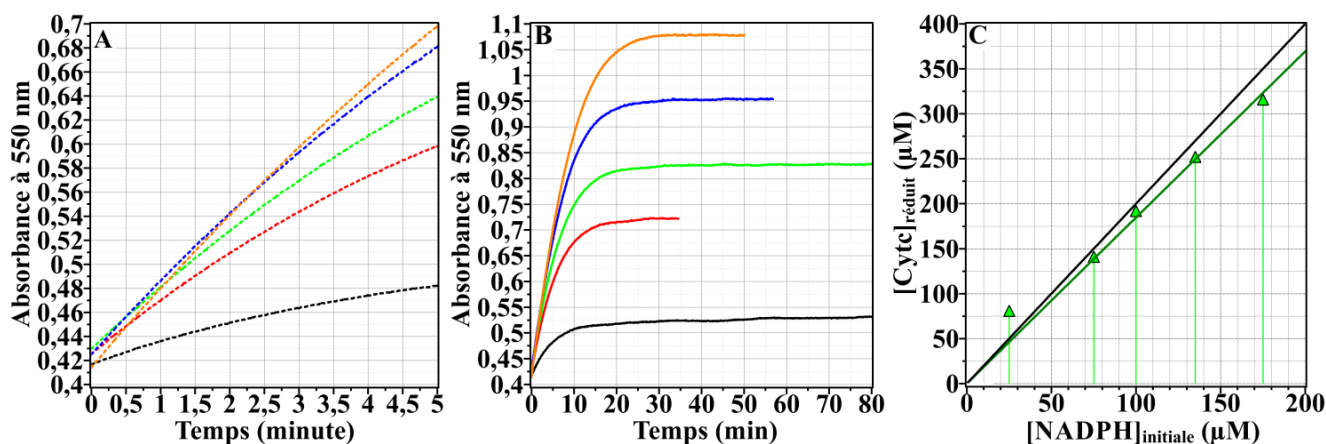


Figure III-19. Étude de la réduction du Cytc couplée à l'activité de NOX2 en concentration saturante en Cytc devant le NADPH.

Présence de 4 nM Cytb₅₅₈, 200 nM p67^{phox}, 200 nM p47^{phox}, 200 nM Rac1Q61L, 46 μM AA, 360 μM Cytc (large excès). Incubation 5 minutes, mesures à 25 °C, trajet optique 1 mm. (A) Cinétiques entre 0 et 5 min. Les concentrations en NADPH sont : courbe noire 25 μM, courbe rouge 75 μM, courbe verte 100 μM, courbe bleue 135 μM et courbe orange 175 μM. (B) Cinétique globale correspondant aux cinétiques du graphique A avec les mêmes correspondances de couleur mais entre 0 et 80 min. (C) Dépendance de la totalité du Cytc réduit au plateau en fonction de la concentration initiale en NADPH. Les points verts sont expérimentaux, la droite verte est une régression linéaire affine faite sur les points expérimentaux entre 50 et 200 μM de NADPH et la ligne noire est une fonction affine traduisant l'évolution théorique de la concentration totale en Cytc réduit au plateau en fonction de la concentration en NADPH initiale.

La **Figure III-19B** présente les cinétiques globales jusqu'au plateau qui traduit un arrêt de la réduction du Cytc. Il est intéressant de constater que le pseudo-plateau décroissant précédemment observé **Figure III-17B** et **Figure III-18B** n'est pas retrouvé ici. En revanche, le plateau est cette fois légèrement croissant en fonction du temps et il s'agit donc d'un pseudo-plateau mais à pente faiblement positive, (pendant au moins deux fois la durée ici présentée, (résultats non montrés)) et je pense qu'il serait intéressant de refaire l'expérience en ajoutant du DPI pour vérifier si la croissance du plateau est due à une flavoenzyme comme NOX2, ou encore de la SOD pour vérifier si cette pente est due à la réduction du Cytc par les anions superoxyde. Le Cytc étant en large excès, tous les anions superoxyde produits devraient être captés par le Cytc et le plateau devrait donc en théorie représenter une réalité sur la réaction catalysée par NOX2 et plus simplement une saturation de la sonde Cytc. Ainsi, la différence entre l'absorbance au temps zéro et l'absorbance au plateau devrait permettre de calculer la concentration en anions superoxyde captés par le Cytc en fin de réaction en fonction de la concentration en NADPH. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un graphique en **Figure III-19C**.

En présence de 25 μM de NADPH initialement, la quantité de Cytc réduit est plus élevée que la production théorique totale possible d'anions superoxyde. Ceci est contradictoire et pourrait venir d'une variabilité dans la concentration en NADPH initiale liée au faible volume à prélever. En revanche, la droite de régression passant par zéro et par les autres points expérimentaux entre 50 et 200 μM de NADPH initial, a une pente égale à 1,85 ce qui correspond à une déviation de 8 % par rapport à la pente de la droite, de valeur 2, correspondant à la stœchiométrie théorique $O_2^- : NADPH$.

La variabilité peut être due à des incertitudes de mesure, (sur la concentration en NADPH, le pipetage, le spectrophotomètre, le coefficient d'extinction molaire du Cytc...), ainsi qu'au temps mort pendant lequel une partie de la mesure est manquée. Afin de séparer ces deux effets, il serait avantageux de refaire ces expériences au stopped-flow.

Il semble donc que le Cyt_c en large excès capte l'entièreté des anions superoxyde. Par conséquent, il semblerait que la bonne façon de mesurer précisément la production des anions superoxyde avec du Cyt_c serait de mettre un large excès de Cyt_c, mais le coût des mesures et le manque de praticité d'utiliser des cuvettes de 1 mm de trajet optique limitent beaucoup les applications de cette méthode. En outre, travailler en large excès de Cyt_c augmente le risque de perturbations structurales du Cyt_{b558} et à l'instar de l'INT le risque de modifier le mécanisme de transfert d'électrons, ce qui annihilerait l'intérêt d'utiliser le Cyt_c pour l'étude des caractéristiques enzymatiques de NOX2.

4.1.4. COMPARAISON DE $ASM=F([NADPH])$ EN EXCES OU EN DÉFAUT DE CYTC

Un large excès de Cyt_c permet de capter l'ensemble des anions superoxyde produits par NOX2. Il est maintenant nécessaire de vérifier si cet excès permet aussi de compenser les différences de vitesses observées auparavant entre l'observable NADPH et l'observable Cyt_c. Ainsi, en considérant les ASM calculées pour différentes concentrations en NADPH à partir des cinétiques présentées en **Figure III-19** avec le Cyt_c en large excès, j'ai ajouté en **Figure III-20** les valeurs de ces ASM en fonction de la concentration en NADPH aux jeux de données utilisées dans la **Figure III-10**.

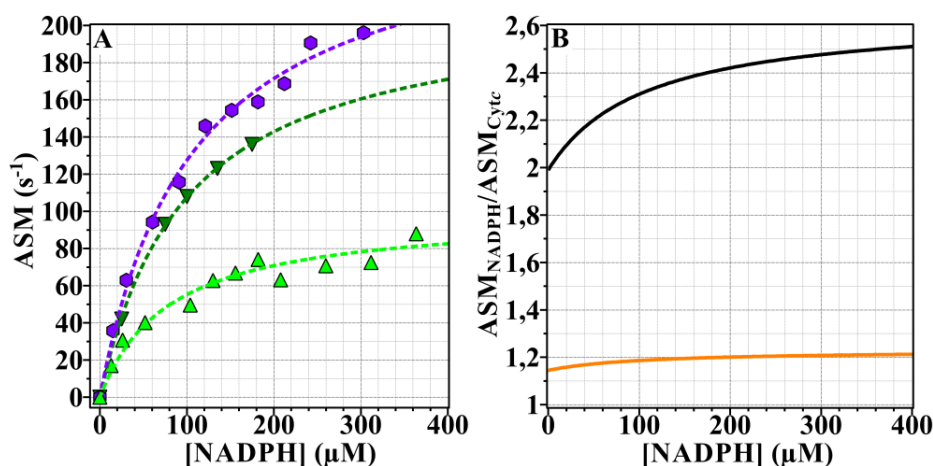


Figure III-20. Effet de l'excès de Cyt_c sur la dépendance d'ASM en fonction de la concentration en NADPH.

Présence de 4 nM Cyt_{b558}, 200 nM p67^{phox}, 200 nM p47^{phox}, 200 nM Rac1Q61L, 46 μM AA. Incubation 5 minutes, mesures à 25 °C, trajet optique 1 mm. **(A)** Dépendance de l'ASM en fonction de la concentration en NADPH avec l'observable NADPH en violet (hexagones), avec l'observable Cyt_c en excès 360 μM en vert foncé (triangles sommet vers le bas) ou avec l'observable Cyt_c en défaut 50 μM en vert clair (triangles sommet vers le haut). **(B)** Rapport de l'ASM du NADPH et de l'ASM du Cyt_c en présence d'un défaut de Cyt_c en noir ou d'un excès de Cyt_c en orange.

Les nouvelles mesures de production des anions superoxyde en large excès de Cyt_c présentées **Figure III-20A** sont beaucoup plus proches de l'observable NADPH que ne le sont les mesures en défaut de Cyt_c. Notamment, il est clair en **Figure III-20B** que le rapport entre les deux observables dont le Cyt_c en excès reste toujours aux alentours de 1,2 sans évoluer vraiment entre 0 et 400 μM de NADPH alors que le rapport entre les deux observables dont le Cyt_c est en défaut débute à 2 et augmente jusqu'à 2,49.

De plus, le **Tableau III-2** montre que les valeurs de K_m^{app} (NADPH) et de k_{cat}^{app} obtenues avec le Cyt_c en excès sont beaucoup plus proches des valeurs obtenues pour l'observable NADPH que ne le sont les valeurs avec du Cyt_c en défaut.

	Cytc 50 μM (Défaut)	Cytc 360 μM (Excès)	NADPH
K_m^{app} (NADPH) (μM)	79 \pm 16	98 \pm 3	106 \pm 11
$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (s^{-1})	99 \pm 6	213 \pm 3	262 \pm 10
R^2	0,96	0,9998	0,994

Tableau III-2. Paramètres enzymatiques de NOX2 vis-à-vis du NADPH à 239 (255) μM de dioxygène avec excès ou défaut de Cytc. K_m^{app} du NADPH (ligne 1) et $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ de l'enzyme (ligne 2) mesurées par 2 observables différentes : en suivant la production des anions superoxydes via le Cytc 50 μM en défaut (colonne 1), ou 360 μM en excès (colonne 2), ou la consommation du NADPH (colonne 3). La troisième ligne renvoie les coefficients de régression des ajustements ayant permis d'obtenir K_m^{app} et $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$.

Ces résultats confirment les résultats précédents qui montraient par des cinétiques de consommation de dioxygène en présence de Cytc, ou par des cinétiques de réduction du Cytc, qu'une concentration de 50 μM de Cytc n'est pas saturante. De plus, ces résultats sur l'ASM sont cohérents avec les mesures de stœchiométrie de presque 2 anions superoxyde pour 1 NADPH avec une déviation de 8 % obtenue en présence de 360 μM de Cytc. Afin d'avoir une vérification supplémentaire de la réalité de ces résultats, il serait intéressant de refaire les mesures d'oxymétrie réalisées en Figure III-16 mais en élargissant la gamme de concentration du Cytc jusqu'à plus de 400 μM pour vérifier la saturabilité du système.

4.1.5. ETUDE DE LA PHASE D'EQUILIBRE (PLATEAU), OU DE QUASI-EQUILIBRE (PSEUDO-PLATEAU)

Jusqu'ici, a été étudié d'une part la phase initiale de la cinétique de réduction du Cytc dans différentes conditions, en s'intéressant à son allure mais aussi aux vitesses mesurées. J'ai notamment déterminé que la phase initiale et donc les vitesses mesurées sont impactées par la concentration en AA et la durée d'incubation en présence d'AA, mais aussi impactées par la concentration en NADPH et en Cytc et étudié la cinétique globale de la réduction du Cytc. Lorsque le Cytc est en excès, le plateau atteint est dû à une consommation totale du NADPH et à l'arrêt de la production des anions superoxyde, alors qu'en défaut de Cytc, le plateau est en fait un pseudo-plateau décroissant atteint très rapidement. Je vais maintenant discuter plus avant du plateau afin, notamment, de chercher à expliquer l'origine de sa décroissance.

Dans un premier temps, j'ai testé, **Figure III-21A**, si le Cytc était totalement réduit lorsque l'absorbance maximale est atteinte au cours d'une cinétique de réduction du Cytc en défaut couplée à NOX2 en ajoutant du dithionite de sodium. Quelle que soit la concentration initiale en Cytc, lorsque celui-ci est en défaut, l'absorbance maximale atteinte au cours de la cinétique est quasiment égale à l'absorbance maximale atteinte une fois le Cytc totalement réduit par le dithionite de sodium ajouté. Par conséquent, lorsqu'il est en défaut, le Cytc est bien totalement réduit par les anions superoxyde produits par NOX2. Le pseudo-plateau implique une décroissance en fonction du temps qui pourrait être due soit à une réoxydation du Cytc, soit à une altération de l'apoprotéine (dénaturation, oxydation des acides-aminés...). Or, l'ajout de dithionite de sodium après la phase de décroissance du plateau permet de réduire à nouveau totalement le Cytc. Par conséquent, la décroissance du plateau est due à une réoxydation du Cytc et non pas à son altération.

En **Figure III-21A**, le Cytc est en défaut, ce qui signifie qu'une fois le pseudo-plateau atteint, il est probable que NOX2 poursuit sa catalyse de production des anions superoxyde. Si des anions superoxyde sont encore produits, ceci est a priori contradictoire avec la réoxydation du Cytc au pseudo-plateau. Cependant, il est connu que le Cytc peut

être réoxydé lentement par le peroxyde d'hydrogène (463, 465, 466) en réalisant potentiellement une action peroxydasique (449, 450), mais aussi beaucoup plus rapidement par le HO₂ (366–368), ou encore très rapidement par le HOCl dont la formation serait alors catalysée par la myéloperoxydase en présence de peroxyde d'hydrogène (479, 480). Pour vérifier que NOX2 est encore fonctionnelle une fois le pseudo-plateau atteint, **Figure III-21B**, j'ai ajouté à nouveau du Cytc au pseudo-plateau et il est clair que le Cytc nouvellement ajouté est bien réduit rapidement, ce qui confirme que NOX2 catalyse encore la production d'anions superoxyde. Cette nouvelle expérience montre que la réoxydation est probablement simplement due à des ordres cinétiques plus favorables aux réactions de réoxydations par les espèces oxydantes du milieu en présence d'une forte concentration en Cytc réduit.

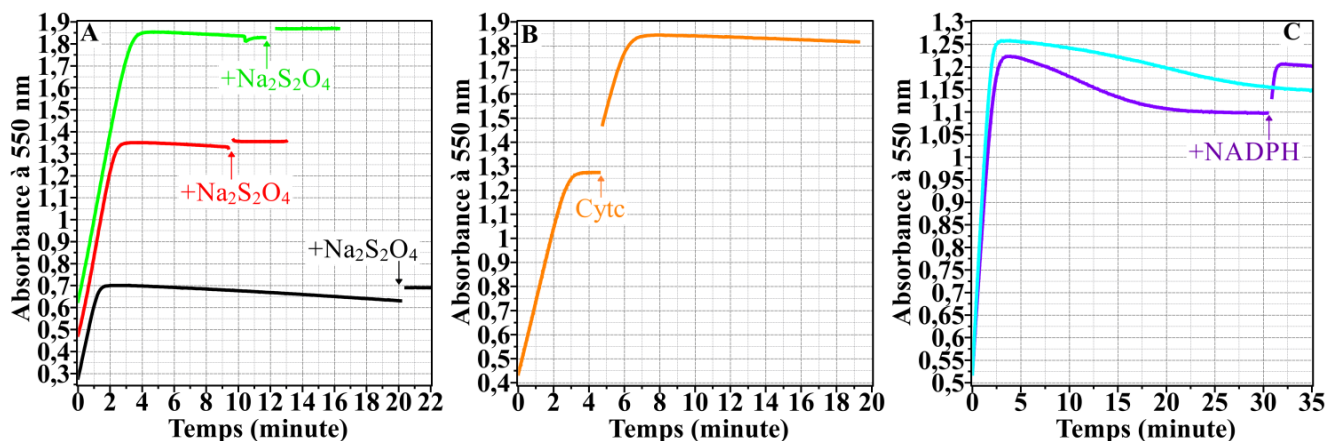


Figure III-21. Étude du plateau par ajout, au plateau, de Cytc ou NADPH ou dithionite de sodium au plateau.

Présence de 4 nM Cytb₅₅₈, 200 nM p67^{phox}, 200 nM p47^{phox}, 200 nM Rac1Q61L, 46 µM AA, 200 µM de NADPH. Incubation 5 minutes, mesures à 25 °C, trajet optique 1 cm. (A) Variation de la concentration initiale en Cytc : noir 22 µM, rouge 45 µM ou vert clair 60 µM. Ajout de dithionite de sodium au plateau signalé par une flèche. (B) Cinétique en présence initiale de 40 µM de Cytc, puis ajout de 20 µM de Cytc signalé par une flèche. (C) Cinétique en présence de 40 µM de Cytc et en présence de 100 µM de NADPH en violet ou 200 µM de NADPH en bleu ciel. Ajout de 100 µM de NADPH signalé par une flèche lors de la cinétique en présence d'initialement 100 µM de NADPH.

J'ai ensuite voulu savoir si un ajout de NADPH une fois la décroissance du pseudo-plateau terminée provoquerait une réduction du Cytc réoxydé afin de vérifier si le Cytc réoxydé est encore capable de capter des anions superoxyde, (autrement dit, s'il est altéré ou pas). La **Figure III-21C** présente une cinétique classique en présence de 200 µM de NADPH en bleu clair ou en présence de 100 µM de NADPH en violet. Premièrement, la réoxydation du Cytc est beaucoup plus rapide en présence de moins de NADPH, ce qui suggère une fois de plus que la réoxydation du Cytc est en effet due à des produits issus de réactions secondaires des anions superoxyde produits, en compétition avec la réduction du Cytc. De plus, lorsque 100 µM de NADPH sont ajoutés une fois la réoxydation terminée, le système est de nouveau capable de réduire totalement le Cytc, ce qui confirme que la réoxydation du Cytc est en compétition avec sa réduction et que cette compétition dépend de la vitesse de production des anions superoxyde.

Dans l'hypothèse où la réoxydation du Cytc est due au peroxyde d'hydrogène ou au HOCl, j'ai ensuite souhaité tester l'effet de la SOD sur les cinétiques globales et leur effet sur le plateau. Je rappelle à propos de la **Figure III-22A** que lorsque le Cytc est en défaut, le plateau décroît, (courbe noire), alors que lorsqu'il est en excès, le plateau croît, (courbe rouge). Or, lorsque le Cytc est en défaut, NOX2 continue de produire des anions superoxyde, comme montré en **Figure III-21B** alors que lorsque le Cytc est en excès, il a capté presque tous les anions superoxyde comme montré en **Figure III-19**. Par conséquent, en excès de Cytc, il n'y a à priori pas de peroxyde d'hydrogène qui se

forme alors qu'il s'en forme probablement par dismutation en défaut de Cytc. Si, de plus, le H₂O₂ est converti en HOCl par la myéloperoxydase, deux espèces oxydantes du Cytc s'accumulent, dont un oxydant rapide.

Afin de vérifier que ce sont bien les anions superoxyde qui réduisent le Cytc, j'ai ajouté de la SOD avant d'initier la réaction. La courbe verte de la **Figure III-22B** montre que 2,5 μM de Cytc est malgré tout réduit, avec une vitesse initiale de 20 nM·s⁻¹ contre 422 nM·s⁻¹ pour la vitesse initiale de réduction du Cytc en présence du système fonctionnel seul. Soit la SOD était en trop faible quantité, ce qui est le plus probable vu la compétition SOD/Cytc observée en **Figure III-11**, soit le Cytc est très faiblement réduit par autre chose que les anions superoxyde à l'instant initial de la réaction.

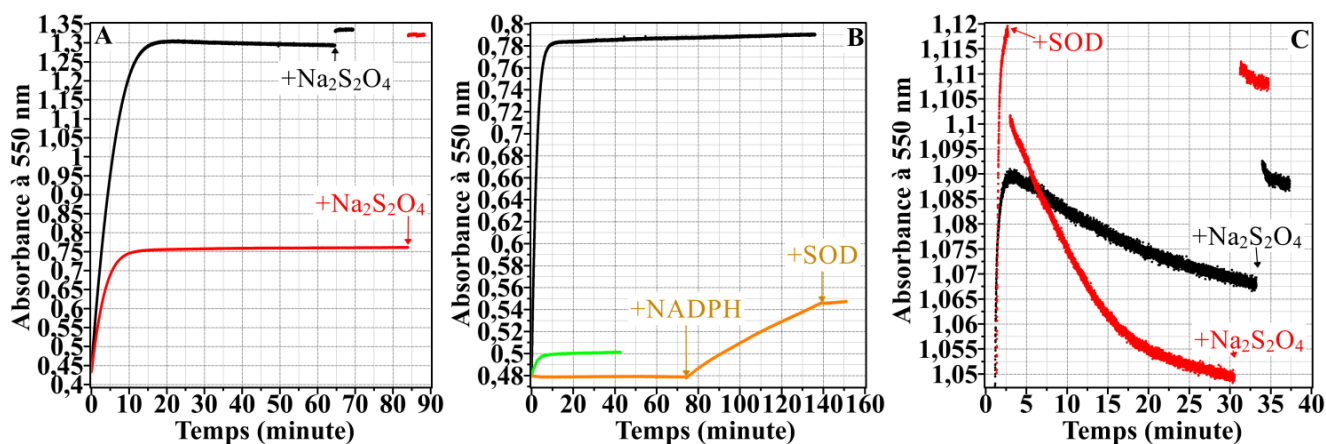


Figure III-22. Caractérisation du plateau dans des conditions multiples.

Présence de 4 nM Cytb₅₅₈, 200 nM p67^{phox}, 200 nM p47^{phox}, 200 nM Rac1Q61L, 46 μM AA, 200 μM de NADPH. Incubation 5 minutes, mesures à 25 °C. **(A)** Cinétiques réalisées en présence de 228 μM de Cytc, trajet optique 2 mm et soit 43 μM de NADPH (en rouge), soit 250 μM de NADPH (en noir). L'ajout de dithionite de sodium (Na₂S₂O₄) est signalé par une flèche. **(B)** Cinétiques réalisées en présence de 250 μM de Cytc, trajet optique 2 mm. En présence de 43 μM de NADPH et du système NADPH oxydase complet pour la courbe noire, additionné de 2 μM de SOD pour la courbe verte. La courbe orange est un contrôle comportant seulement Cytc et AA, puis ajout de 200 μM de NADPH signalée par une flèche puis de 2 μM de SOD signalée par une flèche. **(C)** Cinétiques réalisées en présence de 32 μM de Cytc, trajet optique 1 cm en présence de 200 μM de NADPH. Un ajout de 2 μM de SOD est indiqué par une flèche sur la courbe en rouge et les ajouts de dithionite de sodium sont indiqués par une flèche sur les courbes rouge et noire.

Enfin, comme le présente la courbe orange de la **Figure III-22B**, pour déterminer si le Cytc isolé se réduit spontanément, j'ai mesuré son absorbance à 550 nm pendant 75 minutes et celle-ci est constante. Le Cytc ne se réduit donc pas spontanément. J'ai ensuite ajouté 200 μM de NADPH pour contrôler s'il est capable de réduire spontanément le Cytc et la réponse est oui, avec une vitesse de 7 nM·s⁻¹, ce qui est négligeable. Enfin, j'ai ajouté de la SOD pour vérifier si cette réduction est due à l'anion superoxyde, ce qui s'avère être le cas. Soit le NADPH et le Cytc réagissent ensemble pour catalyser la formation d'anions superoxyde, soit le NADPH isolé dans ces conditions génère spontanément des anions superoxyde. *Cela serait vérifiable indirectement en laissant incuber du NADPH dans ces conditions puis en ajoutant de la SOD et enfin en dosant le peroxyde d'hydrogène formé à l'aide d'une technique sensible comme la détection au LeucoCrystal Violet (LCV).*

Afin de vérifier que le peroxyde d'hydrogène ou le HOCl sont responsables de la réoxydation du Cytc, la **Figure III-22C** présente des cinétiques faites en défaut de Cytc avec ajout de SOD dès le début du plateau, (courbe rouge), ou sans ajout, (courbe noire). Après ajout de SOD, la décroissance du plateau est beaucoup plus rapide qu'en absence de SOD. Cela renforce l'hypothèse que la réoxydation du Cytc est provoquée par le peroxyde d'hydrogène ou par le HOCl. La SOD catalyse la dismutation des anions superoxyde et forme du peroxyde d'hydrogène, donc en présence

de SOD la compétition entre la réaction de réduction du Cyt_c par l'anion superoxyde et la réaction d'oxydation du Cyt_c par le peroxyde d'hydrogène ou le HOCl n'existe plus. Seule la réaction d'oxydation du Cyt_c par le peroxyde d'hydrogène ou le HOCl existe et celle-ci est d'ailleurs encore facilitée par la transformation des anions superoxyde formés en peroxyde d'hydrogène. *Afin de vérifier si le HOCl entre en jeu, dans la réoxydation du Cyt_c, il est possible de détecter sa présence ou des produits de dégradation du HClO par spectrométrie de masse.*

Sur la **Figure III-22C** il y a présence de deux phases à la réoxydation du Cyt_c, une phase rapide et une phase lente au-delà de 25 minutes, dans les deux cas avec ou sans SOD et cela a déjà été observé en **Figure III-21C**. La vitesse de la première phase est très supérieure en présence de SOD qu'en absence de SOD, mais les pentes de la deuxième phase en présence comme en absence de SOD sont les mêmes. Cela pourrait signifier que la production des anions superoxyde est terminée après 25 minutes. Dans des manip non présentées ici réalisées sur les milieux réactionnels ayant permis d'obtenir la **Figure III-21C**, un échantillon du milieu réactionnel a été prélevé en cours de mesure toutes les cinq minutes à partir du temps zéro, puis le NADPH en a été extrait et dosé par fluorimétrie. Cela a permis de montrer que la fin de la première phase de réoxydation est rigoureusement corrélée à la consommation totale du NADPH, donc à l'arrêt de la production des anions superoxyde par NOX2. Ainsi, la deuxième phase de réoxydation lente pourrait être due à la formation progressive de HOCl réoxydant le Cyt_c alors que la première phase serait la combinaison de la réoxydation du Cyt_c par le H₂O₂ et, ou par HOCl.

Cette partie a permis de démontrer que le Cyt_c est totalement réduit par les anions superoxyde produits par NOX2, mais aussi que le pseudo-plateau en présence d'un défaut de Cyt_c est dû à une réoxydation du Cyt_c probablement liée au peroxyde d'hydrogène ou à l'HOCl. De plus, même après une production de 200 μM d'anions superoxyde, NOX2 est encore capable de réaliser une activité NADPH oxydase. L'enzyme semble donc très stable dans les présentes conditions.

4.1.6. BILAN DES RESULTATS OBTENUS SUR LA CINETIQUE DE REDUCTION DU CYTC

Afin de mesurer une vitesse de production correcte des anions superoxyde produits par NOX2 en utilisant le Cyt_c comme sonde, il est nécessaire de mettre le Cyt_c en large excès devant la quantité d'anions superoxyde théoriquement productible à partir de la quantité de NADPH ajoutée initialement. Cependant, les conséquences néfastes d'un tel excès n'ont pas été évaluées. Néanmoins, l'allure des phases initiales des cinétiques de réduction du Cyt_c, mais aussi du pseudo-plateau, suggèrent que la concentration en Cyt_c est un facteur parmi d'autres qui influencent la mesure de la vitesse de production des anions superoxyde. En effet, il est probable que la perméabilité membranaire des FM joue beaucoup sur la sortie des anions superoxyde, ou encore qu'il existe une compétition entre la réduction du Cyt_c et sa réoxydation par d'autres voies compétitives qui sont limitantes à fortes concentrations en Cyt_c.

4.2. CINETIQUE DE CONSOMMATION DU NADPH

À la suite de l'étude de la cinétique de réduction du Cyt_c par NOX2 qui a permis de déterminer des paramètres clés de la mesure de l'activité de NOX2 par cette observable, l'étude de la cinétique de consommation du NADPH

va être réalisée. La mesure de la consommation du NADPH en fonction du temps permet de mesurer de manière directe l'activité de la NADPH oxydase.

Les cinétiques de réduction du Cyt_c présentaient une phase initiale sigmoïdale à basse concentration en AA ou en absence de temps d'incubation, j'ai donc voulu tester si les cinétiques de consommation du NADPH présentaient la même allure ou non. La **Figure III-23A** reporte une cinétique de consommation du NADPH avec un temps d'incubation nul, comportant une phase initiale linéaire, non sigmoïdale, quelle que soit l'échelle utilisée. En pratique, je n'ai d'ailleurs jamais constaté de sigmoïde au temps zéro, quelle que soit l'échelle utilisée et quelle que soit la concentration en AA en suivant la consommation du NADPH. Ainsi, l'ASM peut être calculée à partir des pentes mesurées à l'instant zéro. Ceci démontre que la sigmoïde alors observée est due uniquement à un couplage de mauvaise qualité entre la réaction catalysée par NOX2 et la réaction permettant la détection des anions superoxyde produits. **Il est donc selon moi faux de faire la moindre interprétation de cette sigmoïde relativement à NOX2 (vitesse d'assemblage, mécanisme de l'assemblage...).** Ce résultat clos le débat de l'origine de cette sigmoïde et est donc très important pour la communauté travaillant sur la NADPH oxydase en système acellulaire.

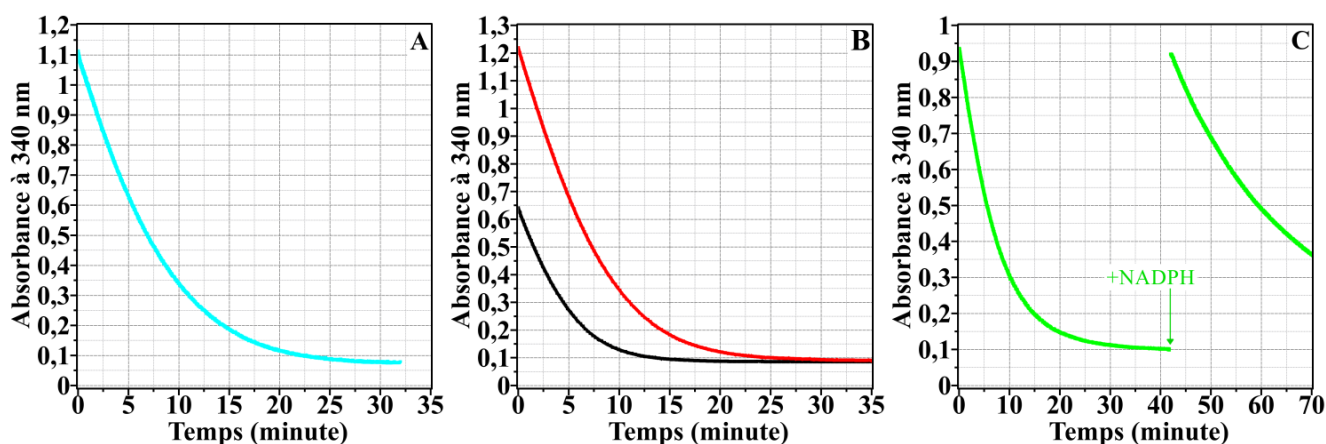


Figure III-23. Étude de la cinétique globale de consommation du NADPH par NOX2.

Présence de 4 nM de Cyt_{b558}, 200 nM de p67^{phox}, 200 nM de p47^{phox}, 200 nM de Rac1Q61L, 46 μM d'AA. Mesures en cuvette de 1 cm de trajet optique à 25 °C. (A) Temps d'incubation nul. En présence de 180 μM de NADPH initialement. (B) Temps d'incubation de 5 minutes.

En présence de 200 μM (courbe rouge) ou 100 μM (courbe noire) de NADPH initialement. (C) Temps d'incubation de 5 minutes. En présence de 150 μM de NADPH initialement, puis nouvel ajout de 150 μM de NADPH identifié par une flèche.

J'ai ensuite voulu vérifier si le plateau obtenu en fin de réaction pour différentes concentrations en NADPH est atteint pour une même valeur d'absorbance afin notamment de savoir si la totalité du NADPH est bien consommé. La **Figure III-23B** présente donc une cinétique de consommation du NADPH en présence de 200 μM initialement, (en rouge), ou de 100 μM initialement, (en noir). Il s'avère que le plateau est bien atteint pour une même valeur d'absorbance qui correspond à l'absorbance initiale du milieu réactionnel en absence de NADPH, ce qui suggère qu'en fin de réaction tout le NADPH est consommé. En outre, la différence entre l'absorbance au temps zéro et l'absorbance au plateau permet de calculer que 88 % du NADPH initialement présent est consommé. Il est possible que les incertitudes sur le pipetage, sur la détermination de la concentration en NADPH (sur le coefficient d'extinction molaire par exemple), mais aussi les incertitudes liées au temps mort soient des raisons qui nous empêchent de retrouver une consommation de 100 % du NADPH initialement introduit. *Il serait intéressant de faire les mêmes expériences au stopped-flow pour s'en assurer.*

Egalement, **Figure III-23B**, le plateau est atteint après 12,5 minutes en présence de 100 μM de NADPH ou 25 minutes en présence de 200 μM de NADPH, ce qui semble corrélé aux ruptures des pentes de réoxydation du Cyt c en quantité limitante observées en **Figure III-21C** ou encore en **Figure III-22C** qui avaient été attribuées à un arrêt de la production des anions superoxyde.

Il m'a ensuite paru nécessaire de vérifier via l'observable NADPH que le système NADPH oxydase est encore fonctionnel après consommation de 150 μM de NADPH, comme cela avait déjà été observé après consommation de 100 μM de NADPH en **Figure III-21C** avec l'observable Cyt c . Ainsi, la **Figure III-23C** montre que à la suite de la consommation totale de 150 μM de NADPH un ajout secondaire de 150 μM de NADPH provoque à nouveau sa consommation totale. La réoxydation du NADPH secondairement ajouté est néanmoins un peu moins rapide qu'à la suite du premier ajout. Par conséquent, NOX2 supporte très bien la production de 300 μM d'anions superoxyde avec toutefois une petite perte d'activité. En effet, des expériences non présentées ici en présence ou en absence de 500 μM de NADP^+ montrent que le NADP^+ n'inhibe pas la réaction d'oxydation du NADPH, donc la diminution de la vitesse d'oxydation du NADPH observée en **Figure III-23C** est bien due à une perte d'activité de l'enzyme.

4.3. ETUDE DE LA STœCHIOMETRIE MESUREE O_2 :NADPH

En complément des expériences réalisées en présence d'un excès de Cyt c qui ont finalement montrées que la stœchiométrie de la réaction catalysée par NOX2 pouvait bien être retrouvée, j'ai voulu vérifier que le dioxygène pouvait être totalement consommé en présence d'un large excès de NADPH en milieu fermé, (pas d'échange de matière), sachant que la concentration en dioxygène du milieu à 25 °C est aux alentours de 239 μM (255 μM expérimentalement). Ces résultats sont présentés en **Figure III-24**.

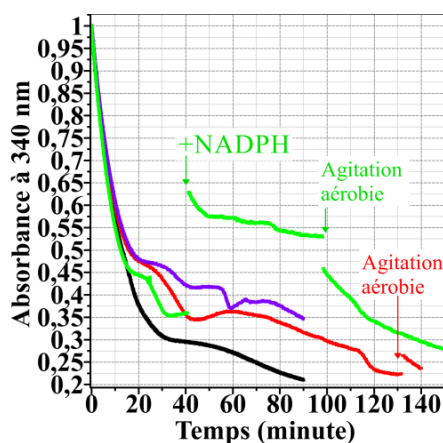


Figure III-24. Cinétiques globales de transformation par NOX2 d'un excès de NADPH en cuvette fermée ou ouverte.

Présence de 4 nM de Cyt b_{558} , 200 nM de p67^{phox}, 200 nM de p47^{phox}, 200 nM de Rac1Q61L, 46 μM d'AA et 750 μM de NADPH. Mesures en cuvette en quartz, de 0,2 cm de trajet optique à 25 °C. La cuvette était scellée hermétiquement par un bouchon en caoutchouc épais pour les courbes verte, rouge et violette. Un ajout secondaire de 195 μM de NADPH a été fait à travers le bouchon pour l'expérience représentée en courbe verte puis quelques minutes après la cuvette a été agitée bouchon ouvert. Pour l'expérience représentée par la courbe rouge, une agitation bouchon ouvert a été réalisé en fin d'expérience.

Contrairement aux expériences en cuvette ouverte, les expériences en milieux fermés sont beaucoup plus délicates. Je pense qu'il est nécessaire de préciser en tant que physicochimiste ce que j'entends par délicates. Il faut tout d'abord une cuvette totalement pleine, sans bulle d'air, sans quoi un échange gazeux tendant vers l'équilibre entre la pression partielle en dioxygène de la bulle et la concentration en dioxygène du milieu va s'établir tout au

long de notre cinétique et les résultats seront nécessairement faussés, même si une bulle non comprimée de très petite taille aura seulement un impact probablement négligeable. Il faut ensuite pouvoir ajouter le substrat NADPH et homogénéiser proprement pour que la réaction débute, ce qui est loin d'être aisé en absence de bulles d'air pour agiter le milieu. J'ai donc bouché les cuvettes à l'aide d'un morceau de caoutchouc souple épais, puis déterminé le volume à ajouter pour que celui-ci remplisse totalement la cuvette. J'ai planté une aiguille de seringue dans le caoutchouc pour que l'air puisse sortir de la cuvette lors du remplissage et à l'opposé du bouchon une autre aiguille de diamètre suffisant pour y faire passer le bout d'un cône très fin, (typiquement un cône pour charger les gels de polyacrylamide). L'ensemble du mélange (voir description **Figure III-23**) a été réalisé dans un tube Eppendorf puis ajouté rapidement à l'aide d'une pipette munie d'un cône bleu de 1000 μL , lui-même muni d'un cône de chargement des gels de polyacrylamides. Les aiguilles ayant une section très faible et la loi de diffusion des gaz étant proportionnelle à la surface d'échange, j'ai considéré que les laisser en place n'était pas dommageable. La procédure est d'autant plus délicate que la cuvette faisait 2 mm de trajet optique. Par conséquent, j'ai réalisé trois fois consécutivement les mesures en cuvette bouchée (en violet, rouge et vert) et une seule fois en cuvette ouverte (en noir).

Tout d'abord, l'ASM mesurée lorsque la cuvette est fermée est de $408 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ et lorsque la cuvette est ouverte de 406 s^{-1} . Par conséquent, au temps initial, l'ASM ne varie pas et le dioxygène n'est donc pas limitant. En outre, l'ajustement non linéaire de la courbe de Michaelis-Menten obtenues en mesurant la consommation du dioxygène prévoyait une $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ de 262 s^{-1} . Ce résultat vient donc contredire les mesures de $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ précédentes mais vient en support de l'hypothèse que cette enzyme ne peut être étudiée dans le détail en considérant l'équation de MMH pour un substrat unique.

Cependant, j'ai déjà constaté plusieurs fois que les cinétiques et particulièrement la pente initiale varient en fonction du contenant utilisé et plus précisément de son matériau et de sa taille et ce en conservant la même surface de faisceau lumineux traversant l'échantillon dans le spectrophotomètre. J'interprète ceci en considérant que certaines molécules, comme le NADPH ou l'AA, ou certaines protéines, comme les protéines cytosoliques, ou encore les fractions membranaires, pourraient se coller sur les surfaces. Cet attachement dépendrait de la nature de la surface mais également de l'aire totale de la surface de contact entre le milieu réactionnel et la cuvette de mesure. Cet effet d'adsorption pourrait être augmenté par l'agitation de la cuvette, qui se fait par retournement. Ainsi, lorsque je mélange par retournement, je fais attention à ce que toutes les surfaces soient systématiquement mouillées par le milieu réactionnel, (les 4 faces de la cuvette), afin d'être reproductible dans une même cuvette. Mais le changement de volume du milieu réactionnel ou de forme ou de composition du contenant pourraient aussi modifier significativement les mesures. Cependant, habituellement, lorsque je réalise un pré-mélange dans un tube Eppendorf et que je réalise les mesures dans les conditions usuelles, je n'observe pas de telle modification de l'ASM, qui sont, selon mon expérience, essentiellement impactées par le passage du plastique au quartz. Le passage en tube Eppendorf, (polypropylène), n'est donc pas responsable de cette modification.

Les cinétiques ont ici une allure inhabituelle. La phase initiale est usuelle, mais la phase de ralentissement est suivie d'une succession d'oscillations irrégulières impliquant une succession de décroissances et de pseudo-plateaux

faisant penser à l'établissement d'équilibres successifs. Il y a en effet probablement l'établissement d'un tel équilibre entre l'air et le milieu réactionnel et, ou, entre le milieu réactionnel et le caoutchouc (bouchon) qui, potentiellement, pourrait stocker du dioxygène. De façon très surprenante, pour la courbe verte entre 30 min et 40 min ou la courbe rouge entre 40 min et 60 min ou la courbe violette entre 55 min et 65 min, il y a une augmentation de l'absorbance à 340 nm qui est lente mais non négligeable et reproductible. Cela pourrait faire penser à une très faible régénération du NADPH alors que j'ai pu constater l'absence d'inhibition de l'enzyme en présence de NADP⁺. Ceci serait donc artéfactuel et potentiellement dû à l'augmentation d'une absorbance spécifique ou non d'une autre molécule du milieu dans ces conditions.

Oxydant/Réducteur E ⁰ /ENH (V)	H ₂ O ₂ /H ₂ O 1,763	H ₂ O ₂ /HO [·] , H ₂ O 0,72	O ₂ /H ₂ O ₂ 0,299	NADP ⁺ /NADPH -0,320
--	--	---	--	------------------------------------

Tableau III-3. Potentiels standards d'oxydoréduction E⁰ de couples d'oxydoréduction contre ENH. (182)

Néanmoins, je souhaite donner une piste de réflexion supplémentaire concernant ce qui semble être une régénération du NADPH. Comme le montre le **Tableau III-3**, en absence de dioxygène, en présence d'une concentration importante en NADP⁺ et si le peroxyde d'hydrogène s'accumule comme j'en ai fait l'hypothèse précédemment, alors la réaction de réduction du NADP⁺ en NADPH par le peroxyde d'hydrogène est thermodynamiquement possible dans les conditions standards. Je n'ai pas vérifié l'aspect cinétique de cette réaction, donc je ne sais pas si celle-ci a une réalité, mais ceci peut être une hypothèse de travail pour ce qui semble être une régénération très limitée du NADPH. Je note également que deux réactions d'oxydation du NADPH par le peroxyde d'hydrogène sont possibles, dont une qui pourrait produire des radicaux hydroxyles. *Il serait donc intéressant de réaliser une étude cinétique de réaction du peroxyde d'hydrogène avec du NADPH ou du NADP⁺.*

Lorsque la cuvette est scellée, il y a consommation de 412 à 434 μM de NADPH au premier pseudo-plateau, qui est le seul plateau quasi-commun aux trois réplicas et donc le seul que je considère pour calculer ces différences. Lorsque la cuvette est ouverte, il y a consommation de 551 μM de NADPH au premier pseudo-plateau. Ceci correspond donc à la consommation respective de 824 à 868 μM ou 1102 μM de dioxygène. Or, 239 μM, (255 μM expérimentalement), de dioxygène sont censés être présents au total dans le milieu. Ce résultat pourrait s'expliquer partiellement par un phénomène de dismutation des anions superoxyde et du peroxyde d'hydrogène formé. Une autre partie pourrait provenir de fuites à travers le bouchon ou encore d'un stockage de dioxygène dans le bouchon qui est relargué progressivement dans le milieu réactionnel au fil du temps.

Concernant la mesure en cuvette ouverte, la cuvette faisant 2 mm d'épaisseur et 10 mm de largeur, l'interface air-liquide est de faible surface. La diffusion du dioxygène dans le milieu est donc nécessairement lente, notamment vu la colonne du milieu réactionnel c'est pourquoi la totalité du NADPH n'est pas immédiatement consommée dans le cas de la cuvette ouverte mais que des équilibres successifs s'établissent également.

Lorsque du NADPH est ajouté secondairement, (courbe verte), cela induit d'abord une augmentation de l'absorbance, puis une légère décroissance liée à une consommation de NADPH aidée par le dioxygène que contenait le petit volume ajouté, suivie d'une série de pseudo-plateaux successifs, comme précédemment. Il n'y a pas de consommation importante du NADPH à la suite de cet ajout, ce qui signifie que la quasi-totalité du dioxygène a bien

été consommée avant cet ajout. En revanche, lorsque le milieu est mélangé en aérobie, (cuvette ouverte, courbes verte et rouge), une consommation assez rapide et significative du NADPH est observable, ce qui implique que l'introduction de dioxygène dans le milieu a permis de relancer la réaction.

Cette partie a permis de montrer que le NADPH est bien totalement consommé par NOX2, qu'il y a visiblement un problème de stœchiométrie difficile, voire impossible dans ces conditions, à évaluer entre le dioxygène et le NADPH et que la sigmoïde observée dans certaines conditions en phases initiales des cinétiques de réduction du Cyt_c est juste un artefact dû à un mauvais couplage entre la réaction catalysée par NOX2 et la réaction de détection des anions superoxyde par le Cyt_c. Dans cette partie, ont aussi été mis en exergue plusieurs problèmes techniques difficiles à appréhender mais qu'il est néanmoins important de soulever dans ma thèse relevant des méthodologies d'étude de l'enzymologie de NOX2.

4.4. CINÉTIQUE DE CONSOMMATION DU DIOXYGÈNE PAR ELECTROCHIMIE

L'étude des cinétiques de réduction du Cyt_c par les anions superoxyde produits par NOX2 ainsi que l'étude des cinétiques de consommation du NADPH par NOX2 ont finalement conduit à la détection d'un problème de stœchiométrie entre le dioxygène et le NADPH pouvant notamment impliquer une réaction de dismutation des anions superoxyde, qui régénère une mole de dioxygène pour deux moles d'anions superoxyde consommés. Ainsi, il est important d'étudier les cinétiques de consommation du dioxygène par NOX2 pour comprendre ce qu'il se passe. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'une électrode de Clark, dans une cellule de mesure thermostatée isochore et agitée à l'aide d'un barreau aimanté et d'un agitateur magnétique. Faire des mesures rigoureuses avec cet appareil implique de nombreuses contraintes techniques, notamment liées à la conception même de l'appareil Oxygraph fabriqué par Hansatech Instruments Ltd, et je détaillerai donc les contraintes majoritaires dans la suite, avant de présenter les principaux résultats obtenus.

4.4.1. LES CONTRAINTES TECHNIQUES

Comme l'électrochimie nécessite une polarisation préalable de l'électrode de travail, impliquant une très faible consommation de l'espèce détectée, ici le dioxygène, il existe, en milieu fermé, une ligne de base avec une pente négative extrêmement faible, (négligeable pour mes applications), et la mesure est nécessairement faite en continue. Ainsi, lorsqu'il y a une consommation rapide du dioxygène, par exemple par la réaction catalysée par NOX2 après ajout du NADPH, la pente initiale devient beaucoup plus forte en un temps très court. Néanmoins, la durée du mélange du substrat ainsi que le temps que s'établisse un état stationnaire entre la concentration en dioxygène qui baisse dans le milieu et la concentration en dioxygène au niveau de l'électrode de platine peuvent laisser penser, en zoomant sur la rupture de pente, qu'il existe une légère sigmoïde. Il est donc probable que cette dernière soit uniquement due à la technique de mesure indépendamment de la catalyse réalisée par NOX2. Par conséquent et jusqu'à preuve du contraire, je n'interpréterai pas ceci comme une réalité enzymologique. Ainsi, je choisis de ne pas étudier cette sigmoïde plus avant et de mesurer la pente maximale pour calculer l'ASM, comme décrit précédemment.

Lors des premières expériences réalisées avec cette électrode, j'ai pu observer l'apparition de bulles dans l'électrolyte en fonction du temps, entre la membrane de PTFE et l'électrode de platine. Ces bulles peuvent gêner la vitesse de diffusion du dioxygène entre la solution et l'électrode de platine et donc perturber le temps de réponse de l'électrode ce qui impliquerait des mesures erronées. Cela vient du fait que l'électrolyte utilisé, une solution aqueuse de chlorure de potassium 3 M, est initialement stockée à la température ambiante, généralement inférieure à la température de mesure, mais aussi du fait que l'électrode est elle-même réalisée à cette température. Par conséquent, mon interprétation est que lorsque l'électrode est installée dans ces conditions, sa thermostatisation implique le relargage des gaz dissous ce qui provoque des bulles. J'ai donc pallié ce problème en secouant vigoureusement plusieurs fois la solution d'électrolyte pour la dégazer et en préchauffant à 25 °C, (température de mesure), l'électrolyte en milieu ouvert au moins une heure avant de monter l'électrode, en préchauffant également le papier utilisé pour le pont salin, la membrane de PTFE, le disque portant les électrodes ainsi que l'applicateur du joint de membrane. L'électrode ainsi préparée extemporanément et rapidement dans l'étuve d'incubation permet de supprimer totalement ce problème de bulles. Bien sûr, si la température de mesure diffère de 25 °C, l'incubation doit être réalisée de la même façon mais à la température de mesure *ad-hoc*.

Le disque portant les électrodes est ajusté et fixé hermétiquement à l'aide d'un joint contre la cuvette de mesure avec une bague vissée en PMMA. Si ce disque est serré trop fortement contre la cuvette de mesure, des bulles apparaissent au niveau de la zone de contact, ce qui implique que le joint ne joue plus son rôle et n'est pas étanche. Ce serrage doit donc être calibré précautionneusement et il est indispensable de s'entraîner plusieurs fois avant de réaliser des mesures rigoureuses. Entre deux mesures, il est nécessaire de rincer et sécher la cuvette et l'électrode pour ne pas diluer l'échantillon de la mesure suivante. La meilleure reproductibilité a été obtenue en laissant l'électrode fixée sur la cuvette de mesure pour ces étapes. Le rinçage est fait à l'aide d'une pissette en envoyant un fort et abondant jet d'eau ultra-pure, la cuvette retournée au-dessus d'un béccher-poubelle. Le séchage est réalisé à l'aide d'un flux modéré de diazote propre. La membrane et l'électrolyte doivent être changées lorsque les mesures deviennent bruitées ou que le temps de réponse de l'électrode devient mauvais, ce qu'il est facile de voir sur le tracé de la mesure, notamment lorsque la cuve est séchée avec le diazote, (brusque diminution du signal).

La concentration en dioxygène dissous est proportionnelle à la salinité, à la température et à la pression atmosphérique. Connaître la concentration en chacun des ions de la solution ainsi que leur conductivité ionique molaire permet de connaître l'impact de la salinité de la solution sur la solubilité en dioxygène dans la solution (396, 396, 481–483). Ainsi, dans mes conditions, le milieu réactionnel contient en théorie 239 μM de dioxygène. En pratique, j'ai toujours mesuré environ 255 μM de dioxygène. Les variations de pression atmosphérique ainsi que l'incertitude sur la mesure font varier un peu cette concentration initiale en fonction des expériences. De plus, le tampon de mesure est initialement conservé au réfrigérateur et il est là aussi indispensable de le sortir au moins une heure avant la mesure pour le mettre à température de mesure et de le secouer fortement pour éliminer le dioxygène dissous en excès. Sans cela, la concentration initiale en dioxygène est beaucoup plus importante et varie beaucoup en fonction des mesures, ce qui signifie que l'activité mesurée varie aussi, si la vitesse maximale n'est pas atteinte.

4.4.2. LES RESULTATS

Dans un premier temps, comme précédemment, j'ai voulu vérifier l'allure globale des cinétiques de consommation du dioxygène à différentes vitesses, pour vérifier quelle est la quantité de dioxygène consommé en fin de réaction. Pour cela, j'ai réalisé, **Figure III-25**, des cinétiques de consommation du dioxygène par NOX2 à différentes concentrations en AA.

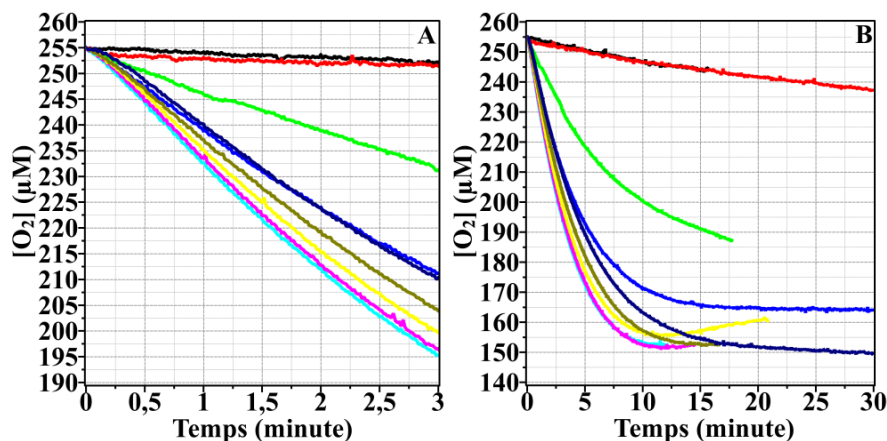


Figure III-25. Allure des cinétiques de consommation du dioxygène par NOX2 à différentes concentrations en AA.

Présence de 4 nM de Cyt_{b558}, 200 nM de p67^{phox}, 200 nM de p47^{phox}, 200 nM de Rac1Q61L, et 200 µM de NADPH. Mesures à 25 °C avec 5 minutes d'incubation, en milieu agité continuellement. Cinétiques en présence de concentrations en AA variable : noir 0 µM, rouge 6 µM, vert clair 17 µM, bleu 22 µM, cyan 28 µM, rose 33 µM, jaune 38 µM, vert kaki 44 µM, bleu nuit 66 µM. (A) Phase initiale des cinétiques. (B) Cinétiques globales.

La **Figure III-25A** permet de montrer qu'il existe effectivement une sigmoïde en phase initiale comme précédemment évoqué. J'ai supposé que cela était intrinsèque au temps d'homogénéisation du substrat NADPH et à l'établissement d'un état stationnaire pour la détection du dioxygène consommé. Ainsi, je néglige cette sigmoïde qui existe sur 5 à 30 secondes environ en début de cinétique.

D'autre part, les cinétiques globales en **Figure III-25B** ont des allures inattendues, elles sont en effet globalement décroissantes, puis soit un plateau est atteint pour des concentrations de 22 µM en AA (bleu foncé) et 66 µM en AA (bleu nuit), soit un minimum, puis une augmentation pour des concentrations de 28 µM (cyan), 33 µM (rose), 38 µM (jaune) et 44 µM (vert kaki) en AA. Cela signifie qu'il y a une consommation de dioxygène, jusqu'à une concentration minimale et enfin une régénération limitée du dioxygène. Par conséquent, un test de fuite a été fait sur cette cellule d'oxymétrie en plaçant dans la cellule de l'eau ultra pure que j'ai ensuite désoxygénée sous flux d'azote, avant de réaliser une mesure en cellule close pendant 14h. J'ai alors observé une augmentation linéaire négligeable du courant mesuré entre 0 h et 14 h (de l'ordre de 5 µM), ce qui montre que la cellule est suffisamment étanche pour des mesures durant quelques heures. J'en déduis donc qu'il y a un problème de reproductibilité concernant ces expériences d'oxymétrie.

Par ailleurs, l'électrode de Clark est connue pour être difficilement reproductible et assez susceptible à l'environnement électromagnétique, d'autant que je ne travaille pas en cage de Faraday. J'ai donc essayé un autre outil de mesure du dioxygène à base de complexes de ruthénium qui peuvent fluorescer lorsqu'ils sont excités avec de la lumière bleue et dont la fluorescence est quenchée par le dioxygène. Il est possible de relier ce quenching avec la concentration en dioxygène du milieu. Malheureusement, faute de cellule isotherme étanche et agitée adaptée, les

mesures n'ont pas été concluantes. Il serait à mon avis intéressant de fabriquer une cellule de mesure du dioxygène adaptée en utilisant ce type de technologie et de refaire les expériences dans ces conditions. La contrainte principale de cette technologie est que le quenching n'est pas directement proportionnel à la concentration en dioxygène, ce qui implique que nous ne pouvons pas réaliser la calibration nous-mêmes à moins d'avoir à disposition un mélangeur de gaz extrêmement bien calibré et dans le cas contraire, la procédure de calibration s'avère coûteuse.

En présence de 200 μM de NADPH, 400 μM de dioxygène est supposée être consommée au total, autrement dit tout le dioxygène est supposé être consommé en fin de réaction. Or, les cinétiques globales en **Figure III-25A** présentent une consommation réelle de seulement 100 μM de dioxygène. Comme il n'y a pas de fuite dans la cellule d'oxymétrie, cela signifie qu'il y a une régénération du dioxygène consommé.

J'ai précédemment supposé qu'une des causes des problèmes de mesure déjà observés pourrait être la dismutation des anions superoxyde. Dans ce cas, hypothétiquement, la mesure de la vitesse de consommation du dioxygène catalysée par NOX2, ainsi que la mesure de la quantité de dioxygène consommée en fin de réaction, pourraient être sous-estimées par rapport à la réalité à cause de la régénération du dioxygène liée au phénomène de dismutation. Ces résultats donnent aussi l'impression que plus la vitesse initiale est importante, plus la consommation maximale atteinte est importante. Il pourrait donc effectivement exister une compétition entre la consommation du dioxygène et sa régénération.

Ainsi, j'ai ensuite voulu savoir si NOX2 est bien capable de consommer tout le dioxygène du milieu à une concentration suffisante en NADPH. J'ai donc réalisé des cinétiques globales à différentes concentrations en NADPH. La **Figure III-26** présente ces résultats.

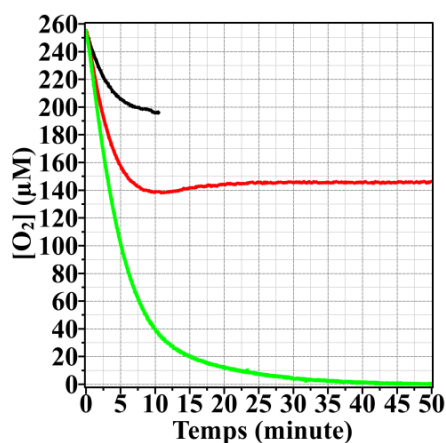


Figure III-26. Cinétiques de consommation du dioxygène par NOX2 à différentes concentrations en NADPH.

Présence de 4 nM de Cyt_{b558}, 200 nM de p67^{phox}, 200 nM de p47^{phox}, 200 nM de Rac1Q61L, 46 μM d'AA et soit 100 μM de NADPH en noir, soit 200 μM de NADPH en rouge, soit 1440 μM de NADPH en vert. Mesures à 25 °C avec 5 minutes d'incubation, en milieu agité continuellement.

En présence de 100 μM de NADPH initialement, seulement 70 à 80 μM de dioxygène sont consommés alors qu'en présence de 200 μM de NADPH initialement, 115 μM de dioxygène sont consommés au maximum, puis il y a une régénération limitée de dioxygène avant une stabilisation avec un vrai plateau, (ce qui soutient l'absence de fuite). En revanche, en présence de 1440 μM de NADPH, il y a une consommation totale du dioxygène au bout d'environ 45 minutes. Il est donc bien possible pour NOX2 de consommer la totalité du dioxygène présent dans le

milieu, mais cela nécessite une forte concentration en NADPH. Je n'ai malheureusement pas fait de gamme plus précise avec les cinétiques globales et il n'est donc pas possible en l'état de savoir quelle est la concentration nécessaire et suffisante pour que NOX2 consomme tout le dioxygène du milieu dans une condition donnée.

La **Figure III-23** a permis de montrer que 200 μM de NADPH sont totalement consommés dans les mêmes conditions au bout d'environ 25 minutes. Or, la courbe rouge présentée en **Figure III-26** montre que le plateau vrai s'établit au bout d'environ 25 minutes après une faible régénération du dioxygène.

Par conséquent, la régénération du dioxygène observée pourrait être liée au fait que l'enzyme produit encore des anions superoxyde, ce qui suggère qu'il s'agit en effet de l'implication de la dismutation des anions superoxyde, comme hypothétisé précédemment.

4.4.3. LE BILAN DES MESURES D'OXYMETRIE

Il a été montré précédemment que la concentration en dioxygène consommée dans le milieu n'est pas proportionnelle à la concentration de NADPH ajoutée initialement. Il est en revanche possible de consommer au moins 255 μM de dioxygène en présence de NOX2 fonctionnelle et de 1440 μM de NADPH. De plus, il existe une compétition entre la consommation du dioxygène et la régénération du dioxygène. Ces résultats soutiennent d'ailleurs l'hypothèse d'une régénération du dioxygène liée à la dismutation des anions superoxyde, (régénération limitée de dioxygène une fois le minimum atteint). L'oxymétrie est une technique délicate à mettre en place et à utiliser, notamment à cause du caractère atmosphérique du substrat dioxygène et donc de l'équilibre qui s'établit entre la pression partielle en dioxygène de l'air et la concentration en dioxygène du milieu, (comme je l'ai déjà évoqué). De plus, cette concentration est impactée par de nombreux facteurs qu'il est parfois difficile de contrôler, comme par exemple l'ajout de volumes de réactifs froids, au temps zéro d'une cinétique, introduisant un excès de dioxygène par rapport à la concentration d'équilibre à la température de mesure. Je suggère donc que cette technique soit utilisée seulement comme complément pour répondre à une question précise. Les résultats obtenus par oxymétrie seront donc bien évidemment pris en compte dans les interprétations, mais il est indispensable de prendre un maximum de précaution pour les interprétations en plus des précautions expérimentales.

4.5. CONCLUSION DE L'ETUDE DES CINETIQUES GLOBALES

Les cinétiques globales de réduction du Cyt_c par les anions superoxyde produits par NOX2, ainsi que les cinétiques globales de consommation du NADPH par NOX2 ou de consommation du dioxygène par NOX2 ont été étudiés en détail et dans différentes conditions

J'ai utilisé deux modes de détermination de la stœchiométrie de la réaction : *i*) via la mesure de la vitesse initiale de catalyse et *ii*) via la mesure, en fin de réaction, que j'appellerai mesure en point final, de la quantité totale de réactif consommé, ou de la quantité totale de produit formé. Deux rapports de stœchiométries ont été testés : le rapport NADPH: O₂ et le rapport NADPH: O₂⁻. Pour le rapport NADPH: O₂, la mesure en point final donne des résultats très éloignés de la stœchiométrie admise de la réaction alors que la mesure des vitesses initiales permet de retrouver des valeurs plus cohérentes, même si encore imparfaites. Concernant le rapport NADPH: O₂⁻, les conditions usuelles ne

permettent pas de déterminer la stœchiométrie admise, mais d'autres conditions, comme en présence d'un large excès de Cyt_c, permettent de retrouver cette stœchiométrie, ce qui peut s'expliquer par une forte perturbation des membranes causées par le Cyt_c lui-même qui, comme je l'ai rappelé, a beaucoup d'interactions avec les membranes et un impact significatif sur sa structure. Cependant, j'estime nécessaire de mettre en garde sur ce dernier résultat qui nécessite un large excès de Cyt_c qui pourrait modifier directement l'enzyme et donc le transfert d'électrons naturel.

Ces résultats montrent que la mesure de la stœchiométrie admise de la réaction catalysée par NOX2 en système acellulaire estimée à partir de la mesure de la vitesse initiale ou de la mesure en point final, est loin d'être triviale. Elle est **fortement impactée par le contexte vésiculaire de l'enzyme** qui impose une catalyse hétérogène ainsi qu'un microenvironnement, (intérieur des vésicules), favorables à la séquestration et donc à la réactivité des ROS générés. Or, l'ensemble des constantes de vitesse et des variables d'état sont définies bien au-delà de la limite thermodynamique et la question de la pertinence de leur utilisation en microenvironnements d'un volume pouvant contenir moins d'un milliard de molécules d'eau, (contre $6,022 \cdot 10^{23}$ dans une mole), reste entière à mon sens. Les interprétations réalisées avec ces grandeurs sont donc à prendre avec précaution.

Dans la suite, je chercherai à déterminer l'impact de la perturbation de la membrane des FM sur la mesure de l'activité de NOX2 en utilisant des effecteurs variés comme la température, des détergents, des molécules formant des pores dans les membranes, ou encore en variant le temps d'incubation. Enfin, je tenterai de vérifier qu'il existe effectivement une dismutation des anions superoxyde et je vérifierai si celle-ci impacte les mesures ou pas.

5. Effet de la température

Afin de perturber la membrane des FM et de tenter d'augmenter sa perméabilisation, l'effecteur physique température peut être utilisé. En effet, l'augmentation de la température amplifie l'agitation moléculaire ce qui a pour conséquence d'accroître la fluidité membranaire et ainsi sa perméabilité dans une certaine mesure (484, 485). Dans cette partie, je présente donc des dépendances en température en comparant les mesures de réduction du Cyt_c et de consommation du NADPH. En pratiquant les expériences, je me suis aperçu que ces mesures impliquent de prendre des précautions très lourdes afin que les résultats soient pertinents, précautions dont je discuterai.

5.1. LES CONTRAINTES TECHNIQUES ET LIEES AU SYSTEME DE MESURE

La première difficulté intervient entre la température de consigne utilisée sur le thermostat et la température réelle dans la cuvette. Il est indispensable de mesurer la température dans la cuvette et de ne surtout pas se fier à la température de consigne définie. La mesure de cette température dans la cuvette entraîne automatiquement une difficulté supplémentaire liée à la capacité thermique de la sonde utilisée, de sa température de départ et du rapport entre le volume de la sonde et le volume dans lequel la température est mesurée. J'ai travaillé dans des volumes de 600 μ L et la sonde était un couple thermoélectrique recouvert de verre fin. J'ai reproduit la taille et la forme approximative de la sonde à l'aide de l'extrémité d'une pipette Pasteur bouchée, j'ai laissé 600 μ L de liquide incubé avec la sonde jusqu'à équilibre thermique à 25 °C puis j'ai introduit le tube de verre mimant la sonde. La température de la solution a varié de -0,8 °C sachant qu'il faisait 20 °C dans la pièce climatisée, (température du mime en verre).

Il est donc extrêmement important d'équilibrer la sonde à une température la plus proche possible de celle que l'on est censée mesurer avant la mesure et d'essayer d'avoir la plus petite sonde possible devant le volume du milieu réactionnel. Afin de ne pas perturber la mesure, j'ai donc, par la suite, toujours équilibré la sonde dans le bloc de thermostatisation en métal avant de la plonger dans la solution.

Les cônes avec lesquels les pipetages sont réalisés modifient énormément la température du milieu réactionnel, d'autant plus que le volume prélevé est grand. Le volume de tampon ajouté dans une cuvette thermostaté doit donc être prélevé avec un cône mis à température de mesure. La façon la plus simple que j'ai trouvée a été d'incuber dans un bain-marie un grand volume de tampon et de faire de nombreuses aspirations-refoulement lentes dans ce grand volume à l'aide du cône de prélèvement pour le mettre à température sans que cela modifie significativement la température du tampon incubé, ce qui a pour inconvénient de mouiller le cône et donc de nécessairement modifier le volume prélevé. Pour ces expériences, j'ai toujours utilisé cette méthode, donc l'erreur est à priori reproductible et les différentes mesures comparables, même si je n'ai pas évalué l'impact de la température sur l'affinité du tampon pour le cône, (autrement dit, la mouillabilité) et donc sur l'erreur du volume prélevé. Les mesures à basses températures posent le problème supplémentaire de liquéfaction de l'eau atmosphérique aux surfaces de la cuvette, ce qui empêche une mesure précise de l'absorbance et donc empêche de réaliser des cinétiques. J'ai pallié ce problème en climatisant la pièce à 16 °C et en appliquant un flux d'air comprimé en direction des cuvettes pour sécher les surfaces.

Un autre facteur à prendre en compte dont je n'ai pas mesuré l'impact est la concentration en dioxygène qui varie en fonction de la température, comme le montre le **Tableau III-4**. J'ai donc chaque fois laissé incuber le tampon 3 h entre chaque changement de température en agitant vigoureusement toutes les 10 minutes le tampon en faisant l'hypothèse que cette attente suffisait pour atteindre l'équilibre. En général, attendre moins de trois heures signifie de voir apparaître des bulles dans le tampon présent dans la cuvette traduisant que l'équilibre n'est pas atteint. Cette contrainte temporelle impose de changer les aliquots des protéines cytosoliques et de FM toutes les deux mesures, (soit environ 3 h en glace après décongélation), sans quoi l'activité décroît rapidement et les mesures ne sont plus reproductibles. Il faut donc également re préparer une nouvelle solution de NADPH, qui se dégrade en fonction du temps, toutes les deux températures. Il est aussi obligatoire de changer l'aliquot d'AA à chaque température de mesure. Il s'agit d'une expérience très consommatrice de protéines, de FM et d'AA. *Idéalement il faudrait faire une mesure conjointe de la concentration en dioxygène dans le milieu, par exemple avec une sonde à complexes de ruthénium comme évoquée avant et avoir la possibilité de fixer la concentration en dioxygène.*

Température (°C)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
[O ₂] à 1 atm. (µM)	416	365	324	291	263	239	220	203	187

Tableau III-4. Concentration en dioxygène dans le tampon de mesure (conductivité calculée 22062 µS/cm) entre 0 et 40 °C à 1 atm. (396, 396, 481–483)

Ainsi, la température et la concentration en dioxygène sont deux paramètres qui varient en même temps au cours de cette expérience et qui peuvent toutes deux influencer sur la mesure des ASM. L'effet de la modification de la température sur l'activité de l'enzyme est biaisé par la modification conjointe de la concentration en dioxygène qui est aussi susceptible de changer l'activité de l'enzyme, cela s'appelle une confusion d'effets.

De plus, la température influe sur l'assemblage et sur les changements de conformations permettant l'activation du système et ce nouveau paramètre est très difficile à prendre en compte. En effet, si l'incubation du système est réalisée à la température de mesure avant la mesure, l'effet de la modification de la température peut être dû soit à l'influence de la température sur la vitesse de réaction ou alors dû à une modification de l'assemblage ou des changements conformationnels au cours de l'activation, ou encore aux deux effets conjoints, (sans détailler les effets sur la membrane qui pourraient perturber la structure et donc la fonction de l'enzyme). J'estime qu'il y a probablement les deux effets conjoints et la seule façon de le savoir serait de faire varier dans un premier temps seulement la température de mesure et de maintenir constante la température d'incubation, ce qui impliquerait d'utiliser des volumes très petits afin d'en faire varier la température très rapidement. Et dans un deuxième temps, de faire varier seulement la température d'incubation et non celle de mesure, puis de faire varier les deux en même temps (ce dernier cas est celui présenté ici). Il faudrait aussi faire des gammes de temps d'incubation pour vérifier l'impact de ce temps à une température donnée sur l'activité de l'enzyme.

Néanmoins, considérant le temps que je me suis laissé pour faire ces expériences, la durée de l'optimisation ainsi que le matériel dont je disposais dans l'immédiat, j'ai décidé de faire varier conjointement la température d'incubation et la température de mesure, ce qui correspond à une incubation du système avant la mesure à la même température que la mesure. Il faut donc rester conscient que les résultats mesurés montrent les **effets combinés** du changement de température sur la cinétique chimique de la réaction, (mesure), sur l'assemblage et les modifications de conformations lors de l'activation du système, (incubation), sur la potentielle désactivation thermique de l'enzyme et sur la concentration en dioxygène initiale dans le milieu, (et donc de l'affinité du dioxygène pour l'enzyme). Ces conditions sont donc très loin des conditions idéales de dépendances en température permettant d'utiliser la loi d'Arrhenius et il est donc, à mon sens, insensé de déterminer des paramètres thermodynamiques comme l'énergie d'activation de la réaction catalysée à partir de ces mesures. Tant que les différents effets n'ont pas été décorrélés, seules sont pertinentes des déductions qualitatives prenant en compte la confusion de tous les effets.

5.2. LES RESULTATS

La **Figure III-27** présente les résultats de l'étude de la dépendance de l'ASM de NOX2 en fonction de la température en utilisant l'observable Cyt_c ou l'observable NADPH.

La **Figure III-27A** montre que l'ASM augmente quasi-linéairement en fonction de la température, quelle que soit l'observable, entre 6 °C et 28 °C pour l'observable Cyt_c, ou entre 6 °C et 29 °C pour l'observable NADPH. Au-delà, l'ASM diminue drastiquement jusqu'à environ 3 fois le maximum pour le Cyt_c ou 5 fois pour le NADPH. Un ajustement linéaire réalisé sur les points entre 6 °C et 28 °C pour l'observable Cyt_c ou entre 6 °C et 29 °C pour l'observable NADPH permet de déterminer que l'augmentation moyenne de l'ASM en fonction de la température est de $5,1 \text{ s}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ pour l'observable NADPH et de $4,8 \text{ s}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ pour le Cyt_c, ce qui est très proche compte tenu de la dispersion importante des mesures. Par conséquent, d'un point de vue thermodynamique, il semble, dans cette gamme de température, que l'évolution de l'ASM mesurée avec deux observables en fonction de la température est similaire, il n'y aurait pas de limitation cinétique liée au Cyt_c en tant que sonde des anions superoxyde si la loi d'Arrhenius est considérée.

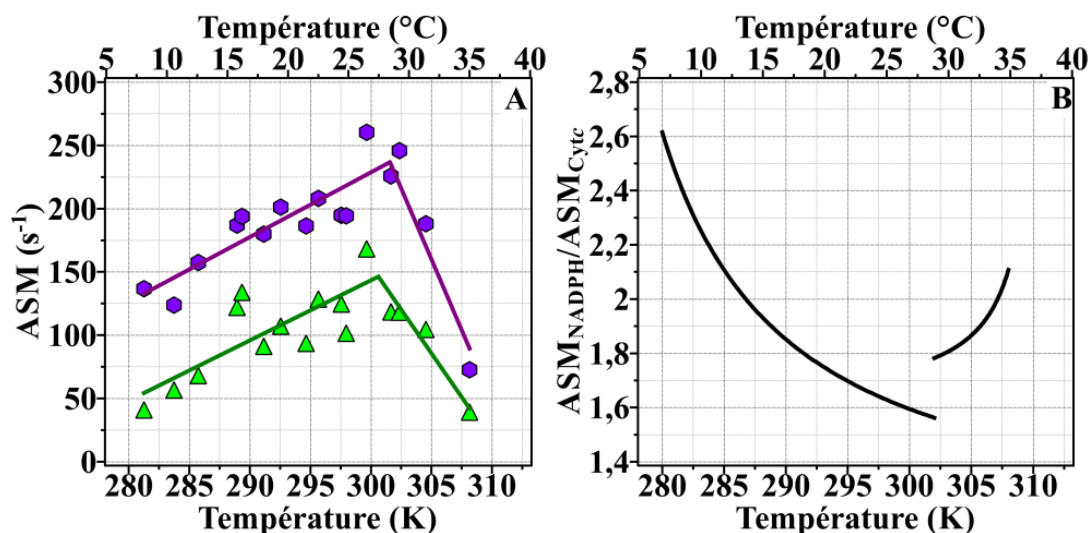


Figure III-27. Dépendance de l'ASM de NOX2 en fonction de la température et rapport entre l'observable NADPH et Cytc. Présence de 4 nM de Cyt_{b558}, 200 nM de p67^{phox}, 200 nM de p47^{phox}, 200 nM de Rac1Q61L, 46 μM d'AA et 200 μM de NADPH. Mesures à la suite de 5 min d'incubation à la température de mesure. Les nuages de points de chacune des observables sont la superposition de deux expériences réalisées deux jours différents à partir de fractions membranaires de deux donneurs différents. **(A)** Dépendance de l'ASM en fonction de la température Observable Cytc (70 μM) en vert et observable NADPH en violet. **(B)** Rapport de l'ASM de l'observable NADPH et de l'observable Cytc à partir des ajustements linéaires réalisés sur l'ensemble de points du panneau A.

Cependant, une différence quasiment constante existe entre les deux observables pour une même température, mais un rapport (**Figure III-27B**) qui diminue de 2,6 à 6 °C jusqu'à environ 1,6 à 28 °C. La diminution de l'ASM au-delà de 27 °C n'était pas attendue compte-tenu des résultats de la littérature (175, 443, 486), mais celle-ci est avérée à la suite de deux séries de mesures, deux jours différents, avec les deux observables différentes. La désactivation observée au-delà de 27 °C pourrait être due à la dénaturation de p67^{phox} ou à la dissociation du complexe entier qui a été démontrée comme effective à 41 °C et à 37 °C et fortement dépendante du temps (430) et j'ajouterai qu'une trop grande perturbation de la structure de la membrane elle-même pourrait déstabiliser le complexe ou les protéines membranaires du complexe. Il faut donc ajouter la désactivation thermique du complexe à la confusion d'effets évoquée précédemment. La désactivation se passe ici à 27 °C ce qui pourrait s'expliquer par des concentrations variables de protéines cytosoliques, de Cyt_{b558}, ou encore d'amphiphile par rapport à la source citée, ou encore de temps d'incubation à une température donnée. Il faut cependant noter que certains auteurs comme Cross *et al* en 1984 trouvent la même dépendance que moi en fonction de la température (487) ou Tamura *et al* en 1992 qui trouvent une dépendance encore plus drastique (202). L'augmentation de la vitesse pour le Cytc peut aussi être due en partie à l'augmentation de la vitesse de captation des anions superoxyde (365) et pas nécessairement seulement à l'augmentation de la perméabilité membranaire. Par conséquent, vu cette nouvelle confusion d'effets, même si le rapport entre l'observable NADPH et l'observable Cytc diminue, cela ne signifie pas forcément que la perméabilité membranaire augmente.

Ces résultats ne me permettent pas de conclure sur l'effet de la fluidité membranaire sur sa perméabilisation aux anions superoxyde, mais il est intéressant de constater une désactivation du système au-delà de 27 °C qui n'est pas souvent retrouvée dans la littérature et qui s'avère être contradictoire à des expériences réalisées par notre équipe notamment en présence du trimère de Pick qui semble stabiliser NOX2 sous forme activée déjà à plus forte concentration en AA et je me demande donc si le trimère ne pourrait pas aussi stabiliser NOX2 lorsque la température augmente (443). Ces différences peuvent être dues aux

optimisations que j'ai réalisées itérativement au cours de nombreux essais de dépendance en température tendant à ajuster précisément la température et amener à l'équilibre la concentration en dioxygène dissous. Il serait donc intéressant de refaire les expériences de dépendance en température avec le trimère en utilisant la procédure optimisée afin de savoir si la désactivation est due à la dénaturation ou au décrochage des protéines cytosoliques ou alors à une destruction de la fraction membranaire elle-même.

6. Effet d'un détergent, le désoxycholate, sur l'activité de NOX2

Les mesures de l'activité de NOX2 en fonction de la température impliquent de nombreuses confusions d'effets et il n'est donc pas pertinent d'en tirer des interprétations rigoureuses. Ainsi, je m'en servirai uniquement à titre indicatif. Afin d'avoir une meilleure idée de l'impact de la perméabilité membranaire des FM sur la mesure des anions superoxyde par le Cyt_c, j'ai essayé de fragiliser la membrane en utilisant un détergent, le désoxycholate, (DOC), de sodium, comme cela a déjà été reporté dans la littérature, (201, 218, 355).

J'ai d'abord testé l'effet du DOC sur l'ASM en **Figure III-28A** avec ou sans AA et en fonction des deux observables NADPH et Cyt_c. Le DOC seul en absence d'AA, courbe rouge, n'est pas capable d'activer significativement le système. En outre, en présence d'AA, la différence entre les constantes catalytiques mesurées pour les deux observables semble diminuer en fonction de l'augmentation de la concentration en DOC mais le rapport entre les deux observables, reporté en **Figure III-28B** reste très éloigné de 1 sauf, évidemment, lorsque l'activité tend vers zéro.

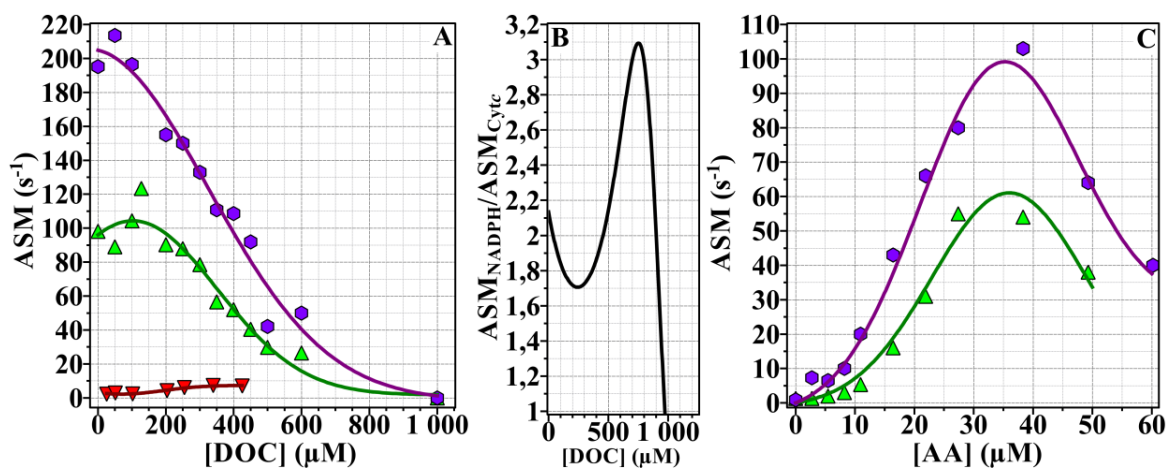


Figure III-28. Effet du désoxycholate de sodium (DOC) sur l'ASM de NOX2 en fonction de l'observable NADPH ou Cyt_c.

Présence de 4 nM de Cyt_{b558}, 200 nM de p67^{phox}, 200 nM de p47^{phox}, 200 nM de Rac1Q61L, et 200 μM de NADPH. Mesures à la suite de 5 min d'incubation à la température de mesure de 25 °C. **(A)** Dépendance de l'ASM en fonction de la concentration en DOC ajouté avant l'incubation en présence de 46 μM d'AA via l'observable 70 μM Cyt_c en vert (triangle sommet vers le haut) ou l'observable NADPH en violet (hexagone) ou encore sans AA via l'observable Cyt_c en rouge (triangle sommet vers le bas). **(B)** Rapport ASM_{NADPH}/ASM_{Cyt_c} en fonction de la concentration en DOC. **(C)** Dépendance de l'ASM en fonction de la concentration en AA en présence de 500 μM de DOC ajouté avant l'incubation via l'observable 70 μM Cyt_c en vert (triangle sommet vers le haut) ou l'observable NADPH en violet (hexagone).

L'effet le plus intéressant à observer est d'une part l'inhibition de l'enzyme pouvant être due à sa solubilisation, d'autre part la légère augmentation d'activité mesurée avec l'observable Cyt_c entre 0 et 200 μM de DOC. Cette légère augmentation donne une indication sur la possibilité de l'augmentation de la perméabilité membranaire aux anions superoxyde en présence de DOC. Ce dernier effet s'est heurté à un manque de reproductibilité certain.

L'absence de résultat significatif pourrait ici simplement être dû au trop court temps d'incubation des FM et du DOC ensemble, *je pense qu'il serait donc judicieux de refaire ces manip en incubant d'abord pendant une heure les FM et le DOC ensemble, puis en ajoutant les autres constituants du système acellulaire pour faire la mesure.*

J'ai néanmoins décidé de pousser l'analyse plus avant en réalisant une dépendance de l'ASM de NOX2 avec les observables NADPH et Cyt_c en présence de 500 µM de DOC, concentration pour laquelle l'activité enzymatique est beaucoup diminuée, ce qui signifie que le DOC a eu un effet, mais encore suffisamment élevée pour observer des variations significatives. Les résultats sont présentés en **Figure III-28C**.

En considérant les ajustements non linéaires réalisés sur les nuages de points de la **Figure III-28C**, il est possible de constater que la concentration optimale en AA pour l'observable Cyt_c passe de 51 µM en absence de DOC, (**Figure III-8**), à 36 µM en présence de 500 µM de DOC. Or, la concentration optimale en AA pour l'observable NADPH passe de 38 µM en absence de DOC, (**Figure III-8**), à 35 µM en présence de 500 µM de DOC. Par conséquent, en présence de DOC la concentration optimale en AA pour l'observable Cyt_c varie beaucoup alors qu'elle varie peu pour l'observable NADPH.

Ainsi, en présence de DOC, il n'y a plus besoin d'un excès d'AA pour que le Cyt_c capte les anions superoxyde le plus efficacement possible par rapport à l'observable NADPH. Je suppose donc que le DOC remplace une partie de l'effet de l'AA mais pas son effet activateur. Ces mesures ne permettent pas de discriminer entre l'effet du DOC sur la membrane des FM et l'effet du DOC sur le Cyt_c lui-même et sa capacité à réoxyder les anions superoxyde.

Afin de vérifier son effet sur la capacité du Cyt_c à capter les électrons des anions superoxyde, il serait intéressant de faire des mesures de radiolyse pulsée sur le Cyt_c en présence séparément de DOC et d'AA ainsi que, simultanément, de DOC et d'AA. Plus simplement, une étude spectrale sur le Cyt_c pourrait être primairement réalisée à l'aide d'une barrette de diodes couplée à un dispositif stopped-flow.

J'ai précédemment suggéré que la sigmoïde en début de réaction de réduction du Cyt_c en absence d'incubation pourrait être due à un problème de perméabilité membranaire, ou encore à une modification du Cyt_c mis en présence de l'AA. En **Figure III-29** sont présentées les phases initiales des cinétiques de réduction du Cyt_c par les anions superoxyde produits par NOX2 **en absence d'incubation** en présence de 46 µM d'AA et de 0 à 200 µM de DOC.

La phase initiale de réduction du Cyt_c en absence d'incubation est sigmoïdale en absence de DOC et en présence de 50 µM de DOC, mais linéaire en présence de 100 ou 200 µM de DOC. Cela corrobore l'idée que la sigmoïde est notamment due à une limitation de la détection soit liée à la perméabilité membranaire soit liée à une modification du Cyt_c par un détergent.

Le même résultat est obtenu en absence de DOC en augmentant la concentration en AA. Par conséquent, cela soutient l'hypothèse faite précédemment que le DOC peut remplacer une partie de l'effet de l'AA.

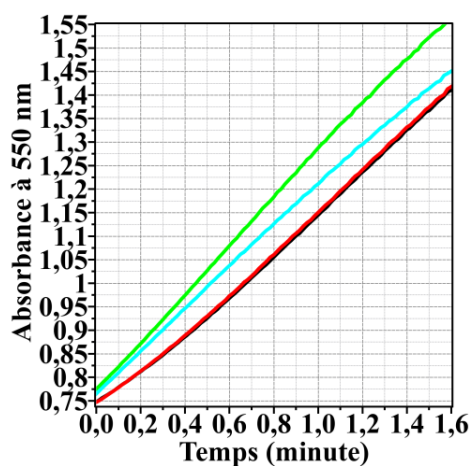


Figure III-29. Allure des phases initiales des cinétiques de réduction du Cytc à différentes concentrations en DOC sans incubation. Présence de 4 nM de Cyt_{b558}, 200 nM de p67^{phox}, 200 nM de p47^{phox}, 200 nM de Rac1Q61L, 46 μM d'AA, 70 μM Cytc et 200 μM de NADPH. Mesures à 25 °C sans incubation. Concentration en DOC : 0 μM courbe noire, 50 μM courbe rouge, 100 μM courbe verte et 200 μM courbe bleue.

Dans cette partie, j'ai montré que le désoxycholate ne permet pas de retrouver la stœchiométrie de 2 anions superoxyde pour 1 NADPH mais qu'il a néanmoins un effet significatif soit sur la perméabilité membranaire, soit sur la capacité du Cytc à réoxyder les anions superoxyde. De plus, ces résultats suggèrent que le DOC peut remplacer certains effets de l'AA sur la mesure des anions superoxyde.

7. Effet de molécules formant des pores dans les membranes

A la suite des difficultés rencontrées pour déterminer si les effets des détergents ou de la température ou du temps d'incubation ou encore de la concentration en AA sont dues à un impact sur la membrane des FM ou sur le Cytc, j'ai essayé des molécules formant des pores dans les membranes pour tenter de départager ces effets. Ces molécules permettraient notamment de faire passer plus facilement les anions superoxyde, en l'occurrence en ajoutant de l'alaméthicine, un peptide bactérien très utilisé pour faire des pores dans les membranes biologiques ou non et par exemple causer des découplages de l'ATP synthase et de la chaîne respiratoire mitochondriales (488–492).

La **Figure III-30A** montre que pour les deux observables l'augmentation de la concentration en alaméthicine jusqu'à 8 μM est corrélée avec une augmentation de l'activité de l'enzyme d'environ 40 % pour l'observable Cytc ou 20 % pour l'observable NADPH. Au-delà de 8 μM d'alaméthicine, l'activité diminue jusqu'à tendre vers 35 s⁻¹ pour 50 μM. Le rapport des deux observables, **Figure III-30B**, est très différent de 1 et n'évolue pas beaucoup jusqu'à 24 μM d'alaméthicine, puis il se rapproche de 1 jusqu'à 1,07 pour 50 μM d'alaméthicine alors que l'ASM de l'enzyme est d'environ 35 s⁻¹.

Il semble donc qu'une forte concentration en alaméthicine permette de retrouver la stœchiométrie entre les anions superoxyde produits détectés par le Cytc et le NADPH consommé. *Il serait particulièrement intéressant de réaliser une étude de l'ASM en fonction de la concentration en AA en présence de 50 μM d'alaméthicine, malheureusement, cette molécule est très coûteuse et je n'ai pas pu faire ces expériences pour l'instant.*

Il a été montré que l'alaméthicine séquestre partiellement les acides gras libres et donc leur distribution membranaire naturelle (493). Ceci pourrait impacter significativement la disponibilité de l'acide arachidonique et il

me semble donc important de refaire ces expériences avec d'autres molécules comme, par exemple, la gramicidine. D'autre part, au lieu d'essayer de faire sortir les anions superoxyde des vésicules de FM, j'ai essayé de faire entrer le Cyt_c. J'ai donc réalisé des tests avec un mutant constitutivement actif de la protéine Bax, mutant BaxP168A, généreusement offert par Stephen Manon (I.B.G.C., Bordeaux). La protéine Bax permet notamment aux cellules apoptotiques de former des pores dans la membrane mitochondriale permettant pour laisser sortir le Cyt_c. Des expériences faites par l'équipe de Stephen Manon montrent que Bax est capable de perméabiliser la membrane de liposomes, j'ai donc souhaité essayer sur les FM.

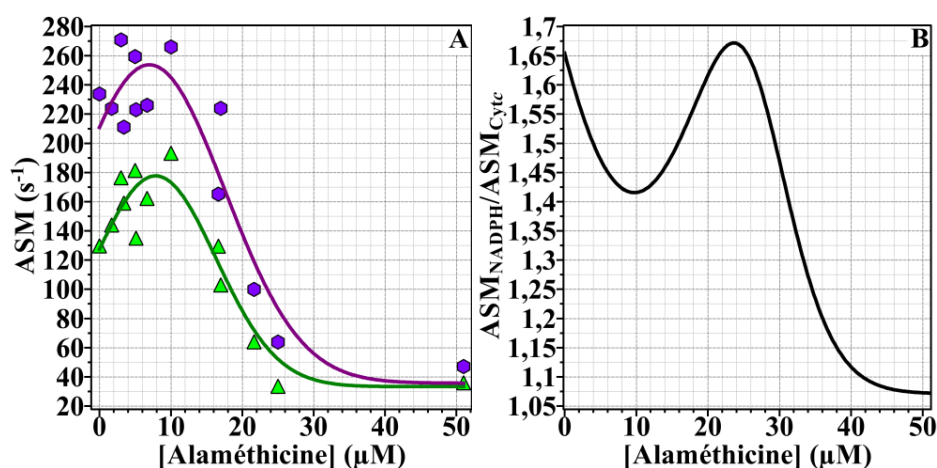


Figure III-30. Effet de l'alaméthicine sur l'ASM de NOX2 en fonction des observables Cyt_c et NADPH.

Présence de 4 nM de Cyt_{b558}, 200 nM de p67^{phox}, 200 nM de p47^{phox}, 200 nM de Rac1Q61L, 46 μM d'AA et 200 μM de NADPH. Mesures à 25 °C avec 5 min d'incubation. **(A)** Dépendance de l'ASM de NOX2 en fonction de la concentration en alaméthicine ajouté deux minutes avant ajout du NADPH. Observable Cyt_c avec 70 μM de Cyt_c en vert (triangles). Observable NADPH en violet (hexagones). **(B)** Rapport de l'ASM de l'observable NADPH et de l'observable Cyt_c en fonction de la concentration en alaméthicine.

Cependant, ces tests n'ont pas permis de rétablir la stœchiométrie théorique $O_2^- : NADPH$, ni même de l'amoindrir. Il est probable que les vésicules de FM soient trop petites pour que Bax forme un pore suffisamment grand pour laisser passer le Cyt_c, cette stratégie n'est donc pas la bonne dans ce cas, mais pourrait être utilisée sur des liposomes de plus grosse taille.

Les expériences en présence d'alaméthicine montrent qu'il y a réellement une implication de la perméabilité membranaire sur la détection des anions superoxyde. Cela renforce l'hypothèse d'une séquestration des anions superoxyde dans les FM, conduisant nécessairement à l'augmentation des phénomènes de dismutation des anions superoxyde, contribuant à l'impossibilité de tous les détecter.

8. Effet du temps d'incubation

Comme je l'ai détaillé précédemment, la littérature montre que la présence de l'AA dans le système acellulaire a un impact sur les protéines du complexe, sur leur assemblage et donc sur l'activation globale de la catalyse enzymatique. Néanmoins, l'AA peut aussi jouer le rôle de détergent. Habituellement, l'ensemble du système, (FM, protéines cytosoliques), est incubé 5 minutes en présence d'AA, alors que l'effet d'un détergent sur la structure d'une membrane peut être lent. Ainsi, afin de déterminer plus précisément l'impact de l'AA sur le système acellulaire et donc sur la mesure de l'ASM, j'ai souhaité vérifier si les modifications causées par l'AA avaient bien atteint un équilibre au bout de 5 minutes. J'ai donc choisi d'incuber pendant 1h30 le système complet en présence de différentes

concentrations en AA, la même expérience ayant déjà été faite en incubant 5 minutes (**Figure III-8**). Cette expérience dont les résultats sont présentés en **Figure III-31** a été faite sur trois fractions membranaires de donneurs différents.

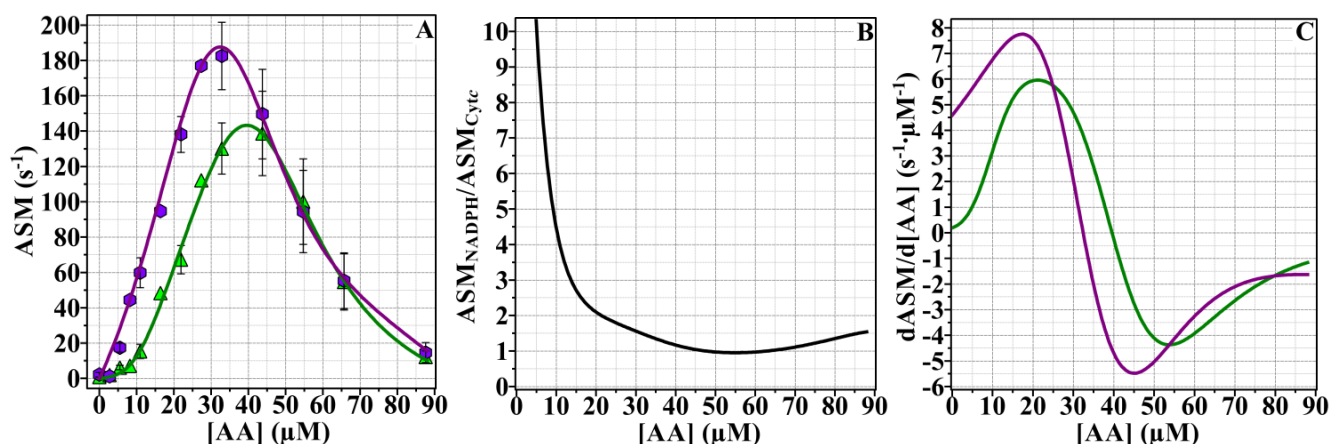


Figure III-31. Dépendance de l'ASM de NOX2 en fonction de la concentration en AA. 1h30 d'incubation.

Présence de 4 nM de Cyt_{b558}, 200 nM de p67^{phox}, 200 nM de p47^{phox}, 200 nM de Rac1Q61L et 200 μM de NADPH. Mesures à 25 °C avec 1h30 d'incubation. Moyenne des mesures sur des FM de 3 donneurs différents. **(A)** ASM de NOX2 en fonction de la concentration en AA avec observable Cytc 70 μM en vert ou observable NADPH en violet. **(B)** ASM avec observable NADPH divisée par ASM avec observable Cytc en fonction de la concentration en AA. **(C)** Dérivée première de l'ajustement de l'évolution de l'ASM en fonction de la concentration en AA pour l'observable NADPH en violet ou l'observable Cytc en vert.

Sur la **Figure III-31A** les courbes en cloche dont l'allure globale a déjà été décrite en détail précédemment sont présentées mais cette fois-ci avec une préincubation de 90 minutes. Néanmoins, des différences significatives sont visibles par rapport aux mêmes expériences réalisées avec 5 minutes d'incubation (**Figure III-8**). En effet, l'ASM via l'observable NADPH et via l'observable Cytc sont quasiment les mêmes au-delà de la concentration optimale en AA. La **Figure III-31B** montre que le rapport des deux observables est quasiment égal à 1 entre 40 et 70 μM d'AA. Par ailleurs, la diminution de vitesse en fonction de l'augmentation de la concentration en AA est quasi-parallèle pour les deux observables, ce qui diffère beaucoup de ce qui a été observé précédemment.

En revanche, jusqu'à la concentration optimale en AA, il y a encore des différences importantes entre les deux observables et le rapport entre l'observable NADPH et l'observable Cytc est d'ailleurs beaucoup plus grand que précédemment pour de faibles concentrations en AA (de 0 à 10 μM globalement) à cause notamment de la sigmoïde plus marquée (**Figure III-31C**), ce qui suggère que la concentration optimale en AA est un seuil à partir, ou au-delà, duquel les FM se comportent complètement différemment. En l'occurrence, la CMC de l'AA étant de 73 μM, il est possible qu'en présence de FM et de protéines, cette CMC soit modifiée et que la transition observée entre avant et après l'optimum de concentration soit notamment due à un dépassement de la CMC dans ces conditions.

De plus, la concentration optimale en AA, (*i.e.* $\frac{dASM}{d[AA]} = 0$, **Figure III-31C**), est égale à 40 μM avec l'observable Cytc et à 32 μM avec l'observable NADPH. Ce décalage était déjà existant avec 5 minutes d'incubation. Ces résultats donnent l'impression que la courbe en cloche avec l'observable Cytc est en fait simplement plus étroite et décalée vers les fortes concentrations en AA par rapport à l'observable NADPH, (ou réciproquement). Cela suggère que si l'AA permet d'activer NOX2, il joue clairement d'autres rôles qui impliquent probablement de la détergence.

Ces expériences révèlent que 5 minutes d'incubation sont insuffisantes pour être à l'équilibre des effets engendrés par l'AA. Dans cette configuration, l'effet de l'AA sur la membrane, sur les protéines, ou encore

sur le Cytc sont encore convolus et il est donc difficile de connaître précisément l'origine des effets observés. Le fait est que la stœchiométrie cinétique est systématiquement retrouvée pour des FM de 3 donneurs différents au-delà de 50 μM d'AA après 1h30 d'incubation. Comme il s'agit d'un seuil assez marqué au-delà de l'optimum de concentration en AA, il est possible que cela soit notamment dû à un dépassement de la CMC de l'AA dans les présentes conditions. Par conséquent, l'étude de NOX2 lors de la variation d'autres paramètres que la concentration en AA devrait être réalisée dans cette configuration avec 1h30 d'incubation au-delà de la concentration optimale en AA pour limiter la confusion des effets qui, malgré cette précaution, resteraient nombreux. Néanmoins, il faudrait réaliser les mêmes mesures en faisant varier le temps d'incubation pour déterminer précisément à partir de quand l'équilibre est atteint.

9. Mesures préliminaires des réactions secondaires perturbant les mesures d'activité

J'ai ensuite souhaité approfondir l'hypothèse de la dismutation des anions superoxyde qui causerait des problèmes de mesure de l'activité enzymatique. Pour cela, j'ai décidé de mesurer la production de peroxyde d'hydrogène par NOX2 par électrochimie avec l'aide de Pauline Lefrançois et Stéphane Arbault (NSysA, ISM, Université de Bordeaux).

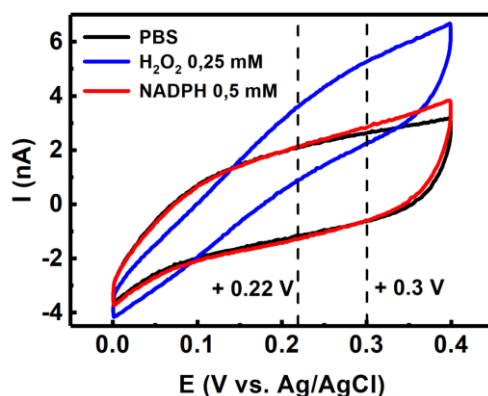


Figure III-32. Voltamogramme cyclique du H₂O₂ 250 μM en bleu, du PBS en noir et du NADPH 500 μM en rouge.

Balayage entre 0 et 0,4 V contre l'électrode de référence AgCl/Ag avec une vitesse de balayage à 20 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, électrode de travail ultramicroélectrode à fibre de carbone 10 μm de diamètre, polie à 45° isolée par électrodéposition de polyoxophénylène fonctionnalisée avec du noir de platine à une charge coulométrique de 10 μC . Figure ajoutée avec l'autorisation généreuse de Pauline Lefrançois, issue d'expériences faites en mon absence.

La comparaison des courbes de voltamétrie cyclique du peroxyde d'hydrogène et du tampon (**Figure III-32**), montrent qu'une polarisation de l'électrode de travail à 0,3 V permet l'oxydation et donc la détection, du peroxyde d'hydrogène (en dioxygène). Ce potentiel permet aussi la détection des anions superoxyde. Il est utile de noter que la détection se faisant au niveau de l'électrode, elle est ponctuelle.

L'électrode consomme par elle-même une quantité négligeable par unité de temps de la molécule détectée, il est donc nécessaire d'agiter le milieu en permanence à l'aide d'un agitateur magnétique et d'un barreau aimanté afin qu'il y ait une homogénéisation du milieu permettant notamment aux espèces électroactives d'être en même concentration au niveau de l'électrode, là où elles sont détectées et dans le milieu loin de l'électrode. L'inconvénient majeur de ce potentiel de polarisation est que le NADPH est lui aussi détecté, même si beaucoup plus faiblement (différence du courant mesuré à 0,3 V pour le NADPH comparé au PBS).

Dans un premier temps, **Figure III-33**, l'électrode a été polarisée à 0,3 V vs. AgCl/Ag en présence d'un large excès de NADPH, dont la concentration pourra donc être considérée comme constante pendant une courte durée en proportion de la rapide production de peroxyde d'hydrogène attendue.

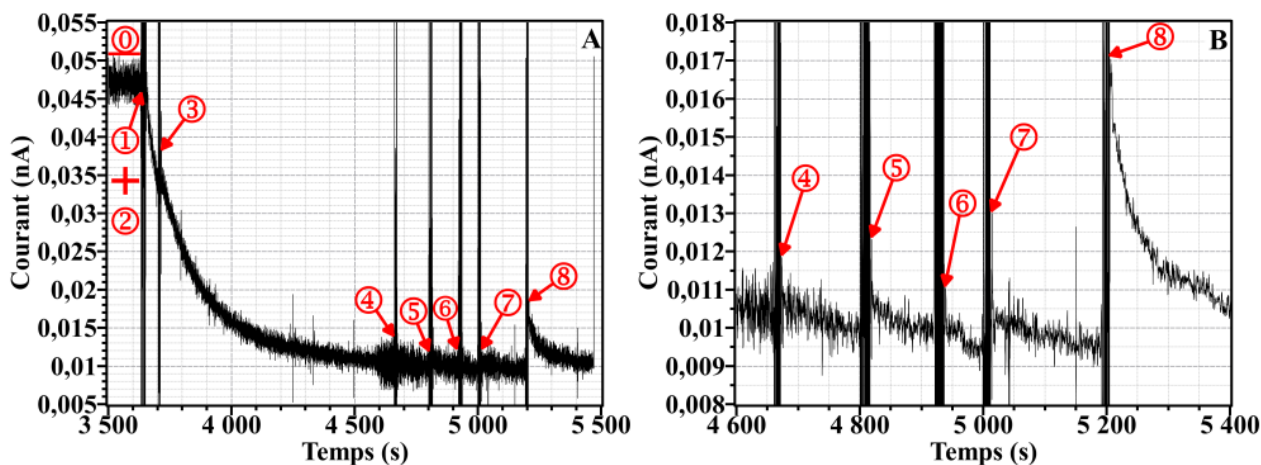


Figure III-33. Mesure de la concentration du NADPH et du H₂O₂ par électrochimie lors de la catalyse réalisée par NOX2.

- ⓪ Polarisation à 0,3 V en présence de 1 mM de NADPH. ①+② Ajouts successifs de 50 µM d'AA immédiatement suivi de l'ajout d'un mélange de FM+protéines cytosoliques telle que la concentration finale en Cyt_{b558} est 10 nM et 500 nM en chacune des protéines cytosoliques. Ajouts successifs du même mélange aux mêmes concentrations initiales en ③, ④, ⑤, ⑥, ⑦ et ⑧. (A) échelle élargie (B) échelle réduite et moyenne mobile à 10 points appliquée au signal.

À la suite de la polarisation ⓪, le signal est stable, avec un bruit de fond d'environ 5 pA. Ce signal est proportionnel à la concentration en espèces électroactives à ce potentiel. Lorsque la polarisation est stable, la seule espèce électroactive largement majoritaire à ce potentiel est le NADPH donc le courant de départ est proportionnel à la concentration en NADPH. En ① est ajouté 50 µM de AA et immédiatement après ② est ajouté un mélange contenant la FM et les protéines cytosoliques. La NADPH oxydase active présente dans le milieu réactionnel catalyse la production d'anions superoxyde qui se dismutent spontanément assez rapidement en peroxyde d'hydrogène. Par conséquent une augmentation du courant mesuré était attendue, (la différence entre le signal du PBS et le signal du peroxyde d'hydrogène étant beaucoup plus grande que la différence entre le signal du PBS et le signal du NADPH à 0,3 V, **Figure III-32**), mais nous avons observé avec surprise une décroissance du courant. Ce résultat semble traduire une consommation de NADPH plus rapide que la production des anions superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, ce qui est en fait cohérent avec les mesures d'activité de NOX2 précédemment présentées (régénération de dioxygène, vitesse de consommation du NADPH supérieure à la vitesse de consommation de dioxygène...). Cela démontre clairement que les anions superoxyde réagissent, probablement par dismutation, puis que le peroxyde d'hydrogène n'atteint pas l'électrode de travail.

Les points ②, ③, ④, ⑤ et ⑥ correspondent à des ajouts du mélange de FM et de protéines cytosoliques. Sur la **Figure III-33A** à la suite de l'ajout de FM au point ③, il n'y a pas d'augmentation de la pente, ce qui permet de faire l'hypothèse que la vitesse de consommation est peu dépendante de la quantité d'enzyme. Lorsque le plateau est atteint, la concentration en NADPH ne varie plus et les ajouts de l'enzyme fonctionnelle ④, ⑤, ⑥, ⑦, ⑧ sont chaque fois suivis d'un léger décrochement puis d'une faible décroissance, **Figure III-33B**. L'augmentation consécutive à l'ajout laisse penser qu'il y a effectivement production de peroxyde d'hydrogène mais que celui-ci est consommé.

La **Figure III-32**, permet de déterminer qu'au potentiel 0,22 V le NADPH n'est pas détecté alors que le peroxyde d'hydrogène l'est de façon importante. Nous avons donc réalisé une seconde expérience, présentée en **Figure III-34**, en polarisant l'électrode de travail à 0,22 V, cette fois-ci dans du PBS seul. Comme il a été observé une décroissance à chaque nouvel ajout de mix fonctionnel, nous avons voulu tester si les différents composants du système pouvaient consommer le peroxyde d'hydrogène. Nous avons donc ajouté 100 μM de peroxyde d'hydrogène une fois la polarisation terminée, vérifié la stabilité du signal, puis ajouté de la FM (②), puis successivement p67^{phox} (③), p47^{phox} (④), Rac1Q61L (⑤), AA (⑥), à nouveau FM (⑦) et enfin 1 mM NADPH (⑧). Pour confirmer que le peroxyde d'hydrogène est bien consommé et vérifier si cela dépend de sa concentration, nous avons ensuite ajouté à nouveau 100 μM de peroxyde d'hydrogène (⑨).

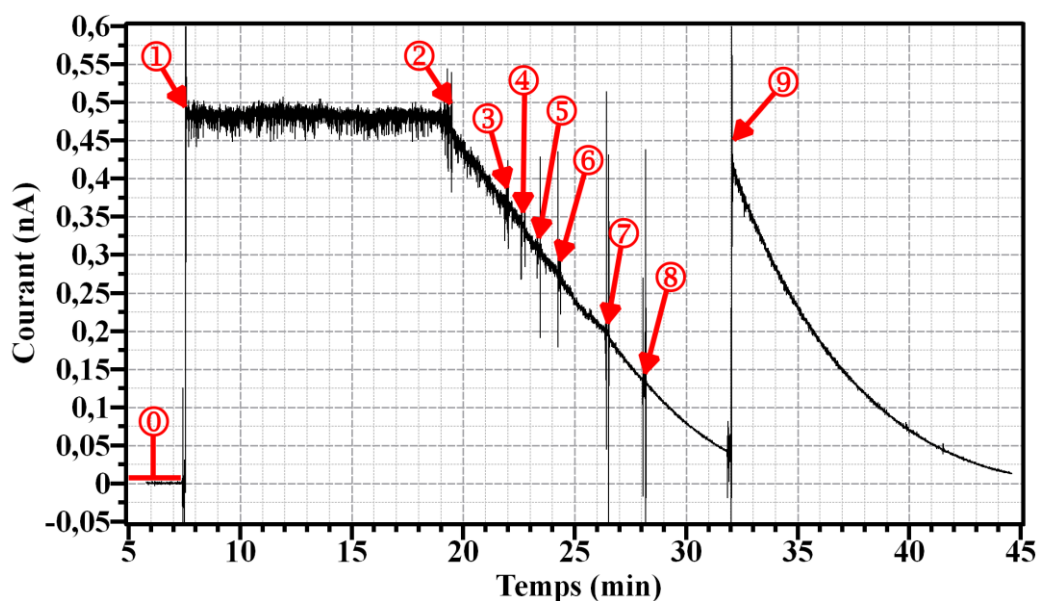


Figure III-34. Mesure de la consommation du H_2O_2 par électrochimie par les différents constituants du système acellulaire.

① Polarisation à 0,22 V en présence de PBS seul. ① Ajout de 100 μM de H_2O_2 ② Ajout de FM tel que la concentration finale en Cyt_{b558} soit de 10 nM ③ Ajout de 500 nM de p67^{phox}. ④ Ajout de 500 nM de p47^{phox}. ⑤ Ajout de 500 nM de Rac1Q61L. ⑥ Ajout de 50 μM d'AA. ⑦ Ajout d 1 mM de NADPH. ⑧ Nouvel ajout de 10 nM final de Cyt_{b558}. ⑨ Nouvel ajout de 100 μM de H_2O_2 .

L'ajout de 100 μM de peroxyde d'hydrogène (①, **Figure III-34**) provoque une brusque augmentation du signal, qui reste ensuite constant, signifiant que la concentration en peroxyde d'hydrogène ne change pas spontanément dans cette gamme de temps. L'ajout de la FM provoque immédiatement une diminution du signal, dont la pente, $-0,04 \text{ nA}\cdot\text{min}^{-1}$, (soit $8 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ basé sur l'étalonnage interne rapide donné par le courant du plateau après injection de 100 μM de peroxyde d'hydrogène), n'est pas significativement changée par l'ajout des protéines cytosoliques, de l'AA, du NADPH ou nouvellement de la FM. Il n'y a ni recrudescence brutale, ni diminution brutale. Par conséquent, à ce potentiel, toutes ces espèces sont électroInactives.

Ces résultats montrent qu'au moins la FM seule est capable de consommer le peroxyde d'hydrogène. Ce résultat est très inattendu mais corrobore les observations faites en **Figure III-33**. L'ajout secondaire de peroxyde d'hydrogène provoque une brusque augmentation du courant mesuré, puis ce signal décroît curieusement plus rapidement que la première pente, ce qui correspond à une pente initiale de $-0,06 \text{ nA}\cdot\text{min}^{-1}$ soit $12 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$. Le milieu réactionnel contient maintenant environ 20 nM de Cyt_{b558} alors qu'initialement il en contenait 10 nM, donc une pente plus forte est cohérente de ce point de vue. Cependant, tous les composants nécessaires au fonctionnement

de la NADPH oxydase sont présents et nous nous attendions à ce que la production de peroxyde d'hydrogène compense en partie sa consommation, ce qui n'est pas le cas. Cela signifie que la consommation de peroxyde d'hydrogène liée à la FM est très rapide et que la catalyse persiste plusieurs dizaines de minutes au moins.

La FM consomme donc le peroxyde d'hydrogène et nous avons eu l'impression **Figure III-33B** d'observer une production de peroxyde d'hydrogène, rapidement consommé. Nous avons souhaité confirmer cette observation de façon plus rigoureuse, à un potentiel où le NADPH est électroinactif. Dans une nouvelle expérience, présentée en **Figure III-35**, nous avons polarisé l'électrode à 0,22 V vs. AgCl/Ag (⊙*) dans du tampon PBS contenant tous les composants du système permettant le fonctionnement de NOX2 excepté le substrat, *i.e.* la FM, les protéines cytosoliques et l'AA. Nous avons précédemment montré qu'une fois tous les composants du système rapidement mélangés ensemble avec l'AA, NOX2 est fonctionnelle pendant plusieurs heures, même à 25 °C. En fait, des expériences préliminaires non présentées ici montrent que le système assemblé, (FM, protéines cytosoliques et AA), est actif pendant au moins 24 h, moyennant une diminution d'un facteur environ 2 de l'activité. Par conséquent, malgré la durée de la polarisation, (environ 1 h), l'expérience reste pertinente.

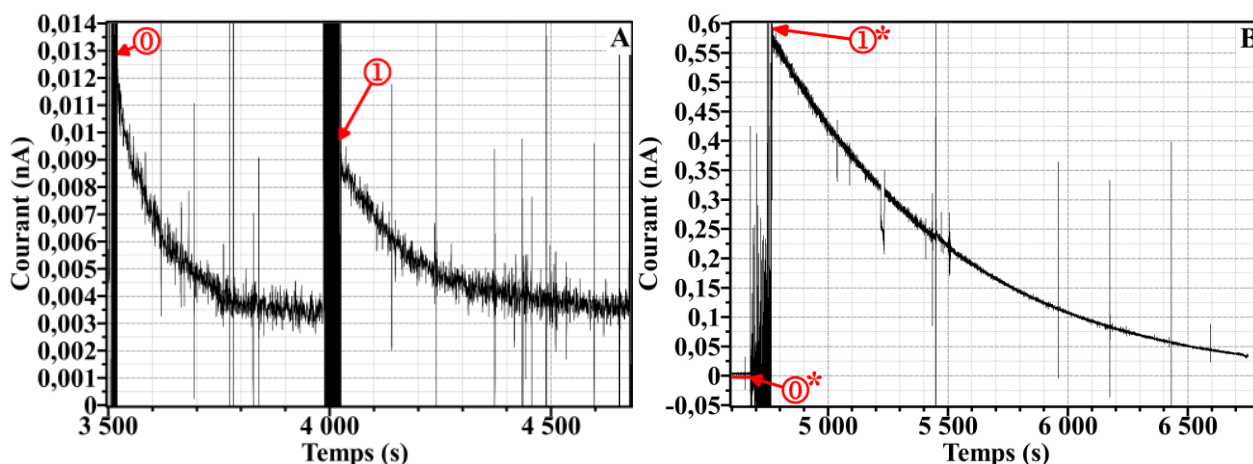


Figure III-35. Mesure de la concentration en H₂O₂ par électrochimie lors de la catalyse réalisée par NOX2.

Polarisation à 0,22 V en présence de PBS contenant 10 nM de Cyt_{b558}, 500 nM de p67^{phox}, de p47^{phox} et de Rac1Q61L ainsi que 50 μM d'AA. (A) échelle réduite. ⊙ ajout de 1 mM de NADPH et ⊙ deuxième ajout de 1 mM de NADPH. (B) échelle élargie. ⊙* polarisation de l'électrode. ⊙* Ajout d'environ 20 mM de NADPH.

Lorsque le signal est stabilisé en fin de polarisation, le milieu réactionnel contient du PBS ainsi que le système NADPH oxydase fonctionnel sans le NADPH (⊙*). L'ajout du NADPH est supposée provoquer l'initiation de la catalyse d'oxydation biélectronique du NADPH et la réduction monoélectronique du dioxygène en anions superoxyde. Le potentiel de polarisation permet de détecter les anions superoxyde et le peroxyde d'hydrogène issu de la dismutation de l'anion superoxyde.

J'observe, **Figure III-35A**, que l'ajout de 1 mM de NADPH (⊙) provoque immédiatement une augmentation du courant, (nous avons démontré précédemment qu'à ce potentiel, NADPH est électroinactif), puis une diminution progressive jusqu'à un plateau équivalent au courant à la suite de la polarisation. Un deuxième ajout de 1 mM de NADPH (⊙) provoque une réponse similaire.

Par conséquent, lors de l'ajout du NADPH, est produite une quantité importante d'anions superoxyde et donc de peroxyde d'hydrogène lié à la dismutation de l'anion superoxyde. Seul le peroxyde d'hydrogène est stable en solution

aqueuse dans cette gamme de temps, j'en conclus donc que le peroxyde d'hydrogène est rapidement consommé dès son apparition et qu'il existe une compétition entre sa production et sa consommation. Ceci confirme mes hypothèses précédentes (dismutation des anions superoxyde et consommation du peroxyde d'hydrogène catalysée par le système). Un ajout d'environ 20 mM de NADPH (①*) provoque une brusque augmentation du courant puis une diminution progressive (**Figure III-35B**).

Nous avons ensuite souhaité déterminer si la catalyse de la consommation du peroxyde d'hydrogène est due à un catalyseur thermolabile ou alors à des impuretés métalliques qu'apporterait la FM (**Figure III-36**). Nous avons donc polarisé l'électrode dans du PBS à 0,22 V contre AgCl/Ag (①), puis ajouté 200 μ M de peroxyde d'hydrogène (②), vérifié la stabilité du signal puis ajouté 10 nM de FM, bouillie pendant 6 minutes, (③), puis 10 nM de FM non bouillie (natives, ③), attendu d'atteindre un pseudo-plateau avant d'ajouter une nouvelle fois 200 μ M de peroxyde d'hydrogène (④) puis 10 nM de FM natives (⑤).

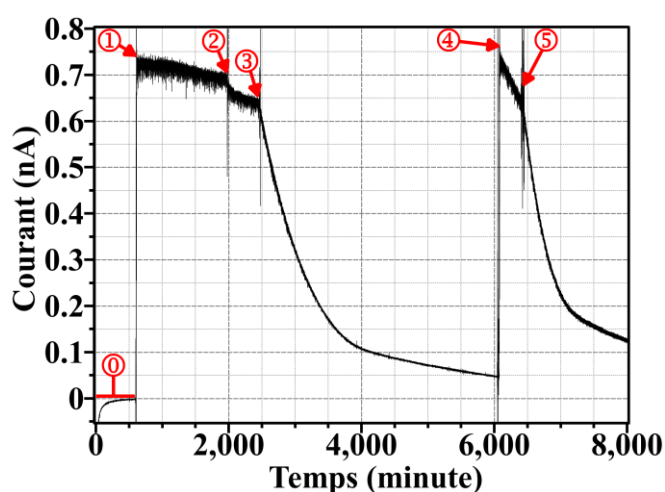


Figure III-36. Mesure de la consommation du H₂O₂ par électrochimie par la fraction membranaire.

① Polarisation à 0,22 V en présence de PBS seul. ② Ajout de 200 μ M de H₂O₂ ③ Ajout de 10 nM de Cyt_b₅₅₈ bouillis. ④ Ajout de 10 nM de Cyt_b₅₅₈ natif. ⑤ Ajout de 200 μ M de H₂O₂. ⑥ Ajout de 10 nM de Cyt_b₅₅₈ natif.

L'ajout de 200 μ M de peroxyde d'hydrogène (①) provoque une brusque augmentation du courant mesuré. Le signal est stable pendant environ 300 s puis une décroissance lente et constante existe pendant environ 1000 s. L'ajout de FM bouillie contenant 10 nM de Cyt_b₅₅₈ (②) provoque une très légère diminution du signal puis le signal a de nouveau la pente négative préexistante en absence de FM bouillie. Ensuite, l'ajout de 10 nM de Cyt_b₅₅₈ native (③) provoque une diminution rapide mais progressive du signal indiquant une consommation progressive du peroxyde d'hydrogène. A ce stade, il est clair que la catalyse de consommation du peroxyde d'hydrogène est réalisée par un composant labile des fractions membranaires, (et non pas par des sels métalliques par exemple) et je suppose donc qu'il s'agit d'une protéine. Par conséquent, je fais l'hypothèse que la FM a une activité catalase ou peroxydase.

L'allure générale de la cinétique globale de consommation du peroxyde d'hydrogène présente d'abord une phase initiale comprenant une décroissance rapide, puis une phase de ralentissement et enfin un pseudo-plateau décroissant qui a quasiment la même pente que celle observée en présence de peroxyde d'hydrogène seul 1000 s après son ajout. Cela laisse penser que la catalyse s'arrête avant la consommation totale du peroxyde d'hydrogène, ce qui peut suggérer la destruction du catalyseur. Nous avons donc ajouté à nouveau 200 μ M de peroxyde d'hydrogène (④), observé l'augmentation brusque du signal comme attendu, puis une diminution progressive du courant, beaucoup

plus lente que la phase initiale précédente, mais plus rapide qu'au pseudo-plateau. Il semble donc qu'il y ait effectivement destruction partielle du catalyseur. Un ajout secondaire de 10 nM de Cytb₅₅₈ native (⑤) provoque une diminution progressive du signal dont l'allure est très proche de celle obtenue à la suite du premier ajout de FM, à la différence que la phase initiale a une pente plus forte, ce qui est probablement dû à la quantité de catalyseur correspondant ici à la somme de ce que nous venons d'ajouter et de la quantité de catalyseur encore actif de l'ajout précédent.

La FM contient donc un composant thermolabile capable de catalyser la consommation du peroxyde d'hydrogène. Dans des expériences qualitatives préliminaires non présentées ici dont la présence ou l'absence de peroxyde d'hydrogène a été détectée à l'aide du leucocrystal violet (LCV) et de HRP, j'ai constaté que le peroxyde d'hydrogène est consommé même en présence de 1 µM de DPI, ce qui signifie que la catalyse ne dépend pas d'une flavine. Afin de s'assurer que NOX2 ne joue aucun rôle dans cette catalyse, sachant qu'elle n'est pas sensible à l'azote, il faudrait refaire ces expériences en présence d'azote pour démontrer si NOX2 est impliquée ou pas dans l'activité catalase.

Afin de savoir si la consommation de peroxyde d'hydrogène catalysée implique une libération de gaz, j'ai placé un excès de peroxyde d'hydrogène, 2 mM, dans des tubes de 2 mL, puis ajouté un même volume de soit la FM, soit la FM bouillie, soit le tampon des FM, **Figure III-37 photos de gauche**. Après 2 h d'incubation à température ambiante tubes fermés, j'ai constaté que le tube avec FM natives contenait beaucoup de bulles de gros diamètre, le tube avec FM bouillie contenait une très faible quantité de bulles fines et le tube sans FM ne contenait pas du tout de bulles. Avec la mesure qualitative au LCV évoquée ci-avant, je suis en mesure de dire qu'il restait néanmoins du peroxyde d'hydrogène dans le tube contenant des FM. J'ai supposé que le gaz libéré était le dioxygène.

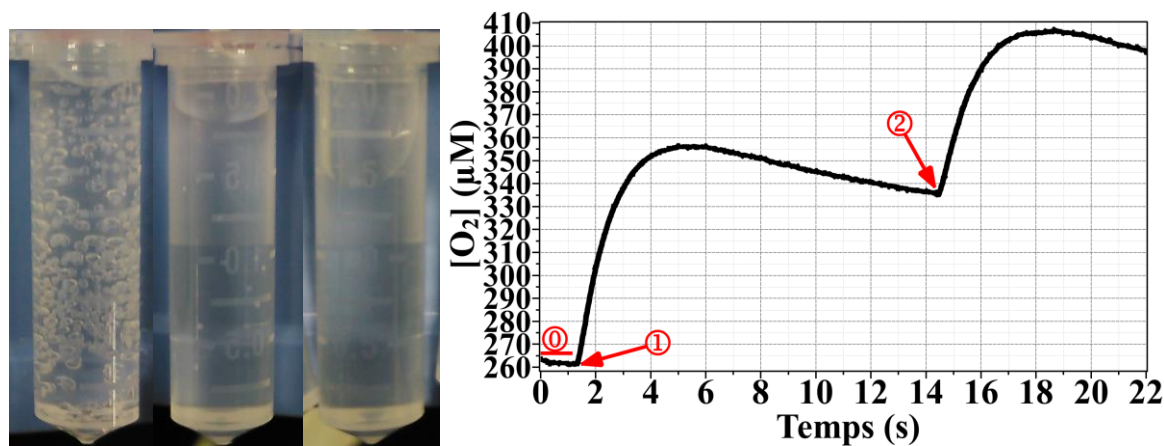


Figure III-37. Etude d'un produit de décomposition du peroxyde d'hydrogène par la FM.

Les photos à gauche sont une étude qualitative de la libération de gaz par les FM en présence de peroxyde d'hydrogène. Le tube le plus à gauche contenait initialement 10 nM de Cytb₅₅₈ et 2 mM de peroxyde d'hydrogène. Le tube du milieu contenait initialement 10 nM de Cytb₅₅₈ issues de FM bouillies 10 minutes à 95 °C et 2 mM de peroxyde d'hydrogène (non bouilli). Le tube de droite contenait initialement 2 mM de peroxyde d'hydrogène seul. Les trois tubes ont été incubés à température ambiante pendant 2 h. Le graphique de droite est une mesure de la libération de dioxygène par les FM. ① Correspond à la polarisation de l'électrode en présence de 200 µM de H₂O₂. ② Correspond à l'ajout de FM contenant 10 nM de Cytb₅₅₈. ③ Correspond à l'ajout de 200 µM de H₂O₂.

Afin d'avoir une indication sur une potentielle activité catalase présente dans les FM, j'ai mesuré le dioxygène libéré en mettant en présence 10 nM de Cytb₅₅₈ et 200 µM de H₂O₂ dans la cellule d'oxymétrie déjà décrite. Les résultats sont présentés en **Figure III-37 graphique de droite**. L'ajout de FM (①) provoque immédiatement une

production de dioxygène jusqu'à environ 100 μM en 3 minutes et 30 secondes où un pseudo-plateau décroissant apparaît ensuite, soit à cause d'une enzyme qui consomme l'excès de dioxygène dans le milieu, soit à cause de la saturation du milieu qui provoque un échange avec l'air beaucoup plus rapide malgré la faible surface d'échange (environ 0,9 mm^2). L'ajout secondaire de 200 μM de H_2O_2 (②) provoque une nouvelle augmentation de la concentration en dioxygène mais cette fois-ci nous n'observons qu'une augmentation de 70 μM de dioxygène puis un pseudo-plateau décroissant comme précédemment.

Par conséquent, il semble y avoir une activité catalase dans les FM mais cela reste à explorer plus avant pour en être certain. *Notamment, un western-blot avec utilisation d'un anticorps anti-catalase pourrait être fait pour vérifier la présence de ces différentes enzymes et leur potentielle implication dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène.* Comme les FM consomment peroxyde d'hydrogène, la réoxydation du Cyt_c lorsqu'il est en défaut est plus probablement due au HClO dont la formation est catalysée par la myéloperoxydase. *Vérifier la libération de HClO par spectrométrie de masse pendant que l'enzyme réalise la catalyse est donc d'autant plus important.*

D. CONCLUSION

A l'aide des résultats présentés en **Figure III-7**, j'ai montré qu'il est nécessaire de compenser expérimentalement et mathématiquement la turbidité du milieu pour mesurer la concentration en Cyt_{b558} des fractions membranaires. J'ai également pu déterminer à travers cet exemple caractéristique que les fractions membranaires sont souvent contaminées par de la myéloperoxydase (MPO).

Les résultats des **Figure III-8** et **Figure III-10** ont ensuite mis en exergue d'importants problèmes de détermination de l'ASM de la NADPH oxydase du neutrophile en système acellulaire dépendant fortement de la technique de mesure, de la concentration en tout-*cis*-acide arachidonique et de la concentration en NADPH. En particulier, l'observable Cyt_c et l'observable NADPH donnent des résultats très différents de l'ASM apparente de NOX2, ainsi que des valeurs de k_{cat}^{app} et de K_m^{app} (NADPH) très différentes.

Ainsi, j'ai pu poser les hypothèses et orienter mes recherches en conséquence pour comprendre les causes de ces variations dont je vais résumer les résultats ci-après.

➤ LE CYTOCHROME C EST HABITUELLEMENT UTILISE EN CONCENTRATION NON SATURANTE

Lorsque le Cyt_c est en défaut par rapport au NADPH, la **Figure III-21A** montre qu'il est totalement réduit par les anions superoxyde, (contrôles SOD **Figure III-11** et **Figure III-22B**), produits par NOX2, puis réoxydé lentement uniquement lorsque NOX2 catalyse encore la production des anions superoxyde, (**Figure III-21B** et **C**, **Figure III-22A** et **Figure III-23B**), et cet effet est augmenté par l'ajout de SOD une fois le Cyt_c totalement réduit (**Figure III-22C**). Le Cyt_c est donc probablement impliqué dans des réactions secondaires avec le H₂O₂ et potentiellement le HOCl dont la présence serait catalysée par la myéloperoxydase, (**Figure III-7**) et j'ai aussi montré qu'il est réduit très lentement par le NADPH avec le concours de qui il forme des anions superoxyde, (**Figure III-22B**). Par ailleurs, NOX2 est encore active après la consommation totale de 100 ou 150 μM de NADPH et est encore capable de réaliser la consommation de NADPH en produisant des anions superoxyde avec une activité un peu plus faible, (**Figure III-21B** et **Figure III-23C**).

La sigmoïde en phase initiale des cinétiques de réduction du Cyt_c par les anions superoxyde produits par NOX2 est obtenue en absence d'incubation, (**Figure III-18**), ou encore à faibles concentrations en AA, (**Figure III-17**). Elle n'est pas liée à la vitesse initiale mais seulement aux propriétés visiblement cinétiquement limitantes conférées par l'AA sur tout ou partie des composants du système acellulaire, y compris le Cyt_c. Cette sigmoïde n'est pas retrouvée en phase initiale des cinétiques de consommation du NADPH, (**Figure III-23A**), ce qui signifie qu'elle est uniquement due à un problème de couplage entre la réaction de production des anions superoxyde par NOX2 et la réaction de détection des anions superoxyde par le Cyt_c. Ainsi, il s'agit d'un problème purement technique et il serait donc erroné de considérer cette sigmoïde pour réaliser des interprétations mécanistiques ou fonctionnelles sur la NADPH oxydase.

J'ai montré, **Figure III-11**, que la vitesse de réduction du Cyt_c par les anions superoxyde que produit NOX2 dépend de la concentration en Cyt_c sur une gamme allant de 50 à 350 µM et les résultats supplémentaires présentés en **Figure III-15** ajoutent que la turbidité du milieu nous empêche de déterminer la concentration saturante réelle en Cyt_c. De plus, les mesures d'oxymétrie, **Figure III-16**, confirment ces résultats en montrant que 90 µM de Cyt_c captent les anions superoxyde produits beaucoup plus lentement que la vitesse réelle de leur production.

En revanche, le Cyt_c est en large excès, ici 360 µM, par rapport au NADPH, ici entre 25 et 175 µM, des vitesses de réduction du Cyt_c proches en proportion de la vitesse de consommation du NADPH sont retrouvées et $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ et de $K_{\text{m}}^{\text{app}}$ (NADPH) sont beaucoup plus proches (**Figure III-20**). De surcroît, dans ces conditions, lorsque la réaction est terminée, la stœchiométrie en quantité de matière est retrouvée : deux anions superoxydes produits pour une molécule de NADPH consommée (**Figure III-19**).

Ma conclusion est que travailler avec le Cyt_c augmente beaucoup le degré de complexité de la mesure de l'activité de la NADPH oxydase. Il est donc préférable autant que possible de mesurer l'activité de la NADPH oxydase en suivant la consommation du NADPH et si la mesure des anions superoxyde est nécessaire, il faut se placer en excès de Cyt_c ce qui impose la forte contrainte technique d'utilisation d'un trajet optique de 1 mm et ceci est sans garantie de perturbation du complexe NADPH oxydase par l'excès de Cyt_c.

- **LA DETECTION DES O_2^- PAR LE CYTC EST IMPACTEE PAR L'AA QUI INFLUENCE TOUS LES CONSTITUANTS DU SYSTEME ACELLULAIRE ET CELA IMPLIQUE UN PROBLEME DE PERMEABILITE MEMBRANAIRE.**

La littérature montre que l'AA influence l'activation de NOX2 en impactant la biophysicochimie du Cyt_{b₅₅₈}, (179, 231, 402), ou encore la structure des protéines cytosoliques, (254, 440, 442), et je présente ici de nombreuses confirmations de l'activation de la NADPH oxydase par l'AA, (**Figure III-8, Figure III-17, Figure III-25, Figure III-28, Figure III-31**). De plus, j'ai montré que la concentration en AA, (**Figure III-17**), ainsi que la durée d'incubation en présence d'AA, (**Figure III-18**), modifie significativement l'allure de la phase initiale des cinétiques de réduction du Cyt_c. L'apport original de cette thèse est de montrer que l'AA a un impact notoire sur la perméabilité membranaire des FM qui elle-même augmente beaucoup la complexité des mesures d'activité et de leurs interprétations. Ces résultats sont confirmés par la capacité du désoxycholate, non activateur de NOX2, de remplacer certains effets de l'AA soit sur la membrane soit sur le Cyt_c soit sur les deux (**Figure III-28, Figure III-29**). Par ailleurs, le spectre du Cyt_c est impacté par la présence d'AA, (**Figure III-13**), ce qui pourrait influencer sa constante de vitesse de réduction par les anions superoxyde, mais je relève cependant que ni l'AA ni les autres constituants du système acellulaire n'impactent son coefficient d'extinction molaire différentiel (**Figure III-14**).

L'expérience en présence d'alaméthicine a permis de démontrer que le problème de perméabilité membranaire est réel, en supposant que l'alaméthicine n'a pas d'effet sur le Cyt_c, (**Figure III-30**). Le problème de perméabilité membranaire augmenterait la séquestration des anions superoxyde produits et donc leur dismutation comme je l'ai supposé à l'aide de plusieurs expériences avec différentes techniques dont l'oxymétrie (**Figure III-21, Figure III-22**,

Figure III-24, Figure III-25, Figure III-26) ce qui pourrait fortement influencer la mesure d'autant plus si la myéloperoxydase présente fortuitement catalyse la production de HOCl (**Figure III-7**).

Les mesures de dépendance en température de l'activité enzymatique de NOX2 (**Figure III-27**) se sont révélées très compliquées à réaliser pour être rigoureuses et difficilement reproductibles. De plus, la variation de la température implique un changement concerté d'un grand nombre de paramètres dont l'implication convolue sur l'activité enzymatique ou encore sur la mesure des anions superoxyde n'est pas contrôlée, ce qui engendre une confusion de très nombreux effets. Par conséquent, il est risqué d'en tirer quelque information thermodynamique rigoureuse sans avoir déconvolué ces effets, à moins de comparer deux conditions en ne modifiant qu'un seul paramètre. Je ne tire pas d'information de cette méthode, mais souhaite cependant souligner les difficultés d'application, qui en font une méthode peu ou pas adaptée pour l'étude de NOX2 en système acellulaire.

En outre, j'ai montré qu'une incubation de 1h30 en présence d'AA permet, au-delà de la concentration optimale en AA, de compenser totalement les problèmes de stœchiométrie observés précédemment entre l'observable Cyt c et l'observable NADPH (**Figure III-31**). Cela signifie d'une part qu'il est nécessaire que l'incubation dure beaucoup plus longtemps que la durée habituelle afin que l'effet de l'AA sur les composants du système soit à l'équilibre. D'autre part, il est nécessaire de s'approcher de la CMC de l'AA pour que son action détergente soit suffisante pour compenser les problèmes de perméabilité observés.

Par conséquent, afin de limiter les problèmes de cinétique de détergence de la membrane par l'AA ou encore de cinétique de changements conformationnels des protéines par l'AA, il est nécessaire de se placer dans des conditions de concentration en AA au-delà de la concentration optimale et d'incuber au moins 1h30. J'ai démontré qu'un excès de Cyt c permet aussi de compenser les problèmes de détection, ce qui suggère a priori que le problème de perméabilité est alors aboli mais je ne peux pas exclure un transfert direct d'électrons du Cyt b_{558} au Cyt c dû à la grande concentration en ce dernier, ce qui serait alors artefactuel. Cependant, le Cyt c est connu pour interagir avec les acides gras libres ainsi qu'avec les phospholipides membranaires et certains détergents ce qui pourrait perturber la structure des membranes auxquelles il se fixe, (452–462, 467), ce qui rendrait la membrane perméable aux O $_2^-$ tout en augmentant la proximité du Cyt c du lieu de production et expliquerait la compensation.

Je note de plus que toute sonde qui ne pénètre pas à l'intérieur des FM sera victime des mêmes contraintes. L'avantage du Cyt c est qu'il est facilement utilisable en spectrophotométrie d'absorption dont la quantification est beaucoup plus simple que la fluorescence ou la luminométrie, mais qui est en contrepartie peu sensible. Je reporte également que toutes les molécules ajoutées, (alaméthicine, AA, DOC, DIDS...), inhibent systématiquement la catalyse réalisée par NOX2 et il est donc possible que cette inhibition ne soit qu'un artefact lié à un environnement non favorable du Cyt b_{558} ou des protéines cytosoliques, empêchant l'assemblage et, ou favorisant la dénaturation. Ce dernier point est à évaluer précautionneusement lors de la recherche de nouveaux inhibiteurs de la NADPH oxydase en système acellulaire.

➤ **LES FRACTIONS MEMBRANAIRES DE NEUTROPHILE PRESENTENT UNE ACTIVITE CATALASE-LIKE QUI POURRAIT EXPLIQUER LES PROBLEMES DE MESURE DE CONSOMMATION DU DIOXYGENE ET FAVORISER LA DISMUTATION DES ANIONS SUPEROXYDE**

Ma collaboration avec Pauline Lefrançois et Stéphane Arbault m'a notamment permise de montrer que les fractions membranaires de neutrophile possèdent un composant thermolabile qui catalyse la consommation du peroxyde d'hydrogène (**Figure III-33, Figure III-34, Figure III-35, Figure III-36**). J'ai ensuite montré que cette consommation provoque la libération de gaz et que ce gaz est du dioxygène (**Figure III-37**). La stœchiométrie entre la libération de dioxygène et le peroxyde d'hydrogène ajouté suggère que les FM possèdent une activité catalase, mais la présence de catalase reste à confirmer.

La catalyse de la consommation du peroxyde d'hydrogène par la FM explique les problèmes de stœchiométrie observés lors des mesures de consommation du dioxygène par NOX2. De plus, le fait de catalyser la consommation du peroxyde d'hydrogène provoque le déplacement de l'équilibre de dismutation de l'anion superoxyde, favorisant cette dismutation selon le principe de Le Chatelier (« *Any change in status quo prompts an opposing reaction in the responding system.* ») en considérant que les deux réactions impliquées sont des équilibres stables. La favorisation de la dismutation de l'anion superoxyde va ainsi entrer en compétition avec la captation des anions superoxyde par le Cyt_c et contribuer à la perturbation des mesures.

CHAPITRE IV – Développement et études de NOX-GUV

A. INTRODUCTION

Il a précédemment été décrit que l'activation du complexe NADPH oxydase peut se faire soit à la membrane plasmique, dans le cas notamment d'une contribution de NOX2 à un processus inflammatoire, soit à la membrane des phagosomes, dans le cas d'une contribution de NOX2 à la destruction d'un objet du **non-soi**. L'assemblage, au moins transitoire, des protéines cytosoliques avec le Cytb₅₅₈ est indispensable à l'activation et à la régulation de l'activité enzymatique de NOX2. Or, ne sont pas encore totalement décrits : les différents partenaires permanents ou transitoires, le rôle exact de chaque partenaire dans la fonction de NOX2 et la séquence d'assemblage et de désassemblage potentiel de ces partenaires. De plus, expérimentalement, il reste aujourd'hui très compliqué de mesurer de façon concomitante l'assemblage du système et son activité. Cela implique la méconnaissance de plusieurs facteurs, comme l'intervalle de temps entre l'assemblage et l'activation du système, la séquence d'assemblage nécessaire, ou suffisante, pour induire une activité, ou le processus d'inactivation de l'enzyme, si celui-ci existe, ou encore les facteurs biochimiques et biophysiques influençant l'activation différentielle à la membrane plasmique ou l'activation à la membrane du phagosome, (molécules effectrices, structure et composition de la membrane, paramètres physicochimiques). Il a précédemment été décrit de nombreuses interactions protéine-protéine et protéine-lipides au sein du complexe NADPH oxydase, mais le lien entre ces interactions et l'activation ainsi que la régulation de l'enzyme n'a pas été établi visuellement de façon directe, comme par exemple l'ensemble des interactions nécessaires et, ou suffisantes pour l'activation de l'enzyme.

Dans un premier temps, j'ai donc souhaité, développer les aspects méthodologiques afin d'avoir des outils pour étudier l'assemblage et l'activité de façon concomitante. Dans un deuxième temps, l'objectif était d'obtenir des résultats concrets en liposomes géants sur les interactions protéine-protéine et protéine-lipides impliquées dans l'assemblage et contribuant à l'activation du complexe. Enfin, ces techniques pourraient être exportées pour des mesures cellulaires et contribuer à l'élaboration d'une cellule synthétique.

Toutes les expériences de ce chapitre ont été faites en collaboration avec Pauline Lefrançois et Stéphane Arbault de l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux, groupe NanoSystèmes Analytiques. J'utiliserai donc des pronoms personnels pluriel ou singulier, lorsque j'aurai besoin de parler respectivement d'un aspect commun ou d'un aspect individuel.

Il a été choisi que l'étude concomitante de l'activité et de l'assemblage de l'enzyme se ferait sur des liposomes géants unilamellaires (Giant Unilamellar Vesicles), dont la taille est suffisante (au moins 10 μm de diamètre) pour leur visualisation par microscopie photonique et pour leur faire subir des micromanipulations à l'aide de micropipettes capillaires ainsi que des analyses de microélectrochimie sous microscope à l'aide d'ultramicroélectrodes (UME). Initialement, les GUV sont en fait simplement constituées d'une bicouche de phospholipides fermée, en l'occurrence globalement sphérique, réalisant une compartimentation entre l'intérieur de la GUV et l'extérieur.

Les objectifs de ce chapitre résumés dans le schéma bilan Figure IV-1, sont donc : *i)* d'élaborer des liposomes géants (Giant Unilamellar Vesicles : GUV) contenant le Cyt_b₅₅₈ dans leur membrane (appelés NOX-GUV) qui seront utiles pour l'étude concomitante de l'assemblage, de l'activation et de la régulation de NOX2. *ii)* De déterminer l'importance des lipides dans l'interaction des protéines cytosoliques avec le Cyt_b₅₅₈ en visualisant les interactions entre les protéines cytosoliques et la membrane des GUV seule, en comparaison avec les interactions observées entre les protéines cytosoliques et la membrane des NOX-GUV. La contribution de l'acide arachidonique à ces interactions a également été sondée. *iii)* De réaliser une mesure qualitative de l'activité NADPH oxydase des NOX-GUV.

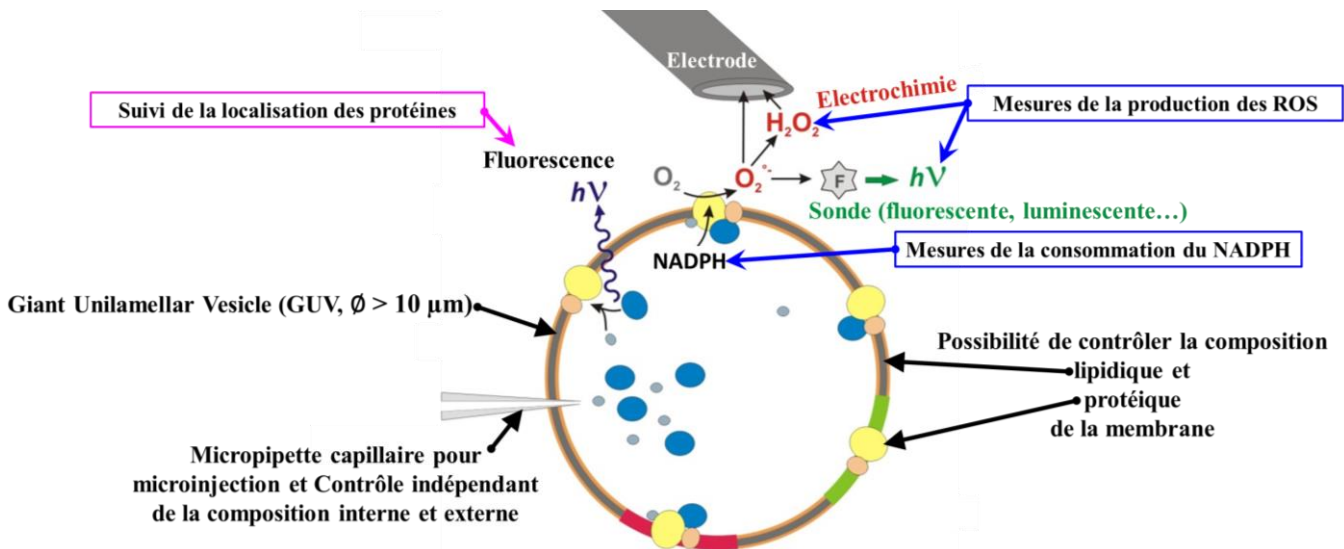


Figure IV-1. Schéma du système d'étude et des techniques théoriques pour l'étude de la NADPH oxydase en liposomes géants. Schéma adapté à partir d'un schéma réalisé par Stéphane Arbault.

B. MATERIELS ET METHODES

Cette partie a pour objectif de présenter les méthodes employées ainsi que certains aspects matériels qu'il est important de connaître pour interpréter les résultats. Les références des produits et appareils importants sont données en ANNEXE 5.

1. Préparation des composants du complexe NADPH oxydase

1.1. PREPARATION DES FRACTIONS MEMBRANAIRES DE NEUTROPHILE

Les fractions membranaires de neutrophile ont été préparées comme indiqué dans le chapitre précédent.

1.2. PREPARATION DES PROTEINES CYTOSOLIQUES FLUORESCENTES

Les protéines fluorescentes Turquoise-p67^{phox} (Tp67), p47^{phox}-Citrine (p47C) et Cherry-Rac1Q61L (ChRac) ont été exprimées et purifiées selon le même protocole que celui décrit pour les protéines cytosoliques non fluorescentes avec quelques modifications qui sont décrites ici. A la suite de l'induction de l'expression des protéines avec de l'IPTG, le milieu de culture a été incubé à 18 °C au lieu de 20 °C. Les protéines Tp67 et p47C ont été purifiées comme décrit pour les protéines p67^{phox} et p47^{phox} respectivement. La protéine ChRac porte un tag Histidine et a donc subi une chromatographie d'affinité à effecteur Nickel au lieu de l'effecteur glutathion utilisé pour Rac1Q61L qui portait un tag GST. J'ai également pris soin de protéger les protéines de la lumière en utilisant notamment du papier d'aluminium, pour éviter leur dégradation liée à l'absorption de lumière par les fluorophores.

Le trimère de Pick fusionné avec une protéine fluorescente verte (GFP) en N-terminal est noté GFP-Trimère. Le trimère de Pick est une protéine chimérique constituée en N-terminal des acides aminés 1 à 286 de la protéine p47^{phox}, suivi des acides aminés 1 à 212 de la protéine p67^{phox}, suivi jusqu'au C-terminal de la totalité de la protéine Rac1Q61L. Le GFP trimère a été exprimé et purifié en suivant le même protocole que Tp67 à l'exception qu'il a subi un tamis moléculaire à la place de la dialyse.

1.3. PREPARATION DES PROTEINES NON FLUORESCENTES

Les protéines non fluorescentes utilisées sont les mêmes que celles utilisées dans le chapitre précédent. La préparation a donc déjà été décrite dans le chapitre précédent.

1.4. MARQUAGE DES PROTEINES NON FLUORESCENTES AVEC DE L'ALEXA FLUOR®

1.4.1. PRESENTATION ET PREPARATION DE L'ALEXA FLUOR®

L'Alexa Fluor® 647 est un fluorophore dont la longueur d'onde d'excitation maximale est de 650 nm et la longueur d'onde d'émission maximale est de 665 nm. L'Alexa Fluor® 647 peut être couplé à différents groupements chimiques pouvant réagir avec différentes fonctions chimiques de molécules biologiques, permettant ainsi un marquage

fluorescent de ces molécules. J'ai utilisé de l'Alexa Fluor® 647 portant une fonction chimique maléimide pouvant réagir avec la fonction thiol, dont celle des cystéines. L'Alexa Fluor® 647 peut donc marquer les protéines en se fixant sur sa ou ses cystéines accessibles via une liaison thioéther ((494) et **Figure IV-2**).

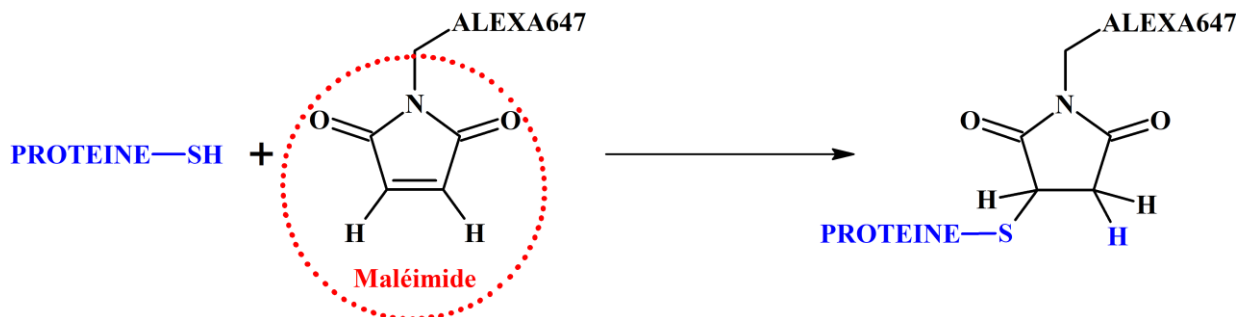


Figure IV-2. Schéma d'illustration du marquage d'une fonction thiol d'une protéine par l'Alexa Fluor® 647 Maléimide.

L'Alexa Fluor® 647 maléimide doit être manipulé autant que possible à l'abri de la lumière. Il est fourni sous forme de poudre dans un tube à conserver à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il est peu soluble et peu stable dans l'eau et la première étape consiste donc à solubiliser tout le stock d'Alexa Fluor® 647 maléimide, (masse molaire $\approx 1250\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), à environ $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), idéalement anhydre. Des aliquots de la solution sont ainsi réalisés en calculant la quantité, (en moles), désirée par aliquot, puis le DMSO, qui est hygroscopique et n'est donc pas un solvant de stockage pour l'Alexa Fluor® 647 maléimide, est évaporé à température ambiante au concentrateur sous vide Speedvac jusqu'à séchage total. Le DMSO ayant un point d'ébullition de $189\text{ }^{\circ}\text{C}$ à pression atmosphérique, afin que l'évaporation soit possible, le volume par aliquot doit être faible, de l'ordre de la dizaine de microlitres et les tubes doivent être de type Eppendorf 1,5 mL. Les aliquots d'Alexa Fluor® 647 maléimide sont stockés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ à l'abri de la lumière pendant plusieurs années. En outre, beaucoup de sondes fluorescentes sont connues pour interagir avec les bicouches phospholipidiques parfois de façon significative, ce qui serait ici dommageable. L'Alexa Fluor® 647 maléimide n'a pas d'interaction significative avec les bicouches phospholipidiques (495).

1.4.2. OPTIMISATION DU RAPPORT DE CONCENTRATION ALEXA FLUOR®/PROTEINE

Pour marquer une protéine avec un Alexa Fluor® maléimide, il faut s'assurer de la présence de cystéines. De plus, il faut optimiser expérimentalement le ratio du nombre d'Alexa Fluor® par protéines afin d'obtenir la fluorescence désirée pour la protéine dans le système d'étude, sans que celle-ci soit dénaturée. Mon optimisation a consisté à tester 1 Alexa Fluor® pour 10 protéines, 1 Alexa Fluor® pour 2 protéines, 1 Alexa Fluor® pour 1 protéine et 1 Alexa Fluor® pour 0,5 protéines. La fluorescence de la protéine sous microscope confocal a ensuite été testée lors de nébulisations à la micropipette capillaire, (voir plus loin) et la perte d'activité a également été testée en système acellulaire, comme décrit dans le chapitre précédent. En pratique, le ratio 1 Alexa Fluor® pour 1 protéine, a permis d'obtenir la fluorescence la plus satisfaisante, associée à une perte d'activité de NOX2 d'environ 10 % seulement, contre un contrôle ayant subi la même procédure mais sans Alexa Fluor®. J'ai donc choisi de marquer p47^{phox} en utilisant 1 Alexa Fluor® pour 1 protéine.

1.4.3. PROTOCOLE DE MARQUAGE DE P47^{phox} AVEC L'ALEXA FLUOR® 647 MALEIMIDE

Connaissant la quantité d'Alexa Fluor® 647 Maléimide dans un tube du stock et le volume, ainsi que la concentration des protéines à marquer, l'Alexa Fluor® 647 Maléimide est resolubilisé dans le volume *ad-hoc* de DMSO, pour obtenir la concentration désirée permettant d'ajouter à la solution de protéines, pas plus d'un centième du volume de cette solution d'Alexa Fluor® 647. La solution d'Alexa Fluor® 647 Maléimide est ajoutée à la solution de protéines et le mélange est incubé sur la glace et sous aluminium, pendant environ 8 h. La solution est alors récupérée et dialysée dans 5 L de PBS, (150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM NaH₂PO₄, pH 7,4), pour maximum 5 mL de protéines, pendant environ 12 h à l'abri de la lumière. La protéine marquée peut alors être aliquotée et stockée à -80 °C pendant environ 2 ans. Il peut être intéressant de tracer le spectre d'absorption UV-Visible des protéines marquées afin de déterminer, à l'aide du coefficient d'extinction molaire de l'Alexa Fluor® 647 à 650 nm, (265 mM⁻¹·cm⁻¹), et celui de p47^{phox} à 280 nm (60 mM⁻¹·cm⁻¹), le nombre moyen d'Alexa Fluor® 647 par protéine.

J'appellerai p47A la protéine p47^{phox} marquée de cette façon avec de l'Alexa Fluor® 647 Maléimide.

1.5. MARQUAGE DES PROTEINES DES FM AVEC DE L'ALEXA FLUOR®

L'Alexa Fluor® 488 est un fluorophore dont la longueur d'onde d'excitation maximale est de 493 nm, (72 mM⁻¹·cm⁻¹), et la longueur d'onde d'émission maximale est de 516 nm. J'ai utilisé de l'Alexa Fluor® 488 portant une fonction chimique maléimide, dont le rôle a été décrit précédemment. L'Alexa Fluor® 488 Maléimide, est davantage soluble dans l'eau que l'Alexa Fluor® 647, mais est aussi instable en présence d'eau. Il a donc été préparé, aliquoté et stocké comme présenté pour l'Alexa Fluor® 647 Maléimide.

L'optimisation de la concentration en Alexa Fluor® 488 Maléimide, m'a conduit à utiliser un rapport de 1,5 Alexa Fluor® 488 Maléimide pour 1 Cytb₅₅₈, ce qui nous procure un signal de fluorescence acceptable en microscopie et diminue l'activité mesurée de la NADPH oxydase de seulement 50 % par rapport à un contrôle ayant subi toutes les étapes de marquage mais sans l'Alexa Fluor® 488 Maléimide.

Le volume *ad-hoc* d'Alexa Fluor® 488 Maléimide, (pas plus de 1 % en volume ; masse moléculaire 720,66 g·mol⁻¹), est ajouté à la suspension de FM et le mélange est ensuite incubé pendant 6 h sur la glace, en absence de lumière dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL. Les suspensions sont alors centrifugées à 14100 x g pendant 12 h à 4 °C, afin de séparer les fractions membranaires du tampon. Les surnageants sont ensuite jetés et les culots rincés deux fois délicatement avec du PBS. Les culots sont ensuite repris dans le volume de PBS désiré par aspiration-refoulement à l'aide d'un cône de 200 µL et d'une micropipette, puis stockés à -80 °C.

2. Préparation des GUV par réhydratation de vésicules multilamellaires

2.1. PRESENTATION DES GUV FORMEES PAR REHYDRATATION DE VESICULES MULTILAMELLAIRES

Après la formation des NOX-GUV, je souhaitais notamment pouvoir y injecter les protéines cytosoliques afin d'étudier NOX2 dans une configuration proche de la configuration de NOX2 dans la membrane plasmique. Les GUV

peuvent être formées avec différentes techniques (496), qui ont chacune leurs avantages et inconvénients. Une technique très utilisée pour former les GUV est l'électroformation (497), qui se fait en appliquant un champ électrique entre deux électrodes sur lesquelles est étalée une fine couche de lipides. Cette technique très efficace, soumet d'une part les lipides à un risque d'oxydation dû au champ électrique et d'autre part forme des GUV à l'intérieur desquelles, l'injection post-formation n'est pas possible sans qu'elles éclatent.

En 1969, (498) une technique de formation des GUV en absence de champ électrique a été développée, permettant de s'affranchir du risque d'oxydation à cette étape. Un inconvénient majeur de cette technique est la nécessité d'optimiser, (composition du tampon, volumes, temps d'incubation, températures, temps d'évaporations, temps de sonication, traitement des surfaces...), chaque étape de la formation, lorsqu'il y a nécessité de faire un changement significatif dans la composition lipidique. Cette technique est très bien adaptée à la formation de GUV, dans un tampon proche des conditions physiologiques et en présence de lipides polaires chargés ((499) pour une revue des techniques de formation des GUV, voir la référence (496)).

Des optimisations de cette technique réalisées depuis, (500, 501), ont permis de former des GUV en absence de champ électrique, en séchant puis réhydratant une suspension de vésicules multilamellaires (MLV) de la taille d'une petite vésicule unilamellaires (notées SUV, jusqu'à 100 nm), suspension que j'appellerai SUV-MLV. La suspension de SUV-MLV est formée à partir de lipides polaires naturels issus de graines de soja, (Soybean Polar Lipid Extracts notés SBL ou SPE). Les GUV formées par réhydratation de SUV-MLV en absence de champ électrique, possèdent un réservoir de phospholipides, lié à leur membrane. Le réservoir permet de fournir des phospholipides en continu à la membrane, en cas d'extension de sa surface, liée par exemple à l'injection, dans la GUV, d'une solution. Le diamètre d'une GUV ainsi injectée, peut augmenter empiriquement jusqu'à 5 fois, sans que la GUV n'éclate, ce qui en fait une technique de choix pour un de mes objectifs. Or, cette technique a été maîtrisée par Pauline Lefrançois pendant son doctorat, ce qui nous a permis de l'utiliser pour mes expériences de conception de NOX-GUV et d'étude de NOX2.

La morphologie d'une GUV formée par réhydratation de vésicules multilamellaires est présentée en **Figure IV-3**.

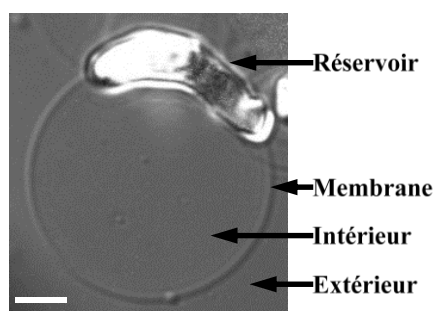


Figure IV-3. Image de GUV en transmission par microscopie confocale avec contraste interférentiel différentiel (DIC).
Grossissement 200x. Barre d'échelle 10 μ m.

Ces GUV, possèdent classiquement une membrane constituée d'une unique bicouche de phospholipides, structurée en un feuillet interne et un feuillet externe, comme présenté dans l'introduction générale. Cette membrane délimite l'intérieur de l'extérieur de la GUV, les deux étant constitués par du tampon PBS. Le réservoir est clairement

visible le long de la membrane, ici en haut de l'image. Selon les stocks de SUV-MLV, le réservoir a parfois cette forme « en haricot » et d'autres fois une forme plus sphérique et il y a une mauvaise reproductibilité à cet égard.

2.2. LES LIPIDES POLAIRES EXTRAITS DE GRAINES DE SOJA (SBL/SPE)

Les lipides polaires extraits de graines de soja sont fournis par Avanti® Polar Lipids, Inc. sous forme grasse, sous atmosphère inerte, en ampoule hermétique conservée à -20 °C. D'après le fabricant, ce mélange contient 45,7 % en masse de phosphatidylcholine (PC), 22,1 % en masse de phosphatidyléthanolamine (PE), 18,4 % de phosphatidylinositol (PI), 6,9 % d'acide phosphatidique (PA) et 6,9 % de composés indéterminés. Aucun détail technique sur la quantification des phospholipides faite par le fabricant n'est fourni. Les acides gras présents, estérifiés ou non, ne sont pas connus et sont probablement de natures variées. Le protocole de formation des GUV par réhydratation de SUV-MLV a été optimisé par l'équipe de Jesorka *et al.* 2011 avec ces lipides, que nous avons donc utilisés pour ne pas avoir à refaire une optimisation. L'avantage de ces lipides est qu'il s'agit d'un mélange naturel qui contient donc une composition proche d'une moyenne de la composition en lipides des membranes des cellules de graines de soja.

2.3. PROTOCOLE

Le protocole de formation des GUV par réhydratation de vésicules multilamellaires, nécessite deux grandes étapes : **premièrement** la réalisation d'un stock, (stocké à -20 °C), de vésicules multilamellaires, (MLV) de la taille de petites vésicules unilamellaires, (mélange noté SUV-MLV), donc de quelques dizaines de nm à 100 nm de diamètre, à partir du mélange de lipides polaires extraits de graines de soja (SBL), **deuxièmement** la formation des GUV par déshydratation, puis réhydratation de la suspension de SUV-MLV, après un cycle de congélation-décongélation (-20 °C). Le protocole détaillé est donné dans l'article de Jesorka *et al.* 2011 (500). Par ailleurs, des détails sur la physicochimie des membranes de ces GUV, qui dépassent le cadre de ma thèse mais sont intéressants pour la compréhension de leur mécanisme de formation, sont discutés dans le Chapitre 2. III. de la thèse de Pauline Lefrançois (398).

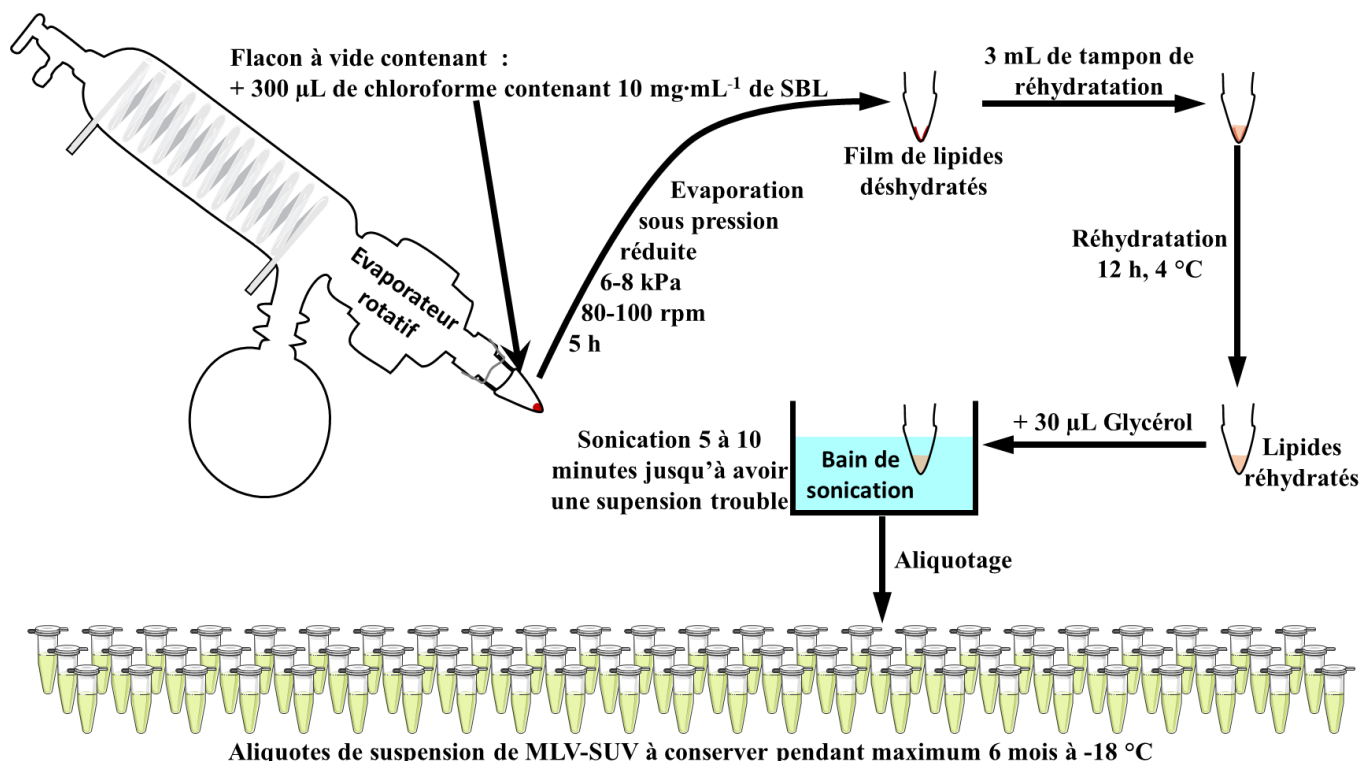
2.3.1. FORMATION DU STOCK DE SUV-MLV

Cette étape de formation du stock de SUV-MLV a été systématiquement exécutée par Pauline Lefrançois pour la réalisation des expériences faites dans ce chapitre. Je donnerai donc ici uniquement une trame générale de leur conception. En revanche, de multiples essais m'ont permis d'importer le protocole au LCP et je détaille la procédure que j'utilise en ANNEXE 6, pour que l'expérience puisse être reproduite par le lecteur qui le désire.

Le schéma de principe récapitulant les différentes étapes de la formation des SUV-MLV, est présenté en **Figure IV-4**.

Brièvement, une solution de 300 µL de SBL à 10 mg·mL⁻¹ dans du chloroforme est placée dans un flacon à vide afin d'évaporer totalement le chloroforme en formant un film de lipide homogène. Puis, 3 mL de tampon de réhydratation, (Trizma base 5 mM, K₃PO₄ 30 mM, KH₂PO₄ 30 mM, MgSO₄ 1 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,4), sont

ajoutés sans agiter et le flacon est laissé incubé 12 h à 4 °C pour réhydrater les lipides. Sont ensuite ajoutés au liquide 30 µL de glycérol, le liquide est homogénéisé délicatement puis le bas du flacon est soniqué 5 à 10 minutes jusqu'à obtention d'une suspension trouble de SUV-MLV. La suspension est alors aliquotée, (50 à 100 µL par tube), puis conservée à -20 °C pendant au plus 6 mois.



Aliquotes de suspension de MLV-SUV à conserver pendant maximum 6 mois à -18 °C
 Figure IV-4. Schéma de principe de la formation du stock de SUV-MLV.

Une fois le stock de SUV-MLV réalisé, un avantage important de cette technique est la possibilité d'obtenir très facilement un grand nombre de GUV utilisables en environ une heure.

2.3.2. FORMATION DES GUV PAR REHYDRATATION DE SUV-MLV

La formation des GUV par réhydratation de SUV-MLV (Figure IV-5) est réalisée extemporanément avant chaque expérience.

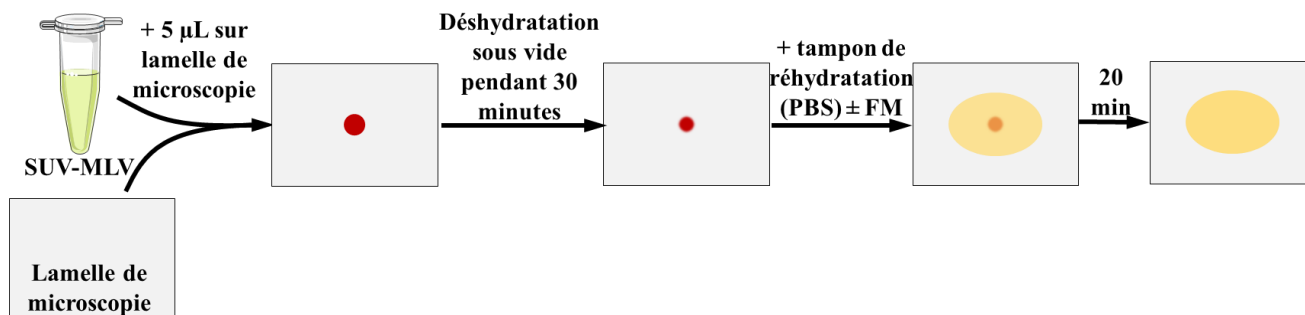


Figure IV-5. Schéma de principe de formation (gonflement) des GUV par réhydratation à partir d'un dépôt séché de SUV-MLV. Vue du dessus de la lamelle utilisée.

La première étape de formation des GUV par réhydratation de SUV-MLV nécessite de *i*) déposer une ou plusieurs gouttes de 5 µL de la suspension de SUV-MLV sur une lamelle de microscopie en verre, (ici 22x40 mm), propre et dégraissée à l'éthanol, puis de *ii*) sécher sous vide, (cloche à vide et pompe à membrane ou à palettes, ou encore

trompe à eau), environ 30 minutes, (il faut que ce soit bien sec). **iii)** Le dépôt est ensuite réhydraté dans du PBS, (3,9 mM NaH₂PO₄, 6,1 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 138 mM NaCl, pH 7,4), en présence ou en absence de FM pendant 15 à 20 minutes, le temps que *les GUV gonflent ('swelling')* et que les processus physicochimiques impliqués (498, 502, 503) tendent vers l'équilibre afin que les GUV soient stables.

Je vais maintenant détailler les différences entre les protocoles utilisés pour la formation des GUV et celui utilisé pour la formation des NOX-GUV.

a. En absence de FM

Pour faire des GUV composées uniquement de lipides, donc lorsqu'il n'y a pas nécessité de faire des NOX-GUV, le dépôt de SUV-MLV séché est réhydraté en ajoutant doucement 200 à 500 µL de PBS, (137 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate, 2,7 mM KCl, pH 7,4), à proximité des dépôts secs, de telle sorte à ce que le tampon recouvre les dépôts en évitant que le flux du tampon ajouté détruise la structure des dépôts. Une incubation de 15 à 20 minutes est alors faite afin que les GUV puisse gonfler à partir des lipides structurés du dépôt, puis se stabiliser. La formation des GUV est alors contrôlée par microscopie photonique à contraste interférentiel différentiel (DIC, grossissement 200 fois). Une lame de microscopie est fonctionnalisée extemporanément avec une solution aqueuse à 0,01 % en masse de poly-L-lysine, (Sigma, P1399), afin d'y fixer des charges positives (issues des Lysines), permettant de fixer les phospholipides à tête anionique des GUV et donc de fixer les GUV à la lame. La fonctionnalisation est réalisée en trempant la lame pendant au moins une heure dans la solution, puis en rinçant délicatement la lame dans l'eau ultra pure, (pas de jet de pissette, mais plutôt un bain), puis en aspirant les gouttes d'eau restantes à l'aide, par exemple, d'un cône et d'une pipette, surtout sans essuyer la lame avec un papier ni la gratter avec le cône, (le cas échéant). La suspension de GUV est alors transférée sur la lame polylysinée, puis un temps d'attente de 15 à 20 minutes est laissé pour que les vésicules décantent et soient fixées sur la polylysine de la lame. Alternativement, des lames fonctionnalisées avec de la résine commerciale SU-8 ont été utilisées pour fixer les GUV, ce qui permet une fixation beaucoup plus forte et donc des micromanipulations plus aisées. Le transfert des GUV sur la lame polylysinée ou fonctionnalisée SU-8 peut se faire délicatement à l'aide d'un cône jaune ou à l'aide d'une aiguille à corps large, (montée sur une seringue de 1 mL), dont l'extrémité a été coupée perpendiculairement au corps de l'aiguille. Il est très important d'éviter les turbulences et donc les bulles lorsque la suspension est transférée. La suspension peut ensuite être diluée au besoin, (en fonction du dispositif d'observation) et les GUV peuvent être visualisées par microscopie et micromanipulées à l'aide d'une micropipette capillaire par exemple.

b. En présence de FM

Un des objectifs était de réaliser des GUV contenant, à leur membrane, Nox2 et p22^{phox} (NOX-GUV). Par chance une méthode pour faire des NOX-GUV a été trouvée très rapidement, même si les caractérisations restent à faire. Pour cela, j'ai utilisé des FM marquées avec de l'Alexa Fluor® 488, que j'appelle FM488, afin de pouvoir voir la localisation des FM.

Le protocole fonctionnel ayant permis d'obtenir les NOX-GUV reprend globalement le protocole de formation des GUV en absence de FM. La différence est que la réhydratation du dépôt sec contient 100 nM de Cytb₅₅₈, ou plutôt, une quantité de FM488 correspondant à 100 nM de Cytb₅₅₈, (dans la suite du chapitre, l'évocation d'une

concentration en Cyt_{b558} sera toujours sous-entendue comme étant la quantité de FM, ou de FM488 correspondant à cette concentration en Cyt_{b558}). Le volume de réhydratation est aussi diminué à 150 ou 100 µL afin d'éviter d'utiliser trop de FM.

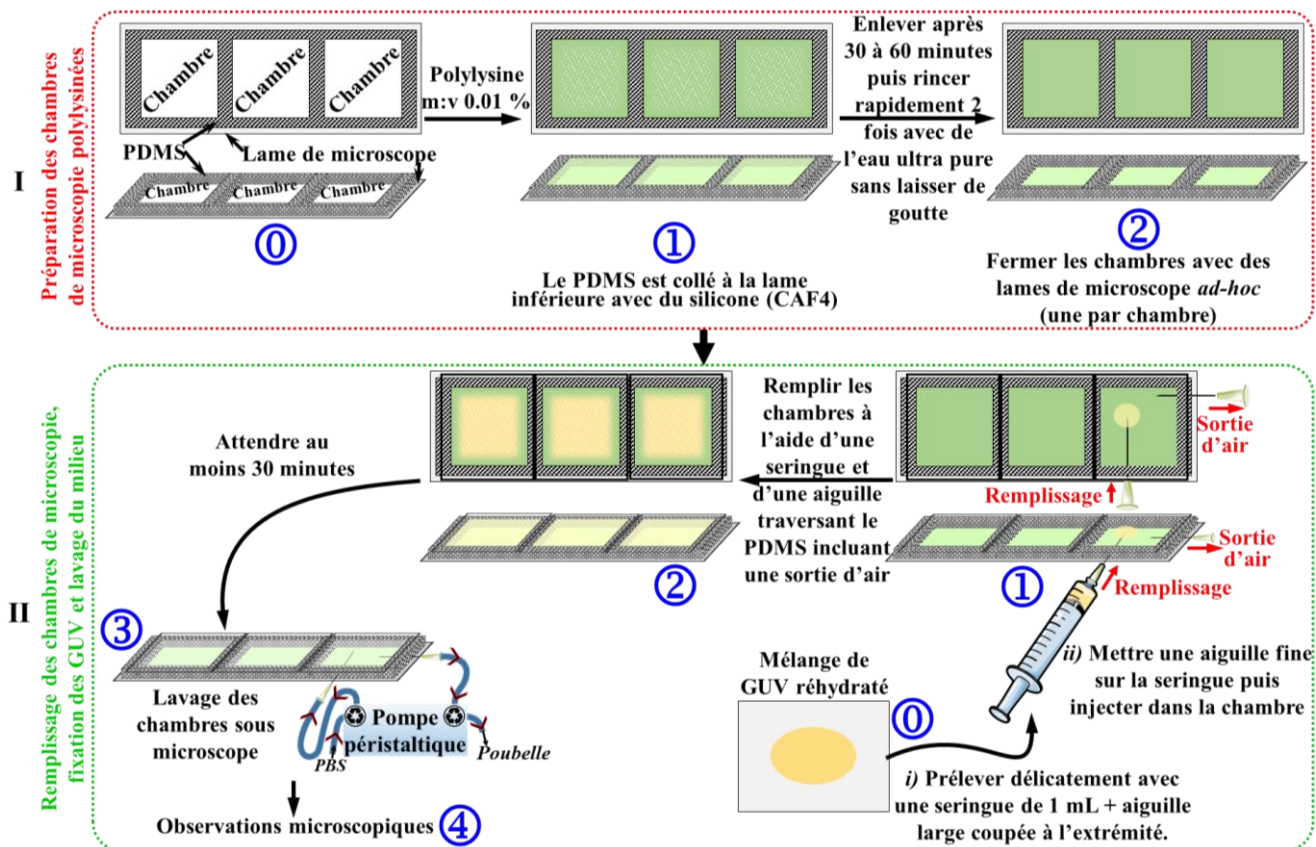


Figure IV-6. Système de chambres de microscopie permettant le lavage du milieu et la comparaison de 3 conditions simultanées. Les numéros entourés en bleu donnent l'ordre des étapes pour chacun des encadrés.

La contrainte technique d'ajouter des FM488 à cette étape est la nécessité de retirer l'excès de FM488 resté en suspension, (et donc non présent à la membrane des GUV). Pour cela, nous avons utilisé deux systèmes différents, le premier, (Figure IV-6), a été conçu au laboratoire pour réaliser trois expériences en parallèle, dont un ou deux contrôles ; il a servi pour les expériences présentées en Figure IV-15. Le deuxième, (Figure IV-7), est un système commercial que nous avons utilisé pour les autres expériences faites avec des NOX-GUV. Ces systèmes, qui sont en fait des chambres de microscopie, permettent de réaliser un échange du tampon, dans lequel baignent les GUV fixées à la surface de la lame ou lamelle de microscopie.

Le protocole associé au premier système est donné en Figure IV-6. Au préalable, (au moins 4 h avant l'expérience), une plaque de Poly(DiMéthylSiloxane), (PDMS ; fournisseur Adhis, RTV 615 A+B (N615-000457A)), d'environ 3 mm d'épaisseur est découpée de façon adaptée pour délimiter trois puits adaptés à une lame de microscopie 76 x 26 mm, comme présenté sur le schéma de la Figure IV-6. Le PDMS découpé est alors collé à l'aide de silicone blanc (CAF 4) sur une lame de microscopie (76 x 26 mm) propre, dégraissée à l'éthanol et sèche. Après séchage (attendre au moins 4 h, ce processus pouvant être accéléré en chauffant à 150 °C), une solution de polylysine 0,01 % en masse est placée dans chacun des puits pendant au moins 1 h pour fonctionnaliser le verre, puis la solution est éliminée et le verre rincé trois fois très doucement (pas de jet de pissette) à l'eau ultra pure, ensuite retirée avec soin par aspiration sans gratter ni essuyer la surface (idéalement sans la toucher).

Un morceau de lame, (les lamelles sont trop fragiles et trop souples pour cette application), découpé à la bonne taille, a été placé sur chacun des puits et maintenu à l'aide de pinces « marque-verres » en forme de petites pinces à linge. La suspension de NOX-GUV est alors prélevée délicatement à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille large coupée perpendiculairement à sa longueur, puis la suspension est diluée délicatement dans la seringue en aspirant une solution de PBS jusqu'au volume équivalent au volume de la chambre. Ensuite, l'aiguille est remplacée par une aiguille plus fine et la suspension est injectée à travers le PDMS dans la chambre fermée, en prenant soin d'ajouter une sortie d'air à l'aide d'une deuxième aiguille à travers le PDMS et de l'orienter vers le haut pendant le remplissage pour éliminer toutes les bulles d'air. Si le volume de la suspension diluée n'est pas suffisant, il est nécessaire d'injecter à nouveau du PBS seul dans la chambre pour enlever l'air restant.

Après une décantation d'environ 30 minutes des GUV afin qu'elles se fixent à la poly-L-lysine, le milieu est lavé en utilisant une pompe péristaltique (**Gilson Minipuls 3**) à débit entre 2 et 6, reliée à un tuyau d'entrée et un tuyau de sortie, ces tuyaux étant connectés à la chambre à travers le PDMS à l'aide d'aiguilles fines. Les NOX-GUV peuvent alors être visualisées par microscopie et micromanipulées après avoir délicatement retiré la lame supérieure. En pratique, le lavage pourrait aussi être réalisé sans fermer les chambres, mais cette configuration nécessite de maintenir les aiguilles pour ne pas que les contraintes qu'elles font subir au PDMS le déchire, ce qui est nettement plus compliqué sur la platine de microscopie.

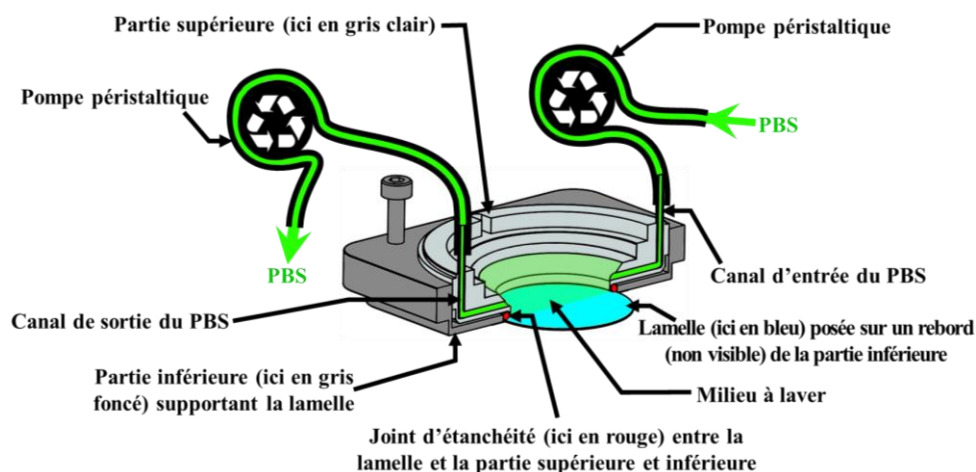


Figure IV-7. Coupe transversale vue de trois-quarts de la chambre de microscopie LUDIN de type 1 de Life Imaging Services. La chambre LUDIN porte une lamelle circulaire de 18 mm de diamètre. Le schéma est modifié à partir de la brochure commerciale de la chambre Ludin de type 1 du site internet de Life Imaging Services Efringerstrasse 79, CH-4057 Basel, Switzerland. (<http://www.lis.ch/thechamber.html> vu le 13 juin 2018)

Le principe d'utilisation de la chambre de microscopie Ludin (**Figure IV-7**) est le même, à quelques exceptions près. En effet, le support de microscopie des GUV est alors une lamelle polylysinée circulaire de 18 mm de diamètre et la chambre n'est pas fermée, ce qui est permis par la présence des canaux de lavage intégrés (pas besoin de fixer des aiguilles). D'autre part, la suspension de GUV est transférée, puis est réalisée la dilution par ajout de PBS, jusqu'à 1,4 mL, volume nécessaire pour un lavage du milieu efficace avec ce système.

3. Microscopie confocale

En microscopie photonique non confocale en transmission qualifiée de « plein champ », un échantillon suffisamment fin, (quelques dizaines de micromètres d'épaisseur), sur un support plan est éclairé de façon normale par un faisceau de lumière blanche, dont certains rayonnements sont absorbés par l'échantillon et d'autres transmis, notamment dans le même axe que le faisceau incident. Un ensemble de lentilles focalise la lumière transmise dans cet axe ainsi qu'une partie de la lumière diffusée en sortie d'échantillon, ce qui permet de visualiser la lumière transmise de l'échantillon et donc l'échantillon lui-même, avec un grossissement. La microscopie photonique en transmission classique permet d'observer des échantillons fins, avec l'inconvénient que l'image obtenue est parasitée par les structures présentes en dessous et au-dessus du plan de focalisation. La microscopie confocale permet de pallier ce problème.

En microscopie confocale laser, la lumière incidente est monochromatique, (une seule longueur d'onde précise \pm incertitude), et fournie par un laser. Le rayon laser est focalisé sur un point précis de l'échantillon, dans son épaisseur, (classiquement dit « dans l'axe z », qui est normal au plan de support de l'échantillon), et à une position horizontale donnée, (classiquement dit « dans le plan xy », qui est coplanaire au plan de support de l'échantillon). La lumière transmise par l'échantillon, dans la même direction que le rayon incident, est ensuite focalisée sur un trou dont le diamètre est réglable à l'aide d'un diaphragme, derrière lequel se situe un détecteur, comme un photomultiplicateur (PMT). Le laser ainsi focalisé réalise un balayage de l'échantillon sur des positions adjacentes deux à deux dans un plan xy à une même hauteur z. En microscopie confocale, est donc visualisée une coupe fine de l'échantillon, parallèle à la surface de la lame porte-échantillon, non parasitée par les structures présentes en dessous et au-dessus du plan de focalisation. Le diaphragme permet notamment de régler l'épaisseur en z de la couche qui est visualisée.

L'acquisition d'une image se fait donc point par point, puis ligne par ligne, jusqu'à obtenir une image complète avec un nombre de pixels donné. Les lignes indépendamment, ou l'image entière, peuvent être moyennées, ou accumulées. L'accumulation de l'image entière consiste à acquérir plusieurs fois la même image (toujours point par point puis ligne par ligne), puis d'additionner les pixels d'une image respectivement à chacun des pixels correspondant des autres images d'un même objet. L'accumulation permet souvent de pallier des problèmes de sensibilité, en augmentant le rapport signal-sur-bruit. De plus, elle a l'avantage majeur, d'une part d'être une amplification expérimentale qui ne nécessite pas de traitement informatique qui pourrait biaiser la réalité de façon non linéaire, d'autre part elle permet la prise en compte de plusieurs acquisitions correspondant à des répliques techniques.

En plus de la transmission confocale, il est aussi possible d'obtenir la fluorescence confocale d'une image en utilisant le même principe que décrit précédemment, avec des modifications décrites ci-après. Le laser permet d'exciter un fluorophore en un point précis de l'échantillon et à une longueur d'onde donnée et la lumière est récupérée à 180° par rapport au sens de progression du rayon laser incident. La lumière récoltée est donc seulement issue de la fluorescence du fluorophore et ne contient pas de signal issu de la transmission. Il est particulièrement

utile de faire des accumulations d'image présentant de faibles niveaux de fluorescence, tout en se méfiant des risques de visualiser de l'autofluorescence qui serait aussi bien amplifiée par les accumulations.

Le microscope confocal utilisé est un Leica TCS SP5 possédant des filtres acousto-optiques ajustables (AOTF) permettant de sélectionner la longueur d'onde du laser incident si plusieurs lasers sont activés en même temps et de sélectionner les longueurs d'ondes de fluorescence émises et collectées par le photomultiplicateur. L'avantage est qu'il est possible de collecter de façon séparée, via plusieurs canaux distincts (ici deux), des longueurs d'ondes de fluorescence dans différentes gammes, issues de différents fluorophores. En pratique, nous préférons utiliser un seul canal à la fois en excitant un seul fluorophore.

Les sources de lumière disponibles sur le microscope confocal sont : Diode 405 nm, Laser Argon 458 nm, Laser Argon 476 nm, Laser Argon 488 nm, Laser Argon 496 nm, Laser Argon 514 nm, Laser Hélium-Néon 543 nm et Laser Hélium-Néon 633 nm.

Afin de visualiser les GUV efficacement en microscopie optique, il est nécessaire d'utiliser un microscope muni d'un contraste interférentiel différentiel (DIC) qui permet de visualiser les interfaces entre deux milieux d'indices de réfraction optique différents, comme par exemple le tampon et les bicouches de phospholipides. Les microscopes utilisés sont tous munis de ce type de contraste DIC.

3.1. TRAITEMENT DES IMAGES

Les images de microscopie confocales présentées sont définies en niveaux de gris et seront colorisées pour les images en fluorescence, ou pas pour les images en transmission. L'image enregistrée à partir d'une prise de vue comprend initialement 4095 niveaux de gris, allant, pour une image donnée, du noir correspondant à un signal nul, (pas de photon détecté), au blanc correspondant à un signal maximum, (détection d'une quantité maximale de photons, voire saturante si elle est trop grande). Il est possible de modifier le nombre de niveaux de gris pour l'ajustement subjectif de l'aspect d'une image et je l'ai fait quasi-systématiquement pour les images de ce manuscrit afin de souligner mes observations.

Il y a deux façons de diminuer les niveaux de gris. L'augmentation du seuil bas des niveaux de gris va faire tendre l'ensemble des pixels vers le noir, (pas de signal), et plus les pixels sont foncés, (peu de signal), plus ils tendront comparativement vers le noir pour une augmentation donnée. Cette augmentation est donc utile pour la **diminution subjective du bruit de fond**. La diminution du seuil haut des niveaux de gris va faire tendre l'ensemble des pixels vers le blanc, (signal maximal), et plus les pixels sont clairs, (beaucoup de signal), plus ils tendront comparativement vers le blanc pour une diminution donnée. Cette diminution est donc utile pour l'**augmentation subjective du signal**.

La quantification des signaux d'intérêt présents sur les images est très importante pour avoir des résultats objectifs et comparer avec les contrôles, mais elle omet la répartition des niveaux de gris sur la surface de l'image et est donc insuffisante pour interpréter et critiquer les résultats. Il est donc important de présenter les images, en plus des quantifications, afin d'avoir un aperçu de la localisation, de la répartition et des intensités relatives des signaux relativement à la position des objets étudiés.

Le signal de chaque image vient toujours avec un bruit de fond, souvent différent, en répartition et en intensité, en fonction des images, en fonction des fluorophores, de la concentration en fluorophore... Il est donc nécessaire de normaliser le signal mesuré (S) par le bruit de fond mesuré (B) en faisant le rapport « signal sur bruit » (S/B). Ainsi, la comparaison de plusieurs conditions se fera uniquement en se basant sur les rapports S/B de chacune des conditions et du rapport S/B du contrôle. Cependant, il est important de noter que le bruit de fond varie beaucoup en fonction de la longueur d'onde d'excitation et que le signal dépend beaucoup du fluorophore. Par conséquent, il est peu judicieux de comparer les rapports signal sur bruit à deux longueurs d'ondes d'excitation différentes, de surcroît si cela concerne deux fluorophores distincts. Certaines expériences a priori comparables n'ont pas systématiquement été faites dans les mêmes conditions d'acquisition, mais j'ai néanmoins fait certaines comparaisons avec des longueurs d'ondes d'excitation variables, mais toujours pour un même fluorophore. Il est indispensable que le lecteur ait à l'esprit *i*) les limites de ces comparaisons et *ii*) que j'ai pleinement conscience de ces limites et de l'honnêteté scientifique minimum requise pour se permettre une affirmation dans ces conditions. Affirmations qui, dans le cas d'une interprétation litigieuse, seront donc toujours conditionnées à la réalisation nouvelle de réplicas et à des contrôles rigoureux et suffisants, même si cela n'est pas explicitement mentionné.

Par exemple, en toute rigueur dans les conditions ci-après, la seule condition permettant d'affirmer une colocalisation de deux protéines est l'existence d'un transfert d'énergie résonnant, (Fluorescence Resonance Energy Transfer, ou FRET), entre les fluorophores des deux protéines. La superposition des signaux de deux images donne potentiellement une *indication*, à condition de normaliser les signaux de chacune des images avant de les superposer, mais n'est en aucun cas une preuve. En effet, une superposition de deux images donne une résolution spatiale très limitée liée à la limite de résolution du microscope et la fluorescence de différents fluorophores ne peut pas être comparée. Il n'y a alors aucun moyen d'affirmer qu'il y a colocalisation à l'échelle moléculaire, même si les résultats sont reproductibles, simplement parce que la technique n'est pas adaptée à ce qui est recherché. Ainsi, je ne réalise pas de superposition d'images prises avec plusieurs fluorophores différents.

La détermination du rapport signal sur bruit de la membrane des GUV (S/B) a été faite en faisant *la moyenne de l'intensité mesurée*, (qui est donc totalement indépendante de tout traitement informatique des images), de l'ensemble des pixels formant *la membrane de la GUV*, puis en la divisant par *la moyenne de l'intensité mesurée*, (indépendante de toute traitement informatique des images), de l'ensemble des pixels présents *à l'extérieur de la GUV excepté les structures caractéristiques qui seraient présentes*, comme les réservoirs sans GUV, d'autres GUV, ou encore des agrégats caractéristiques.

Pour des raisons de comparaison avec un contrôle négatif, qui seront décrites dans la partie résultats, (**Figure IV-18**), j'ai choisi arbitrairement de considérer que la fluorescence à la membrane traduisait un recrutement membranaire des protéines cytosoliques si et seulement si le rapport signal sur bruit était supérieur ou égal à 1,5.

4. Microinjection

La microinjection est une technique permettant la **nébulisation** d'une solution, ou d'une suspension à granulométrie faible, à une échelle micrométrique. Le liquide à nébuliser est contenu dans une micropipette capillaire,

(que j'abrège en « micropipette » dans la suite), fabriquée à l'aide d'une étireuse, (Narishige PC-100), par étirement d'un microcapillaire en verre borosilicate à paroi fine contenant un filament pour faciliter le remplissage, (Worl Precision Instruments TW100F-4). Un injecteur, (Eppendorf Femtojet), permet d'appliquer une pression à la surface du liquide, provoquant son expulsion au niveau de la pointe. L'expulsion du liquide hors de la pipette implique l'effet Venturi, ce qui permet d'obtenir une nébulisation dont la coupe focale observée est globalement parabolique. La micropipette est fixée sur un support conçu par le laboratoire de Stéphane Arbault et le support est micromanipulé à l'aide d'un micromanipulateur, (ThorLabs PCS5200).

Il est possible de nébuliser à l'intérieur de la GUV, je parlerai alors d'**injection**, (et les catégories lexicographiques associées), ou encore de **nébulisation interne**, (et les catégories lexicographiques associées). Lorsque la nébulisation se fait à l'extérieur, je parle de **nébulisation externe**, (et les catégories lexicographiques associées). Un schéma illustrant ces deux types de nébulisations est présenté en **Figure IV-8**.

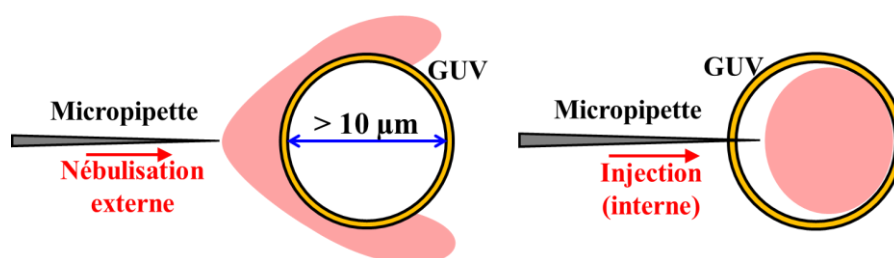


Figure IV-8. Schémas illustrant la nébulisation externe à gauche, ou l'injection (nébulisation interne) à droite.

La nébulisation externe proche de la membrane nécessite simplement d'approcher la pointe de la micropipette de la membrane de la GUV, puis de réaliser la nébulisation. Il faut cependant s'assurer que le flux ne soit pas trop fort, ce qui risquerait de décrocher la GUV de son support.

En pratique, si la pipette est bouchée par une bulle ou par un agrégat, nous avons aussi parfois cassé délicatement la pointe de la micropipette sur la lame ou lamelle de microscopie à l'aide du micromanipulateur, afin de réaliser la nébulisation plus facilement.

Pour l'injection, (nébulisation interne), il est très important que le liquide ne contienne pas d'agrégat qui risquerait de boucher la micropipette. Par conséquent, j'ai centrifugé les échantillons, (au moins 10000 x g pendant 3 minutes), après les avoir soniqué pendant 1 minute dans un bain de sonication.

En outre, l'application de la micropipette seule sur la membrane ne suffit pas pour que la pointe soit internalisée. La membrane est en effet souple et il est nécessaire d'y créer des pores supposés transitoires par électroporation. Par conséquent, un fil de platine relié à un générateur, court à l'intérieur du capillaire et plonge dans le liquide à injecter présent dans le capillaire. Dans la chambre de microscopie est plongé un autre fil de platine qui servira de contre-électrode.

L'électroporation est donc réalisée en appliquant la pointe de la micropipette, (contenant le fil de platine), contre la membrane avec un très léger flux de liquide et en imposant simultanément de nombreuses impulsions de différences de potentielles de 10 à 40 V·cm⁻¹ pendant de courte durée, (20 ms), à l'aide d'un générateur, (Digitimer

DS2A), jusqu'à ce que l'extrémité de la micropipette pénètre dans la GUV. Cette électroporation est soupçonnée de provoquer l'oxydation d'une portion des phospholipides de la membrane et de causer des pores permanents (398) mais je ne m'intéresserait pas à ce phénomène.

4.1. FABRICATION DES MICROPIPETTES

L'étirement des micropipettes est réalisé avec l'étireuse verticale Narishige PC-100 avec un niveau de chaleur donné à 80 et un lestage maximum. Après étirement, les micropipettes sont fixées horizontalement sur un morceau épais de Patafix collé dans le fond d'une boîte de Pétri qui est ensuite fermée.

Les micropipettes doivent être faites au maximum quelques jours avant l'expérience. Elles deviennent empiriquement de plus en plus difficiles à remplir avec le temps de conservation.

4.2. REMPLISSAGE DES MICROPIPETTES

Pour remplir les micropipettes, la première étape est le prélèvement d'au moins 50 μL du liquide à injecter dans un cône classique de 200 μL . Puis, est fixé sur ce cône de 200 μL un cône Eppendorf Microloader qui possède une pointe longue et suffisamment fine pour être insérée d'une extrémité à l'autre du capillaire.

La pointe du cône Eppendorf Microloader est insérée dans le capillaire par l'extrémité opposée à la pointe, puis le liquide est délivré progressivement dans la micropipette, tout en ressortant la pointe du cône Eppendorf Microloader au fur et à mesure du remplissage.

À la suite du remplissage, des bulles persistent toujours au niveau de la pointe de la micropipette. Pour faire sortir les bulles, il est possible de tenir le haut de la micropipette entre le pouce et l'index de la même main et de tapoter le milieu de la micropipette à l'aide du majeur et de l'ongle du majeur de la même main en tenant la micropipette verticale.

Une autre technique est de fractionner les bulles en plus petites autres bulles en tenant le haut de la micropipette d'une main et en tapotant doucement mais fermement le corps de la micropipette avec le plat d'une lame de microscopie. Il est aussi possible d'alterner les deux méthodes en fonction des besoins.

La vérification de l'absence de bulles se fait au microscope optique à grossissement 200x. La micropipette est alors fixée sur un morceau de Patafix épais, qui est collé sur une lame de microscopie qui est posée sur une platine de microscope sans support spécifique.

5. Microélectrochimie

La microélectrochimie a été réalisée comme indiqué dans le **CHAPITRE III**, à l'exception que celle-ci s'est faite dans la suspension de GUV ou de FM-GUV, sous microscope. La polarisation de l'électrode a été faite à 0,3 V contre AgCl/Ag directement sous microscope, dans du PBS contenant du NADPH.

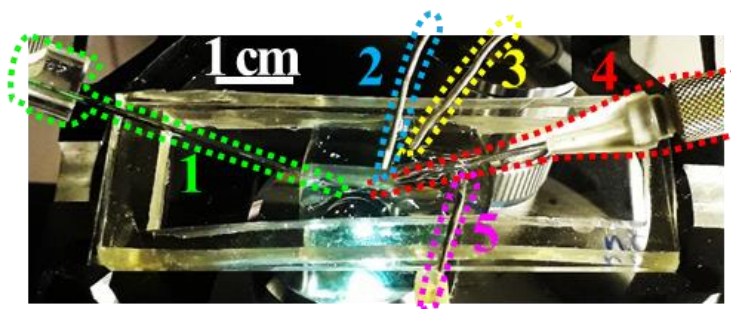


Figure IV-9. Schéma du dispositif expérimental utilisé pour l'électrochimie sous microscope et l'électroportation.

Photo modifiée, empruntée à Pauline Lefrançois.

- 1** : Electrode de travail à fibre de carbone platinée ($10 \mu\text{C}$).
- 2** : Electrode de référence AgCl/Ag.
- 3** : Contre-électrode pour la mesure du courant (électrode auxiliaire) en platine.
- 4** : Micropipette munie d'une électrode en platine pour l'électroportation.
- 5** : Contre-électrode en platine pour l'électroportation.

Le système de microélectrochimie utilisé ici est le même que celui utilisé et décrit dans le **CHAPITRE III**.

C. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Préalables sur la forme des résultats de microscopie présentés

Dans un premier temps, afin de faciliter la lecture des résultats et de prendre en compte les détails techniques nécessaires à la critique constructive d'un cliché de microscopie de fluorescence, le lecteur doit se familiariser aux conventions d'affichages utilisées. Les résultats sont principalement affichés sous forme de clichés de microscopie, par transmission ou de fluorescence. Les conventions pour les images de microscopie de fluorescence sont données en **Figure IV-10**.

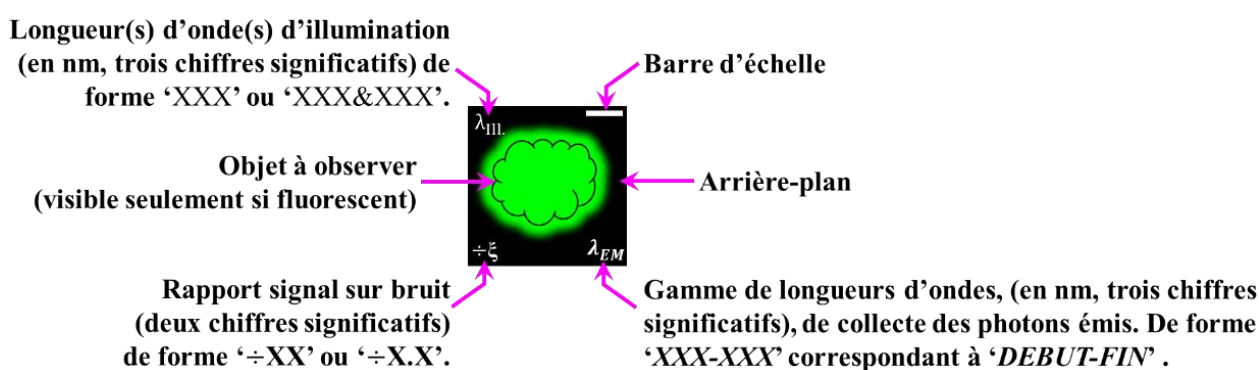


Figure IV-10. Conventions d'affichage des images de microscopie de fluorescence.

L'image est le carré noir central présentant l'objet à observer en vert et des annotations en blanc correspondant à des caractéristiques de la prise de vue, légendées latéralement.

Chaque cliché de microscopie est de forme carrée et porte une barre d'échelle en blanc située en haut à droite. Sur chacune des images de microscopie de fluorescence montrées ci-après, la, ou les, longueurs d'ondes d'illumination sont affichées en haut à gauche ('405' ou '458' ou '488' ou '514' ou '543' ou '633' ou '405&458' ou '514&543'). De plus, la gamme de longueur d'onde de collecte des photons est affichée en chiffres gras-italique en bas à droite ('*début-fin*'). Les longueurs d'ondes sont toutes en nanomètres avec trois chiffres significatifs.

Le rapport 'signal-sur-bruit' correspondant à la membrane est affiché en gras en bas à gauche de chaque image (lorsqu'approprié), précédé du signe \div avec deux chiffres significatifs (' $\div XX$ ' ou ' $\div X.X$ ').

Dans le cas où plusieurs clichés sont montrés sur une même figure et si j'ai jugé qu'il y a un risque d'incompréhension, j'ai parfois utilisé des cadres rouges permettant de regrouper des images ayant des points communs décrits soit directement sur la figure, soit dans sa description.

Des mentions supplémentaires, visant à faciliter la lecture des images et des figures, sont le cas échéant affichées en jaune sur la figure et les abréviations associées sont définies dans sa description. Par ailleurs, les caractéristiques de chaque ligne ou de chaque colonne d'images sont respectivement affichées en bout de ligne à droite ou à gauche, ainsi qu'en début de colonne en haut.

Il est important de noter qu'à une figure donnée correspond un type d'expérience. Dans certains cas litigieux ou pour illustrer plus précisément mes propos, des répliques peuvent aussi être montrés sur une même figure.

2. Elaboration de NOX-GUV

2.1. INJECTION D'UNE SUSPENSION DE FM

Afin de déterminer si la FM peut s'intégrer spontanément à la membrane de la GUV à partir de l'intérieur, l'injection d'une suspension de FM marquées avec de l'Alexa Fluor® 488, (FM488), a été réalisée et la fluorescence de la FM488 a été visualisée au temps zéro, (juste après l'injection), puis vérifiée après 75 minutes d'incubation. Ces résultats sont présentés **Figure IV-11**.

Nous avons eu l'opportunité de choisir deux GUV sur le même champ de microscopie, ce qui a permis de réaliser l'injection dans une seule des deux (**Figure IV-11** cadre '**Injection**') et d'utiliser la deuxième comme témoin technique négatif. Les aliquots (50 µL) de FM488 doivent toujours, au préalable, être décongelé lentement sur glace, puis soniqués en bain de sonication pendant 5 minutes avec des pauses 30 secondes en glace toutes les 30 secondes. Cela permet de casser les agrégats de FM488.

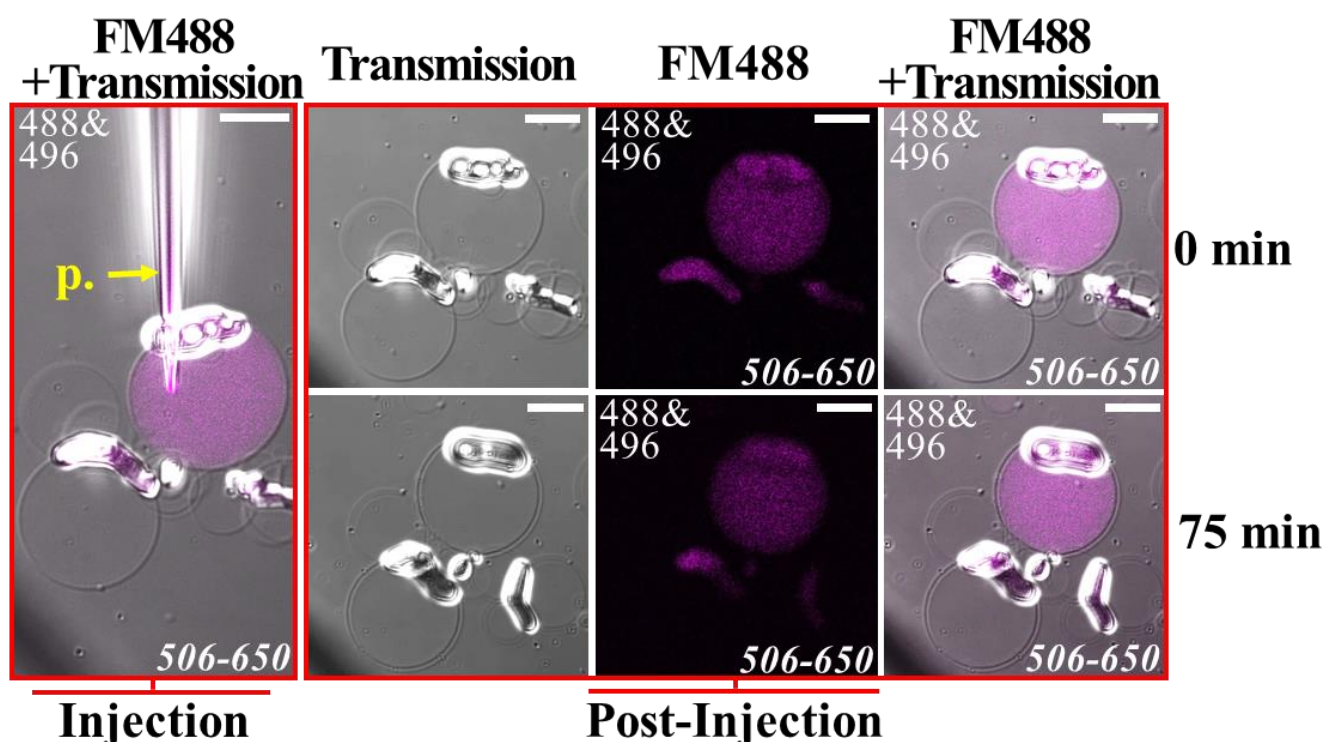


Figure IV-11. Effet de l'injection dans une GUV d'une suspension de FM488 en fonction du temps.

Les GUV sont fixées sur une lamelle fonctionnalisée avec de la poly-L-lysine. La suspension de FM488 (1,5 Alexa Fluor® pour 1 Cyt_{b558}) contient 100 nM de Cyt_{b558}. Pendant l'injection, ou à 0 min ou 75 min après l'injection. Les images sont prises en microscopie confocale à fluorescence. La transmission est munie d'un DIC. Grossissement 200x. Barre d'échelle 25 µm. p.<=>micropipette.

Pendant l'injection, la fluorescence est exclusivement visible à l'intérieur de la GUV injectée, mais aussi dans son réservoir et dans les autres réservoirs proches. Immédiatement après l'injection, à la suite du retrait de la micropipette ('0 min'), il est visible dans le cadre '**Post-Injection**' que la fluorescence est toujours localisée exclusivement à l'intérieur de la GUV injectée, dans son réservoir mais aussi dans les réservoirs des GUV voisines. Par conséquent, soit les membranes des GUV forment un réseau via lequel les FM peuvent passer par diffusion latérale, soit il s'agit surtout de l'autofluorescence des lipides du réservoir. Le rapport signal-sur-bruit *du réservoir de la GUV en bas à gauche*, (fluorescence moyenne du réservoir divisé par la fluorescence moyenne à l'intérieur de la GUV non

injectée), est de 3,4 juste après l'injection ('0 min') et de 2,4 après 75 minutes d'incubation ('75 min'). En outre, une expérience identique en présence de FM non marquée a permis de déterminer que le rapport signal-sur-bruit d'un réservoir en absence de fluorophore est de 1,7. Par conséquent, la fluorescence des réservoirs est, dans ce cas, (**Figure IV-11**), supérieure à leur autofluorescence et il semble donc qu'effectivement la FM488 s'accumule notamment dans les réservoirs des GUV voisines via un mécanisme indéterminé impliquant probablement des réseaux lipidiques.

Par ailleurs, aucune surintensité de fluorescence n'est visible au temps zéro à la membrane. L'intégration des FM à la membrane du liposome pouvant être cinétiquement limitée, la préparation a été incubée 75 minutes à température ambiante, (environ 22 °C), en absence d'illumination (pour éviter le photoblanchiment), pour voir l'évolution du profil d'intensité de fluorescence. Après 75 minutes, l'intensité de fluorescence à l'intérieur de la GUV a diminué. Dans la GUV injectée, le rapport signal-sur-bruit était en effet de 4,1 juste après l'injection, puis de 3,3 après 75 minutes d'attente.

Le rapport signal-sur-bruit a été déterminé en prenant comme signal l'intensité de fluorescence moyenne sur une surface de 863,3 μm^2 à l'intérieur la GUV injectée, et comme bruit l'intensité de fluorescence moyenne sur la même surface dans la GUV non injectée en bas à gauche. Ainsi, la diminution du rapport signal-sur-bruit en fonction du temps signifie soit que les FM peuvent traverser lentement les membranes des GUV, soit que le fluorophore est progressivement altéré. Comme le rapport signal-sur-bruit de la fluorescence des réservoirs des GUV adjacentes diminue aussi entre 0 et 75 minutes, j'estime que l'altération du fluorophore est prépondérante dans cette gamme de temps, plutôt qu'une fuite des FM.

Après 75 minutes, il n'y a toujours pas de surintensité à la membrane de la GUV, ce qui signifie, soit qu'il n'y a pas de localisation, (ni intégration ni adsorption), des FM à la membrane de la GUV, soit que la fluorescence de la membrane intégrée en z dans la coupe confocale est en dessous du seuil de sensibilité, notamment par rapport à l'intensité de la fluorescence à l'intérieur de la GUV, (problème de contraste).

L'Alexa Fluor® 488 est quelque peu altéré dans ces conditions sans illumination en 75 minutes et les FM488 ne sont pas détectées à la membrane des GUV soit parce qu'elles n'y sont pas localisées spécifiquement, soit à cause d'un manque de contraste. L'injection de FM dans une GUV ne semble donc pas adaptée à l'intégration des FM à leur membrane et la membrane des GUV est imperméable aux FM. Il semble en revanche y avoir une connexion entre des GUV adjacentes permettant aux FM de passer d'un réservoir à un autre, ce qui suggère donc que les FM ont une affinité particulière pour la structure du réservoir mais que celle-ci n'est pas suffisante pour une intégration membranaire.

2.2. REHYDRATATION DES SUV MULTILAMELLAIRES EN PRESENCE DE FM488

Une deuxième tentative d'insertion des FM dans les membranes des GUV a consisté en la réhydratation d'un dépôt de SUV-MLV en présence de FM488 dans du PBS. Nous avons fait l'hypothèse que la membrane des vésicules de FM pourrait fusionner avec la membrane des GUV pendant le processus de gonflement. Dans cette partie, les différentes étapes de la manip sont détaillées successivement.

2.2.1. REHYDRATATION

Dans cette première étape, je présente la phase de réhydratation du dépôt sec de SUV multilamellaires en présence de FM488.

La **Figure IV-12** présente des images de trois champs de microscopie différents, (**A**, **B** et **C** correspondant respectivement chacun à un champ), présentant des GUV néoformées 15 minutes après la réhydratation du dépôt sec de SUV-MLV, baignant dans le milieu de réhydratation contenant des FM488 à une concentration équivalente à 100 nM de *Cytb₅₅₈*. Le nombre de GUV par champs et la taille des GUV, sont subjectivement moins importants à cette étape que lorsque les GUV sont préparées en absence de FM. La présence de FM488 dans le milieu de réhydratation permet donc la formation limitée mais suffisante de GUV.

Sont observées en transmission de petites particules dans le milieu de réhydratation, ainsi qu'une hétérogénéité de la fluorescence, majoritairement associée à ces particules. Nous avons constaté que soniquer la FM pendant 5 minutes dans un bain de sonication avec des pauses 30 secondes en glace toutes les 30 secondes de sonication avant de préparer le milieu de réhydratation, est efficace afin de réduire la taille de ces agrégats ; qui sont probablement dus à la centrifugation qui a suivi le marquage des FM avec l'Alexa Fluor® 488. Ces particules et points fluorescents peuvent donc être attribués à de la FM488 agglomérée.

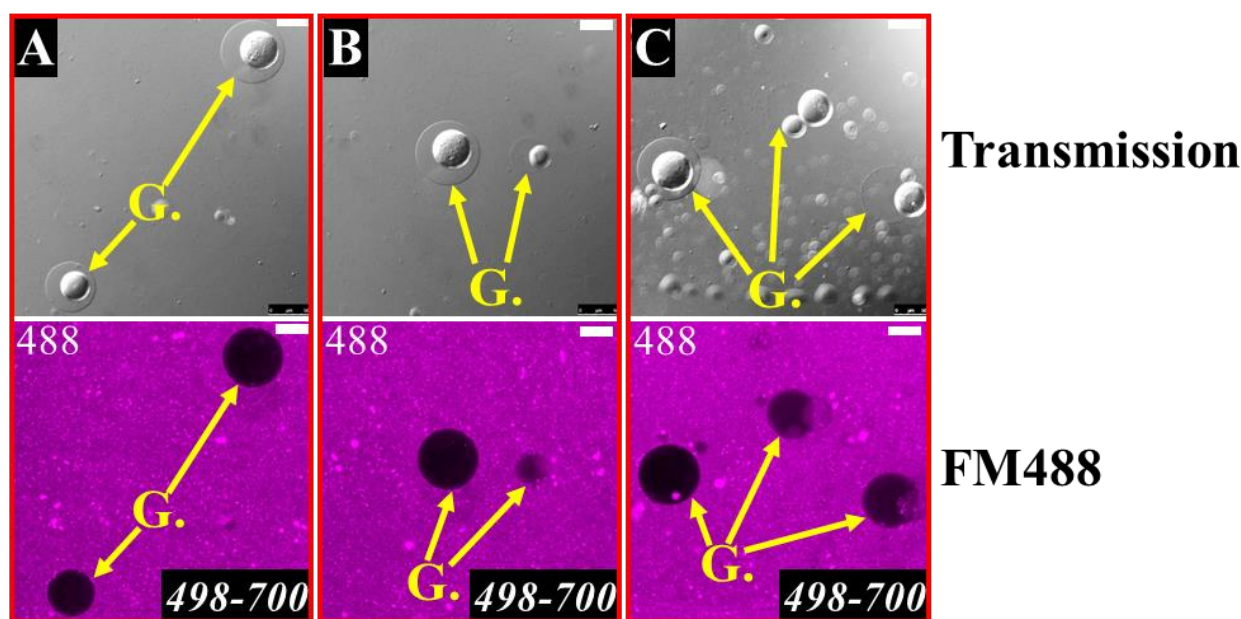


Figure IV-12. SUV multilamellaires réhydratées en présence de FM488.

La suspension de réhydratation contient des FM488 (1,5 Alexa Fluor® pour 1 *Cytb₅₅₈*) en quantité volumique correspondante à 100 nM de *Cytb₅₅₈*. Les images sont prises en microscopie confocale à fluorescence. La transmission est munie d'un DIC. Grossissement 200x. Barre d'échelle 50 μ m. (**A**), (**B**) et (**C**) Correspondent respectivement à trois champs de microscopie différents sur une même préparation. G.<=>GUV.

Il est aussi intéressant de constater que la fluorescence à l'intérieur des GUV est beaucoup plus faible qu'à l'extérieur, (rapport signal moyen intérieur sur signal moyen extérieur entre 0,2 et 0,4 selon les champs). Il semblerait donc que le processus de formation des GUV implique un gonflement principalement osmotique qui ne permet pas aux particules insolubles d'être encapsulées. Or, l'absence de FM à l'intérieur des GUV est un critère important pour le système que je souhaite développer, cette caractéristique est donc encourageante. Néanmoins, les images semblent

montrer un gradient hétérogène de fluorescence de la membrane vers le centre de la section circulaire de GUV observée. Nous avons montré précédemment que la membrane des GUV est imperméable aux FM488. Je fais l'hypothèse que si les FM ne peuvent pas sortir elles ne peuvent pas non plus entrer et exclue donc la possibilité d'une diffusion des FM488 de l'extérieur vers l'intérieur. Une seconde explication pour ce gradient de fluorescence pourrait être simplement la détection d'un signal de fluorescence parasite provenant de la membrane de la GUV au-dessus ou en dessous de la section observée et qui n'est pas filtré par la confocalité. L'impression de gradient serait alors due à la sphéricité de la membrane dont la courbure impose une hauteur d'intégration en z de plus en plus faible en fonction de la proximité du centre et de plus en plus forte jusqu'à la périphérie membranaire de la coupe confocale. De plus, la membrane des GUV semble subjectivement bien délimitée par une couronne brillante, mais je n'ai pas réussi à quantifier cette observation, l'intensité du fond étant trop forte, (problème de contraste).

A ce stade, des GUV ont été formées avec succès en présence de FM488 séquestrée à l'extérieur et la fluorescence à la membrane semble visuellement plus intense et bien délimitée.

2.2.2. FIXATION DES GUV SUR UNE LAMELLE ET LAVAGE

À la suite de la réhydratation, la suspension de GUV+FM488 est transférée sur une lamelle fonctionnalisée avec de la poly-L-lysine placée dans un dispositif permettant l'échange du tampon, comme par exemple la chambre d'observation Ludin. La suspension est ensuite diluée, ce qui permet d'augmenter le volume pour faciliter le lavage et diminuer les problèmes liés à l'évaporation, (les expériences sur une même préparation de GUV peuvent durer plusieurs dizaines de minutes, voire quelques heures. Il est donc nécessaire de mettre un volume assez grand pour que l'évaporation ait moins d'effet sur la concentration en sels qui peut perturber la structure des GUV). Ensuite, il est nécessaire de laisser un temps de sédimentation d'une dizaine de minutes permettant à une quantité suffisante de GUV de se fixer à la surface fonctionnalisée poly-L-lysine. Enfin, l'échange de milieu est réalisé avec du PBS afin d'enlever un maximum de FM488 non fixées aux GUV. La **Figure IV-13** présente l'effet du lavage, (échange du tampon), sur l'aspect des GUV et de l'arrière-plan et permet de vérifier s'il est efficace pour le retrait des FM488 libres en suspension.

Nous constatons avant lavage et après lavage, que le fond présente toujours des agrégats peu visibles en transmission mais bien visibles en fluorescence. Comme les FM sont des vésicules issues de membranes naturelles, il est possible qu'elles interagissent avec la poly-L-lysine et s'y fixent, il s'agit donc probablement d'agrégats de FM488 fixées sur la lamelle de verre fonctionnalisée.

Le lavage impose qu'il y ait un flux de tampon impliquant à l'échelle micrométrique de fortes turbulences risquant de favoriser l'entraînement des GUV dans le flux, rendant les expériences impossibles. Or, à la suite du lavage, la GUV est toujours présente, ce qui signifie que la poly-L-lysine est efficace pour l'attachement des GUV à la surface. En cours de lavage, nous pouvons néanmoins constater que de nombreuses GUV non fixées ou pas assez bien fixées sont emportées par le flux.

La fluorescence du réservoir est saturée, ce qui signifie que dans le processus de réhydratation, les FM488 sont densément intégrées dans le réservoir. La membrane de la GUV est fluorescente et cette fluorescence a une composante hétérogène. Les particules fluorescentes conférant l'hétérogénéité dans la membrane sont très mobiles sur la surface de la membrane, notamment pendant le lavage. Il est clairement visible sur la **Figure IV-13** que ces particules ne sont pas au même endroit avant ou après le lavage, elles sont en fait mobiles à la surface de la membrane. Les positions relatives de la GUV et de son réservoir peuvent changer légèrement en fonction du temps en absence de perturbation extérieure, ou beaucoup en appliquant une contrainte externe, comme ici le flux lié au lavage. Très souvent, nous avons constaté que c'est le réservoir qui se fixe au support plutôt que la membrane de la GUV elle-même.

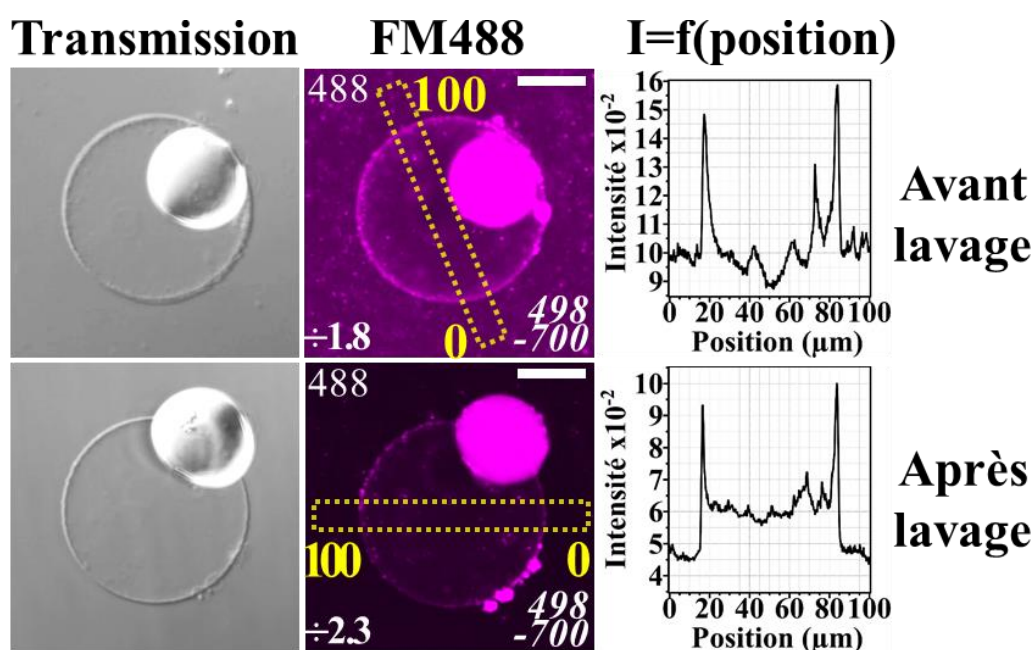


Figure IV-13. Effet du lavage de la suspension observée, sur une GUV fixée sur lamelle fonctionnalisée poly-L-lysine.

Deux conditions sont présentées, avant lavage ou après lavage. La transmission est munie d'un DIC. Grossissement 200x. Barre d'échelle 25 μm . Le profil de l'intensité de fluorescence (sans dimension) moyenne des pixels sur 10 μm de large en fonction de la position de 0 à 100 μm le long des encadrés pointillés, respectivement avant ou après lavage, est présenté à droite.

Le profil de l'intensité de fluorescence moyenne, (en ordonnée), d'une rangée de pixels sur 10 μm de large, (petit côté du rectangle en pointillés jaunes sur la **Figure IV-13**), en fonction de la position de cette rangée de 0 à 100 μm , (en abscisse, côté long du rectangle en pointillés jaunes sur la **Figure IV-13**) le long de la zone encadrée en pointillés sur ces deux figures, est présenté sur la droite. Ces profils montrent qu'avant lavage, la fluorescence moyenne à l'intérieur de la GUV est similaire à la fluorescence moyenne à l'extérieur de la GUV et que la membrane présente une fluorescence environ 1,5 fois plus forte que cette moyenne. Après lavage, la fluorescence moyenne à l'intérieur de la GUV est environ 1,3 fois supérieure à la fluorescence à l'extérieur de la GUV alors que la membrane présente une fluorescence environ 1,5 fois supérieure à celle de l'intérieur de la GUV. Le fait que la fluorescence interne soit supérieure à la fluorescence externe alors que la membrane des GUV est imperméable aux FM signifie que la confocalité d'excitation et de collecte des photons n'est pas parfaite et que certains photons issus de la membrane au-dessus ou en dessous du plan confocal sont collectés à la suite d'une illumination à la longueur d'onde donnée. Cela souligne d'ailleurs l'aspect tridimensionnel de la GUV.

Par ailleurs, le rapport signal-sur-bruit de la fluorescence moyenne de la membrane par rapport à la fluorescence moyenne de l'extérieur de la GUV est de 1,8 avant lavage ou de 2,3 après lavage. Cela signifie que le bruit de fond est en effet légèrement réduit par rapport au signal et que le lavage est efficace. Le signal a été mesuré en prenant la fluorescence moyenne le long de la membrane en considérant naïvement la totalité de la membrane visible d'une épaisseur constante, c'est-à-dire sans détourner les excroissances fluorescentes à la surface de la membrane. La fluorescence de la membrane n'a pas été prise en compte lorsque celle-ci traverse le réservoir, même si la membrane se distingue du réservoir. Le bruit a été quantifié en considérant la moyenne de fluorescence exclusivement à l'extérieur de la GUV et de son réservoir, sur l'entièreté du champ de microscopie, en excluant les structures caractéristiques, (autres GUV, réservoirs, agrégats clairement définis ou encore micropipette).

Néanmoins, beaucoup de FM restent collées à la poly-L-lysine, ce qui ne gêne pas trop l'observation, mais pourrait gêner les mesures d'activité de l'enzyme. *Il faudrait idéalement trouver un moyen de laver les GUV avant de les transférer sur la lamelle fonctionnalisée poly-L-lysine. Ceci reste, pour l'heure, un défi technique dans la mesure où le lavage est un processus générateur de fortes turbulences à l'échelle des GUV, qui risquent donc d'être emportées par le flux.*

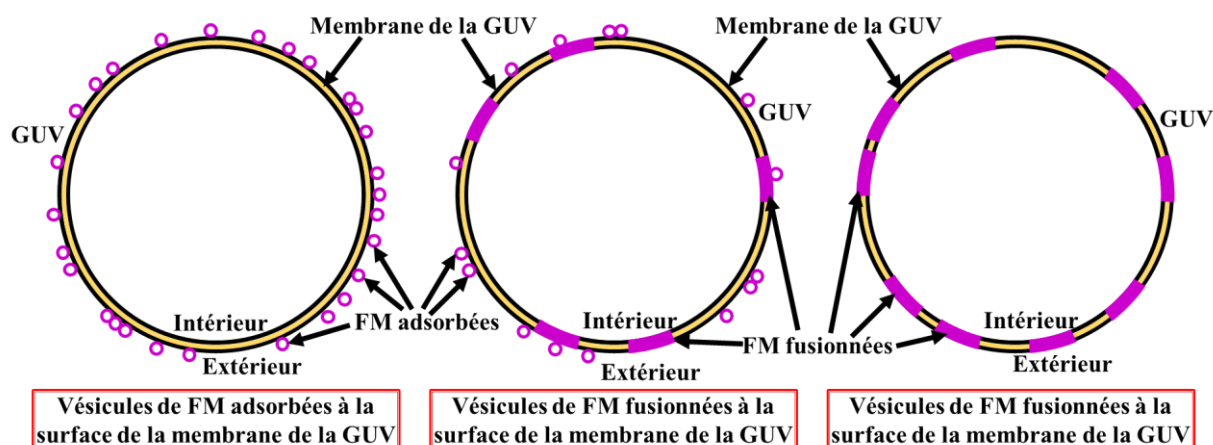


Figure IV-14. Schéma des trois hypothèses de FM-GUV pouvant être faites suite à la visualisation des FM488 à la membrane des GUV. Schéma qui n'est pas à l'échelle. **A gauche** toutes les FM sont adsorbées à la surface de la membrane de la GUV, **au milieu** une partie des FM est adsorbée à la surface de la membrane de la GUV et une autre partie est fusionnée à la membrane de la GUV, **à droite** toutes les FM sont fusionnées à la membrane de la GUV.

De plus, ce résultat fournit l'information que la FM est localisée principalement à la membrane des GUV et dans leur réservoir, mais je ne suis pas en mesure d'affirmer si les FM sont adsorbées à la surface des GUV ou si les protéines des FM sont bien intégrées aux membranes ou encore s'il existe une combinaison des deux (**Figure IV-14**). J'appelle « FM-GUV » ces GUV avec FM à la membrane. Les NOX-GUV sont des GUV dont la membrane contient du Cytb₅₅₈ transmembranaire, elles sont donc différentes des FM-GUV qui sont simplement des GUV présentant des FM à leur membrane, de façon non caractérisée.

Il aurait été intéressant de faire une préparation de GUV sans FM puis de nébuliser à l'extérieur une suspension concentrée en FM488, pour tester si les FM peuvent s'adsorber à la membrane une fois les GUV stables formées (expérience miroir de celle de l'injection de FM488), ou alors si la localisation membranaire nécessite d'ajouter les FM au moment du gonflement des GUV.

La réhydratation des SUV multilamellaires en présence de FM488 permet donc de former des GUV stables pouvant être transférées et fixées de façon satisfaisante sur une lamelle fonctionnalisée poly-L-lysine. Le lavage par échange du milieu permet de retirer une fraction significative des FM488 en suspension, mais celles qui se fixent à la poly-L-lysine ne sont pas évacuées. Les FM488 sont alors principalement présentes à la membrane de la GUV de façon hétérogène et mobile, ainsi que dans son réservoir. Il reste à caractériser si les FM488 sont intégrées ou juste adsorbées à la membrane, ou s'il y a une combinaison des deux. Comme je n'ai aucun moyen de savoir si le Cyt_{b558} est intégré à la membrane des GUV, j'appellerai 'FM488-GUV' des GUV ainsi formées et de façon plus générale indépendamment du fluorophore 'FM-GUV'. Enfin, la technique de formation des GUV par réhydratation de SUV multilamellaires en présence de FM488 permet d'obtenir des FM-GUV de façon reproductible, rapide et relativement facilement.

2.2.3. TESTS D'INTEGRATION DES FM A LA MEMBRANE DES GUV

Lors de la formation de GUV par réhydratation de SUV-MLV en présence de FM488, ces dernières sont séquestrées à l'extérieur des GUV dont la membrane est imperméable aux FM488. Or, les FM488 sont des SUV dont la membrane peut soit *i*) fusionner avec celle des GUV ce qui conduirait à une intégration totale des protéines et des lipides membranaires, (nous dirons que les FM sont intégrées à la membrane des GUV), soit *ii*) s'adsorber à la surface externe de la membrane des GUV, qui seront alors recouvertes de SUV adsorbées. Il est aussi possible qu'il y ait une combinaison de ces deux hypothèses (**Figure IV-14**).

Ainsi, nous avons tenté de savoir si les fractions membranaires sont intégrées à la membrane des GUV formées en présence de FM non marquées en utilisant des anticorps fluorescents monoclonaux anti-Nox2 (Santa Cruz, référence sc-130543 AF488 « gp91-phox (54.1) Alexa Fluor® 488 », se fixe sur les aa 383 à 390 de Nox2, sur sa partie C-terminale soluble), ou anti-p22^{phox} (Santa Cruz, référence sc-271968 AF647 « p22-phox (E-11) Alexa Fluor® 647 », se fixe sur les aa 133 à 159 de p22^{phox}, près de sa partie C-terminale soluble, du même côté de la membrane que la partie C-terminale de Nox2 (**Figure II-22**)). A priori, la nébulisation externe d'une solution à 2 µg/mL de ces anticorps devrait marquer la membrane des GUV quel que soit le mode de localisation à la membrane. En revanche, l'injection des anticorps ne marquerait la membrane des GUV que si les FM ont fusionnées avec elle et si l'orientation des protéines cibles est concordante, (**Figure IV-14** et **Figure III-1**).

En pratique, (résultats non présentés), l'injection des deux anticorps fluorescents, (séparément), dans les GUV n'a pas permis d'observer une surintensité de fluorescence à la membrane en microscopie confocale. En revanche, la fluorescence à l'intérieur de la GUV est importante et il pourrait y avoir un problème de sensibilité ou de contraste empêchant de voir la fluorescence membranaire. Un tel problème de contraste a déjà été constaté dans le cas où le milieu extérieur de la GUV, (**Figure IV-12**), ou son milieu intérieur, (**Figure IV-11**), est fluorescent pour une autre raison, et ce, même si la membrane est effectivement marquée.

Par conséquent, ces résultats ne me permettent pas de dire si Nox2 et p22^{phox} sont intégrées à la membrane des GUV ou juste adsorbées à leur surface. En revanche, lors d'une nébulisation externe proche de la membrane des GUV, l'anticorps anti-Nox2 se fixe, mais pas de l'anticorps anti-p22^{phox}. Cela peut signifier que cet anticorps n'est

pas efficace pour marquer p22^{phox}, (il n'a pas été testé préalablement en western-blot). Ou encore, p22^{phox} pourrait simplement être inaccessible à l'anticorps, pour des raisons d'orientation ou de dénaturation. Toutefois, alors que le marquage des FM à l'Alexa Fluor® 488 n'est pas spécifique de la protéine (Nox2 et, ou, p22^{phox}), cette présente expérience est spécifique et confirme que la protéine Nox2 est bien située à la membrane des GUV formées par réhydratation de SUV multilamellaires en présence de FM non marquées.

Afin de vérifier si les FM ont fusionné à la membrane des GUV, des tests d'activité sur les FM-GUV ont aussi été réalisés et seront présentés dans la suite (**CHAPITRE IVC.5**). Néanmoins, l'activation de l'enzyme nécessitant le recrutement membranaire des protéines cytosoliques, j'ai d'abord souhaité visualiser les interactions existantes entre les protéines cytosoliques et la membrane des GUV.

Il serait intéressant de faire de la cryomicroscopie électronique pour visualiser la surface de la membrane et déterminer s'il y a des vésicules de FM collées en surface ou des protéines dépassant de la membrane de la GUV, voire une combinaison des deux. Afin de limiter les problèmes de contraste en microscopie de fluorescence, nous pourrions, après injection du fluorophore et d'une durée d'incubation donnée, réaliser le photoblanchiment des fluorophores libres à l'intérieur de la GUV exclusivement.

Nous avons donc montré que Nox2 est bien localisée à la membrane des GUV formées par réhydratation de SUV-MLV en présence de FM non marquées. Pour l'instant, nous ne pouvons pas déterminer si les FM sont intégrées à la membrane des GUV. Nous pouvons raisonnablement affirmer que les FM sont adsorbées à leur surface et contiennent Nox2 dans une orientation adaptée à la fixation de l'anticorps anti-Nox2 qui est aussi l'orientation permettant la fixation des protéines cytosoliques et du NADPH dans cette même configuration.

2.2.4. BILAN : ETAT D'AVANCEMENT DE L'ELABORATION DE NOX-GUV

La membrane des GUV est imperméable aux FM. Il existe une connexion indéfinie permettant aux FM injectées d'aller dans le réservoir de la GUV et de passer dans ceux des GUV adjacentes ; de façon générale, les FM semblent avoir une affinité particulière pour le réservoir. L'Alexa Fluor® est un bon fluorophore pour marquer et visualiser les FM par microscopie ; il est cependant partiellement altéré en 75 minutes à température ambiante en absence d'illumination. La présence d'une grande quantité de fluorophore à l'intérieur ou à l'extérieur des GUV ne permet pas de visualiser une fixation membranaire, même si elle est effective, à cause de problèmes de contrastes.

La réhydratation de SUV-MLV en présence de FM ou de FM488 permet effectivement de former des GUV, de les fixer sur poly-L-lysine et de laver l'excédent de FM. Il s'agit alors de FM-GUV, qui peuvent donc être formées simplement, rapidement et de façon reproductible, sur lesquelles il est possible de travailler. Nous avons montré que Nox2 est bien présente à la surface externe de la membrane des GUV mais ne sommes pas en mesure de dire si elle est intégrée à la membrane des GUV.

J'ai également montré que la NADPH oxydase avait encore une activité significative à la suite d'un séchage des FM pendant 30 minutes à 30 °C puis leur réhydratation dans le tampon d'activité. Nous pourrions donc essayer une

voie différente d'intégration des FM dans la membrane des GUV, par exemple en séchant les SUV multilamellaires en présence de FM, qui seraient donc encore fonctionnelles après un cycle de séchage-réhydratation. Par ailleurs, une expérience préliminaire en lavant le milieu avec du PBS contenant 1 M de NaCl a laissé les GUV intactes et la fluorescence membranaire n'a pas diminué, les agrégats de FM surfaciques étant également restés accrochés à la membrane. Il faudrait cependant approfondir ces expériences pour confirmer le résultat.

3. Interactions des protéines cytosoliques avec la face externe de la membrane

Comme cela a été décrit précédemment, une des conditions *sine qua non* pour l'activation de la NADPH oxydase en système acellulaire est le recrutement total ou partiel et pérenne ou transitoire des trois protéines cytosoliques p67^{phox}, p47^{phox} et Rac1Q61L au Cytb₅₅₈. Ce recrutement dépend notamment fortement de la présence d'acide arachidonique. Les protéines Nox2 et p22^{phox} contribuent à ce recrutement par des interactions qu'elles établissent avec les protéines cytosoliques. De plus, les protéines cytosoliques ont des ancrages membranaires lipidiques via des interactions protéine-lipides. La façon la plus simple d'étudier ces interactions et ces ancrages sur les GUV est de le faire à la face externe des GUV, dans la même configuration que pour un phagosome, où les protéines cytosoliques sont fixées à l'extérieur.

Cette partie présente donc les résultats recherchant si la face externe de la membrane des GUV permet la fixation des protéines cytosoliques en présence ou en absence d'AA et en présence ou en absence de FM. Nous avons donc étudié les interactions *i*) des trois protéines cytosoliques avec la membrane (interactions 'trio'), *ii*) de toutes les combinaisons deux à deux des protéines cytosoliques (interactions 'duo') ainsi que *iii*) des protéines cytosoliques isolées (interactions 'mono'). Enfin, nous avons testé sans FM et en présence ou en absence d'AA l'interaction externe du trimère de Pick fusionné en N-terminal avec une protéine GFP (GFP-Trimère).

Les contraintes techniques rencontrées et les solutions trouvées pour y faire face seront présentées au fur et à mesure de la présentation des résultats.

3.1. INTERACTIONS DE TP67, P47A ET CHRAC AVEC LA MEMBRANE DES GUV OU FM-GUV

3.1.1. VISUALISATION DE L'INTERACTION PROTEINES-GUV : PREMIERS ESSAIS

Ces premières expériences avaient pour but de cribler différentes conditions pour orienter les expériences suivantes, de mettre en exergue les difficultés techniques. Nous avons donc testé la condition qui nous paraissait à priori optimale pour obtenir une fixation membranaire et qui consistait en la nébulisation externe des trois protéines cytosoliques Turquoise-p67^{phox} (Tp67), p47^{phox}-citrine (p47C), Rac1Q61L à 300 nM chacune en présence de l'activateur AA à 50 µM sur des FM-GUV. Nous avons également réalisé des tests en conditions similaires sur FM-GUV en absence d'AA ou sur GUV (sans FM) en présence d'AA. Ici l'excitation des deux fluorophores (Turquoise et Citrine), a été réalisée simultanément en éclairant l'échantillon avec la diode laser 405 nm et le laser Argon 514 nm. La collecte des photons sur deux gammes de longueurs d'onde différentes a été réalisée en parallèle via deux canaux distincts aboutissant à deux photomultiplicateurs (PMT) différents.

A cette étape, nous avons rencontré plusieurs problèmes techniques. À la suite du remplissage de la pipette, des bulles restaient, la plupart du temps, bloquées à son extrémité avec impossibilité de les enlever. L'ajout d'environ 10 % d'éthanol (v:v), le solvant de l'AA, nous a cependant parfois permis de nous affranchir des bulles. Néanmoins, la nébulisation, même à pression élevée et sans bulles à l'extrémité, s'avérait impossible, ou alors trop limitée pour pouvoir faire une expérience correcte. Nous avons d'abord attribué ces deux contraintes à un problème de viscosité. Comme la nébulisation devait être faite à l'extérieur de la GUV dans un premier temps, nous avons décidé de casser la pointe sur la lamelle d'observation afin d'élargir l'ouverture ce qui a permis la nébulisation.

La **Figure IV-15** présente ces résultats préliminaires ou chaque condition (+FM-AA ou +FM+AA ou -FM+AA) a impliqué l'utilisation d'une nouvelle préparation de GUV ou de FM-GUV. En premier lieu, il est possible de remarquer que pendant la nébulisation, (ligne du haut), quelle que soit la condition, l'extrémité de la micropipette présente une zone dense et spatialement restreinte, saturée en fluorescence. Cette zone est attribuée à un agrégat de protéines fluorescentes, (ag.), et cet agrégat est beaucoup plus important en présence d'AA (reproductible). De plus, la fluorescence du nuage de nébulisation est homogène en absence d'AA mais hétérogène en présence d'AA. Cela souligne l'existence d'une agrégation des protéines cytosoliques en présence d'AA, qui est inexistante, (ou très limitée), en absence d'AA. Cette agrégation est cohérente avec le postulat de l'induction par l'AA d'un assemblage des protéines cytosoliques.

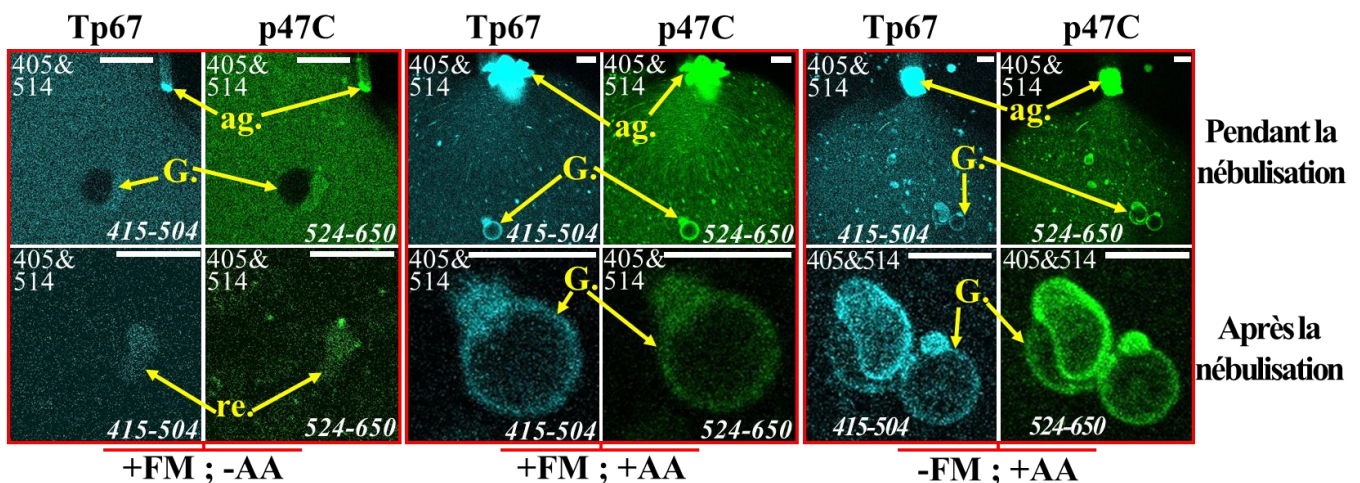


Figure IV-15. Interaction d'un mélange de Tp67, p47C en présence de Rac1Q61L sans ou avec 50 μ M AA sur l'extérieur des GUV avec ou sans FM.

Grossissement 200x. Les abréviations : ag.<=>agregat ; G.<=>GUV ; re.<=> réservoir. Barre d'échelle 25 μ m.

La présence d'agrégats dans la micropipette rend beaucoup plus difficile la nébulisation avec une pointe de pipette intacte. De plus, l'observation de la pipette elle-même permet de mettre en évidence de petits agrégats internes collés au verre. Or, il est connu que la protéine fluorescente Citrine a tendance à coller au verre. Ces agrégats peuvent expliquer en partie la difficulté de nébulisation des protéines cytosoliques avec une pipette intacte. Pour pallier ce problème, dans la suite, nous utiliserons p47^{phox} marquée avec de l'Alexa Fluor® 647, autrement dit p47A.

Sur les FM-GUV pendant et après la nébulisation externe, les deux protéines Tp67 et p47C en présence de Rac1Q61L se fixent très nettement à la membrane mais seulement en présence d'AA, elles ne se fixent pas à la membrane en absence d'AA. De plus, il semble qu'en présence d'AA, ces protéines se fixent dans le réservoir alors qu'en absence d'AA, seule une légère autofluorescence des réservoirs est observable.

Sur les GUV sans FM, les deux protéines Tp67 et p47C, en présence de Rac1Q61L et d'AA, se fixent très nettement à la membrane. Elles se fixent également dans le réservoir et en particulier à sa surface. Comme sur des FM-GUV sans AA ces protéines ne se fixent pas. Ces résultats me permettent de faire l'hypothèse préliminaire que sur des GUV sans FM, ces protéines ne se fixeront pas non plus en absence d'AA. De plus, comme ces protéines se fixent sur des GUV sans FM en présence d'AA, j'en déduis que les lipides de la membrane jouent un rôle majeur dans l'ancrage membranaire de ces protéines seulement en présence d'AA et que les protéines Nox2 et p22^{phox} sont facultatives pour ce recrutement.

Il me paraît alors nécessaire de décorrélérer la fixation des protéines cytosoliques aux lipides de leur fixation aux protéines Nox2 et p22^{phox}. Pour cela, il faudra faire systématiquement des expériences similaires sur GUV sans FM, en présence d'AA.

L'agrégation visible des protéines cytosoliques clairement induite par l'AA suggère l'interaction d'au moins Tp67 et p47C ensemble en phase homogène. Il pourrait alors s'agir d'un préassemblage contrôlé biochimiquement et requis pour l'assemblage complet de NOX2 avec le concours des lipides membranaires et des protéines du Cytb₅₅₈.

Il serait intéressant de vérifier ces observations en réalisant des expériences similaires mais dans des conditions mieux contrôlées sur des liposomes SUV unilamellaires en utilisant les mêmes lipides, avec simplement des mesures de spectrophotométrie de fluorescence pour vérifier l'attachement des protéines à la membrane. Ces expériences pourraient être complétées par des mesures de Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) pour vérifier la variation du rayon d'hydratation des SUV en présence des protéines fixées avec des contrôles ad-hoc.

En condition de nébulisation externe sur GUV, l'AA est indispensable à la fixation membranaire externe des protéines cytosoliques Tp67 et p47C en présence de Rac1Q61L qui semble impliquer un assemblage des protéines cytosoliques à la membrane, voire un préassemblage en phase homogène. En revanche, la présence de FM est facultative, ce qui signifie que les lipides de la membrane ont une importance prépondérante sur l'ancrage des protéines cytosoliques et l'implication réelle de Nox2 et p22^{phox} dans l'assemblage reste à définir dans ces conditions.

3.1.2. FIXATION A L'EXTERIEUR DE LA MEMBRANE DES GUV : LES TROIS PROTEINES ENSEMBLE ('TRIO') ± AA

Dans un premier temps les conditions de fixation des trois protéines cytosoliques Tp67, p47A et ChRac ensemble sur l'extérieur de la membrane des GUV ont été testées. Des contrôles fondamentaux seront inclus dans cette partie ainsi que des informations importantes sur l'interprétation des données. Chaque test a été réalisé sur une nouvelle GUV, après, ou pas, une nouvelle préparation de GUV ou de FM-GUV lorsque cela s'avérait nécessaire, (instabilité des GUV, plus assez de GUV de taille suffisante disponible, évaporation trop importante...).

a. Sur FM-GUV en présence d'AA

Comme nous l'avons montré précédemment, les FM sont réparties de façon très hétérogène à la membrane des FM-GUV. De plus, les protéines Tp67 et p47C ensemble en présence Rac1Q61L et d'AA se fixent à l'extérieur de la membrane des FM-GUV. J'ai donc voulu tester si Rac1Q61L se fixe aussi dans ces conditions et pour cela, la

protéine chimérique Cherry-Rac1Q61L (ChRac) a été utilisée. J'ai aussi souhaité déterminer si la fixation des protéines cytosoliques est corrélée à l'hétérogénéité de la FM ou pas. Autrement dit, si la fixation des protéines cytosoliques à la membrane est significativement spécifique du Cytb₅₅₈ ou alors totalement aspécifique ou encore si les FM ont un rôle observable ou pas sur cette fixation. Vu les résultats obtenus sur GUV sans FM, je m'attendais à une fixation aspécifique, mais il est indispensable de tester pour l'affirmer.

Dans la suite, afin de limiter le risque d'un problème de filtrage de longueurs d'ondes émises ou encore le risque de FRET qui perturberait les résultats, chaque image a été prise en excitant **un seul** fluorophore et en utilisant un seul canal de collecte de photons via un seul PMT, (au contraire de la **Figure IV-15** où deux fluorophores ont été excités simultanément et leur fluorescence collectée sur deux canaux distincts simultanément). De plus, pour limiter le photoblanchiment, les images ont été prises successivement par ordre de longueurs d'ondes d'excitation décroissantes et le temps d'observation et de mise au point des GUV a été réduit au strict nécessaire. Certaines fois, deux longueurs d'ondes d'excitation ont été utilisées pour exciter un seul fluorophore lorsque cela semblait nécessaire, notamment concernant l'excitation de Cherry dans la mesure où le laser HeNe 543 nm utilisé était de puissance très faible.

La nébulisation d'une solution de Tp67, p47C, Rac1Q61L en présence d'AA est difficile notamment à cause de l'agrégation des protéines dans la solution. L'utilisation de p47^{phox} marquée avec de l'Alexa Fluor® 647, (p47A, 1 Alexa Fluor® pour 1 protéine), à la place de p47C permet d'avoir une nébulisation avec une agrégation bien moindre mais avec un comportement similaire sur les GUV dans ces conditions. Nous avons donc décidé d'utiliser p47A, ce qui a aussi pour avantage que la longueur d'onde d'excitation de l'Alexa Fluor® 647 permet d'utiliser quatre fluorophores de longueurs d'ondes d'excitation différentes et mieux réparties sur la gamme du visible.

Ainsi, sur des FM-GUV, nous avons nébulisé à l'extérieur proche de la membrane un mélange de Tp67, p47A et ChRac1Q61L en présence d'AA et les résultats sont présentés **Figure IV-16** environ 5 min après la fin de la nébulisation, ou en cours de nébulisation.

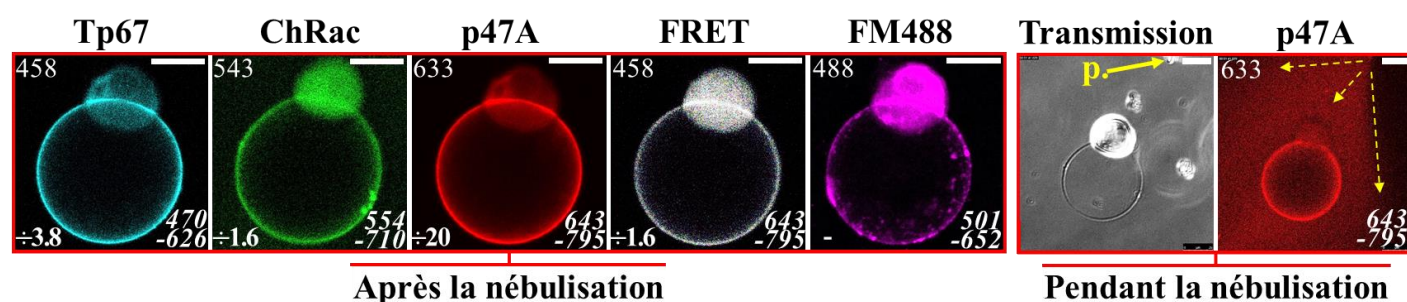


Figure IV-16. Interaction de Tp67, p47A et ChRac1Q61L en présence de 50 µM AA sur l'extérieur des GUV avec FM488.

La transmission est munie d'un DIC. Barre d'échelle 25 µm, grossissement 200 fois. p.<=>micropipette. Flèches pointillées : sens, direction et largeur de la nébulisation partant de la pipette.

Le mélange des trois protéines Tp67, p47A et ChRac en présence d'AA ne présentait quasiment pas d'agrégats dans le nuage de nébulisation, ni à l'extrémité de la pipette. Par conséquent, il est possible que l'agrégation observée précédemment lors de la nébulisation de Tp67, p47C et Rac1Q61L en présence d'AA ne soit due qu'à la présence de citrine. La FM est à nouveau répartie de façon hétérogène à la surface de la membrane de la GUV et est aussi présente dans le réservoir. Les trois protéines cytosoliques sont réparties de façon globalement homogène à la membrane de

la GUV avec un rapport signal sur bruit toujours supérieur à 1,5. Seul ChRac présente sur une très petite portion de la section de membrane observée, une hétérogénéité, le reste de la membrane présentant une fluorescence homogène. Les protéines cytosoliques semblent aussi avoir une certaine affinité pour le réservoir, mais cela reste à confirmer par mesure de son autofluorescence.

Toutes les protéines cytosoliques se fixent de façon homogène à la membrane des GUV. Afin de déterminer si la fixation des protéines cytosoliques est, dans une certaine mesure, spécifique des Cyt_{b558} et si, par conséquent, leur fixation serait augmentée aux endroits de la membrane où la FM est la plus concentrée, nous avons vérifié s'il existait un phénomène de FRET entre tous les fluorophores présents à la membrane. Ainsi, nous avons excité Tp67 à 458 nm et récolté la fluorescence émise par p47A. Il s'avère que le FRET est, lui aussi, homogène le long de la membrane avec un rapport signal sur bruit supérieur à 1,5. Ceci signifie que ce FRET est probablement dû à la grande proximité des fluorophores et non pas à des interactions spécifiques entre les différentes protéines, ce phénomène est appelé 'crowding'. De plus, cela pourrait aussi signifier que le fluorophore porté par FM488 ne joue pas un rôle prépondérant dans le transfert de l'énergie entre les différents fluorophores.

Les trois protéines cytosoliques Tp67, ChRac et p47A se fixent ensemble sur l'extérieur de la membrane des FM-GUV en présence d'AA, indifféremment de la position prépondérante de la FM. Il semblerait donc une fois de plus que la FM et donc le Cyt_{b558}, ne soient pas les facteurs déterminants de l'ancrage membranaire des protéines cytosoliques.

b. Sur GUV (sans FM) en présence d'AA

Pour tester de l'utilité des FM dans la fixation externe des trois protéines cytosoliques ensemble en présence d'AA, nous avons ensuite réalisé la même expérience sur une GUV en absence de FM, en nébulisant à l'extérieur Tp67, p47A et ChRac en présence d'AA. Ces résultats sont présentés **Figure IV-17**.

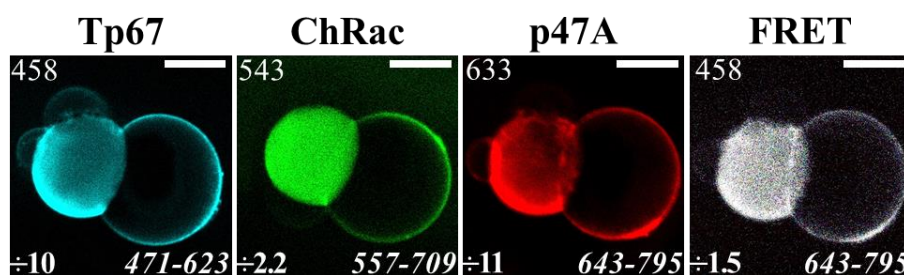


Figure IV-17. Interaction de Tp67, p47A et ChRac1Q61L ensemble en présence de 50 μM AA sur l'extérieur des GUV sans FM. Barre d'échelle 25 μm , grossissement 200 fois.

Les protéines Tp67, ChRac et p47A se fixent à la membrane de la GUV de façon globalement homogène avec un rapport signal sur bruit toujours supérieur à 1,5. Une partie mobile semble cependant un peu plus brillante que le reste le long de la membrane ce qui suggère une concentration des protéines en 'patch'. Cette partie mobile est présente à différents endroits de la membrane selon le cliché, chaque cliché étant pris successivement. Comme précédemment, la fluorescence est aussi accumulée dans le réservoir mais il reste à vérifier que cela n'est pas dû à son autofluorescence. Il existe un FRET entre les différents fluorophores avec un rapport signal sur bruit membranaire égal à 1,5, ce qui suggère que le FRET observé dans l'expérience précédente n'impliquait pas ou peu l'Alexa Fluor®

488 porté par la FM. La FM n'est pas nécessaire à la fixation membranaire des protéines cytosoliques et nous confirmons que les lipides de la membrane sont suffisants pour cet ancrage.

Changer la composition des lipides des GUV serait indispensable pour déterminer s'il y a une affinité particulière pour un ou plusieurs lipides donnés ou s'il s'agit juste d'une interaction non spécifique quel que soit le lipide tant qu'il est inséré dans une membrane. Changer d'activateur semble également indispensable pour vérifier si cet effet est activateur-dépendant.

Les trois protéines cytosoliques Tp67, ChRac et p47A se fixent ensemble en présence d'AA sur les GUV sans FM et du FRET est observable entre ces trois fluorophores. Il semble donc que les protéines cytosoliques aient effectivement une affinité particulière pour la face externe de la membrane des GUV. Cette affinité pourrait être spécifique ou aspécifique en fonction des lipides membranaires et cela reste à tester. Cela montre que les hypothèses d'ancrage membranaire non spécifique des protéines cytosoliques dues à l'AA décrites dans le CHAPITRE III, (insertion de la queue hydrophobe dans le feuillet externe et attachement électrostatique de la tête polaire à la protéine, ou inversement), restent à explorer.

c. Sur GUV (sans FM) en absence d'AA

Pour tester l'importance de l'AA dans la fixation externe des trois protéines cytosoliques ensemble à la membrane des GUV sans FM, nous avons réalisé la nébulisation externe proche de la membrane d'un mélange de Tp67, p47A et ChRac1Q61L en absence d'AA. Ces résultats, dont l'observation nous a conduit à utiliser des conditions extrêmes de nébulisation (nébulisation très forte et très longue), d'excitation des fluorophores (lasers à 100 % de leur puissance, plusieurs lasers simultanément si disponibles) et d'accumulation d'images (16 images accumulées), sont présentés en **Figure IV-18**.

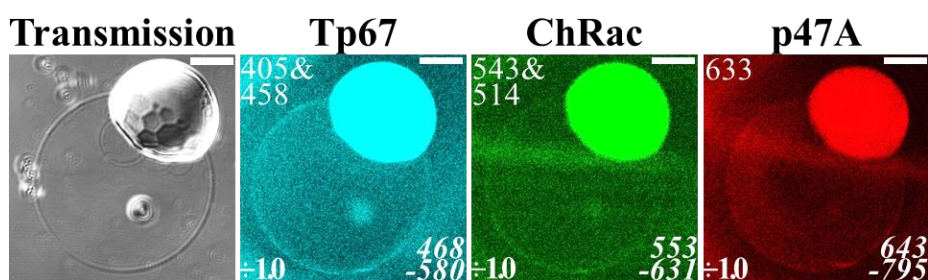


Figure IV-18. Interaction de Tp67, p47A et ChRac1Q61L ensemble en absence d'AA sur l'extérieur des GUV sans FM.
La transmission est munie d'un DIC. Barre d'échelle 25 μ m, grossissement 200 fois.

Sur ces images obtenues dans des conditions drastiques explicitées ci-dessus, est visible un liseré faiblement fluorescent le long de la membrane pour les trois protéines cytosoliques. Ici le résultat mitigé, les images apportent une information purement visuelle et donc subjective, qu'il serait par conséquent, notamment vu les conditions de prise de vue, malhonnête de considérer positive. D'où le caractère crucial de la quantification du rapport signal sur bruit de la membrane.

Les rapports signal sur bruit relatifs à la membrane pour les trois protéines sont égaux à 1,0. Ceci signifie, selon mes critères arbitraires, que la fluorescence moyennée de la membrane est identique à la fluorescence moyennée du bruit de fond. Cependant, l'image apporte néanmoins une information importante qui correspond à l'information

spatiale. Elle nous informe sur la répartition de la fluorescence, (en l'occurrence membranaire), même trop faible pour être considérée significative et ceci serait particulièrement utile dans le cas d'une fluorescence hétérogène avec un rapport signal sur bruit proche de 1,0. Ici, la fluorescence non significative de la membrane est répartie de façon homogène, la question ne se pose donc pas et j'en conclus que la fixation, si elle existe dans cette configuration, est marginale et non significative.

Partant de ce constat, afin de limiter les effets de seuils entraînant des faux positifs, je décide que la fixation sera considérée positive si le rapport signal sur bruit lié à la membrane est au moins égal à 1,5. Bien sûr, dans le cas où il existe une hétérogénéité de la fluorescence le long de la membrane, même si le rapport signal sur bruit lié à la membrane est inférieur à 1,5 et en prenant en compte la procédure de détermination de ce rapport, il est indispensable d'interpréter les résultats en considérant et discutant cette hétérogénéité en fonction des connaissances autres que nous disposons sur les GUV et la NADPH oxydase. Si le rapport est compris entre 1,0 et 1,5 il sera de toute façon légitime de le critiquer en fonction des conditions et des résultats visuels.

Le réservoir est ici toujours saturé en fluorescence, je ne peux pas conclure si cela est dû à l'autofluorescence ou aux protéines cytosoliques qui s'y seraient fixées.

Je fais la même remarque que précédemment, il serait intéressant de confirmer les résultats de cette expérience sur des SUV unilamellaires en conditions bien mieux contrôlées avec des mesures par spectrophotométrie de fluorescence et éventuellement DLS.

Les trois protéines cytosoliques ensemble Tp67, p47A et ChRac1Q61L en absence d'AA ne se fixent pas à la membrane des GUV sans FM. Il est particulièrement important de considérer le rapport signal sur bruit lié à la membrane et je considère qu'un rapport 1,5 est minimum pour que la fixation soit considérée positive. Il est néanmoins indispensable de prendre aussi en compte la localisation et la répartition de la fluorescence pour les interprétations et la discussion et ne pas s'arrêter au rapport signal sur bruit.

d. Contrôle de l'autofluorescence d'une GUV sans FM, sans AA, sans protéine

Bien que le rapport signal sur bruit membranaire est égal à 1,0 lors de la nébulisation des trois protéines cytosoliques ensemble en absence d'AA sur une GUV sans FM et qu'il puisse donc être considéré comme une référence négative, il nous a semblé important de tester l'autofluorescence des lipides aux longueurs d'ondes d'excitation utilisées pour observer Tp67, p47A ou ChRac. Ces résultats, dont l'observation nous a conduit à utiliser des conditions extrêmes d'excitation des fluorophores théoriques, d'accumulation d'images et de gamme de collection de photons, comme expliqué dans l'expérience précédente, sont présentés en **Figure IV-19**.

Je n'observe aucun signal membranaire pour la longueur d'onde correspondant à l'excitation de Cherry, ni pour celle correspondant à l'excitation de l'Alexa Fluor® 647. En revanche, un infime liseré est observable pour un œil attentif à la longueur d'onde d'excitation correspondant à l'excitation de la Turquoise. La fluorescence localisée à la membrane est bien moins intense visuellement que celle issue de la nébulisation externe des trois protéines cytosoliques en absence d'AA sur une GUV sans FM, mais les conditions ne sont pas exactement les mêmes et la

comparaison s'avère délicate. Néanmoins, le rapport signal sur bruit de la membrane est identiquement égal à 1,0. De plus, le réservoir semble moins fluorescent en fonction de l'augmentation de la longueur d'onde, mais je n'ai pas quantifié cet aspect, notamment parce que le sens en serait limité. Je note néanmoins que plus la longueur d'onde est courte, plus l'autofluorescence du réservoir semble forte.

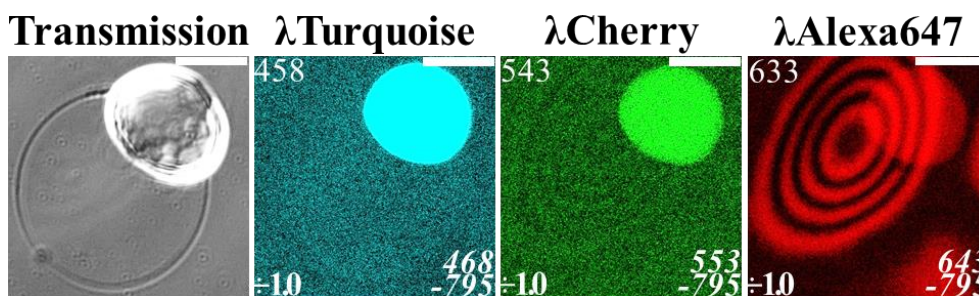


Figure IV-19. Autofluorescence en microscopie confocale des GUV formées en absence de FM et fixées sur résine SU8.

La transmission est munie d'un DIC. Barre d'échelle 25 μm , grossissement 200 fois. $\lambda\text{Turquoise}$, λCherry et $\lambda\text{Alexa647}$ correspondent aux conditions d'excitation et de collecte respectivement des fluorophores mTurquoise, mCherry et Alexa Fluor® 647.

L'autofluorescence de la membrane des GUV pour des longueurs d'onde d'excitation de 458 nm, 543 nm ou 633 nm est négligeable. La fluorescence des réservoirs est, en revanche, significative, mais sa quantification a, à priori, peu d'intérêt dans la mesure où ce n'est pas l'objet de la thèse.

3.1.3. FIXATION À L'EXTÉRIEUR DE LA MEMBRANE DES GUV EN PRÉSENCE D'AA : LES 'DUOS'

Dans un deuxième temps, il nous a paru essentiel de vérifier si les protéines nébulisées deux à deux à l'extérieur des GUV sans FM pouvaient interagir avec la membrane ou pas. Comme les trois protéines cytosoliques ensemble ne se fixent pas aux GUV en absence d'AA et que ces conditions ont été considérées optimales pour une fixation en présence d'AA, j'ai fait l'**hypothèse** qu'aucune autre combinaison de protéines cytosoliques ou aucune protéine cytosolique isolée ne se fixerait en absence d'AA.

Les couples de protéines testés sont donc : ChRac & p47A ou ChRac & Tp67 ou Tp67 & p47A, chaque test ayant été fait sur une nouvelle GUV.

a. ChRac & p47A

Les résultats de la nébulisation externe de ChRac et p47A ensemble en présence d'AA sur des FM-GUV ou sur des GUV sans FM sont présentés en **Figure IV-20**.

En présence de FM, ChRac se fixe à la membrane de façon plutôt homogène avec un rapport signal sur bruit de 3,7.

En absence de FM, la fluorescence de ChRac est visible à la membrane de façon hétérogène pour un des deux essais (E1) ce qui est corrélé à un épaissement de la membrane sur l'image en transmission, donc est probablement artefactuel. Cet épaissement pourrait être dû à une multicouche locale d'origine inconnue. Le rapport signal sur bruit est de 1,2 ce qui ne permet pas de conclure à une réelle interaction selon les critères définis précédemment. Comparé au rapport signal sur bruit de ChRac en présence de FM, il est possible de dire que ChRac s'il se fixe, mais beaucoup moins bien en absence de FM et parfois de façon hétérogène. D'autant que la fluorescence, bien

qu'hétérogène, ne se déplace pas à la surface de la membrane. J'estime que je ne peux pas conclure clairement à l'issue de ce résultat la fixation de ChRac aux GUV sans FM, mais considère plutôt qu'il n'y a pas de fixation. Je peux cependant tempérer en évoquant une possible très faible interaction.

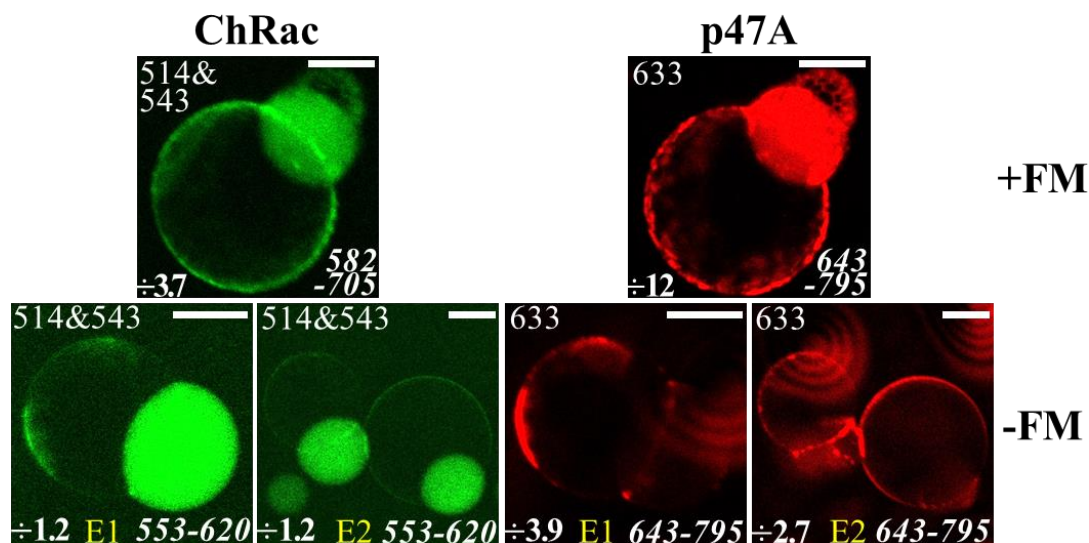


Figure IV-20. Interaction de p47A et ChRac avec la face externe de la membrane d'une GUV en présence d'AA et avec ou sans FM. Barre d'échelle 25 μ m, grossissement 200 fois. En absence de FM, deux essais ont été réalisés et sont désignés en jaune par E1 et E2.

En présence de FM, p47A se fixe à la membrane de façon très hétérogène avec un rapport signal sur bruit de 12. Cette hétérogénéité est mobile et les taches fluorescentes se déplacent à la surface de la membrane en fonction du temps, ce qui est cohérent avec les propriétés de fluidité membranaire.

En absence de FM, p47A se fixe à la membrane de façon hétérogène pour E1 avec un rapport signal sur bruit de 3,9 et partiellement hétérogène pour E2 avec un rapport signal sur bruit de 2,7. Je ne peux pas conclure sur le mode de fixation de p47A à la membrane, hétérogène ou homogène. Il y a cependant clairement une composante hétérogène. Le rapport signal sur bruit de la membrane pour p47^{phox} sur FM-GUV est donc bien supérieur au rapport signal sur bruit de la membrane pour p47^{phox} sur GUV sans FM ce qui suggère que la FM joue un rôle dans la fixation de p47^{phox}. En présence comme en absence de FM la fluorescence correspondant à ChRac est visible dans les réservoirs. En revanche, pour p47^{phox}, de la fluorescence dans le réservoir de la FM-GUV est visible mais pas dans le réservoir des GUV sans FM, alors que les conditions sont identiques. Ceci soutient qu'il pourrait exister une implication des FM dans la fixation de p47A.

Aucune hétérogénéité membranaire de la fixation de p47A ni de p47C n'est observable lorsque les trois protéines cytosoliques sont nébulisées ensemble. Par conséquent, il semble que p47A se fixe à la membrane de façon hétérogène en présence de ChRac seule. Cette différence peut être due à une interaction de p47A avec Tp67 et, ou, Rac1Q61L. Cette interaction pourrait soit conduire p47A à la membrane de façon homogène grâce à une distribution homogène des autres protéines sur la membrane soit induire un changement conformationnel de p47A permettant sa fixation homogène, soit empêcher p47A d'oligomériser.

Sur la face externe de la membrane des FM-GUV, en présence d'AA p47A se fixe de façon hétérogène et ChRac se fixe de façon homogène. L'absence de colocalisation suggère que ces deux protéines n'interagissent pas entre elles lorsqu'elles sont fixées à la membrane.

Sur la face externe des GUV sans FM, en présence d'AA p47A se fixe de façon plutôt hétérogène beaucoup plus faiblement que sur la membrane d'une FM-GUV. En outre, ChRac ne se fixe pas, ou alors très peu.

Par conséquent, lors de la nébulisation d'un mélange de ChRac, de p47A et de AA, la présence de FM est indispensable à la fixation de ChRac et favorise aussi beaucoup la fixation de p47A. *L'hétérogénéité de p47A est un phénomène intéressant qu'il faudrait explorer plus avant.*

b. ChRac & Tp67

Les résultats de la nébulisation externe de ChRac et Tp67 ensemble en présence d'AA sur des FM-GUV ou des GUV sans FM sont présentés en **Figure IV-21**.

La **Figure IV-21** montre que quelle que soit la condition, avec ou sans FM, ChRac et Tp67 ont une fluorescence membranaire faible et homogène à l'observation. Le rapport signal sur bruit varie entre 1,2 et 1,4 ce qui signifie selon les critères définis précédemment, que je considère faible, (voire nulle), la fixation de ces protéines à la membrane.

En présence de FM, des agrégats fluorescents sont visibles et semblent être à l'intérieur de la GUV. Ainsi, soit les images ont été faites à trop grande proximité de la lame ce qui engendre la visualisation d'artefacts liés aux interactions entre les protéines cytosoliques et la polylysine, soit des protéines ont traversé la membrane et se sont agrégées à l'intérieur. Ces agrégats étant rigoureusement immobiles, il est plus probable qu'il s'agisse d'artefacts liés à la surface de la lamelle de verre, que ne filtrent pas la confocalité.

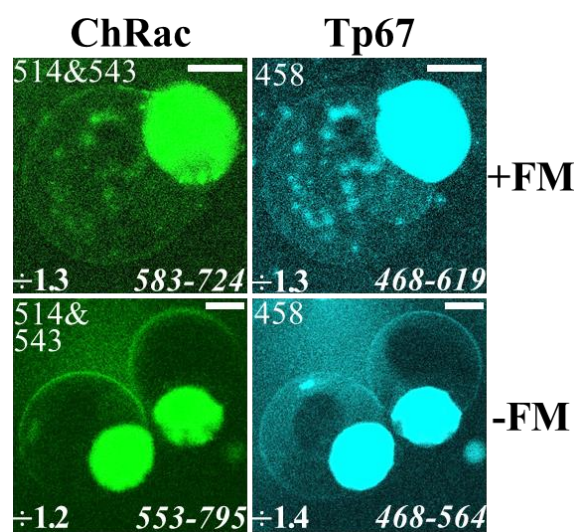


Figure IV-21. Interaction de ChRac et Tp67 avec la face externe de la membrane d'une GUV en présence d'AA et en présence ou en absence de FM. Barre d'échelle 25 μ m, grossissement 200 fois.

Sur la face externe de la membrane des FM-GUV et des GUV sans FM, ChRac et Tp67 nébulisées ensemble en présence d'AA ne se fixent pas, ou très faiblement. Cela signifie que Tp67 ainsi que ChRac ont besoin du partenaire p47A pour aller à la membrane.

c. p47A & Tp67

Les résultats de la nébulisation externe de p47A et Tp67 ensemble en présence d'AA sur des FM-GUV ou des GUV sans FM sont présentés en **Figure IV-22**.

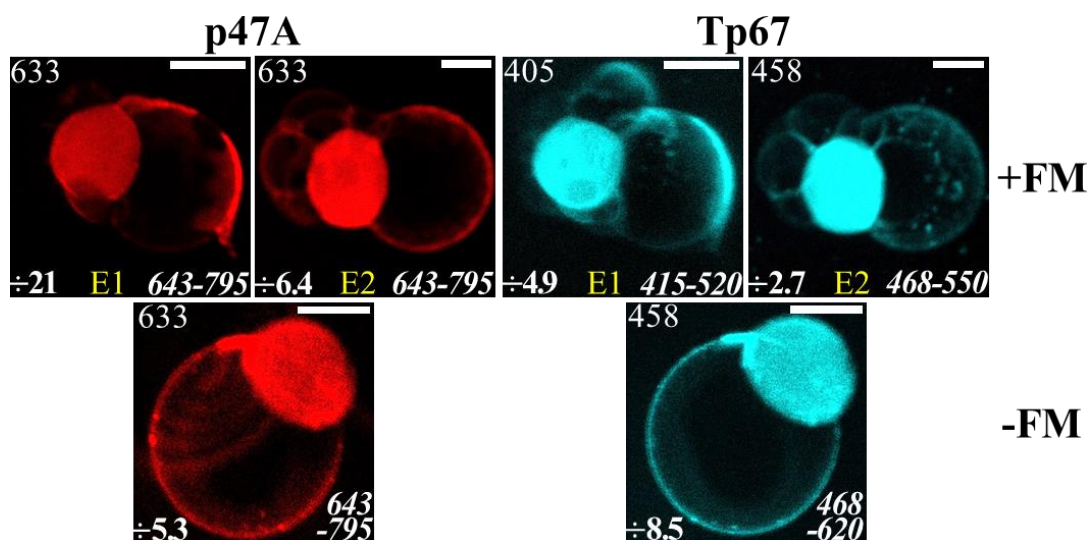


Figure IV-22. Interaction de p47A et Tp67 avec la face externe de la membrane d'une GUV en présence d'AA et avec ou sans FM. Barre d'échelle 25 μ m, grossissement 200 fois.

Sur les FM-GUV, p47A se fixe bien sur la face externe de la membrane des GUV avec un rapport signal sur bruit variant entre 6,4 et 21. Cette fixation a été hétérogène pour un essai (E1) et cette hétérogénéité corrélée à un épaissement de la membrane visible en transmission, est donc probablement artéfactuelle. Cet épaissement pourrait être dû à une multicouche locale d'origine inconnue. La protéine Tp67 se fixe elle aussi sur la face externe de la membrane des GUV avec un rapport signal sur bruit variant entre 4,9 et 2,7 en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Cette fixation est hétérogène pour E1 avec la même explication que précédemment pour p47A.

Sur les GUV en absence de FM, p47A se fixe sur la face externe de la membrane des GUV avec un rapport signal sur bruit de 5,3. Cette fixation est globalement homogène avec quelques points hétérogènes. La protéine Tp67 se fixe également de façon homogène avec quelques points hétérogènes à la face externe de la membrane de la GUV avec un rapport signal sur bruit de 8,5.

Tous les réservoirs sont fluorescents, notamment pour p47A, en absence de FM ce qui n'était pas le cas lors de sa nébulisation en présence de ChRac alors que nous étions dans les mêmes conditions d'excitation et d'acquisition. D'après l'hypothèse faite précédemment, nous pouvons suggérer que Tp67 et p47A vont ensemble à la membrane en induisant des changements conformationnels potentiellement réciproques leur permettant de se fixer plus efficacement aux lipides de façon non spécifique par rapport aux FM.

La nébulisation externe de Tp67 et p47A ensemble en présence d'AA sur des FM-GUV ou des GUV sans FM induit la fixation significative de Tp67 et de p47A à la face externe de la membrane des GUV. J'ai fait l'hypothèse que la Tp67 et p47A ont un effet synergique leur permettant d'aller à la membrane efficacement lorsqu'elles sont ensemble, via des changements de conformations potentiellement réciproques induisant la possibilité d'une des deux protéines, voire des deux protéines, d'interagir avec les lipides membranaires. Il reste à explorer plus avant les raisons des petites hétérogénéités observées.

3.1.4. FIXATION A L'EXTERIEUR DE LA MEMBRANE DES GUV SANS FM AVEC AA : LES PROTEINES SEULES ('SOLO')

Dans un troisième et dernier temps, il nous a paru essentiel de vérifier si les protéines nébulisées isolément proche de la membrane à l'extérieur des GUV parvenaient à se fixer à la membrane ou pas. Pour des raisons de temps, ces expériences n'ont pas été faites sur des FM-GUV mais seulement sur des GUV sans FM. De l'AA était toujours présents dans les solutions nébulisées.

Nous avons donc testé chaque protéine seule : Tp67 puis p47A et enfin ChRac chacune sur des GUV différentes.

a. Tp67 seule

Les résultats de la nébulisation externe de Tp67 seule en présence d'AA sur des GUV sans FM sont présentés en **Figure IV-23**.

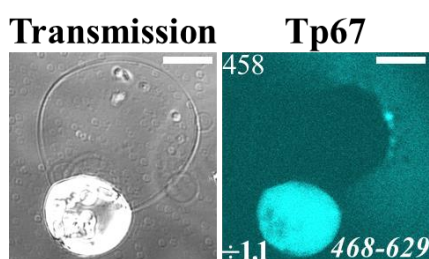


Figure IV-23. Interaction de Tp67 avec la face externe de la membrane d'une GUV en présence d'AA et en absence de FM.

Barre d'échelle 25 μm , grossissement 200 fois.

La protéine Tp67 en présence d'AA nébulisée sur une GUV sans FM ne se fixe pas, ni visuellement, ni via le rapport signal sur bruit égal à 1,1. Les points fluorescents présents sur la droite de l'image de microscopie de fluorescence correspondent aux points observables en transmission à l'intérieur de la GUV sur la droite assez proche de la membrane. Ces points ne signifient donc pas une fixation membranaire mais probablement une fixation Tp67 à la résine SU8 en surface de la lame de verre. D'ailleurs, un halo fluorescent semble délimiter la zone d'attache de la GUV sur la surface fonctionnalisée de la lame.

Le réservoir est fluorescent, mais à cette longueur d'onde il est probable qu'il s'agisse simplement d'autofluorescence.

La protéine Tp67 isolée en présence d'AA ne se fixe donc pas sur la face externe de la membrane d'une GUV sans FM. Cela confirme que la présence d'au moins p47A est nécessaire pour que Tp67 aille à la membrane.

b. p47A seule

Les résultats de la nébulisation externe de p47A seule en présence d'AA sur des GUV sans FM sont présentés en **Figure IV-24**.

La protéine p47A en présence d'AA nébulisée sur une GUV sans FM se fixe de façon hétérogène, (expérience reproduite une fois), avec un rapport signal sur bruit égal à 4,2. Un épaissement de la membrane est présent et son origine reproductible est consécutive à la nébulisation externe et p47A seule en présence d'AA, ce qui est différent des épaissements observés dans de précédentes figures qui préexistaient avant la nébulisation. En effet, lors de la

nébulisation, il y a dans un premier temps l'apparition d'une fluorescence homogène tout du long de la membrane. Puis, au fur et à mesure de la nébulisation, la fluorescence se regroupe progressivement à un ou plusieurs endroits de la membrane, en formant un ou des patches à la surface de la membrane, clairement visibles en faisant une série d'images en se déplaçant le long de l'axe z perpendiculaire à la surface de la lame. Cela suggère qu'une oligomérisation progressive de p47A peut exister après qu'elle a interagit avec la membrane dans ces conditions.

De plus, le réservoir ne présente aucune fluorescence visible, ce qui est cohérent avec les observations de la **Figure IV-20**. Il semble que la fixation de p47A dans le réservoir en absence de FM nécessite que p47A soit en interaction avec au moins Tp67, ou que Tp67 perturbe suffisamment le réservoir pour que p47A s'y loge.

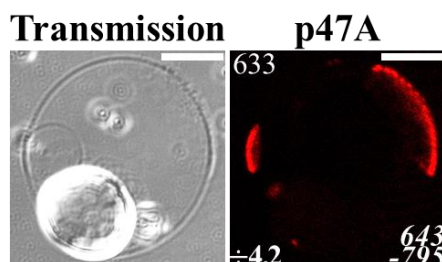


Figure IV-24. Interaction de p47A avec la face externe de la membrane d'une GUV en présence d'AA et en absence de FM. Barre d'échelle 25 μ m, grossissement 200 fois.

La protéine p47A seule en présence d'AA se fixe de façon hétérogène, probablement de façon concomitante à une oligomérisation, sur la face externe des GUV sans FM. p47A nécessite, dans ces conditions, la présence de Tp67 pour être intégrée dans le réservoir mais la raison reste indéfinie et je fais l'hypothèse en lien avec les résultats précédents que Tp67 pourrait perturber l'intégrité du réservoir, permettant à p47A de s'y loger. De plus, en présence d'au moins Tp67, la protéine p47A se fixe de façon homogène à la membrane d'une GUV avec ou sans FM, ce qui montre que le mode de fixation de p47^{phox} est très différent en présence ou en absence de p67^{phox} et donc cette technique permet de confirmer en visualisation directe l'existence d'une interaction de p67^{phox} avec p47^{phox}.

c. ChRac seule

Les résultats de la nébulisation externe de ChRac seule en présence d'AA sur des GUV sans FM sont présentés en **Figure IV-25**.

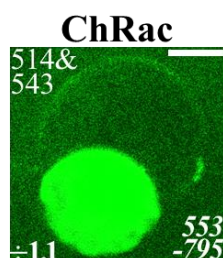


Figure IV-25. Interaction de ChRac avec la face externe de la membrane d'une GUV en présence d'AA et en absence de FM. Barre d'échelle 25 μ m, grossissement 200 fois.

La fluorescence de ChRac forme un très léger liseré globalement homogène à la membrane de la GUV. Néanmoins, le rapport signal sur bruit est égal à 1,1 et donc ChRac isolée ne se fixe pas de façon significative à la membrane des GUV en absence de FM.

La protéine ChRac en présence d'AA ne se fixe pas sur la face externe de la membrane des GUV sans FM. ChRac nécessite la présence de p47A et de Tp67 pour se fixer sur la face externe de la membrane des GUV sans FM ou encore au moins de p47A pour se fixer sur la face externe de la membrane des FM-GUV.

3.2. INTERACTIONS DU GFP-TRIMERE AVEC LA FACE EXTERNE DE LA MEMBRANE DES GUV

Dans l'article intitulé « Conversion of NOX2 into a constitutive enzyme *in vitro* and in living cells, after its binding with a chimera of the regulatory subunits. » que mon équipe et moi avons publié en 2017 (443), nous montrons que la protéine chimérique Citrine-Trimère exprimée dans des cellules COS se fixe aux systèmes membranaires en présence, mais aussi en absence, de Nox2. Cela a été attribué au fait que le trimère contient notamment la séquence complète correspondant à Rac1Q61L, donc Rac1 de forme constitutivement active, qui porte probablement un groupement prényl sur la cystéine la plus proche de l'extrémité C-terminale. Le groupement prényl adresse la protéine à la face cytosolique de la membrane, notamment en s'insérant dans son feuillet interne.

Or, le GFP-Trimère que nous utilisons ici est une protéine recombinante dans *Escherichia coli*. Il ne possède donc pas de prénylation mais contient la même séquence que le trimère utilisé en cellules COS.

L'objectif était donc ici de vérifier si le GFP-Trimère non prénylé interagit ou pas avec la membrane des GUV sans FM. Nous avons aussi testé l'implication de l'AA sur cette interaction potentielle.

3.2.1. EN PRESENCE D'AA

Dans un premier temps, nous nous sommes demandé si le GFP-Trimère pouvait se fixer sur la face externe de la membrane d'une GUV sans FM en présence de AA. Les résultats de la nébulisation externe du GFP-Trimère en présence d'AA sur des GUV sans FM sont présentés en **Figure IV-26**.

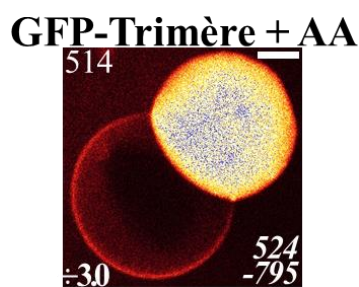


Figure IV-26. Interaction du GFP-Trimère avec la face externe de la membrane d'une GUV sans FM en présence d'AA.
Barre d'échelle 10 μ m. Grossissement 200x.

Sur une GUV sans FM, le GFP-Trimère non prénylé nébulisé en présence d'AA se fixe sur la face externe de la membrane de la GUV de façon homogène avec un rapport signal sur bruit de 3,0. Il y a également une fluorescence importante du réservoir qui est trop forte pour n'être due qu'à de l'autofluorescence dans ces conditions.

Ainsi, sur une GUV sans FM, le GFP-Trimère non prénylé nébulisé en présence d'AA se fixe sur la face externe de la membrane de la GUV de façon homogène. En présence d'AA la prénylation est donc facultative pour sa fixation à la membrane.

3.2.2. EN ABSENCE D'AA

Afin de tester l'importance de l'AA dans la fixation du GFP-Trimère à la face externe de la membrane d'une GUV sans FM, nous avons réalisé la nébulisation du GFP-Trimère seul sur une GUV sans FM. Les résultats de la nébulisation externe du GFP-Trimère en absence d'AA sur des GUV sans FM sont présentés en **Figure IV-27**, qui présente deux répliquas techniques de la même expérience.

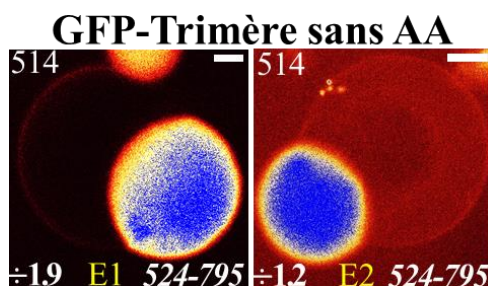


Figure IV-27. Interaction du GFP-Trimère avec la face externe de la membrane d'une GUV sans FM en absence d'AA.
Deux essais. Barre d'échelle 10 μ m. Grossissement 200x.

Sur une GUV sans FM, le GFP-Trimère nébulisé seul, sans AA, pour les deux essais nous observons un liseré fluorescent homogène plutôt faible le long de la membrane des GUV avec un rapport signal sur bruit membranaire de 1,9 pour E1 ou de 1,2 pour E2. Ceci signifie qu'il y a une fixation significative pour E1 mais pas pour E2. Dans les deux cas, ce rapport est donc supérieur à 1,0 et dans un cas la fixation est considérée significative. Je peux donc raisonnablement supposer qu'il y a une faible fixation du GFP-Trimère, même en absence d'AA. En tout cas, la présence d'AA facilite clairement la fixation du GFP-Trimère.

J'observe également que le réservoir est très fluorescent, davantage dans ces conditions qu'une simple autofluorescence ce qui suggère que le GFP-trimère a une affinité pour les lipides du réservoir.

Ainsi, sur une GUV sans FM, le GFP-Trimère nébulisé seul, sans AA, se fixe faiblement sur la face externe de la membrane de la GUV ; beaucoup plus faiblement qu'en présence d'AA. Néanmoins, j'en déduis que la prénylation n'est pas nécessaire pour une fixation membranaire, avec ou sans AA, mais que l'AA facilite cette fixation. D'autres expériences préliminaires faites au laboratoire sur des SUV utilisant les mêmes lipides ainsi que sur des FM montrent un résultat similaire.

3.3. BILAN DES NEBULISATIONS EXTERNES DE TP67, P47A, CHRAC ET DU GFP-TRIMERE

Beaucoup de résultats ont été donnés isolément dans le début de ce chapitre concernant les interactions des protéines cytosoliques avec la face externe de la membrane des GUV. Cette partie a pour but de faire la synthèse de l'ensemble de ces résultats afin de pouvoir les interpréter et les discuter de façon globale en fonction des connaissances contemporaines sur la NADPH oxydase et les GUV formées par réhydratation de SUV multilamellaires.

3.3.1. RECAPITULATIF DES EXPERIENCES REALISEES ET DES RESULTATS OBTENUS

Le **Tableau IV-1** regroupe les expériences faites dans ce chapitre et les résultats, après interprétation, des interactions protéines-membrane testées dans cette partie.

Ces résultats montrent que les trois protéines cytosoliques habituellement utilisées, (ici marquées avec un fluorophore), pour faire fonctionner la NADPH oxydase en système acellulaire, Tp67, p47A et ChRac, lorsqu'elles sont nébulisées ensemble, interagissent avec la membrane des GUV ou des FM-GUV seulement en présence d'AA. L'AA est donc indispensable à la fixation des trois protéines mélangées avec la membrane des GUV mais cette fixation est indépendante de la présence de FM. Les protéines, en particulier Nox2 et p22^{phox}, ainsi que les lipides de la FM, jouent donc un rôle secondaire dans l'ancrage des protéines cytosoliques à la membrane des GUV alors que l'AA a une fonction cruciale. Comme l'AA est indispensable à la fixation des trois protéines cytosoliques, Tp67, p47A et ChRac nébulisées ensemble, nous avons choisi de nous placer systématiquement en présence d'AA dans toutes les autres expériences.

Mélange nébulisé ↓					Résultats					
					+FM			-FM		
"Trio"	+Tp67	+p47C	+Rac	+AA	Tp67	p47C		Tp67	p47C	
	+Tp67	+p47C	+Rac		Tp67	p47C		x		
	+Tp67	+p47A	+ChRac	+AA	Tp67	p47A	ChRac	Tp67	p47A	ChRac
	+Tp67	+p47A	+ChRac		x			Tp67	p47A	ChRac
"Duo"	+Tp67	+p47A		+AA	Tp67	p47A		Tp67	p47A	
	+Tp67		+ChRac	+AA	Tp67	ChRac		Tp67	ChRac	
		+p47A	+ChRac	+AA	p47A	ChRac		P47A	ChRac	
"Mono"	+Tp67			+AA	x			Tp67		
		+p47A		+AA	x			P47A		
			+ChRac	+AA	x			ChRac		
GTrim			+GTrim	+AA	x			GTrim		
			+GTrim	-AA	x			GTrim		

Tableau IV-1. Bilan des interactions des protéines cytosoliques ou du trimère avec la face externe de la membrane de la GUV ±FM et, ou ±AA
 Fond vert : fixée. Fond rouge doublement barré : non fixée. Fond noir caractères blancs : fixée de façon hétérogène. Fond orange simplement barré : pas de fixation significative. Croix noire sur fond blanc : condition non testée.

Pour déterminer les conditions minimales de fixation et le rôle de chacune des protéines, la nébulisation externe des protéines deux à deux en présence d'AA ou des protéines prises isolément en présence d'AA a été testée. La **Figure IV-28** présente un schéma récapitulatif de l'ensemble des interactions observées entre les protéines cytosoliques nébulisées en présence d'AA et la face externe de la membrane des GUV ou FM-GUV.

Il est facile de constater sur ce schéma que p47^{phox} se fixe quelle que soit son partenaire protéique et sur des FM-GUV aussi bien que sur des GUV sans FM. En outre, Rac1 se fixe seulement en présence de p47^{phox} sur des GUV avec FM, ainsi qu'en présence de p67^{phox} et p47^{phox} sur des GUV avec ou sans FM. Finalement, p67^{phox} se fixe seulement lorsqu'elle est en présence de p47^{phox} et lorsqu'elle est en présence de p47^{phox} et de Rac1 et ce sur des GUV

avec ou sans FM. Ici il manque clairement la donnée de la nébulisation externe de ChRac seul avec AA sur une GUV avec FM.

La protéine p47A permet à Tp67 d'être recrutée à la membrane d'une GUV ou d'une FM-GUV. En outre, la protéine p47A seule se fixe de façon hétérogène probablement en oligomérisant alors qu'elle se fixe de façon homogène en présence de Tp67. J'en déduis qu'il existe effectivement une interaction entre p47A et Tp67, qui pourrait induire des modifications conformationnelles et, ou, des modifications membranaires, permettant aux deux protéines de se fixer de façon homogène, même en absence de FM. L'interaction entre le SH3 de p67^{phox} et la PRR de p47^{phox} pourrait expliquer cela. L'apport de ces expériences est de savoir que l'interaction du dimère p67^{phox}-p47^{phox} avec la membrane est indépendante de la présence du Cytb₅₅₈. Par conséquent, la fixation de p47^{phox} à la membrane, potentiellement via son domaine PX et sa région polybasique, joue un rôle majeur dans son maintien à la membrane et cela m'amène aussi à supposer que p67^{phox} a aussi des ancrages membranaires pas encore décrits. En outre, l'oligomérisation de p47^{phox} était un phénomène inattendu et il serait intéressant d'étudier si celle-ci dépend seulement de la présence de lipides ou plus spécifiquement de la présence d'une structure membranaire.

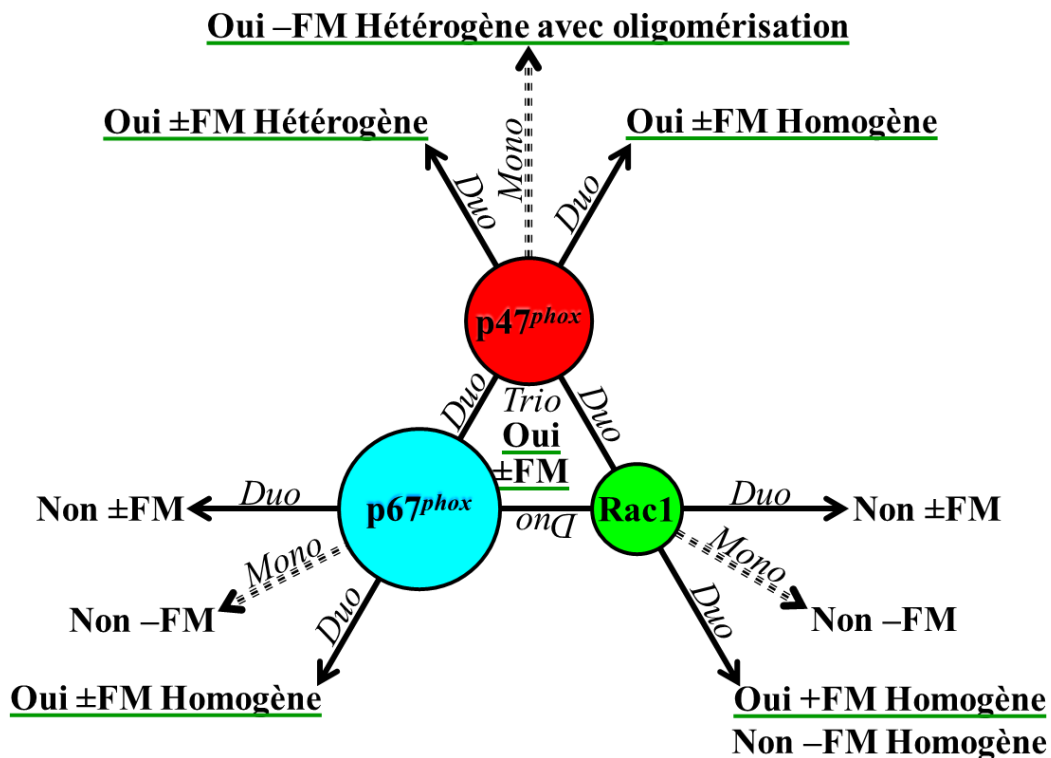


Figure IV-28. Bilan des résultats des expériences de nébulisation avec AA des protéines cytosoliques sur l'extérieur de la membrane des GUV. Duo signifie que deux protéines sur la même ligne ont été nébulisées en même temps. Mono signifie que seule la protéine à l'origine de la flèche a été nébulisée. Trio signifie que les trois protéines ont été nébulisées ensemble. Les interactions positives avec la membrane sont soulignées en vert.

D'autre part, la protéine p47A permet également à ChRac d'être recrutée à la membrane d'une GUV si et seulement si cette GUV possède des FM et qu'il s'agit donc d'une FM-GUV. ChRac nécessite donc la présence de p47A et de Tp67 simultanément pour être localisée à la membrane des GUV sans FM. Curieusement, en présence de p67^{phox} et de Rac1Q61 seules, (en absence de p47^{phox}), en système acellulaire le système NADPH oxydase fonctionne. Cela pourrait signifier que la fixation de p67^{phox} et de Rac1Q61L est transitoire à la membrane des FM et induit juste un changement conformationnel dans le Cytb₅₅₈ permettant la fixation du NADPH et, ou, le transport des électrons.

Ou alors, comme la protéine Cherry est fixée en N-terminal de Rac1Q61L et que la protéine Turquoise est fixée en N-terminal de p67^{phox}, je suggère aussi que la fixation entre la séquence SWITCH1 de ChRac et le TPR de Tp67 n'est pas possible. La protéine ChRac étant exprimée dans *Escherichia coli*, elle ne possède pas de prénylation, ce qui pourrait empêcher la fixation de ChRac à la membrane. Il est aussi possible de suggérer un problème de concentration, si l'interaction entre Tp67 et ChRac avec la membrane est très spécifique de Nox2 et que trop peu de Nox2 sont intégrées, ou dans le bon sens, pour qu'il y ait une fixation suffisante pour être visible par microscopie confocale à fluorescence.

J'ai supposé qu'il existe une interaction en solution entre p47A et ChRac et que celle-ci se rompt lorsque les protéines interagissent avec la membrane des FM-GUV. Ceci expliquerait l'homogénéité de ChRac à la membrane d'une FM-GUV alors que p47A est hétérogène. Par conséquent, soit p47A et ChRac interagiraient en phase homogène (en solution), permettant à ChRac d'interagir avec la membrane après un changement conformationnel, suivi d'une rupture de l'interaction. Soit p47A modifie la membrane et, ou, la FM, ce qui permet à ChRac de s'y fixer. Comme ChRac ne se fixe qu'en présence de FM, je peux suggérer que p47A modifie la conformation de p22^{phox} ou de Nox2 ou la courbure membranaire locale autour du Cytb₅₅₈, ce qui permet à ChRac de se fixer à la FM. Il était totalement inattendu que la fixation de ChRac soit dépendante de la présence de p47A dans la mesure où aucune interaction spécifique n'a été observée jusqu'à aujourd'hui à ma connaissance entre ces deux protéines.

En outre, je fais l'hypothèse que lorsque les trois protéines cytosoliques sont nébulisées ensemble (Tp67, p47A et ChRac) en présence d'AA, un effet coopératif provoque la fixation homogène des trois protéines à la membrane et ce de façon indépendante de la présence de la FM. Ainsi, les trois protéines ensemble interagiraient facilement avec les lipides seuls alors que les protéines p47A et ChRac ensemble ont besoin de la FM pour se fixer efficacement. La protéine Tp67 pourrait donc être le lien entre p47A et ChRac permettant une fixation coordonnée.

Le GFP-Trimère se fixe très bien aux GUV sans FM en présence d'AA et faiblement en absence d'AA, mais néanmoins de façon significative. Par conséquent, le GFP-trimère se fixe aux lipides sans l'aide des FM et n'a pas nécessairement besoin de l'AA. Ceci signifie que sa conformation initiale est nativement adaptée à une fixation membranaire, malgré l'absence de la prénylation qui a été supposée être la responsable de l'adressage membranaire spontané (sans activateur) de la Citrine-Trimère en cellule COS. Cependant, sans AA, le GFP-Trimère n'active pas la NADPH oxydase, ce qui peut indiquer l'importance de l'AA pour l'activation du Cytb₅₅₈ indépendamment des protéines cytosoliques. La présence de la mutation Q61L dans Rac1 présent dans le trimère est peut-être responsable de la fixation spontanée du trimère à la membrane des GUV sans FM, mais à elle seule ne semble pas être suffisante pour une fixation aussi efficace qu'en présence d'une prénylation comme cela a été observé dans les cellules COS sans Cytb₅₅₈ (443). L'importance de ces hypothèses, permises par l'utilisation du Trimère, souligne le caractère crucial de l'utilisation de telles protéines chimériques pour simplifier l'étude du système et met en exergue la progression pas-à-pas de la recherche fondamentale.

3.3.2. LES CONDITIONS A TESTER DANS LE FUTUR

Les conditions de nébulisations externes proche d'une GUV non testées :

- Les Trios 'Tp67+p47C+Rac' sans AA sur GUV et 'Tp67+p47A+ChRac' sans AA sur FM-GUV
- Les Duos 'Tp67+p47A' ainsi que 'Tp67+ChRac' et 'p47A+ChRac' sans AA sur FM-GUV et sur GUV
- Les Monos Tp67 ainsi que p47A et ChRac avec ou sans AA sur FM-GUV. Et sans AA sur GUV.
- Le GFP-Trimère avec ou sans AA sur FM-GUV et identiquement avec le GFP-Trimère prénylé ou non et avec ou sans la mutation Q61L.

Il faut noter que pour une condition donnée, si une protéine se fixe à la membrane d'une GUV sans FM, je peux raisonnablement supposer, dans un premier temps, qu'elle se fixera aussi à la membrane d'une FM-GUV à moins que les FM soient adsorbées en surface et cachent l'accès à la membrane de la GUV et qu'il n'y ait pas non plus d'interaction entre cette protéine et la FM. Donc en première intention, les fixations positives sur GUV sans FM peuvent ne pas être répliquées sur FM-GUV. En revanche, pour une condition donnée, si une protéine ne se fixe pas à la membrane d'une GUV sans FM, il est indispensable de tester cette condition sur FM-GUV pour vérifier si la non-fixation est due à l'absence de Nox2 et, ou, de p22^{phox}, ou si elle est intrinsèque à la composition du mélange nébulisé.

4. Interactions des protéines cytosoliques avec la face interne de la membrane

L'intérêt des GUV est de pouvoir étudier de façon concomitante la localisation des protéines en mesurant l'activité de l'enzyme. En extrapolant, il y a clairement des possibilités supplémentaires comme celle de se placer soit *i*) dans une configuration phagosome avec Nox2 et p22^{phox} intégrées dans la membrane des GUV et orientées de l'extérieur vers l'intérieur avec accrochage des protéines cytosoliques et fixation du NADPH à l'extérieur et production des anions superoxyde à l'intérieur. Soit *ii*) dans une configuration membrane plasmique avec Nox2 et p22^{phox} intégrées dans la membrane des GUV et orientées de l'intérieur vers l'extérieur avec accrochage des protéines cytosoliques et fixation du NADPH à l'intérieur et production des anions superoxyde à l'extérieur.

Jusqu'à maintenant, a été explorée la fixation des protéines cytosoliques à l'extérieur de la GUV, en configuration phagosome, avec une courbure membranaire positive. J'ai donc souhaité tester la fixation des protéines cytosoliques à la face interne de la membrane des GUV, en configuration membrane plasmique. Cette fixation est possiblement différente à cause de la courbure négative de la face intérieure de la membrane, qui peut provoquer, ou être causée, par des lipides membranaires de géométrie différente. Ainsi, les différences potentielles peuvent être dues à *i*) la composition en lipides éventuellement différente dans le feuillet interne et dans le feuillet externe et, ou à *ii*) la courbure négative de la membrane qui favorise ou défavorise l'assemblage du complexe protéique à la membrane. Il est important de considérer ces possibilités en particulier dans le cas de p47^{phox} qui se fixe à certains phosphoinositides préférentiellement ainsi qu'à certains phospholipides anioniques, ou encore de Rac1Q61L qui se fixe à des phospholipides anioniques.

Ces expériences ont été réalisées exclusivement sur des GUV sans FM. L'injection des protéines cytosoliques a été permise par l'amélioration des conditions de nébulisation, qui initialement ne permettaient pas, ou très difficilement, l'injection de solutions visqueuses. Les pipettes ont d'abord été réalisées de façon beaucoup plus reproductible avec une forme de pointe beaucoup mieux adaptée permettant de traverser plus facilement la membrane des GUV tout en étant capable de nébuliser des solutions visqueuses. La technique de débullage de la solution

contenue dans l'extrémité de la pointe de la pipette a aussi été améliorée (**CHAPITRE IVB**) et nous avons pu constater qu'il était important d'utiliser des micropipettes récemment étirées, (moins de 24 h), permettant à la solution d'avoir une affinité suffisante avec le verre pour pouvoir progresser par capillarité.

Ainsi, l'objectif de cette partie est de déterminer si les protéines cytosoliques sont capables de se fixer à la face interne de la membrane des GUV, en utilisant des paramètres du contrôle positif de fixation externe correspondant aux trois protéines cytosoliques Tp67, p47A et ChRac ensemble en présence d'AA.

4.1. INJECTION DE TP67, CHRAC ET P47A A 300 nM EN PRESENCE DE 60 µM D'AA

Dans un premier temps, a été injecté, (nébulisé à l'intérieur), un mélange de Tp67, ChRac et p47A à 300 nM chacune, en présence de 60 µM d'AA dans des GUV sans FM. Cette condition est la condition de fixation systématiquement positive observée lors des nébulisations externes sur des GUV avec ou sans FM. La **Figure IV-29** présente ces résultats.

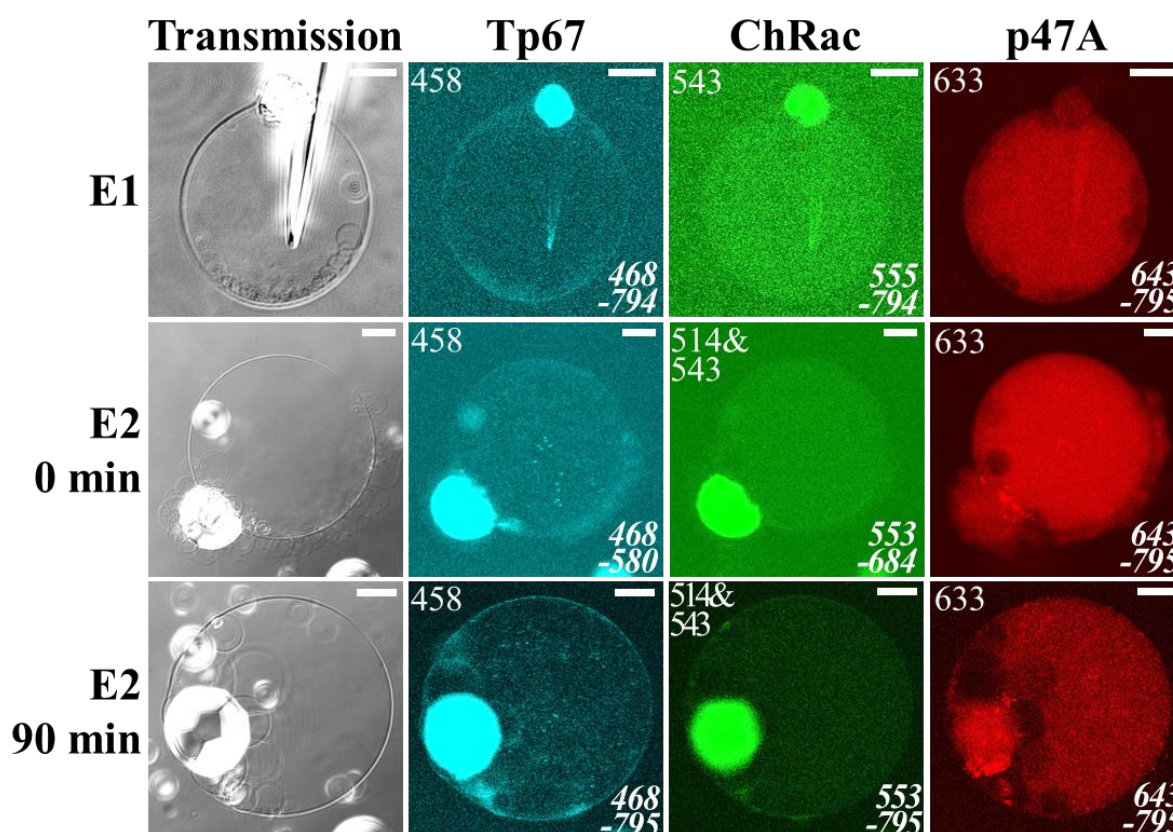


Figure IV-29. Localisation de Tp67, ChRac et p47A à 300 nM chacune, injectées ensemble en présence de 60 µM d'AA dans une GUV sans FM. Barre d'erreur 25 µm. Grossissement 200x.

À la suite du premier essai (**ligne E1**), est immédiatement observable la présence d'amas faiblement fluorescents de Tp67 à la face **interne** de la membrane. J'ai considéré qu'il était peu judicieux de quantifier la fluorescence de ces amas situés clairement à l'intérieur de la GUV plutôt qu'à la membrane. Par ailleurs, excepté ces amas, la fluorescence interne due à Tp67 est, (à l'œil nu), globalement la même que la fluorescence externe de la GUV, ce qui peut signifier soit que tout le Tp67 est sorti de la GUV, soit qu'il s'est concentré dans les amas périphériques, soit que la sensibilité par rapport au bruit de fond à cette longueur d'onde d'excitation n'est pas suffisante pour voir une différence. A contrario, ChRac présente une fluorescence homogène à l'intérieur de la GUV légèrement

supérieure à la fluorescence externe. En revanche, p47A présente une fluorescence homogène à l'intérieur de la GUV beaucoup plus importante que la fluorescence extérieure. De plus, par endroit, correspondant globalement aux amas de Tp67, la fluorescence de p47A à l'intérieur de la GUV est beaucoup diminuée. En fait, en observant la transmission, il est possible d'observer que Tp67 semble liée à des petites GUV présentes contre la face interne de la membrane de la GUV, alors que p47A est exclue de ces petites vésicules et que ChRac est répartie de façon homogène dans la grande GUV.

Dans un deuxième essai, (**ligne E2:0 min**), immédiatement après injection j'observe que Tp67 est surtout localisée dans des petites GUV adjacentes à la surface **externe** de la membrane de la GUV, comme cela est visible en parallèle sur l'image en transmission. Ces petites GUV en surface apparaissent lors de l'injection de façon anarchique à partir du réservoir et circulent le long de la membrane, à l'intérieur principalement mais parfois à l'extérieur également. En cours d'injection, il peut arriver que les petites GUV néoformées impliquent des réarrangements de la membrane de la GUV principale, avec parfois une réduction en circonférence de la section de la membrane de la GUV principale observée, mais le plus souvent une fusion de cette membrane (donc une augmentation de la circonférence de la coupe) avec les petites GUV néoformées. Comme cela est visible sur certains clichés de ce chapitre, un ensemble de petites GUV se forment souvent autour du réservoir ; parfois de façon pérenne, ou parfois temporairement en semblant réintégrer progressivement le réservoir au fil du temps. Il peut exister, plus rarement, des petites GUV internes juste après la formation des GUV, mais cette sous-compartmentation n'est souvent plus observable une fois le transfert de la suspension faite sur un autre support.

Autrement, à l'intérieur de la GUV comme à l'extérieur, la fluorescence de Tp67 est globalement la même. ChRac est une fois encore retrouvée faiblement à l'intérieur de la GUV, avec une intensité de fluorescence légèrement supérieure à l'intensité extérieure. Je constate également que p47A est présente de façon homogène à l'intérieur de la GUV de façon beaucoup plus intense qu'à l'extérieur, mais est exclue de quelques petites GUV de sous-compartmentation. Elle est, de plus, présente dans les GUV surfaciques externes.

Il semble que la localisation des protéines cytosoliques dans ces conditions est quelque peu erratique et difficile à interpréter. Tout se passe comme si Tp67 était encapsulée totalement dans des petites GUV néoformées, que p47A était partiellement, mais pas totalement, encapsulée avec Tp67 et que ChRac était totalement indépendant des deux autres protéines, contrairement à ce qui a été observé précédemment.

Nous nous sommes demandé si l'absence de fixation membranaire remarquable n'était pas due à une limite cinétique. Nous avons donc attendu 90 minutes puis pris de nouveaux clichés, (**ligne E2:90 min**). La membrane de la GUV s'est réarrangée et les petites GUV externes adjacentes ne sont plus visibles. Il reste néanmoins quelques petites GUV internes. Tp67 semble localisée principalement à la membrane de la GUV, ainsi qu'aux membranes des petites GUV internes. ChRac semble toujours homogène à l'intérieur, avec une légère surintensité membranaire mais est absente de l'intérieur des petites GUV internes. p47A semble, elle, homogène à l'intérieur de la GUV sauf aux endroits où sont repérables en transmission des petites GUV internes. Cela donne l'impression que Tp67 et ChRac se fixent légèrement dans cette configuration en fonction du temps, tandis que p47A ne se fixe pas. De plus, des différences subjectivement significatives d'intensité sont repérables entre les différents compartiments internes de la

GUV principale pour p47A ainsi que pour ChRac, mais pas pour Tp67, ce qui me fait penser que, dans cette configuration Tp67 passe facilement les membranes et s’y fixe facilement alors que p47A et ChRac ont plutôt tendance à rester séquestrés sans traverser les membranes. Si Tp67 se fixe ainsi aux membranes, si c’est le seul capable de traverser, c’est aussi le seul capable d’aller sur la face externe de la membrane et à s’y fixer. En effet, il a été montré que des molécules de 70 kDa comme le Dextran sont capables de traverser ces membranes de GUV, probablement via des mouvements de reptation (398). En considérant ce résultat, plus la protéine est globulaire, moins elle aura tendance à passer à travers ces membranes.

Selon moi, les trois protéines cytosoliques à 300 nM chacune injectées ensemble en présence de 60 μM d’AA ne se fixent pas sur la face interne de la membrane des GUV sans FM. Néanmoins, un phénomène intéressant de sous-compartmentation est observé, qui pourrait être exploré plus avant dans un projet parallèle. Lors de la nébulisation externe, beaucoup plus de protéines sont nébulisées que lors d’une nébulisation interne, (ceci est certain). Si seulement une petite proportion de ces protéines est dans une configuration active et est impliquée dans des interactions permettant leur fixation membranaire, alors il est nécessaire de nébuliser une grande quantité du mélange pour avoir suffisamment de protéines qui se fixent à la membrane. Il s’agirait donc d’un problème de concentration et de proportion de protéines actives.

4.2. INJECTION DE TP67, CHRAC ET P47A A 900 nM EN PRESENCE DE 60 OU 180 μM AA

Dans un deuxième temps, nous avons voulu vérifier si le comportement observé dans ces conditions n’était pas dû à une trop faible concentration en protéines, j’ai donc augmenté la concentration de chacune des trois protéines cytosoliques à 900 nM et testé cette condition en présence de 60 μM d’AA ou, sur une autre GUV, 180 μM d’AA, proportionnellement à l’augmentation de la concentration de chacune des protéines. Ces résultats sont présentés en **Figure IV-30**.

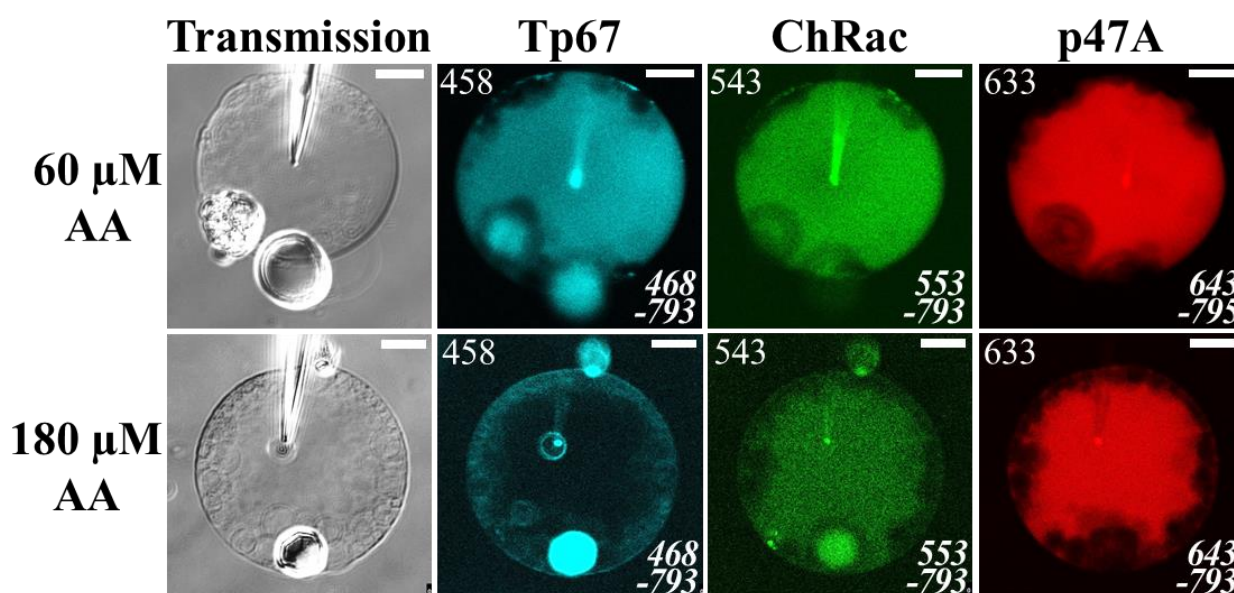


Figure IV-30. Localisation de Tp67, ChRac et p47A à 900 nM chacune, injectées ensemble en présence de 60 μM ou 180 μM d’AA dans une GUV sans FM. Barre d’échelle 25 μm . Grossissement 200x.

Une image en transmission présentant une GUV en cours de réarrangement avec une compartimentation interne est présentée pour la condition avec 60 μM d’AA. A l’endroit de ces compartimentations, j’observe, cette fois-ci,

peu de Tp67, peu de ChRac et pas du tout de p47A. Pourtant, ces trois protéines sont présentes clairement de façon homogène à l'intérieur de la GUV principale. Une fixation membranaire très ponctuelle hétérogène de Tp67 et de ChRac semble aussi avoir lieu, (en haut de l'image), alors que p47A semble totalement séquestrée dans la GUV principale

En présence de 180 μM d'AA, est présentée une GUV avec beaucoup de compartimentations stables internes collées contre la membrane de la GUV principale. Ici, Tp67 ne semble pas ou peu présente dans cette GUV, ni à l'extérieur, mais semble collée aux petites GUV internes de compartimentation, ainsi que, dans une moindre mesure, à la membrane de la GUV principale. ChRac et p47A sont principalement séquestrées dans la GUV principale, mais semblent avoir tendance à marquer légèrement la membrane de la GUV principale et les membranes des GUV de compartimentation.

Par conséquent, je ne retrouve pas une fixation franche comme cela a été observé précédemment suite aux nébulisations externes. Tp67, p47A et ChRac injectées ensemble à 900 nM chacune en présence de 60 ou 180 μM d'AA ne se fixent pas à la face interne de la membrane des GUV malgré l'augmentation de la concentration en protéines cytosoliques.

4.3. BILAN DES RESULTATS DE NEBULISATIONS INTERNES

En comparaison du résultat obtenu dans ces conditions par nébulisation externe, je peux affirmer que le résultat obtenu par nébulisation interne est négatif et que ces trois protéines cytosoliques ensemble en présence d'AA sur une GUV sans FM ne se fixent pas à la face interne des GUV.

Il y a potentiellement un problème de structure physicochimique de ces GUV qui limite la fixation des protéines cytosoliques, comme par exemple un ensemble de SUV adsorbées à la surface interne, ou encore une répartition inéquitable des phospholipides entre le feuillet interne et le feuillet externe, qui impliquerait l'absence des phospholipides indispensables à leur fixation dans le feuillet interne, ou bien une courbure négative peu efficace pour cette fixation.

Comme les expériences ont toutes été réalisées en absence de FM, je fais aussi l'hypothèse que sur une courbure membranaire positive les lipides suffisent pour que les protéines cytosoliques se fixent indépendamment de la présence de Cytb₅₅₈, alors que sur une courbure positive, les interactions avec le Cytb₅₅₈ seraient indispensables à la fixation des protéines cytosoliques. Il serait très intéressant de tester ces hypothèses en refaisant cette expérience sur des FM-GUV.

Une sous-compartimentation peut facilement être obtenue par cette technique, elle était ici incontrôlée, mais dans un contexte contrôlé, il pourrait s'avérer utile de compartimenter des GUV. Il serait donc intéressant de comprendre le mécanisme de formation de ces sous-compartiments et de faire, par exemple, des essais d'injection dans ces sous-compartiments.

5. Tests d'activité de NOX2 sous microscope

Après avoir exploré quelques aspects de l'assemblage des protéines cytosoliques de NOX2 à la membrane des GUV, nous avons voulu savoir si nous sommes capables de mesurer les ROS produits par NOX2 fonctionnelle dans ces conditions.

5.1. PAR MICROELECTROCHIMIE

Comme expliqué dans l'introduction, j'ai souhaité mesurer la production de peroxyde d'hydrogène par électrochimie sous microscope avec l'aide de mes collaborateurs du groupe NSysA de l'ISM de Bordeaux, qui ont une expertise avancée dans la détection d'espèces électroactives par microélectrochimie sous microscope.

5.1.1. TESTS D'INSERTION DE NOX2 ET P22^{phox} DANS LA MEMBRANE DES GUV PAR ELECTROCHIMIE

Nous avons précédemment montré que la formation des GUV par réhydratation de SUV multilamellaires en présence de FM conduit à la formation de FM-GUV à partir desquelles trois hypothèses peuvent être faites : *i*) soit les vésicules de FM sont fusionnées avec la membrane de la GUV et les protéines Nox2 et p22^{phox} sont intégrées à cette membrane, *ii*) soit les vésicules de FM sont adsorbées à la surface de la membrane de la GUV, auquel cas aucune protéine n'est intégrée à cette membrane, *iii*) soit les deux phénomènes existent.

Par conséquent, l'injectons dans une FM-GUV de l'ensemble des composants permettant à NOX2 d'effectuer la catalyse d'oxydation du NADPH et de réduction monoélectronique de l'anion superoxyde, *i.e.* p67^{phox}, p47^{phox}, Rac1Q61L, AA et NADPH, nous devrions pouvoir montrer que les FM sont intégrées si des ROS sont détectés. En effet, si Nox2 et p22^{phox} sont intégrées à la membrane de la GUV avec une orientation adéquate, dans ces conditions les ROS devraient être produits à l'extérieur de la GUV.

Je présente en **Figure IV-31** le dispositif expérimental de microélectrochimie sous-microscope après injection de l'ensemble de ces composants dans une FM-GUV.

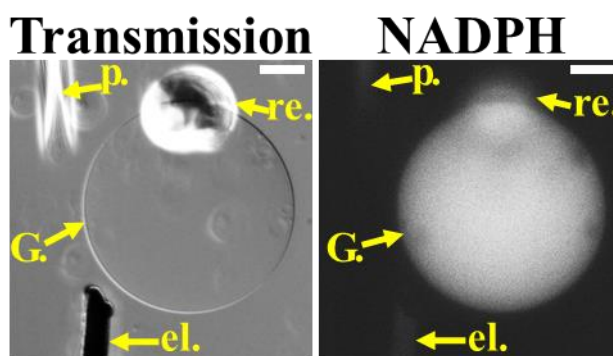


Figure IV-31. Dispositif expérimental de microélectrochimie sous microscope plein champ sur une FM-GUV injectée avec NADPH, p67^{phox}, p47^{phox}, Rac1Q61L et AA. En transmission et avec Fluorescence du NADPH.

el.<=>microélectrode. G.<=>GUV. p.<=>micropipette. re.<=>réservoir. Barre d'échelle 25 μ m. Grossissement 200x.

La mesure des ROS est très dépendante de la distance de la microélectrode à la membrane et la microélectrode doit donc être très proche de la membrane pour pouvoir observer un signal (398). La fluorescence du NADPH est également bien visible. Nous pensons pouvoir observer un signal de ROS par électrochimie, mais aucun signal n'a

été détecté. Cela peut signifier soit que les conditions sont inadaptées à l'obtention d'une activité de NOX2 (pas la bonne concentration en AA par exemple), soit que la FM n'a pas fusionné à la membrane de la GUV, soit que le signal est trop faible pour être détecté, soit que tous les Cytb₅₅₈ sont dans la mauvaise orientation.

Par microélectrochimie, nous n'avons pas pu prouver l'intégration des protéines Nox2 et p22^{phox} à la membrane d'une FM-GUV.

Il serait possible d'avoir une meilleure idée de la réalité de l'intégration de protéines membranaires dans la membrane des GUV en faisant de la cryofracture en microscopie électronique.

5.1.2. DETECTION DES ROS PRODUITES PAR NOX2 EN MICROREACTEUR PAR ELECTROCHIMIE

La détection des ROS par microélectrochimie sur des FM-GUV ayant échouée, nous avons maximisé nos chances de détection en injectant, dans des GUV sans FM, un mélange fonctionnel de NADPH oxydase contenant 10 nM de Cytb₅₅₈ avec 300 nM de chaque protéine cytosolique p67^{phox}, p47^{phox} et Rac1Q61L en présence de 40 μM d'AA et de 500 μM de NADPH. Nous avons ensuite approché l'électrode proche de la membrane comme montré précédemment et mesuré la production de ROS. Le signal mesuré est montré en **Figure IV-32**.

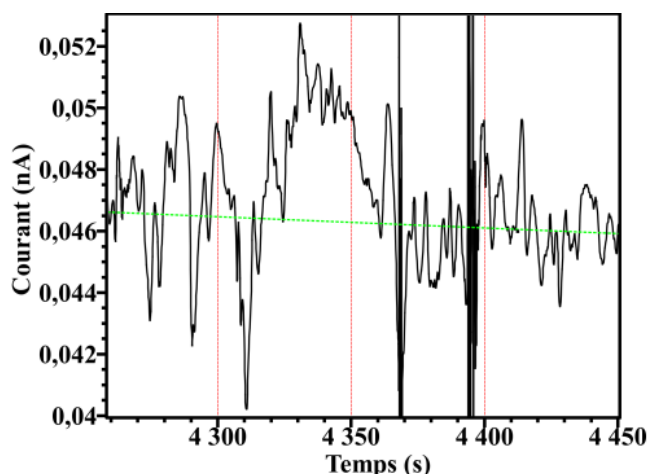


Figure IV-32. Mesure de la sortie de ROS produites en microréacteurs par NOX2 à travers une membrane de GUV par chronoampérométrie. Polarisation 0,3 V contre AgCl/Ag dans du PBS contenant 500 μM de NADPH. Electrode de carbone platiné 10 μC. Moyenne mobile à 10 points du signal. La ligne verte pointillée correspond à la ligne de base. Bruit de fond environ 2 pA.

Une variation d'amplitude faible mais significative du signal entre 4275 et 4350 s est observée, signifiant probablement la détection du peroxyde d'hydrogène et des anions superoxyde résiduels diffusant à travers la membrane. Ce signal est cependant très instable et il est difficile d'exclure une variation de la concentration locale en NADPH. En effet, à ce stade, nous n'avons pas encore optimisé la détection du peroxyde d'hydrogène et des anions superoxyde en présence de NADPH comme nous avons pu le faire pour les cinétiques de consommation du peroxyde d'hydrogène par électrochimie en macroréacteur au **CHAPITRE III**.

Afin de s'assurer qu'il s'agissait bien d'un signal, nous avons ensuite nébulisé le mélange fonctionnel décrit ci-dessus directement sur l'électrode. Nous présentons ces résultats en **Figure IV-33**.

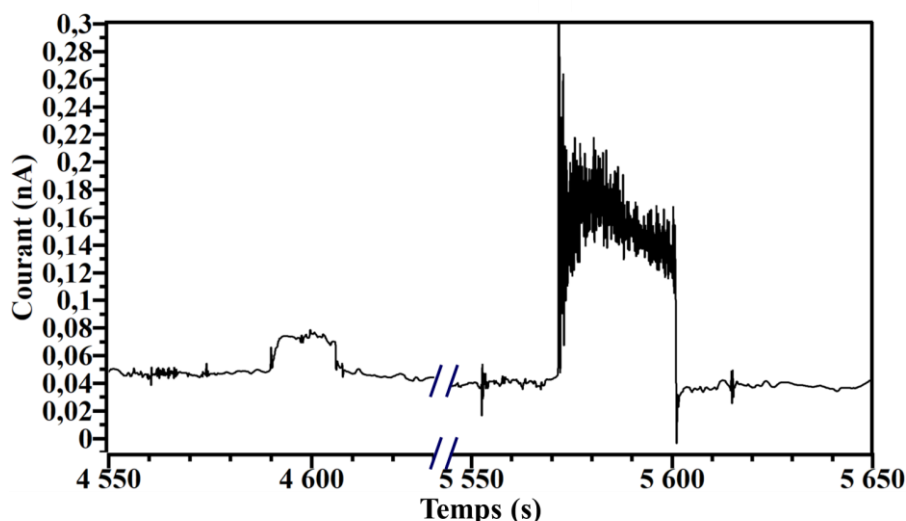


Figure IV-33. Mesure du peroxyde d'hydrogène, des anions superoxyde et du NADPH dans un flux de nébulisation d'un mélange de NOX2 fonctionnelle. Polarisation 0,3 V contre Ag/AgCl dans du PBS contenant 500 μ M de NADPH. Electrode de carbone platiné 10 μ C.

Deux nébulisations consécutives ont été réalisées, le deuxième flux étant beaucoup plus fort que le premier. Il est clairement visible, aux alentours de 4600 s puis aux alentours de 5580 s deux augmentations du signal correspondant à la détection du peroxyde d'hydrogène et des anions superoxyde (et potentiellement du NADPH même si l'électrode a été polarisée en présence de cette concentration en NADPH).

Ces résultats montrent qu'il est difficile de mesurer la production des ROS produits par NOX2 par électrochimie de cette façon mais nous avons pu obtenir un résultat quantitatif et cela semble néanmoins possible. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus en macroréacteurs au CHAPITRE III qui montrent que la détection du peroxyde d'hydrogène est extrêmement limitée du fait de sa consommation intrinsèque à la FM.

5.2. PAR FLUORESCENCE (AMPLEX-RED)

Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'origine du problème de détection est intrinsèque à l'activité de NOX2 ou dû à une contrainte de détection, qui serait notamment liée à la technique utilisée. Nous avons donc utilisé un autre moyen de détection homogène du peroxyde d'hydrogène : l'Amplex-Red (AR) couplé à la HorseRadish Peroxidase (HRP).

5.2.1. SUR GUV SANS FM

Nous avons tout d'abord formé des GUV en absence de FM en réhydratant les SUV-MLV avec le tampon habituel supplémenté avec 1 mM de NADPH dans 300 μ L, puis en diluant jusqu'à 1000 μ L avec du PBS supplémenté tel que la concentration finale soit de 50 μ M d'AR et de 1 mM de NADPH. En effet, afin de maximiser le signal, en considérant que le NADPH et l'AR traversent facilement les membranes de ces GUV, nous souhaitons avoir une concentration de NADPH et d'AR que nous pouvions considérer comme constante à l'intérieur des GUV pendant la durée de la mesure qualitative.

Nous avons ensuite injecté un mélange fonctionnel contenant 10 nM de Cyt_{b558}, ainsi que 300 nM de chacune des protéines p67^{phox}, p47^{phox} et Rac1Q61L additionné de 60 μM d'AA et de 0,04 U·mL⁻¹ de HRP. Les résultats sont présentés **Figure IV-34**.

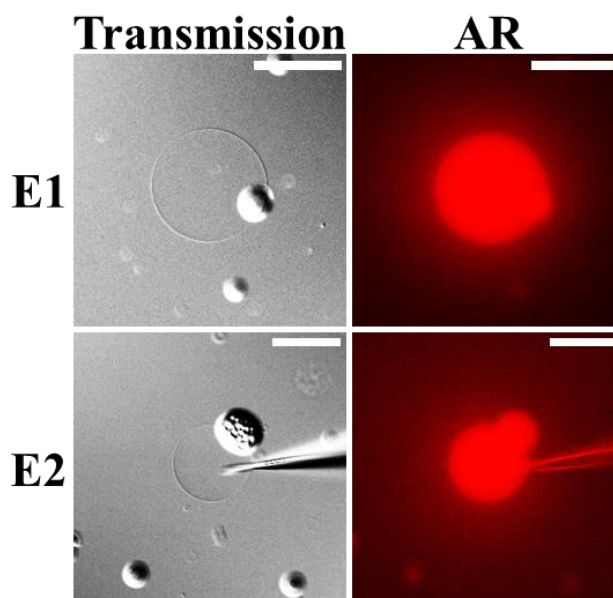


Figure IV-34. Mesure de la production de peroxyde d'hydrogène par NOX2 en microréacteur GUV.

Microscopie plein champ (non confocal) DIC. Barre d'échelle 50 μm. Grossissement 200x. Excitation 545±15 nm, Emission 565 nm (cube filtre Y3).

Les deux essais montrent la production de résorufine exclusivement à l'intérieur de la GUV, avec un halo fluorescent externe correspondant à la diffusion de la résorufine de l'intérieur de la GUV vers l'extérieur. La fuite de la résorufine de ce type de GUV a déjà été clairement démontrée (398, 504).

Vu l'important volume injecté, impliquant une multiplication environ par 3 du diamètre, soit une multiplication par environ 3,4 du volume initial, nous pouvons considérer qu'il y a ainsi, à l'intérieur de la GUV, une activité spécifique moléculaire proche de celle que nous obtenons par spectrophotométrie d'absorption, donc entre 200 et 400 anions superoxyde produits par seconde pour une seule enzyme. Si ces anions superoxyde se dismutent rapidement, nous pouvons obtenir une production de 100 à 200 molécules de peroxyde d'hydrogène par seconde pour une seule enzyme. Ce qui signifierait une consommation de 100 à 200 nM d'AR en une seconde pour 1 nM d'enzyme, or il y a un peu moins de 10 nM d'enzyme dans la GUV, ce qui impliquerait une consommation d'un peu moins de 1 à 2 μM d'AR en une seconde.

Une expérience identique a été faite mais avec, dans le mélange injecté, 226 μM d'AA au lieu de 60 μM. La GUV a été fortement perturbée par l'injection, probablement à cause de la présence d'une telle quantité d'AA, mais une production de peroxyde d'hydrogène a été néanmoins détectée. Il faut noter que comme nous l'avons vu dans le **CHAPITRE III**, l'activité spécifique moléculaire (ASM), (observable Cyt_c ou observable NADPH), décroît fortement voire devient quasiment nulle au-delà d'une certaine concentration en AA. Ici nous observons, aux deux concentrations utilisées, une production de peroxyde d'hydrogène. Cela peut signifier que dans ces conditions et dans le cas de la détection du peroxyde d'hydrogène, la concentration en AA ne serait pas forcément aussi cruciale.

Du peroxyde d'hydrogène est ainsi bien détecté et donc produit directement ou indirectement par NOX2 dans ce microréacteur. Il est donc tout à fait envisageable de détecter une production de peroxyde d'hydrogène par une FM-GUV dans des conditions similaires. Si nous ne détectons pas de peroxyde d'hydrogène produit par électrochimie, c'est donc qu'il y avait un problème d'accessibilité à l'électrode. Le fait que nous ne détectons quasiment pas de peroxyde d'hydrogène en macroréacteur par électrochimie suggère la même hypothèse. La HRP et l'AR sont répartis de façon homogène et sont toujours en proche contact avec les FM. A l'opposé, la zone active de l'électrode de travail est très ponctuelle et le peroxyde d'hydrogène doit traverser la couche de diffusion avant d'atteindre l'électrode, autrement dit, la distance entre les FM et la zone active de l'électrode est élevée à l'échelle de la molécule, ce qui peut laisser le temps au peroxyde d'hydrogène de réagir par d'autres voies.

Il va être indispensable de mesurer la production du peroxyde d'hydrogène en milieu homogène en système acellulaire comme je l'ai présenté dans le CHAPITRE III pour vérifier que nous obtenons bien des résultats équivalents.

5.2.2. SUR GUV AVEC FM

Nous avons montré que le peroxyde d'hydrogène n'est pas détecté par électrochimie à travers la membrane alors qu'il est bien produit à l'intérieur. Nous avons donc voulu savoir si nous pouvions le détecter à l'intérieur des GUV à l'aide de l'Amplex-Red et de la HRP. Pour ce faire, nous avons formé des, FM-GUV (non fluorescentes, donc nous n'avons pas pu vérifier la localisation des FM ici), nous avons lavé le milieu après transfert sur une lame fonctionnalisée poly-L-lysine tel que la concentration finale en NADPH est de 1 mM et en AR de 50 μ M. Nous avons ensuite injecté dans la GUV une solution de HRP à 4 U·mL⁻¹ puis réalisé une nébulisation externe sur cette GUV d'un mélange contenant 300 nM chacune de p67^{phox}, p47^{phox} et Rac1Q61L, additionné de 60 μ M d'AA. Le résultat à un instant t est donné en **Figure IV-35**.

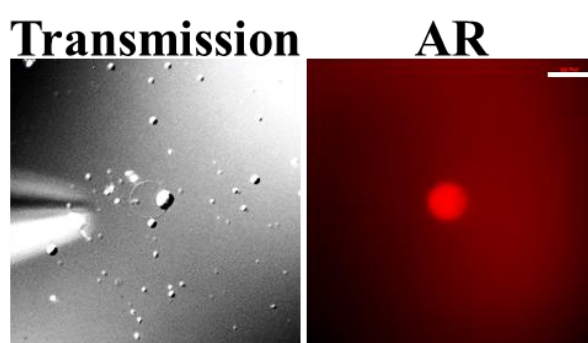


Figure IV-35. Mesure de la présence de H₂O₂ dans une FM-GUV via une activation externe de NOX2.

Microscopie plein champ (non confocal) DIC. Barre d'échelle 50 μ m. Grossissement 200x. Excitation 545 \pm 15 nm, Emission 565 nm (cube filtre Y3).

L'Amplex red est rapidement oxydé en résorufine à l'intérieur de la FM-GUV puis un halo rouge autour de la FM-GUV signe que la résorufine traverse facilement la membrane comme cela est déjà connu. Ceci qui signifie que NOX2 est active et que le peroxyde d'hydrogène soit est produit à l'intérieur de la GUV, signifiant qu'il y a bien fusion de la membrane des FM avec la membrane de la GUV, soit que le peroxyde d'hydrogène formé par les FM adsorbées à la surface de la GUV traverse la membrane de la GUV, contrairement à ce qui a précédemment été

observé en électrochimie. Ce résultat n'apporte qu'une réponse indicative qui est néanmoins intéressant dans la mesure où il s'agit de la première expérience qui implique une étude transmembranaire sur les FM-GUV.

Il aurait été idéal de faire le contraire, c'est-à-dire faire des FM-GUV, mettre dans le milieu extérieur HRP et injecter à l'intérieur les protéines cytosoliques et l'AA pour vérifier si nous obtenons une oxydation de l'AR. Le plus gros problème de ce système est la perméabilité membranaire qui est très forte.

D. CONCLUSION

Ce chapitre traite dans un premier temps de développement méthodologique à travers la mise au point d'une technique de formation de FM-GUV suivie de leur caractérisation préliminaire. Dans un deuxième temps, les interactions entre les protéines cytosoliques et la membrane, entre les protéines cytosoliques entre-elles et entre les protéines cytosoliques et le *Cytb₅₅₈* ont été testées visuellement directement sur GUV, en face interne et en face externe. Enfin, des tests qualitatifs évaluant la possibilité de mesurer l'activité de NOX2 par microélectrochimie et par fluorescence sous microscope ont été réalisés.

- **LA FORMATION DE NOX-GUV RESTE A CONFIRMER MAIS DES PROGRES SIGNIFICATIFS ONT ETE REALISES ET LA FORMATION DE FM-GUV EST OPTIMISEE**

Nous avons réussi à former facilement et de façon reproductible des FM-GUV par réhydratation d'un dépôt sec de SUV-MLV. Cependant, nous avons été dans l'impossibilité de caractériser si les FM ont fusionné avec la membrane des GUV et s'il s'agit donc vraiment de NOX-GUV ou si les FM sont seulement adsorbées en surface des GUV et qu'il s'agit seulement des FM-GUV (**Figure IV-12, Figure IV-13, Figure IV-14**). En outre, nous avons montré que les FM ont une affinité particulière pour le réservoir de lipides et qu'elles ne peuvent pas traverser la membrane des GUV (**Figure IV-11**).

- **LES GUV ET LES FM-GUV COUPLEES A LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE SONT DE PUISSANTS OUTILS POUR ETUDIER DIRECTEMENT LES INTERACTIONS DE PROTEINES AVEC UNE MEMBRANE**

Les GUV, couplées à la microscopie confocale à fluorescence, se sont révélées être un système très efficace pour étudier directement les interactions entre la bicouche de phospholipides et les protéines cytosoliques *p67^{phox}*, *p47^{phox}* et *Rac1Q61L*. L'apport des GUV dans ce contexte par rapport aux autres liposomes de plus petites tailles est d'une part d'avoir accès à une visualisation directe des interactions et d'autre part de facilement visualiser la répartition des protéines en interaction avec la membrane (**Figure IV-15, Figure IV-16, Figure IV-17, Figure IV-18, Figure IV-20, Figure IV-21, Figure IV-22, Figure IV-23, Figure IV-24, Figure IV-25**). Nous avons eu des difficultés à réaliser ces expériences sur la face interne de la membrane et la cause reste à déterminer (**Figure IV-29, Figure IV-30**). Il sera indispensable de compléter ces expériences en présence de *p40^{phox}* ainsi que pour des compositions lipidiques variées.

Néanmoins un résultat global important est que certaines combinaisons de protéines cytosoliques sont capables d'interagir avec une membrane purement lipidique en absence de *Cytb₅₅₈*. Autrement dit, dans certaines conditions, la translocation des protéines cytosoliques aux membranes biologiques pourrait être régie uniquement par la composition lipidique et la structure de la membrane, de façon indépendante de la présence du *Cytb₅₅₈*, comme cela a déjà pu être observé avec le trimère de Pick en cellules (443) et a été confirmé en GUV (**Figure IV-26, Figure IV-27**).

➤ **DES MESURES QUALITATIVES DE PRODUCTION DE ROS PAR NOX2 ONT ETE REALISEES, MAIS IL RESTE DES CHALLENGES DE TAILLE A SURMONTER POUR FAIRE DES ANALYSES QUANTITATIVES**

Les mesures de production de ROS par électrochimie ont échoué à montrer une activité significative de NOX2 au niveau des FM-GUV, mais nous avons pu montrer que les ROS produits par NOX2 sont mesurables par cette technique (**Figure IV-32, Figure IV-33**). Il faut rappeler qu'au **CHAPITRE III** nous avons montré que les ROS produits par NOX2 ne sont pas mesurables en macroréacteur à cause d'une activité catalase et potentiellement d'une activité superoxyde dismutase intrinsèque aux FM (**Figure III-33, Figure III-34, Figure III-35, Figure III-36**). Par conséquent, tant que le problème de consommation, par les FM, du peroxyde d'hydrogène produit par NOX2 n'est pas résolu, cette technique ne sera pas efficace.

La mesure qualitative de la production de peroxyde d'hydrogène par NOX2 en microréacteur GUV, mais aussi en FM-GUV par fluorescence (AR+HRP), est un succès et montre que du peroxyde d'hydrogène est effectivement un sous-produit de la catalyse de la production des anions superoxyde par NOX2 (**Figure IV-34, Figure IV-35**). Le fait de ne pas pouvoir détecter le peroxyde d'hydrogène par électrochimie mais de réussir à le faire par fluorescence suggère que l'électrode est à une distance trop importante de la source de production du peroxyde d'hydrogène pour pouvoir le détecter, alors que l'AR et l'HRP sont, virtuellement, partout et homogène dans le milieu, donc la probabilité de rencontre est beaucoup plus importante.

L'ensemble des données du projet ont été collectées en seulement quatre semaines intensives d'expériences, (sans inclure la préparation des échantillons). J'estime donc, considérant le temps alloué et l'ambition du projet, que ce dernier a progressé de façon très satisfaisante, même si certains objectifs restent à développer.

E. REPARTITION DU TRAVAIL

Le projet dont les résultats sont présentés et discutés dans le présent chapitre étant une collaboration, je souhaite évoquer la répartition du travail entre mes collaborateurs et moi-même ainsi que mon équipe.

Expérimentalement, j'ai produit l'ensemble des protéines et le cas échéant j'ai marqué, notamment, p47^{phox} avec l'Alexa Fluor® 647. J'ai aussi isolé les fractions membranaires de neutrophiles et le cas échéant je les ai marquées avec l'Alexa Fluor® 488. J'ai traité, analysé et mis en forme la quasi-totalité des données. Evidemment, j'ai écrit seul ce chapitre.

Pauline Lefrançois a préparé les stocks de SUV-MLV. Elle s'est aussi occupée des aspects techniques de l'électrochimie, de la microscopie et de la micromanipulation et nos discussions à propos des expériences ont toujours aidé à nous faire progresser. Les expériences réalisées à Bordeaux ont donc été réalisées en majorité par Pauline Lefrançois, avec mon expertise sur la NADPH oxydase pour faire des tests pertinents. Les expériences ont été supervisées sur place par Stéphane Arbault et au LCP par Tania Bizouarn.

J'estime avoir eu beaucoup de chance à travers cette collaboration, en premier lieu grâce à l'efficacité et aux indéniables qualités scientifiques de Pauline Lefrançois et de Stéphane Arbault, qui ont permis à ce projet d'exister

et m'ont transmis nombre de compétences et de connaissances avec beaucoup de gentillesse. De surcroît, leur groupe NSysA du laboratoire ISM de Bordeaux, m'a permis de bénéficier d'un matériel de pointe, de qualité et bien entretenu. L'association des compétences et du matériel nous a permis d'obtenir des résultats de très bonne qualité en peu de temps.

CHAPITRE V – Conclusions générales et perspectives

A. CONCLUSIONS

1. La compartimentation limite la mesure des O_2^- produits par NOX2 avec le Cytc

Les fractions membranaires de neutrophiles humains contenant NOX2 sont utilisées depuis des décennies pour étudier la biochimie de l'enzyme entière comme par exemple les mécanismes d'activation et de régulation de l'activité enzymatique en lien avec l'assemblage macromoléculaire, ou encore, l'impact de molécules effectrices et de paramètres physiques sur l'activité de l'enzyme en lien avec les propriétés physicochimiques des différentes protéines du complexe et les groupements prosthétiques de Nox2. La technique privilégiée de mesure de l'activité de NOX2 est, depuis lors, l'utilisation du Cytc pour mesurer la production des anions superoxyde.

Dans ma thèse, je montre que dans les conditions usuelles de mesure, la vitesse de réduction du Cytc par les anions superoxyde produits par NOX2 est non linéairement proportionnelle à la vitesse de production des anions superoxyde. J'explique ceci par le caractère hétérogène et compartimenté de la catalyse, qui implique une sous-estimation de la détection des anions superoxyde. Plus précisément, la sous-estimation est due à une perméabilité membranaire limitante, pouvant causer une séquestration des anions superoxyde et augmenter la proportion de dismutation et donc la proportion d'anions superoxyde non détectés par le Cytc. Ces difficultés de mesure sont amplifiées par la présence d'autres enzymes pouvant catalyser des réactions parasites et j'ai notamment montré que les fractions membranaires de neutrophiles possèdent une activité catalase et qu'il est probable qu'elles possèdent aussi une activité myéloperoxydase.

J'ai déterminé en outre que pour réaliser des mesures fiables, il faut se placer à des concentrations en AA supérieures à la concentration optimale en AA et laisser un temps d'incubation suffisant pour que l'effet de l'AA sur les composants du système soit à l'équilibre. Les autres optimisations réalisées sur les aspects techniques, (dégazage du tampon avant usage, dépendance en température, mesures de la concentration en dioxygène...), ainsi que les réflexions qui y sont issues, sont aussi importantes pour les expériences futures, en système acellulaire comme en système cellulaire, mais aussi pour d'autres systèmes qui utilisent du dioxygène.

En conclusion, mes travaux ont permis de comprendre les origines multiples des problèmes de stœchiométrie constatés et de finalement trouver des conditions permettant de les résoudre. Afin de faire des mesures pertinentes, je conseille d'ailleurs à toute personne travaillant en système acellulaire de mesurer la consommation du NADPH plutôt qu'une autre observable plus aléatoire. L'avantage supplémentaire de mesurer la consommation du NADPH est qu'elle peut être faite soit par absorptiométrie, soit par fluorimétrie, (excitation à 350 nm et émission autour de 450 nm), s'il y a nécessité d'une sensibilité plus grande. De plus, les fruits de mes recherches pourront aussi être utiles aux études dans d'autres systèmes compartimentés proches comme par exemple les microsomes mitochondriaux. Les objectifs de ce projet ont donc été pleinement atteints. Ces travaux m'ont aussi été très utiles pour m'approprier les subtilités du fonctionnement de la

NADPH oxydase et des mesures associées, ce qui m'a beaucoup servi pour la mise au point et l'étude des FM-GUV avec rigueur.

2. La formation de FM-GUV permet l'étude des interactions protéine-protéine et protéine-lipides

Les interactions protéine-protéine et protéine-lipides des NADPH oxydases sont classiquement mesurées en biochimie à l'aide de tests d'interaction, (Scatchard, EC50, SPR...), mais aussi en cellules à l'aide de protéines fluorescentes pouvant faire du FRET lorsqu'elles interagissent, ou en coimmunolocalisation ou encore en utilisant des techniques de biochimie après fractionnement subcellulaire. L'étude concomitante sur cellule unique de l'activité de l'enzyme et de l'assemblage du complexe aux différentes phases de son fonctionnement, (activation localisée et temporisée, maintien de l'activité et désactivation), est très difficile à faire.

L'obtention de ces résultats a été permise par ma collaboration avec Pauline Lefrançois et Stéphane Arbault. J'ai montré que des FM-GUV peuvent être formées rapidement et facilement en réhydratant un dépôt sec de SUV-MLV avec du tampon contenant des fractions membranaires. De plus, les interactions protéine-lipides et protéine-protéine sont facilement étudiables avec ces FM-GUV par micromanipulations et cela a permis en particulier de montrer que l'interaction entre les protéines et les lipides est plus importante pour la fixation et le maintien membranaire des protéines cytosoliques que ne le sont les interactions entre les protéines cytosoliques et le Cytb₅₅₈.

En particulier ces résultats montrent que p47^{phox} joue un rôle central pour l'ancrage des autres protéines cytosoliques sur une membrane totalement lipidique. De plus, il semble que p47^{phox} seul oligomérisse et se regroupe en patchs à la suite de son interaction avec les lipides de la membrane et il me paraît alors intéressant d'étudier l'implication de cette oligomérisation potentielle en cellules.

Le trimère est capable d'interagir avec la membrane en absence d'AA, même si son interaction est meilleure en présence d'AA. Ce résultat est en bonne corrélation avec les résultats obtenus en cellules montrant que le trimère est capable de se fixer aux membranes des cellules en absence de stimulus. En cellules, cela avait été attribué à la présence de la prénylation, or lors des expériences sur les GUV le trimère n'était pas prénylé. Il me semble donc important de faire des contrôles de l'implication de la prénylation sur les résultats obtenus par notre équipe en cellules.

Les mesures d'activité par électrochimie n'ont pu être optimisées faute de temps. Néanmoins nous avons pu montrer qu'il est possible de voir un signal de production de ROS par NOX2 par électrochimie sous microscope, ce qui signifie que des optimisations sont possibles. De plus, un microréacteur de GUV sans FM ainsi qu'un microréacteur de FM-GUV ont permis de montrer que du peroxyde d'hydrogène était très facilement détectable en utilisant de l'Amplex-Red et de la HRP.

En conclusion, des conditions pour former des FM-GUV ont été trouvées et les expériences d'interactions protéine-protéine et protéine-lipides ont montré l'efficacité du système pour cette application. Les mesures

d'activité de NOX2 en FM-GUV ont seulement partiellement réussies et il est nécessaire d'optimiser le système. L'objectif de cette partie a donc été partiellement atteint.

B. PERSPECTIVES

1. Mesures de l'activité des NADPH oxydases en système acellulaire

Mes recherches ont permis de montrer que la mesure de l'activité de la NADPH oxydase du phagocyte en système acellulaire nécessite obligatoirement d'établir le rapport entre la mesure des ROS produits et la mesure de la consommation du substrat NADPH. Dans l'avenir, les expériences similaires devront, en toute rigueur, prendre en compte ces résultats. Idéalement, les FM de neutrophile devraient être beaucoup mieux caractérisées : en analysant qualitativement et quantitativement leur composition lipidique de façon systématique (par HPLC par exemple), mais aussi en trouvant un moyen de quantifier précisément le nombre de vésicules présentes par unité de volume, (éventuellement par dénombrement au microscope électronique), et en mesurant systématiquement leur taille par DLS. En outre, le protocole de fraction membranaire reste encore à optimiser pour limiter les risques de contamination par la myéloperoxydase.

Afin d'approfondir ces recherches et de vérifier plus avant la responsabilité de la membrane dans les phénomènes observés, la première étape pourrait être de réaliser les mêmes expériences mais dans un système mieux contrôlé en utilisant du Cyt_{b558} purifié qui serait inséré dans des SUV synthétiques, ce qui permettrait de s'affranchir des autres protéines des FM pouvant perturber la mesure. Pour tester l'importance potentielle de la compartimentation sur l'activité de l'enzyme, il serait très intéressant d'insérer le Cyt_{b558} dans des nanodisques permettant d'obtenir une NADPH oxydase stable et soluble, sans la contrainte de compartimentation.

Il sera de toute façon indispensable de produire le Cyt_{b558} recombinant en quantité suffisante d'une part pour réaliser les expériences ci-dessus, d'autre part pour déterminer le mécanisme enzymatique précis, (formation d'un complexe binaire ou ternaire, séquence d'assemblage et de désassemblage des substrats et produits, séquence de transfert d'électrons...). Le mécanisme pourrait alors être étudié par des techniques de stopped-flow, de radiolyse pulsée, ou encore d'EXAFS, RPE ou voltamétrie cyclique.

Par extension, les difficultés de mesure des cinétiques des réactions catalysées en système hétérogène compartimenté sont *potentiellement valables quel que soit le système compartimenté*. J'espère que ma thèse pourra ainsi servir de mise en garde pour tempérer la pertinence des quantifications réalisées sur ce type de systèmes sans prise en compte de leur nature, qu'il s'agisse d'un milieu cellulaire ou acellulaire. Il est nécessaire de bien connaître le système étudié mais aussi les phénomènes physicochimiques impliqués dans la détection et le risque de réactions secondaires. La méconnaissance de certains aspects du système implique la réalisation de contrôles insuffisants, comme dans le présent cas le contrôle négatif en présence de SOD, ce qui entraîne l'obtention de résultats litigieux.

2. Elaboration de NOX-GUV

Il reste à confirmer la réussite de la formation de NOX-GUV en vérifiant l'intégration du Cyt_{b558} à leur membrane. L'essai avec les anticorps par microscopie confocale à fluorescence ayant échoué, il serait possible de tester l'intégration du Cyt_{b558} par microscopie électronique après immunomarquage de Nox2 ou p22^{phox}. Le développement

de GUV contenant le Cytochrome b_{558} à leur membrane, ou d'autres centres catalytiques issus d'autres NADPH oxydases, couplée à la microscopie de fluorescence et à la microélectrochimie permettra d'étudier les aspects biochimiques de l'activité de l'enzyme en lien avec la dynamique de l'assemblage macromoléculaire. Ceci permettra de donner les bases purement biochimiques décorrélées de la difficulté des nombreuses confusions d'effets qui existent en cellules. Il pourra donc s'agir du point de départ pour des études similaires en cellules. En particulier, ces études permettront d'obtenir des informations précises sur la régulation spatiale liée à la biochimie des protéines impliquées et des lipides impliqués.

L'ensemble des expériences réalisées dans ma thèse étant préliminaires sur ce sujet, il est nécessaire de les reproduire avec le recul acquis. Les interactions protéine-lipides devraient être explorées plus avant en modifiant la composition des lipides de la membrane des GUV. Un autre volet à améliorer est notamment l'identification des complexes formés via des techniques permettant de visualiser des interactions directes comme du FRET. Cela pourra aussi impliquer l'utilisation du trimère pour simplifier les études des interactions entre le $Cytb_{558}$ et les protéines cytosoliques dans un premier temps.

L'utilisation de NOX-GUV permettant la nébulisation interne est nécessaire, mais les GUV utilisées sont mal caractérisées et il sera nécessaire pour poursuivre le projet de mieux les caractériser, par exemple par microscopie électronique, pour comprendre notamment pourquoi elles sont perméables aux protéines, quel est le lien précis entre la GUV et son réservoir, quelle est la structure du réservoir.

Il serait intéressant d'utiliser la capacité de sous-compartimentation des GUV qui a été observée dans certaines expériences, pour, par exemple, créer un phagosome synthétique encapsulant une bactérie pour étudier l'effet des ROS produits par la NADPH oxydase sur bactérie unique. L'augmentation de la complexité du système en ajoutant progressivement d'autres protéines permettrait d'enrichir le système en ayant des contrôles rigoureux intrinsèques à l'approche « bottom-up » progressive, d'une petite échelle vers une grande échelle.

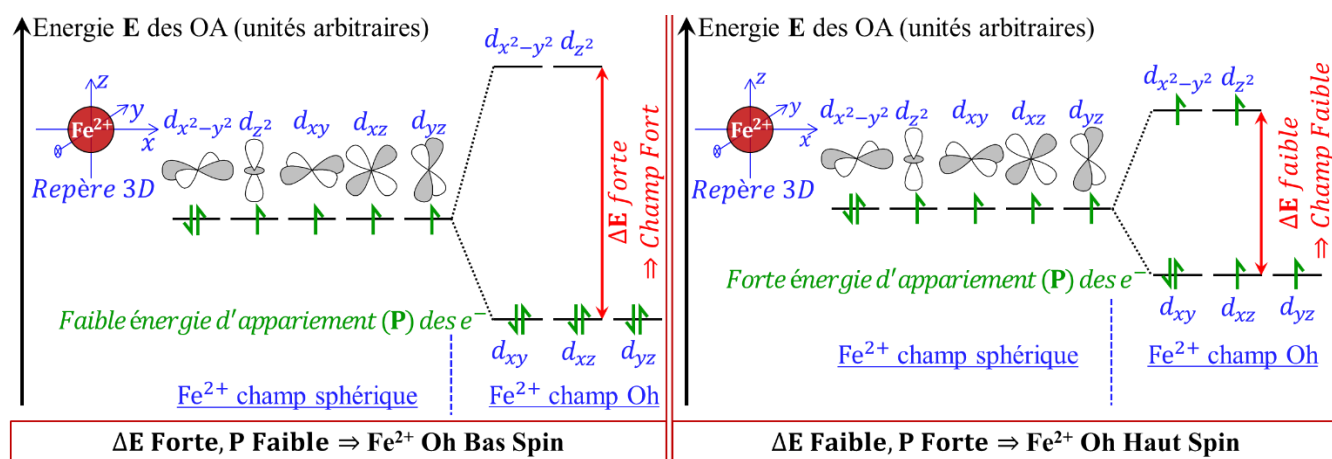
CHAPITRE VI – Annexes

ANNEXE 1 : Les notions de fer bas-spin et de fer haut-spin

Les électrons sont des particules (fermions) qui possèdent toutes une propriété particulière relevant exclusivement de la mécanique quantique, cette propriété est appelée spin électronique ; (ici nous nous focaliserons sur le spin au sens du nombre quantique magnétique de spin). Les électrons peuvent avoir seulement deux états de spin différents, ils peuvent être soit spin « up », soit « down », ils sont forcément l'un ou l'autre. Pour éviter les confusions, je garde ces noms anglais qui seront dédiés au spin des électrons.

Le fer est un élément chimique faisant partie des métaux de transition, il possède donc cinq orbitales atomiques de type d ('diffuse') qui s'appellent $d_{x^2-y^2}$, d_{z^2} , d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} et dont les formes dans l'espace sont présentées en **Figure VI-1**. Le cation fer ferreux, (Fe^{2+}), possède six électrons à répartir dans ces six orbitales atomiques (OA) de type d.

Lorsque le fer est au milieu d'un champ sphérique de ligands identiques, (condition hypothétique), l'ensemble des orbitales atomiques de type d, quelle que soit leur orientation et leur forme, a exactement le même environnement chimique, elles ont donc toutes la même énergie et sont donc dites dégénérées. En réalité, dans notre cas, le fer est chélaté par quatre ligands équatoriaux provenant de la protoporphyrine XI (noyaux pyrroles) et deux ligands axiaux provenant de la protéine (histidines), soit six ligands conférant au complexe une géométrie octaédrique.



A gauche l'éclatement du champ de ligand dans le cas d'un champ fort et d'une énergie d'appariement des électrons faible en comparaison. A droite l'éclatement du champ de ligand dans le cas d'un champ faible et d'une énergie d'appariement des électrons forte en comparaison. Le niveau énergétique des OA est représenté par des traits horizontaux noirs et les électrons y sont représentés, superposés, par des flèches asymétriques vertes pointant en haut (spin 'up') ou en bas (spin 'down'). L'éclatement du champ de ligand est représenté par la double flèche rouge et lié aux OA en champ sphérique par des pointillés noirs. La représentation spatiale, (à lier au repère 3D), des différentes OA d est représentée par des lobes blancs et gris au-dessus des OA en champ sphérique.

D'après la théorie du champ cristallin (qui est une approximation très satisfaisante), dans un complexe octaédrique (Oh), les ligands axiaux (ici histidines) et équatoriaux (ici porphyrine), ne sont pas équivalents ce qui provoque empiriquement une stabilisation des orbitales atomiques d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} , qui ont donc une énergie plus basse dans un champ de ligand Oh et déstabilise les orbitales atomiques $d_{x^2-y^2}$, d_{z^2} qui ont donc une énergie plus haute dans un

champ de ligand Oh (**Figure VI-1**, la déstabilisation des OA $d_{x^2-y^2}$, d_{z^2} est effectivement plus forte que la stabilisation des OA d_{xy} , d_{xz} , d_{yz}).

Un complexe adopte toujours la configuration de plus basse énergie et celle-ci nécessite au moins qu'il y ait, selon la règle d'exclusion de Pauli, au maximum deux électrons par orbitale atomique (AO), que, selon la règle de Hund, des électrons de même spin remplissent d'abord toutes les OA dégénérées de plus basse énergie et donc que l'appariement des électrons dans une OA se fasse seulement si l'ensemble des OA dégénérées de plus basse énergie contiennent un électron. Deux conditions sont alors possibles pour adopter la configuration la plus stable, de plus basse énergie (corollaire) :

- i) **1^{er} cas : BAS SPIN**. La différence d'énergie ΔE entre les OA $d_{x^2-y^2}$, d_{z^2} et les OA d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} est **forte** en comparaison de l'énergie **P** d'appariement des électrons qui est plus **faible**. Dans ce cas il faudra **moins d'énergie** pour que les électrons s'apparient et ils vont **en priorité s'apparier dans les OA d'énergie la plus basse**, les OA d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} et si et seulement s'il y a plus de 6 électrons de valence, les électrons restants iront, **ensuite**, dans les OA $d_{x^2-y^2}$, d_{z^2} .
- ii) **2^{ème} cas : HAUT SPIN**. La différence d'énergie ΔE entre les OA $d_{x^2-y^2}$, d_{z^2} et les OA d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} est **faible** en comparaison de l'énergie **P** d'appariement des électrons qui est plus **forte**. Dans ce cas il faudra **moins d'énergie** pour que les électrons se répartissent dans l'ensemble des OA et ils vont **en priorité se répartir dans toutes les OA d** (d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} , $d_{x^2-y^2}$, d_{z^2}) et si et seulement si il y a plus de 5 électrons de valence, les électrons restants iront, **ensuite**, s'apparier dans les OA les plus basses (d_{xy} , d_{xz} , d_{yz}).

Un élément métallique chélaté relevant de la théorie du champ cristallin en champ octaédrique sera champ faible ou champ fort toutes choses égales par ailleurs en fonction de ses ligands, de son état redox, de s'il est dans un état excité ou dans son état fondamental, de la nature de l'élément métallique et de la géométrie du complexe. Dans le cas des hèmes de Nox2, observer un changement du spin électronique du fer sachant les ligands présents permet donc d'être informé des changements de la géométrie du complexe et de l'état redox (de la charge) de l'élément métallique. Il s'agit donc d'une donnée très importante.

Les notions ici abordées ont été très succinctement et simplement présentées. J'invite le lecteur curieux d'en savoir plus sur les complexes inorganiques, la théorie du champ cristallin, l'effet Jan Teller, la théorie des orbitales moléculaires, à se référer à des livres spécialisés de chimie inorganique. Le lecteur désireux d'en apprendre davantage sur les notions de spin utilisées en chimie pourra se tourner vers des ouvrages généraux de chimie physique ou plus spécialisés de chimie quantique.

ANNEXE 2 : Fondamentaux pour l'interprétation d'un spectre de porphyrine

La **Figure VI-2** présente un schéma d'un noyau pyrrole, un schéma d'une porphyrine de fer II théorique et un schéma de l'hème b faisant partie du Cyt_b₅₅₈.

La base d'une porphyrine est une molécule tétrapyrrolique (quatre cycles pyrrole). Chaque cycle pyrrole est reliée, via ses deux carbones α , aux carbones α de deux autre cycles pyrrole via un pont méthine. Les azotes des porphyrines peuvent chélater un cation métallique, dans notre cas, les cations du fer. Ici le cation représenté correspond au fer ferreux (Fe^{2+}), qui est capable de fixer le dioxygène, contrairement au fer ferrique (Fe^{3+}). Plus précisément, deux azotes face-à-face lient le fer via une liaison de coordination, (aussi appelée liaison dative, représentée par une flèche perpendiculaire à un doublet non liant), chacune impliquant donc un doublet non liant de chacun des azotes qui se comportent donc comme des ligands L, (selon la nomenclature de Malcolm Leslie Hodder Green). Les deux autres azotes se comportent comme des ligands X, (selon M. L. H. Green), et forment donc des liaisons covalentes, (perpendiculaires aux précédentes liaisons datives), impliquant chacune un électron de l'azote et un électron du fer.

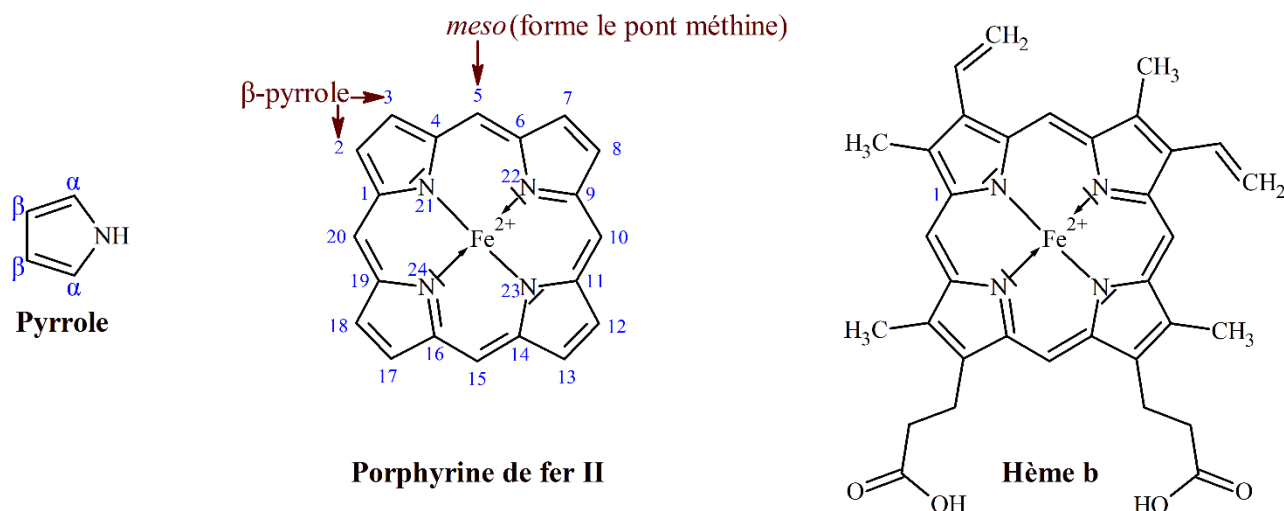


Figure VI-2. Description schématique de la nomenclature et de la numérotation des porphyrines, exemple de l'hème b
Un noyau pyrrole, une porphyrine théorique de Fe^{2+} théorique et un hème b fait d'une porphyrine de type IX de Fe^{2+} .

Or, à l'état fondamental, les métalloporphyrines, dont les hèmes, peuvent subir des transitions électroniques π - π^* impliquant notamment les orbitales moléculaires des 26 électrons délocalisés de la porphyrine dans la gamme d'énergie comprise entre 300 et 800 nm. L'énergie, ainsi que la probabilité de ces transitions, sont impactées par le métal chélaté, dans notre cas le fer, mais aussi par les autres ligands du fer, (distal et proximal), ainsi que par les groupements supplémentaires liés à la porphyrine en positions *meso* (carbones 5, 10, 15 et 20) ou β -pyrrole (carbones 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 et 18).

Ainsi, (s'aider au besoin de la **Figure VI-3**), une irradiation entre 380 et 500 nm peut provoquer des transitions électroniques de la plus haute orbitale moléculaire occupée (S_0) au deuxième niveau excité, (S_2 , deuxième plus basse orbitale vacante à l'état fondamental), que nous observons sur un spectre d'absorption UV-Visible en tant que bandes B, ou bandes de Soret. D'autre part, une irradiation entre 500 et 750 nm peut aussi provoquer des transitions, mais entre la plus haute orbitale moléculaire occupée (S_0) et le premier niveau excité, (S_1 , plus basse orbitale vacante à

l'état fondamental), que nous observons sur un spectre UV-visible en tant que bandes Q, environ 10 fois moins intenses que les bandes B.

Ces transitions peuvent être simplement représentées sur le diagramme électronique très simplifié des orbitales moléculaires (OM) frontières, **Figure VI-3**, selon le modèle simplifié proposé par Martin Gouterman, avec ou sans dégénérescence des deux orbitales moléculaires les plus hautes occupées (HO). En pratique, les modes vibrationnels ne sont pas les mêmes entre un axe x et un axe y perpendiculaires dans le plan de l'hème, de plus, les différentes symétries de l'hème peuvent faire varier l'énergie des OM selon x ou selon y, c'est pourquoi les deux OM HO sont souvent dégénérées (505–508).

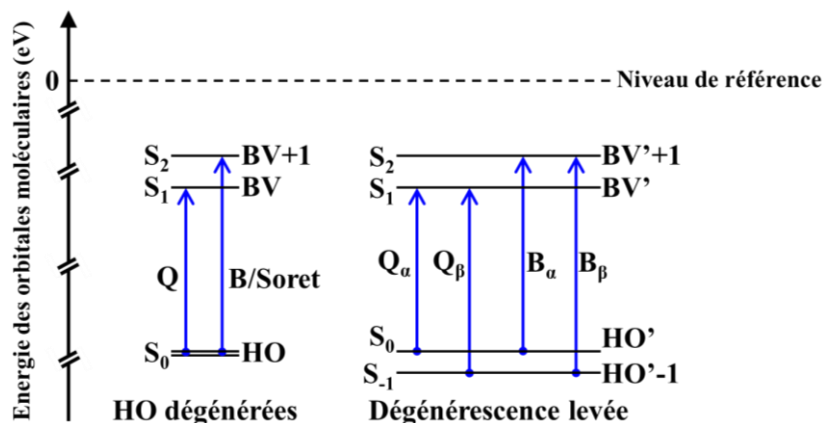
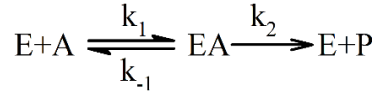


Figure VI-3. Schéma simplifié des OM frontières des métalloporphyrines selon Martin Gouterman. Echelle non respectée.

Les niveaux électroniques correspondant aux orbitales moléculaires sont représentés par des segments noirs horizontaux. Les transitions électroniques entre deux niveaux sont représentées par des flèches bleues, du niveau de départ (point bleu) au niveau final (pointe de la flèche). L'échelle verticale correspond à l'énergie des OM en eV et le niveau de référence est par définition égal à 0 eV.

ANNEXE 3 : Intégration de l'équation de Michaelis-Menten-Henri



$$ASM = \frac{k_{cat}^{app} \cdot [A]}{K_m^{app} + [A]}$$

$$\Gamma \Leftrightarrow ASM = \frac{k_{cat}^{app} \cdot [A]}{K_m^{app} + [A]} \Leftrightarrow \frac{d[A]}{[Cytb_{558}]_0 \cdot dt} = \frac{k_{cat}^{app} \cdot [A]}{K_m^{app} + [A]}$$

$$\Gamma \Leftrightarrow \frac{d[A]}{[A]} \cdot (K_m^{app} + [A]) = [Cytb_{558}]_0 \cdot k_{cat}^{app} \cdot dt$$

$$\Gamma \Leftrightarrow K_m^{app} \cdot \frac{d[A]}{[A]} + d[A] = [Cytb_{558}]_0 \cdot k_{cat}^{app} \cdot dt \Leftrightarrow K_m^{app} \int_0^{[A]_t} \frac{d[A]}{[A]} + \int_0^{[A]_t} d[A] = [Cytb_{558}]_0 \cdot k_{cat}^{app} \int_0^t dt$$

$$\Gamma \Rightarrow \Theta \Leftrightarrow K_m^{app} \cdot \ln([A]_t) + [A]_t = [Cytb_{558}]_0 \cdot k_{cat}^{app} \cdot t - [Cytb_{558}]_0 \cdot k_{cat}^{app} \cdot \alpha$$

Lorsque $t = 0$ alors $[A]_t = [A]_0$, ainsi :

$$K_m^{app} \cdot \ln([A]_0) + [A]_0 = -[Cytb_{558}]_0 \cdot k_{cat}^{app} \cdot \alpha \Leftrightarrow \alpha = -\frac{1}{[Cytb_{558}]_0 \cdot k_{cat}^{app}} \cdot (K_m^{app} \cdot \ln([A]_0) + [A]_0)$$

L'injection de α dans l'équation équivalente à Θ permet d'obtenir :

$$\Theta \Rightarrow \Lambda \Leftrightarrow K_m^{app} \cdot \ln([A]_t) + [A]_t = [Cytb_{558}]_0 \cdot k_{cat}^{app} \cdot t + K_m^{app} \cdot \ln([A]_0) + [A]_0$$

$$\Lambda \Rightarrow \Phi \Leftrightarrow \boxed{\frac{[A]_t}{K_m^{app}} + \ln([A]_t) = \frac{V_m}{K_m^{app}} \cdot t + \frac{[A]_0}{K_m^{app}} + \ln([A]_0)}$$

$$\Phi \Rightarrow \Psi \Leftrightarrow \boxed{t = \frac{K_m^{app}}{[Cytb_{558}]_0 \cdot k_{cat}^{app}} \cdot \ln\left(\frac{[A]_t}{[A]_0}\right) + \frac{[S]_t - [S]_0}{[Cytb_{558}]_0 \cdot k_{cat}^{app}}}$$

Cette équation Ψ montre qu'il est possible d'exprimer de façon simple analytiquement le temps en fonction de la concentration en substrat à cet instant $[A]_t$ à l'aide d'un logarithme népérien et d'un polynôme. En revanche, il n'est pas possible d'exprimer simplement de façon analytique la concentration en substrat $[A]_t$ à un instant t en fonction du temps t . De plus, il est évident que la concentration en substrat $[A]_t$ dépend du temps passé depuis le début de la réaction, mais aussi de la nature du substrat, de la réaction, du catalyseur et plus généralement des conditions expérimentales... Il est donc tout à fait cohérent de ne pas pouvoir remonter à la concentration en substrat pour toute réaction catalysée par une enzyme Michaélienne à partir du seul temps de réaction. Pour réaliser des régressions non linéaires permettant d'obtenir les paramètres enzymatiques K_m^{app} et k_{cat}^{app} directement à partir d'une cinétique globale de consommation d'un substrat dans les conditions décrites dans le texte de ma thèse, il est donc nécessaire de tracer l'ensemble des points dans un repère du temps en fonction de la concentration en substrat $t = f([S]_t)$ puis de réaliser l'ajustement non linéaire selon l'équation Φ .

ANNEXE 4 : Exemples d'acides gras fréquemment trouvés chez les animaux

	Nombre n	Nombre d'insaturations	Nom systématique	Nom vernaculaire	Formule (Conformation des liaisons simples non prise en compte)
	de carbones				
Acides gras monoinsaturés	16	1	Acide <i>cis</i> -9-hexadécenoïque	Acide palmitoléic	
	18	1	Acide <i>cis</i> -9-octadécenoïque	Acide oléique	
	18	1	Acide <i>trans</i> -9-octadécenoïque	Acide élaïdique	
	18	1	Acide <i>trans</i> -11-octadécenoïque	Acide <i>trans</i> -vaccénique	
	20	1	Acide <i>cis</i> -11-eicosénoïque	Acide gondoïque	
Acides gras polyinsaturés	18	2	Acide <i>cis, cis</i> -9,12-octadécadiénoïque	Acide linoléique	
	18	3	Acide tout- <i>cis</i> -6,9,12-octadécatriénoïque	Acide γ-linoléique	
	20	4	Acide tout- <i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatétraénoïque	Acide arachidonique	
	20	5	Acide tout- <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque	-	
	22	5	Acide tout- <i>cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentaénoïque	Acide clupanodonique	
	22	6	Acide tout- <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque	DHA	

Tableau VI-1. Exemples d'acides gras monoinsaturés et d'acides gras polyinsaturés fréquemment retrouvés chez les animaux.

Nombre n de carbones total	Nom systématique	Nom vernaculaire	Formule chimique
3	Acide <i>n</i> -propanoïque	Acide propionique	$\text{H}_3\overset{3}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_1-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{matrix}$
4	Acide <i>n</i> -butanoïque	Acide Butyrique	$\text{H}_3\overset{4}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_2-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{matrix}$
6	Acide <i>n</i> -hexanoïque	Acide caproïque	$\text{H}_3\overset{6}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_4-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{matrix}$
8	Acide <i>n</i> -octanoïque	Acide caprylique	$\text{H}_3\overset{8}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_6-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{matrix}$
10	Acide <i>n</i> -decanoïque	Acide caprique	$\text{H}_3\overset{10}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_8-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{matrix}$
12	Acide <i>n</i> -dodecanoïque	Acide laurique	$\text{H}_3\overset{12}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{10}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{matrix}$
14	Acide <i>n</i> -tetradecanoïque	Acide myristique	$\text{H}_3\overset{14}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{12}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{matrix}$
16	Acide <i>n</i> -hexadecanoïque	Acide palmitique	$\text{H}_3\overset{16}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{14}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{matrix}$
18	Acide <i>n</i> -octadecanoïque	Acide stéarique	$\text{H}_3\overset{18}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{16}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{matrix}$
20	Acide <i>n</i> -eicosanoïque	Acide arachidique	$\text{H}_3\overset{20}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{18}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{matrix}$
26	Acide <i>n</i> -hexacosanoïque	Acide cérotique	$\text{H}_3\overset{26}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{24}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{matrix}$

Tableau VI-2. Exemples d'acides gras saturés fréquemment retrouvés chez les animaux.

ANNEXE 5 : Matériels

Appareil	Méthode	Marque	Modèle
Bain d'eau avec générateur d'ultrasons	Sonication en bain	Bioblock Scientific	88155 (puissance 1x35W)
Centrifugeuse de paillasse	Centrifugation volume max 2 mL/tube	Eppendorf	MiniSpin® Plus™
Centrifugeuse réfrigérée de paillasse	Centrifugation réfrigérée volume max 50 mL/tube	Eppendorf	Centrifuge 5810R
Centrifugeuse réfrigérée de paillasse	Centrifugation réfrigérée volume max 50 mL/tube	Beckman®	Allegra™ 21R
Centrifugeuse réfrigérée gros volume	Centrifugation réfrigérée gros volume max 1 L/tube	Beckman®	AVJ20XP
Générateur d'ultrasons + convertisseur	Sonication directe	Branson	Branson 250 + Convertisseur CU00985G
Microscope confocal	Microscopie confocale	Leica	TCS SP5 II
Microscopie plein champ	Microscopie plein champ inversé	Leica	STP-6000
Oxymètre à électrode de Clark	Oxymétrie	Hansatech Instruments Ltd	Oxygraph Plus System
Pompe à vide	Vide d'une enceinte	Vacubrand®	MZ2C NT + 2AK
Potentiostat	Ampérométrie	Biologic	VSP-300
Spectrophotomètre	Absorptiométrie UV-Visible	Secomam®	Uvikon XS
Spectrophotomètre sans cuvette	Absorptiométrie UV-Visible en goutte	Thermo Scientific™	Nanodrop 2000
Système de chromatographie Fast Flow	Chromatographie Fast Flow	GE Healthcare	ÅKTAprime
Thermostat	Régulation thermique	Huber	Ministat 125
Ultracentrifugeuse réfrigérée sous pression réduite	Ultracentrifugation réfrigérée sous pression réduite	Beckman®	L8-70M

Tableau VI-3. Tableau des appareils.

Produit	Type de produit	Marque	Référence
Alaméthicine	Forme des pores membranaires	Abcam	ab141893
Cytochrome c de cœur de cheval	Cytochrome c	Sigma-Aldrich®	C7752-1G
Dextran	Agrégants hématies	Sigma-Aldrich®	31392-50G
DiPhénylène Iodonium	Inhibiteur des flavoprotéines	Acros Organics	328660250
Extrait de lipides polaires de graines de soja	Mélange de lipides membranaires	Avanti® Polar Lipids, Inc	541602
Ficoll-Paque Plus	Gradient continu	GE Healthcare	17-1440-02
Glutathione Sepharose™	Résine pour chromatographie d'affinité glutathion	GE Healthcare	17-5132-01
HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade	Colonne pour tamis moléculaire	GE Healthcare	17-1068-01
Microcapillaires en verre borosilicate avec filament	Microcapillaires	World Precision Instruments	TW100F-4
NADPH	Substrat NADPH	Acros Organics	328742500
Ni Sepharose™	Résine pour chromatographie d'affinité histidine	GE Healthcare	17-5268-01
Nystatine	Forme des pores membranaires	Sigma-Aldrich®	N6261-5MU
Poly-L-Lysine hydrobromide	Fonctionnalisation pour fixer les GUV	Sigma-Aldrich®	P1399-100MG
Q Sépharose™	Résine pour chromatographie échangeuse d'anions	GE Healthcare	17-0510-01
SOD d'érythrocyte bovins	SuperOxyde Dismutase	Sigma-Aldrich®	S5395-30KU
SP Sépharose™	Résine pour chromatographie échangeuse de cations	GE Healthcare	17-0729-01
tout- <i>cis</i> -acide arachidonique	Acide Arachidonique	Sigma-Aldrich®	A9673 (Référence interrompue. Remplacée récemment au LCP par A3611-100MG qui reste à tester rigoureusement)

Tableau VI-4. Tableau des produits.

ANNEXE 6 : *Protocole de formation des SUV-MLV importé puis adapté au LCP*

i) Résumé

Le mélange SBL est solubilisé dans du chloroforme, qui est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif dans un ballon à fond rond afin d'obtenir une fine couche régulière et symétrique de lipides. La couche de lipides est ensuite réhydratée dans du tampon sous atmosphère protectrice, puis le mélange est soniqué dans un bain de sonication, ce qui permet de fournir l'énergie utilisée par le film de lipides pour former les SUV-MLV. La suspension de SUV-MLV est ensuite stockée.

ii) Lavage du matériel : à suivre scrupuleusement et à faire extemporanément. Etape dangereuse.

Lavages préliminaires. Laver la verrerie au lave-vaisselle ou à la main. Vérifier qu'elle est bien propre visuellement. S'il reste de la graisse à vide sur le ballon monocol de 30 mL, frotter avec un détergent et de l'eau à l'aide d'un écouvillon et faire en sorte qu'il n'en reste plus visuellement, même sur le rodage. Laver précautionneusement plusieurs fois les flacons en verre (de 2 mL), le ballon monocol, les seringues Hamilton® (de 500 µL et 100 µL) et les éprouvettes graduées (une éprouvette de 25 mL et une éprouvette en verre de 100 mL) à l'eau « ultra-pure », puis au moins trois fois à l'acétone. Rincer avec de l'eau « ultra pure » pour enlever l'acétone (ce dernier laisse souvent des traces blanches sur la verrerie en séchant, à moins de l'avoir redistillé plusieurs fois soi-même dans les règles de l'art). Laisser tremper 2 h, avec du Hellmanex™ 4 % fraîchement préparé, les flacons en verre, les seringues Hamilton® et les éprouvettes graduées à température ambiante et le ballon monocol à 90 °C (bain marie). Rincer plusieurs fois, au moins 20 fois, précautionneusement à l'eau « ultra-pure ». Rincer cinq fois avec du chloroforme sauf pour les seringues Hamilton qui sont rincées 10 fois. Rincer à l'eau « ultra-pure ». Pour les flacons en verre, le ballon monocol et les éprouvettes graduées, mais PAS pour les seringues Hamilton®, laisser sécher totalement à 90 °C (armoire séchante).

Préparation de la solution piranha. Très dangereux. Préparer extemporanément la « solution piranha ». Cette étape est potentiellement extrêmement dangereuse et peut occasionner, en cas de non-respect des consignes, y compris les consignes de lavage évoquées ci-avant, de graves lésions chimiques physiologiques irréversibles, des brûlures, la destruction de matériel de laboratoire, des incendies et/ou des explosions. Toutes les manipulations doivent se faire sous la sorbonne, derrière la vitre de sécurité, avec des gants en nitrile épais, des lunettes de sécurité, d'une blouse en coton et après avoir prévenu une personne compétente présente à proximité de cette manipulation, en ayant en tête la position des éléments de sécurité du laboratoire, (douche, éviers, rince-yeux, extincteurs, accessibles et fonctionnels). Toujours marquer en gros l'interdiction que quiconque manipule sous la sorbonne tant que celle-ci est utilisée pour la solution piranha, au cas où vous deviez vous absenter, seule la personne qui lance l'expérience et est au courant de l'organisation sous la sorbonne est alors habilitée à y manipuler. Mesurer 26 mL d'acide sulfurique à 98 % (m:m) à l'éprouvette graduée en verre. Mettre l'éprouvette dans la glace pilée fondante, (glace pilée dans laquelle de l'eau du robinet a été ajouté afin de maximiser les surfaces de contact), dans la boîte en polystyrène, attendre 10 minutes l'équilibre thermique. Dans une autre éprouvette graduée en verre, mesurer 14 mL de peroxyde d'hydrogène 30 % (m:m). Verser très lentement, goutte à goutte à l'aide d'une pipette pasteur en verre

et d'une poire de prélèvement, le peroxyde d'hydrogène dans l'acide sulfurique en laissant celui-ci en glace. Au cours de l'ajout, mélanger régulièrement à l'aide d'une baguette en verre très propre ou d'une autre pipette pasteur propre inutilisée. L'ajout du peroxyde d'hydrogène doit prendre environ 5 minutes au total (c'est long pour une question de sécurité). Ne pas mettre de solution piranha sur la paillasse. Attendre un refroidissement raisonnable avant utilisation. Ne jamais stocker. Ne jamais boucher les contenants hermétiquement. Ne jamais utiliser de matière organique comme du papier, du plastique, du Parafilm®, de l'acétone, du chloroforme, de l'éthanol, de l'acide acétique... De façon générale, ne jamais mettre au contact de matière organique. En présence d'une trop grande quantité de matière organique, la solution peut s'enflammer et exploser spontanément. Un ajout trop rapide de peroxyde d'hydrogène provoque la surchauffe de la solution et la libération conséquente de vapeurs extrêmement corrosives qui peuvent potentiellement s'enflammer en présence de matières organiques, (filtres de la sorbonne par exemple). La surchauffe de la solution peut la faire bouillir ce qui provoque des éclaboussures très chaudes et très corrosives et potentiellement explosives au contact de matière organique. Si la solution est stockée ou jetée dans un contenant fermé hermétiquement, celui-ci risque d'éclater, (libération de gaz par décomposition). Une poubelle à solution piranha doit être obligatoirement fermée avec un bouchon à évent ou un bouchon juste posé (non vissé). La solution usagée doit être jetée dans une poubelle dédiée, en verre, sous la sorbonne, qui doit rester allumée H24 et 7J/7. Il est possible de neutraliser la solution par ajout lent (exothermique) de carbonate ou de bicarbonate de sodium en plaçant le contenant dans la glace. En cas de renversement ou déversement sur des surfaces, NE PAS UTILISER DE PAPIER, qui risque de s'enflammer spontanément au contact de la solution. Neutraliser avant tout avec du carbonate ou bicarbonate de sodium en poudre. Nettoyer précautionneusement toutes les surfaces horizontales et verticales accessibles par tout autre manipulateur à la fin de l'expérience.

Utilisation de la solution piranha. Très dangereux. Le ballon tenu fermement verticalement à l'aide d'une pince deux doigts de qualité fermement attachée sur la potence, (testée au préalable), d'un statif stable, (testé au préalable), via une noix métallique solidement vissée, (testée au préalable), sera rempli jusqu'à 2 mm du bord du col avec la solution piranha. Le flacon en verre de 2 mL sera tenu de la même façon sur le statif ou posé de façon stable et repérable sur la paillasse et sera rempli à ras-bord avec la solution piranha. Laisser tremper 1h30 à 2h sous hotte. Vider ensuite dans le bidon de récupération. Rincer à l'eau « ultra pure » deux fois brièvement, (petits volumes), en jetant lentement dans la poubelle dédiée, en considérant toutes les précautions citées ci-avant, ainsi que l'ajout d'eau peut être exothermique et provoquer des projections et des vapeurs. Rincer ensuite au moins 30 fois à l'eau « ultra-pure » en remplissant chaque fois le ballon et le flacon à ras-bord pour être sûr de bien rincer la totalité. Ne surtout pas laver les seringues Hamilton avec la solution piranha, le plastique (PTFE), le métal et les colles qu'elles contiennent seraient détruits.

Lavages finaux. Le ballon et le flacon de 2 mL seront ensuite rincés cinq fois avec un peu de chloroforme, (quelques millilitres ou centaines de microlitres, ne pas remplir les contenants à chaque fois pour ne pas gacher), puis le chloroforme restant sur les parois rincé une dizaine de fois à l'eau « ultra-pure ». Un séchage à 200 °C pendant 1 h, (cette durée n'inclus pas le préchauffage), est ensuite réalisé pour éliminer les traces d'eau adsorbées au verre.

iii) Conception des SUV-MLV

Généralités. Les lipides insaturés sont très sensibles à l'oxydation. Nous chercherons donc à limiter au strict minimum la concentration en oxygène dissout en manipulant sous vide ou sous azote ou argon. Le chloroforme solubilise les plastiques totalement ou partiellement, ainsi que les agents plastifiants et les conservateurs contenus dans les plastiques. Il faut donc proscrire l'utilisation du plastique pour le prélèvement comme pour le stockage.

Solubilisation des SBL. L'idéal est de faire cette étape dans une boîte à gants ou un sac à gants en pression positive de diazote ou d'argon. Néanmoins, il n'est pas facile d'y manipuler et on n'y a pas toujours accès. Je propose donc une alternative acceptable. Mettre quelques millilitres de chloroforme dans un flacon en verre et y faire buller du diazote ou de l'argon de préférence anhydre. En parallèle, boucher avec un bouchon à jupe le flacon de 2 mL qui a subi toutes les étapes de lavage et de séchage décrites ci-avant et y faire passer un flux d'azote à l'aide d'une aiguille d'entrée et d'une aiguille de sortie traversant le bouchon. Garder une pression positive d'azote dans le flacon en retirant l'aiguille de sortie au maximum une seconde avant l'aiguille d'entrée. À l'aide d'une seringue Hamilton® de 1 mL conditionnée en chloroforme, ajouter 600 µL de chloroforme saturé en diazote dans l'ampoule commerciale contenant 100 mg de SBL, bien solubiliser tout le solide puis le transférer à la seringue Hamilton® de 1 mL dans le flacon contenant une surpression en diazote. À la seringue Hamilton® de 250 µL conditionnée en chloroforme, ajouter 200 µL de chloroforme dans l'ampoule commerciale pour bien rincer les parois et transférer dans le flacon fermé avec la seringue de 1 mL. Recommencer ce même rinçage une fois de plus. Rincer avec 50 µL de chloroforme le bouchon cassé de l'ampoule puis ajouter ces 50 µL dans le flacon avec la seringue de 1 mL. Faire enfin des allers-retours avec le piston de la seringue de 1 mL pour homogénéiser le contenu du flacon et rincer la seringue. Ensuite, sans faire buller, appliquer un faible flux d'azote dans le flacon pendant 2 minutes en agitant doucement à la main et en faisant en sorte que le mélange de lipides solubilisés ne touche pas le bouchon (plastique). Laisser une pression positive en diazote dans le flacon en retirant l'aiguille de sortie 1 minute avant l'aiguille d'entrée. Le volume du mélange peut être vérifié à la seringue de 1 mL conditionnée en diazote. Il devrait être d'environ 1 mL. Le mélange sera stocké à -80 °C pendant quelques semaines maximum en s'assurant que le flacon reste à la verticale.

Formation d'un film de SBL par évaporation du solvant. Dans le ballon lavé et séché comme décrit ci-avant, ajouter 300 µL de chloroforme avec la seringue Hamilton® de 1 mL préalablement bien rincée avec du chloroforme. Avec 10 µL + 10 µL de la solution de lipides rincer la seringue de 50 µL conditionnée préalablement avec du chloroforme. Prélever ensuite 30 µL de la solution de lipides et la placer dans le ballon, directement dans les 300 µL de chloroforme, puis agiter doucement le ballon pour homogénéiser en prenant garde à ne pas trop faire monter le liquide sur les parois du ballon, (pas plus de 1 cm de haut). Évaporer le solvant à l'évaporateur rotatif à une pression comprise entre 300 et 350 mbar à 100 rotations par minute à environ 25 °C (température ambiante). Commencer l'évaporation avec un ballon quasiment à la verticale puis pencher de plus en plus, progressivement, jusqu'à avoir le ballon à l'horizontal afin d'étendre le film de lipides sur le fond du ballon (sur moins de 1 cm de hauteur néanmoins). L'évaporation a lieu à l'œil nu et dure quelques dizaines de secondes à quelques minutes au maximum (**Figure VI-4**).

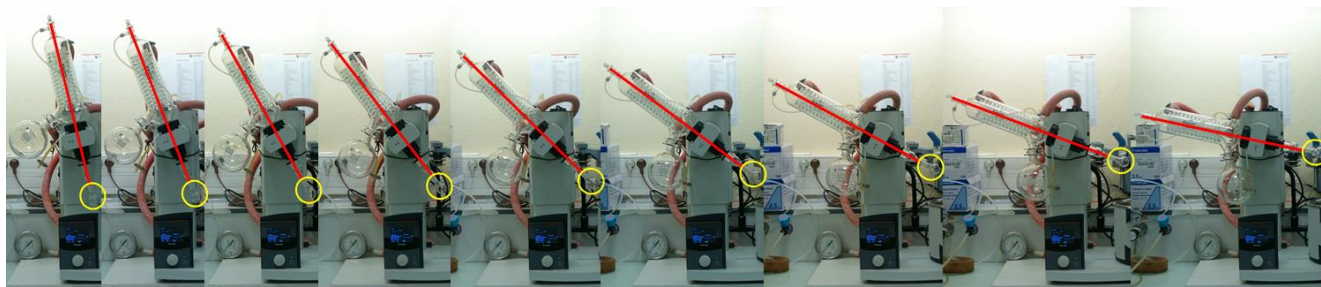


Figure VI-4. Evaporation progressive du chloroforme pour obtenir le film de lipides homogène, fin, transparent, incolore, symétrique.

Le trait rouge correspond à l'axe de rotation de l'évaporateur rotatif, qui est aussi l'axe du condenseur et du ballon. Autrement dit, il traduit l'inclinaison du ballon entouré en jaune sur la figure.

A cette étape, je précise que la pression évoquée dans le papier dont est issu ce protocole modifié (500) est très inférieure à la pression de vapeur saturante du chloroforme à température ordinaire ; ceci implique l'ébullition très forte du chloroforme et l'impossibilité d'obtenir un film de lipides, donc il faut éviter d'utiliser une pression si faible, il doit y avoir une erreur dans le protocole. Une fois qu'il n'y a plus du tout de solvant à l'œil nu, le film de lipides doit être homogène, transparent, incolore, très fin et symétrique (**Figure VI-5**). On peut alors faire descendre la pression en dessous de 25 mbar pendant 1h30 afin d'éliminer toute trace de solvant.

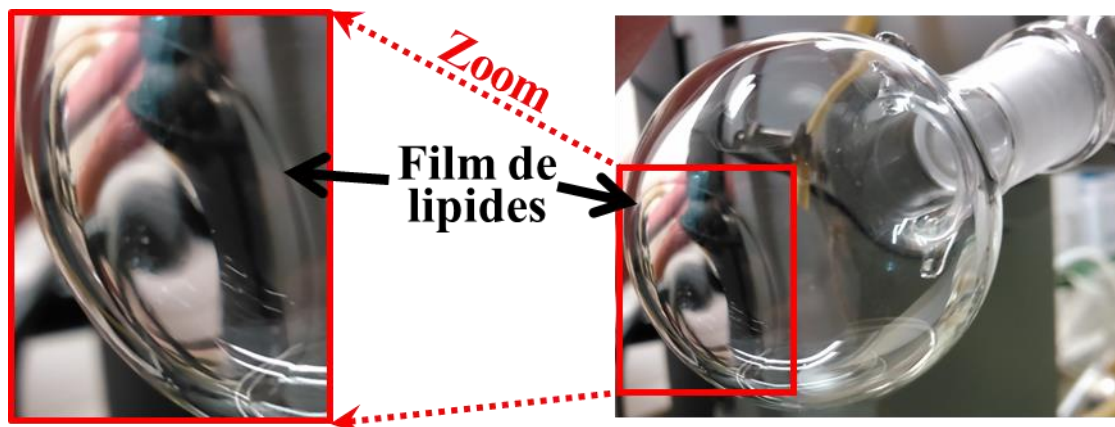


Figure VI-5. Aspect final du film de lipides obtenu.

Réhydratation des lipides du film. Faire buller du diazote dans du tampon de réhydratation pendant 5 minutes avec un flux assez important. Rincer cinq fois la seringue Hamilton® avec de l'eau « ultra-pure » puis cinq fois avec du tampon dans lequel le diazote est en train de buller. Ajouter 3 mL du tampon en train de buller dans le ballon à l'aide de la seringue de 1 mL en prenant soin de le faire couler doucement sur les parois du ballon afin de ne pas détruire le film de lipides. Apposer un bouchon à jupe en silicone sur le ballon puis faire passer un flux d'azote ou d'argon saturé en eau dans le ballon pendant 30 minutes. Placer le ballon verticalement à 8 °C pendant 12 h (**Figure VI-6**).

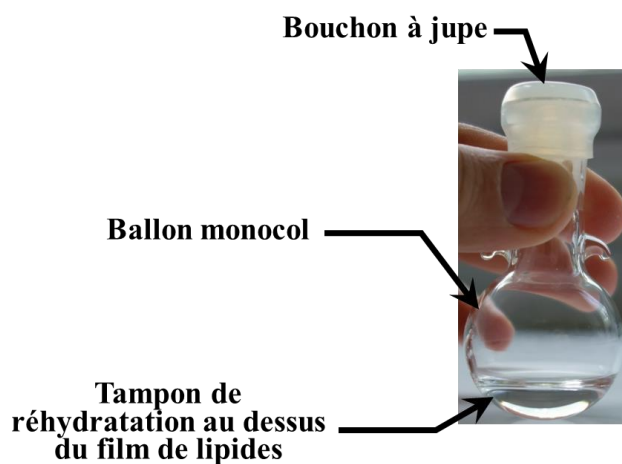


Figure VI-6. Photo du ballon bouché contenant le tampon de réhydratation au-dessus du film de lipides, conditionnés sous atmosphère inerte

Formation des SUV-MLV par sonication. Ajouter 60 μL de glycérol dilué deux fois à l'aide de la seringue Hamilton® de 250 μL , (nettoyée comme indiqué précédemment), à travers le bouchon à jupe. Le glycérol tombe au fond du ballon. Agiter lentement le ballon pour homogénéiser le glycérol. Soniquer ensuite le mélange dans le bain de sonication, à la position horizontale (xy) et à la position verticale (z) où la sonication semble la plus efficace. Pour connaître cette position, il est nécessaire de faire des tests préalables dans les mêmes conditions, avec le même ballon et le même volume de tampon, pour déterminer à quelle position du bain le liquide dans le ballon est le plus fortement agité ou troublé par les ultrasons. Il est possible de constater qu'en fonction de la profondeur dans le bain, l'efficacité de sonication dans le ballon diffère avec la hauteur z . Dans ce cas, il est bon de faire des légers mouvements de haut en bas autour de la position la plus efficace. Cette position est parfois centrée dans le bain, mais pas toujours. Il faut veiller à mettre toujours le même volume d'eau dans le bain, jusqu'à la limite haute et à toujours mettre le panier métallique afin que la sonication soit reproductible. Dans ces conditions, le film de lipides doit se décoller de façon visible du fond du ballon et le mélange doit se troubler. Au bout de quelques dizaines de secondes, on n'observe plus de décollement du film de lipides, on peut alors agiter régulièrement mais transitoirement le ballon par mouvements rotatifs modérés. Au bout de trois minutes, on peut arrêter la sonication. Lorsque le ballon est dans le bain on doit voir une suspension trouble blanchâtre mais être capable de voir clairement le panier métallique présent en dessous. Il sera probablement nécessaire d'ajuster le protocole en fonction du bain de sonication utilisé. J'ai dû faire environ 10 essais avant d'arriver à un bon résultat.

Stockage de la suspension de SUV-MLV. La suspension peut être aliquotée par volume de 50 μL dans des tubes Eppendorf® de 0,5 mL ou de 1,5 mL, puis conservée à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à 6 mois. Cette conservation est idéalement faite sous atmosphère dénuée de dioxygène mais ce n'est pas indispensable. Cette étape peut se faire à l'aide d'une pipette et de « cônes jaunes » en polypropylène pouvant prélever entre 2 μL et 200 μL .

RÉFÉRENCES

1. Bazin, D., Jouanneau, C., Bertazzo, S., Sandt, C., Dessombz, A., Réfrégiers, M., Dumas, P., Frederick, J., Haymann, J.-P., Letavernier, E., Ronco, P., and Daudon, M. (2016) Combining field effect scanning electron microscopy, deep UV fluorescence, Raman, classical and synchrotron radiation Fourier transform Infra-Red Spectroscopy in the study of crystal-containing kidney biopsies. *Comptes Rendus Chim.* **19**, 1439–1450
2. Sumimoto, H. (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species: Structure, regulation and evolution of Nox. *FEBS J.* **275**, 3249–3277
3. Hajjar, C., Cherrier, M. V., Dias Mirandela, G., Petit-Hartlein, I., Stasia, M. J., Fontecilla-Camps, J. C., Fieschi, F., and Dupuy, J. (2017) The NOX Family of Proteins Is Also Present in Bacteria. *mBio.* **8**, e01487-17
4. Sedeek, M., Nasrallah, R., Touyz, R. M., and Hebert, R. L. (2013) NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and the Kidney: Friend and Foe. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 1512–1518
5. Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., and Dong, W. (2016) ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–18
6. André-Lévine, D., Modarressi, A., Pepper, M. S., and Pittet-Cuénod, B. (2017) Reactive Oxygen Species and NOX Enzymes Are Emerging as Key Players in Cutaneous Wound Repair. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–28
7. Jiang, F., Zhang, Y., and Dusting, G. J. (2011) NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling: Roles in Cellular Stress Response, Stress Tolerance, and Tissue Repair. *Pharmacol. Rev.* **63**, 218–242
8. Lassegue, B., San Martin, A., and Griendling, K. K. (2012) Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology of NADPH Oxidases in the Cardiovascular System. *Circ. Res.* **110**, 1364–1390
9. Browning, E. A., Chatterjee, S., and Fisher, A. B. (2012) Stop the Flow: A Paradigm for Cell Signaling Mediated by Reactive Oxygen Species in the Pulmonary Endothelium. *Annu. Rev. Physiol.* **74**, 403–424
10. Brown, D. I., and Griendling, K. K. (2009) Nox proteins in signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1239–1253
11. Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007) The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313
12. Giardino, G., Cicalese, M. P., Delmonte, O., Migliavacca, M., Palterer, B., Loffredo, L., Cirillo, E., Gallo, V., Violi, F., and Pignata, C. (2017) NADPH Oxidase Deficiency: A Multisystem Approach. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–23
13. van den Berg, J. M., van Koppen, E., Åhlin, A., Belohradsky, B. H., Bernatowska, E., Corbeel, L., Español, T., Fischer, A., Kurenko-Deptuch, M., Mouy, R., Petropoulou, T., Roesler, J., Seger, R., Stasia, M.-J., Valerius, N. H., Weening, R. S., Wolach, B., Roos, D., and Kuijpers, T. W. (2009) Chronic Granulomatous Disease: The European Experience. *PLoS ONE.* **4**, e5234
14. De Ravin, S. S., Naumann, N., Cowen, E. W., Friend, J., Hilligoss, D., Marquesen, M., Balow, J. E., Barron, K. S., Turner, M. L., Gallin, J. I., and Malech, H. L. (2008) Chronic granulomatous disease as a risk factor for autoimmune disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 1097–1103
15. Fattahi, F., Badalzadeh, M., Sedighipour, L., Movahedi, M., Fazlollahi, M. R., Mansouri, S. D., Khotaei, G. T., Bemanian, M. H., Behmanesh, F., Hamidieh, A. A., Bazargan, N., Mamishi, S., Zandieh, F., Chavoshzadeh, Z., Mohammadzadeh, I., Mahdaviani, S. A., Tabatabaei, S. A., Kalantari, N., Tajik, S., Maddah, M., Pourpak, Z., and Moin, M. (2011) Inheritance Pattern and Clinical Aspects of 93 Iranian Patients with Chronic Granulomatous Disease. *J. Clin. Immunol.* **31**, 792–801

16. Lee, B. W., and Yap, H. K. (1994) Polyarthritis resembling juvenile rheumatoid arthritis in a girl with chronic granulomatous disease. *Arthritis Rheum.* **37**, 773–776
17. Olsson, L. M., Lindqvist, A.-K., Källberg, H., Padyukov, L., Burkhardt, H., Alfredsson, L., Klareskog, L., and Holmdahl, R. (2007) A case-control study of rheumatoid arthritis identifies an associated single nucleotide polymorphism in the NCF4 gene, supporting a role for the NADPH-oxidase complex in autoimmunity. *Arthritis Res. Ther.* **9**, 1–11
18. Rioux, J. D., Xavier, R. J., Taylor, K. D., Silverberg, M. S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M. M., Datta, L. W., Shugart, Y. Y., Griffiths, A. M., Targan, S. R., Ippoliti, A. F., Bernard, E.-J., Mei, L., Nicolae, D. L., Regueiro, M., Schumm, L. P., Steinhardt, A. H., Rotter, J. I., Duerr, R. H., Cho, J. H., Daly, M. J., and Brant, S. R. (2007) Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat. Genet.* **39**, 596–604
19. Roberts, R. L., Hollis-Moffatt, J. E., Gearry, R. B., Kennedy, M. A., Barclay, M. L., and Merriman, T. R. (2008) Confirmation of association of IRGM and NCF4 with ileal Crohn's disease in a population-based cohort. *Genes Immun.* **9**, 561–565
20. Muise, A. M., Walters, T., Xu, W., Shen-Tu, G., Guo, C., Fattouh, R., Lam, G. Y., Wolters, V. M., Bennitz, J., van Limbergen, J., Renbaum, P., Kasirer, Y., Ngan, B., Turner, D., Denson, L. A., Sherman, P. M., Duerr, R. H., Cho, J., Lees, C. W., Satsangi, J., Wilson, D. C., Paterson, A. D., Griffiths, A. M., Glogauer, M., Silverberg, M. S., and Brumell, J. H. (2011) Single Nucleotide Polymorphisms That Increase Expression of the Guanosine Triphosphatase RAC1 Are Associated With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology.* **141**, 633–641
21. Muise, A. M., Snapper, S. B., and Kugathasan, S. (2012) The Age of Gene Discovery in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* **143**, 285–288
22. Dhillon, S. S., Fattouh, R., Elkadri, A., Xu, W., Murchie, R., Walters, T., Guo, C., Mack, D., Huynh, H. Q., Baksh, S., Silverberg, M. S., Griffiths, A. M., Snapper, S. B., Brumell, J. H., and Muise, A. M. (2014) Variants in Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Complex Components Determine Susceptibility to Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* **147**, 680-689.e2
23. Mailman, T., and Schmidt, M. H. (2005) *Francisella philomiragia* Adenitis and Pulmonary Nodules in a Child with Chronic Granulomatous Disease. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **16**, 245–248
24. Falcone, E. L., Petts, J. R., Fasano, M. B., Ford, B., Nauseef, W. M., Neves, J. F., Simões, M. J., Tierce, M. L., de la Morena, M. T., Greenberg, D. E., Zerbe, C. S., Zelazny, A. M., and Holland, S. M. (2016) Methylophrotroph Infections and Chronic Granulomatous Disease. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 404–409
25. Greenberg, D. E., Shoffner, A. R., Zelazny, A. M., Fenster, M. E., Zarembek, K. A., Stock, F., Ding, L., Marshall-Batty, K. R., Wasserman, R. L., Welch, D. F., Kanakabandi, K., Sturdevant, D. E., Virtaneva, K., Porcella, S. F., Murray, P. R., Malech, H. L., and Holland, S. M. (2010) Recurrent *Granulibacter bethesdensis* Infections and Chronic Granulomatous Disease. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1341–1348
26. Rodríguez López, F. C., Franco-Álvarez de Luna, F., Gamero Delgado, M. C., Ibarra de la Rosa, I., Valdezate, S., Saez Nieto, J. A., and Casal, M. (2008) *Granulibacter bethesdensis* isolated in a child patient with chronic granulomatous disease. *J. Infect.* **57**, 275–277
27. Chase, J. M., Holland, S. M., Greenberg, D. E., Marshall-Batty, K., Zelazny, A. M., and Church, J. A. (2012) *Acidomonas Methanolica*-Associated Necrotizing Lymphadenitis in a Patient with Chronic Granulomatous Disease. *J. Clin. Immunol.* **32**, 1193–1196
28. Lai, C.-C., Cheng, A., Liu, W.-L., Tan, C.-K., Huang, Y.-T., Chung, K.-P., Lee, M.-R., and Hsueh, P.-R. (2011) Infections Caused by Unusual *Methylobacterium* Species. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3329–3331

29. Reichenbach, J., Lopatin, U., Mahlaoui, N., Beovic, B., Siler, U., Zbinden, R., Seger, R. A., Galmiche, L., Brousse, N., Kayal, S., Güngör, T., Blanche, S., and Holland, S. M. (2009) *Actinomyces* in Chronic Granulomatous Disease: An Emerging and Unanticipated Pathogen. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 1703–1710
30. Henriët, S. S. V., Verweij, P. E., and Warris, A. (2012) *Aspergillus nidulans* and Chronic Granulomatous Disease: A Unique Host–Pathogen Interaction. *J. Infect. Dis.* **206**, 1128–1137
31. Vinh, D. C., Freeman, A. F., Shea, Y. R., Malech, H. L., Abinun, M., Weinberg, G. A., and Holland, S. M. (2009) Mucormycosis in chronic granulomatous disease: Association with iatrogenic immunosuppression. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 1411–1413
32. Silliman, C. C., Lawellin, D. W., Lohr, J. A., Rodgers, B. M., and Donowitz, L. G. (1992) *Paecilomyces lilacinus* infection in a child with chronic granulomatous disease. *J. Infect.* **24**, 191–195
33. De Ravin, S. S., Challipalli, M., Anderson, V., Shea, Y. R., Marciano, B., Hilligoss, D., Marquesen, M., DeCastro, R., Liu, Y. -c., Sutton, D. A., Wickes, B. L., Kammeyer, P. L., Sigler, L., Sullivan, K., Kang, E. M., Malech, H. L., Holland, S. M., and Zelazny, A. M. (2011) *Geosmithia argillacea*: An Emerging Cause of Invasive Mycosis in Human Chronic Granulomatous Disease. *Clin. Infect. Dis.* **52**, e136–e143
34. Machouart, M., Garcia-Hermoso, D., Rivier, A., Hassouni, N., Catherinot, E., Salmon, A., Debourgogne, A., Coignard, H., Lecuit, M., Bougnoux, M.-E., Blanche, S., and Lortholary, O. (2011) Emergence of Disseminated Infections Due to *Geosmithia argillacea* in Patients with Chronic Granulomatous Disease Receiving Long-Term Azole Antifungal Prophylaxis. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1681–1683
35. Giraud, S., Favennec, L., Bougnoux, M.-E., and Bouchara, J.-P. (2013) *Rasamsonia argillacea* species complex: taxonomy, pathogenesis and clinical relevance. *Future Microbiol.* **8**, 967–978
36. Santos, P. E., Piontelli, E., Shea, Y. R., Galluzzo, M. L., Holland, S. M., Zelazko, M. E., and Rosenzweig, S. D. (2006) *Penicillium piceum* infection: diagnosis and successful treatment in chronic granulomatous disease. *Med. Mycol.* **44**, 749–753
37. Haidar, G., Zerbe, C. S., Cheng, M., Zelazny, A. M., Holland, S. M., and Sheridan, K. R. (2017) *Phellinus* species: An emerging cause of refractory fungal infections in patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Mycoses.* **60**, 155–160
38. Hahn, K. J., Ho, N., Yockey, L., Kreuzberg, S., Daub, J., Rump, A., Marciano, B. E., Quezado, M., Malech, H. L., Holland, S. M., Heller, T., and Zerbe, C. S. (2015) Treatment With Anakinra, a Recombinant IL-1 Receptor Antagonist, Unlikely to Induce Lasting Remission in Patients With CGD Colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **110**, 938–939
39. Foster, C. B., Lehrnbecher, T., Mol, F., Steinberg, S. M., Venzon, D. J., Walsh, T. J., Noack, D., Rae, J., Winkelstein, J. A., Curnutte, J. T., and Chanock, S. J. (1998) Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* **102**, 2146–2155
40. Martire, B., Rondelli, R., Soresina, A., Pignata, C., Broccoletti, T., Finocchi, A., Rossi, P., Gattorno, M., Rabusin, M., Azzari, C., Dellepiane, R. M., Pietrogrande, M. C., Trizzino, A., Di Bartolomeo, P., Martino, S., Carpino, L., Cossu, F., Locatelli, F., Maccario, R., Pierani, P., Putti, M. C., Stabile, A., Notarangelo, L. D., Ugazio, A. G., Plebani, A., and De Mattia, D. (2008) Clinical features, long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease: An Italian multicenter study. *Clin. Immunol.* **126**, 155–164
41. Winkelstein, J. A., Marino, M. C., Johnston, R. B., Boyle, J., Curnutte, J., Gallin, J. I., Malech, H. L., Holland, S. M., Ochs, H., Quie, P., Buckley, R. H., Foster, C. B., Chanock, S. J., and Dickler, H. (2000) Chronic Granulomatous Disease. *Medicine (Baltimore).* **79**, 155–169
42. Shamsian, B. S., Mansouri, D., Pourpak, Z., Rezaei, N., Chavoshzadeh, Z., Jadali, F., Gharib, A., Alavi, S., Eghbali, A., and Arzanian, M. T. (2008) Autosomal Recessive Chronic Granulomatous Disease, IgA

- Deficiency and Refractory Autoimmune Thrombocytopenia Responding to Anti-CD20 Monoclonal Antibody. *7*, 4
43. Trelinski, J., Chojnowski, K., Kurenko-Deptuch, M., Kasznicki, M., Bernatowska, E., and Robak, T. (2005) Successful treatment of refractory autoimmune thrombocytopenia with rituximab and cyclosporin A in a patient with chronic granulomatous disease. *Ann. Hematol.* **84**, 835–836
 44. Roos, D., and de Boer, M. (2018) Retrotransposable genetic elements causing neutrophil defects. *Eur. J. Clin. Invest.* 10.1111/eci.12953
 45. Gungör, T., Teira, P., Slatter, M., Stussi, G., Stepensky, P., Moshous, D., Vermont, C., Ahmad, I., Shaw, P. J., da Cunha, J. M. T., Schlegel, P. G., Hough, R., Fasth, A., Kentouche, K., Gruhn, B., Fernandes, J. F., Lachance, S., Bredius, R., Resnick, I. B., Belohradsky, B. H., Gennery, A., Fischer, A., Gaspar, H. B., Schanz, U., Seger, R., Rentsch, K., Veys, P., Haddad, E., Albert, M. H., and Hassan, M. (2014) Reduced-intensity conditioning and HLA-matched haemopoietic stem-cell transplantation in patients with chronic granulomatous disease: a prospective multicentre study. *The Lancet.* **383**, 436–448
 46. Aiuti, A., Bacchetta, R., Seger, R., Villa, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2012) Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 2. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 585–591
 47. Goldblatt, D. (2014) Recent advances in chronic granulomatous disease. *J. Infect.* **69**, S32–S35
 48. Leiding, J. W., Marciano, B. E., Zerbe, C. S., DeRavin, S. S., Malech, H. L., and Holland, S. M. (2013) Diabetes, Renal and Cardiovascular Disease in $p47^{phox^{-/-}}$ Chronic Granulomatous Disease. *J. Clin. Immunol.* **33**, 725–730
 49. Ma, M. W., Wang, J., Zhang, Q., Wang, R., Dhandapani, K. M., Vadlamudi, R. K., and Brann, D. W. (2017) NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Mol. Neurodegener.* **12**, 1–28
 50. Harraz, M. M., Marden, J. J., Zhou, W., Zhang, Y., Williams, A., Sharov, V. S., Nelson, K., Luo, M., Paulson, H., Schöneich, C., and Engelhardt, J. F. (2008) SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J. Clin. Invest.* **118**, 659–670
 51. Wu, D.-C., Re, D. B., Nagai, M., Ischiropoulos, H., and Przedborski, S. (2006) The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 12132–12137
 52. Marrali, G., Casale, F., Salamone, P., Fuda, G., Caorsi, C., Amoroso, A., Brunetti, M., Restagno, G., Barberis, M., Bertuzzo, D., Canosa, A., Moglia, C., Calvo, A., and Chiò, A. (2014) NADPH oxidase (NOX2) activity is a modifier of survival in ALS. *J. Neurol.* **261**, 2178–2183
 53. Seredenina, T., Nayernia, Z., Sorce, S., Maghzal, G. J., Filippova, A., Ling, S.-C., Basset, O., Plastre, O., Daali, Y., Rushing, E. J., Giordana, M. T., Cleveland, D. W., Aguzzi, A., Stocker, R., Krause, K.-H., and Jaquet, V. (2016) Evaluation of NADPH oxidases as drug targets in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* **97**, 95–108
 54. Lambeth, J. D. (2007) Nox enzymes, ROS, and chronic disease: An example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 332–347
 55. Murdoch, C. E., Chaubey, S., Zeng, L., Yu, B., Ivetic, A., Walker, S. J., Vanhoutte, D., Heymans, S., Grieve, D. J., Cave, A. C., Brewer, A. C., Zhang, M., and Shah, A. M. (2014) Endothelial NADPH Oxidase-2 Promotes Interstitial Cardiac Fibrosis and Diastolic Dysfunction Through Proinflammatory Effects and Endothelial-Mesenchymal Transition. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 2734–2741
 56. Murdoch, C. E., Alom-Ruiz, S. P., Wang, M., Zhang, M., Walker, S., Yu, B., Brewer, A., and Shah, A. M. (2011) Role of endothelial Nox2 NADPH oxidase in angiotensin II-induced hypertension and vasomotor dysfunction. *Basic Res. Cardiol.* **106**, 527–538

57. Mollnau, H., Wendt, M., Szöcs, K., Lassègue, B., Schulz, E., Oelze, M., Li, H., Bodenschatz, M., August, M., Kleschyov, A. L., Tsilimingas, N., Walter, U., Förstermann, U., Meinertz, T., Griendling, K., and Münzel, T. (2002) Effects of Angiotensin II Infusion on the Expression and Function of NAD(P)H Oxidase and Components of Nitric Oxide/cGMP Signaling. *Circ. Res.* **90**, e58–e65
58. Rajagopalan, S., Kurz, K., Münzel, M., Tarpey, M., Freeman, B. A., Griendling, K. K., and Harrison, D. G. (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.* **97**, 1916–1923
59. Szöcs, K., Lassègue, B., Sorescu, D., Hilenski, L. L., Valppu, L., Couse, T. L., Wilcox, J. N., Quinn, M. T., Lambeth, J. D., and Griendling, K. K. (2002) Upregulation of Nox-Based NAD(P)H Oxidases in Restenosis After Carotid Injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 21–27
60. Weaver, M., Liu, J., Pimentel, D., Reddy, D. J., Harding, P., Peterson, E. L., and Pagano, P. J. (2006) Adventitial delivery of dominant-negative p67^{phox} attenuates neointimal hyperplasia of the rat carotid artery. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **290**, H1933–H1941
61. Jacobson, G. M., Dourron, H. M., Liu, J., Carretero, O. A., Reddy, D. J., Andrzejewski, T., and Pagano, P. J. (2003) Novel NAD(P)H Oxidase Inhibitor Suppresses Angioplasty-Induced Superoxide and Neointimal Hyperplasia of Rat Carotid Artery. *Circ. Res.* **92**, 637–643
62. Barry-Lane, P. A., Patterson, C., van der Merwe, M., Hu, Z., Holland, S. M., Yeh, E. T. H., and Runge, M. S. (2001) p47^{phox} is required for atherosclerotic lesion progression in *ApoE*^{-/-} mice. *J. Clin. Invest.* **108**, 1513–1522
63. Quesada, I. M., Lucero, A., Amaya, C., Meijles, D. N., Cifuentes, M. E., Pagano, P. J., and Castro, C. (2015) Selective inactivation of NADPH oxidase 2 causes regression of vascularization and the size and stability of atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* **242**, 469–475
64. Sorescu, D., Weiss, D., Lassègue, B., Clempus, R. E., Szöcs, K., Sorescu, G. P., Valppu, L., Quinn, M. T., Lambeth, D., Vega, D., Taylor, R., and Griendling, K. K. (2002) Superoxide Production and Expression of Nox Family Proteins in Human Atherosclerosis. *Circulation.* **105**, 1429–1435
65. Altenhöfer, S., Radermacher, K. A., Kleikers, P. W. M., Wingler, K., and Schmidt, H. H. H. W. (2015) Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxid. Redox Signal.* **23**, 406–427
66. Leoni, G., Neumann, P.-A., Sumagin, R., Denning, T. L., and Nusrat, A. (2015) Wound repair: role of immune–epithelial interactions. *Mucosal Immunol.* **8**, 959–968
67. Strbo, N., Yin, N., and Stojadinovic, O. (2014) Innate and Adaptive Immune Responses in Wound Epithelialization. *Adv. Wound Care.* **3**, 492–501
68. Vermeren, S., Karmakar, U., and Rossi, A. G. (2018) Immune complex-induced neutrophil functions: A focus on cell death. *Eur. J. Clin. Invest.* **In Press**, 1–8
69. Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., and Kagan, J. C. (2015) Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 257–290
70. Huber-Lang, M., Lambris, J. D., and Ward, P. A. (2018) Innate immune responses to trauma. *Nat. Immunol.* **19**, 327–341
71. Thaiss, C. A., Levy, M., Itav, S., and Elinav, E. (2016) Integration of Innate Immune Signaling. *Trends Immunol.* **37**, 84–101
72. Rosales, C., and Uribe-Querol, E. (2017) Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Res. Int.* **In Press**, In Press

73. Richards, D. M., and Endres, R. G. (2017) How cells engulf: a review of theoretical approaches to phagocytosis. *Rep. Prog. Phys.* 10.1088/1361-6633/aa8730
74. Gordon, S. (2016) Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*. **44**, 463–475
75. Dharmaraja, A. T. (2017) Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Therapeutics and Drug Resistance in Cancer and Bacteria. *J. Med. Chem.* **60**, 3221–3240
76. Hayyan, M., Hashim, M. A., and AlNashef, I. M. (2016) Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem. Rev.* **116**, 3029–3085
77. Krumova, K., and Cosa, G. (2016) Chapter 1. Overview of Reactive Oxygen Species. in *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences* (Nonell, S., and Flors, C. eds), pp. 1–21, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1**, 1–21
78. Winterbourn, C. C. (2012) Biological Chemistry of Reactive Oxygen Species. *Encycl. Radic. Chem. Biol. Mater.* 10.1002/9781119953678.rad077
79. Winterbourn, C. C. (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 278–286
80. Odobasic, D., Kitching, A. R., and Holdsworth, S. R. (2016) Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase. *J. Immunol. Res.* 10.1155/2016/2349817
81. Kato, Y. (2016) Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **58**, 99–104
82. Davies, M. J., Hawkins, C. L., Pattison, D. I., and Rees, M. D. (2008) Mammalian Heme Peroxidases: From Molecular Mechanisms to Health Implications. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1199–1234
83. Nauseef, W. M. (2014) Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell. Microbiol.* **16**, 1146–1155
84. Kettle, A. J., Anderson, R. F., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2007) Reactions of Superoxide with Myeloperoxidase. *Biochemistry.* **46**, 4888–4897
85. Davies, M. J. (2011) Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **48**, 8–19
86. Bastian, N. R., and Hibbs, J. B. (1994) Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 131–139
87. Cedergren, J., Follin, P., Forslund, T., Lindmark, M., Sundqvist, T., and Skogh, T. (2003) Inducible nitric oxide synthase (NOS II) is constitutive in human neutrophils. *APMIS.* **111**, 963–968
88. Förstermann, U., and Sessa, W. C. (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**, 829–837
89. Rosen, G. M., Tsai, P., and Pou, S. (2002) Mechanism of Free-Radical Generation by Nitric Oxide Synthase. *Chem. Rev.* **102**, 1191–1200
90. Faurischou, M., and Borregaard, N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5**, 1317–1327
91. Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengeløv, H., Bastholm, L., Nielsen, M. H., and Bainton, D. F. (1993) Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur. J. Haematol.* **51**, 187–198
92. Nauseef, W. M. (2004) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem. Cell Biol.* **122**, 277–291

93. Dewald, B., Baggiolini, M., Curnutte, J., and Babior, B. M. (1979) Subcellular localization of the superoxide-forming enzyme in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **63**, 21–29
94. Borregaard, N. (1985) The respiratory burst of phagocytosis: Biochemistry and subcellular localization. *Immunol. Lett.* **11**, 165–171
95. Garcia, R. C., and Segal, A. W. (1984) Changes in the subcellular distribution of the cytochrome *b*₂₄₅ on stimulation of human neutrophils. *Biochem. J.* **219**, 233–242
96. Vaissiere, C., Le Cabec, V., and Maridonneau-Parini, I. (1999) NADPH oxidase is functionally assembled in specific granules during activation of human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 629–634
97. Tsunawaki, S., Kaneda, M., and Kakinuma, K. (1983) Activation of Guinea Pig Polymorphonuclear with Soluble Stimulators Leads to Nonrandom of NADPH Oxidase in the Plasma Membrane. *J. Biochem. (Tokyo)*. **94**, 655–664
98. Bjerrum, O. W., and Borregaard, N. (1989) Dual granule localization of the dormant NADPH oxidase and cytochrome *b*₅₅₉ in human neutrophils. *Eur. J. Haematol.* **43**, 67–77
99. Borregaard, N., Heiple, J. M., Simons, E. R., and Clark, R. A. (1983) Subcellular localization of the *b*-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell Biol.* **97**, 52–61
100. YAMAGUCHI, T., KAKINUMA, K., and SATO, K. (1982) Subcellular Localization of O₂⁻: Fractionation of Subcellular Particles by Using a Percoll Density Gradient. *J Biochem.* **91**, 31–40
101. Kjeldsen, L., Sengeløv, H., Lollike, K., Nielsen, M. H., and Borregaard, N. (1994) Isolation and Characterization of Gelatinase Granules From Human Neutrophils. *Blood.* **83**, 1640–1649
102. Borregaard, N., and Tauber, A. I. (1984) Subcellular Localization of the Human Neutrophil NADPH Oxidase. *J. Biol. Chem.* **259**, 47–52
103. Clark, R. A., Leidal, K. G., Pearson, D. W., and Nauseef, W. M. (1987) NADPH Oxidase of Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **262**, 4065–4074
104. Borregaard, N., Kjeldsen, L., Sengeløv, H., Diamond, M. S., Springer, T. A., Anderson, H. C., Kishimoto, T. K., and Bainton, D. F. (1994) Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *J. Leukoc. Biol.* **56**, 80–87
105. Abo, A., Webb, M. R., Grogan, A., and Segal, A. W. (1994) Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21^{rac} from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem. J.* **298**, 585–591
106. El Benna, J., Ruedi, J. M., and Babior, B. M. (1994) Cytosolic Guanine Nucleotide-binding Protein Rac2 Operates *in Vivo* as a Component of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. *J. Biol. Chem.* **269**, 6729–6734
107. Clark, R. A., Volpp, B. D., Leidal, K. G., and Nauseef, W. M. (1990) Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J. Clin. Invest.* **85**, 714–721
108. Quinn, M. T., Evans, T., Loetterle, L. R., Jesaitis, A. J., and Bokoch, G. M. (1993) Translocation of Rac Correlates with NADPH Oxidase Activation. *J. Biol. Chem.* **268**, 20983–20987
109. Bainton, D. F., and Farquhar, M. G. (1966) Origin of Granules in Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Cell Biol.* **28**, 277–301

110. El-Benna, J., Dang, P. M.-C., and Gougerot-Pocidalò, M.-A. (2008) Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin. Immunopathol.* **30**, 279–289
111. Wientjes, F. B., Segal, A. W., and Hartwig, J. H. (1997) Immunoelectron microscopy shows a clustered distribution of NADPH oxidase components in the human neutrophil plasma membrane. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 303–312
112. Ginsel, L. A., Onderwater, J. J. M., Fransen, J. A. M., Verhoeven, A. J., and Roos, D. (1990) Localization of the Low-M_r Subunit of Cytochrome *b*₅₅₈ in Human Blood Phagocytes by Immunoelectron Microscopy. *Blood.* **76**, 2105–2113
113. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (178AD) The Nomenclature of Lipids (Recommendations 1976). *Biochem. J.* **171**, 21–35
114. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1977) The Nomenclature of Lipids. Recommendations, 1976. *Eur. J. Biochem.* **79**, 11–21
115. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1968) The Nomenclature of Lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **123**, 409–415
116. Cevc (1993) *Phospholipids Handbook*, Marcel Dekker, INC, Gregor Cevc Technical University of Munich
117. Ridgway, N. D., and McLeod, R. S. (2016) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, Sixth edition, Elsevier, Amsterdam ; Boston
118. van Meer, G., Voelker, D. R., and Feigenson, G. W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124
119. Marquês, J. T., Marinho, H. S., and de Almeida, R. F. M. (2018) Sphingolipid hydroxylation in mammals, yeast and plants – An integrated view. *Prog. Lipid Res.* **71**, 18–42
120. Hamilton, R. . (1998) *Lipid Analysis in Oils and Fats*, First Edition, Springer US, Boston, MA, [online] <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3079022> (Accessed June 1, 2018)
121. Adlercreutz, P., Lyberg, A.-M., and Adlercreutz, D. (2003) Enzymatic fatty acid exchange in glycerophospholipids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**, 638–645
122. D'Arrigo, P., and Servi, S. (2010) Synthesis of Lysophospholipids. *Molecules.* **15**, 1354–1377
123. Mnasri, T., Hérault, J., Gauvry, L., Loiseau, C., Poisson, L., Ergon, F., and Pencreac'h, G. (2014) Lipase-catalyzed production of lysophospholipids. *OCL.* **24**, 1–6
124. Schink, K. O., Tan, K.-W., and Stenmark, H. (2016) Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **32**, 143–171
125. Dufourc, E. J. (2008) Sterols and membrane dynamics. *J. Chem. Biol.* **1**, 63–77
126. Nes, W. D. (2011) Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols. *Chem. Rev.* **111**, 6423–6451
127. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1989) The nomenclature of steroids. Recommendations 1989. *Eur. J. Biochem.* **186**, 429–458
128. de Meyer, F., and Smit, B. (2009) Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 3654–3658
129. Frolov, V. A., Shnyrova, A. V., and Zimmerberg, J. (2011) Lipid Polymorphisms and Membrane Shape. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–14

130. Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., and Deng, Y. (2015) A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J. Pharm. Sci.* **10**, 81–98
131. Jouhet, J. (2013) Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Front. Plant Sci.* **4**, 1–5
132. Cullis, P. R., Hope, M. J., and Tilcock, C. P. S. (1986) Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem. Phys. Lipids.* **40**, 127–144
133. Israelachvili, J. N., Marčelja, S., and Horn, R. G. (1980) Physical principles of membrane organization. *Q. Rev. Biophys.* **13**, 121–200
134. Cullis, P. R., and De Kruijff, B. (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **559**, 399–420
135. Gruner, S. M., Cullis, P. R., Hope, M. J., and Tilcock, C. P. S. (1985) Lipid Polymorphism: The Molecular Basis of Nonbilayer Phases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **14**, 211–238
136. Janmey, P. A., and Kinnunen, P. K. J. (2006) Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol.* **16**, 538–546
137. Suetsugu, S., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2014) Dynamic Shaping of Cellular Membranes by Phospholipids and Membrane-Deforming Proteins. *Physiol. Rev.* **94**, 1219–1248
138. Wenk, M. R., and De Camilli, P. (2004) Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: Insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 8262–8269
139. Balla, T. (2013) Phosphoinositides: Tiny Lipids With Giant Impact on Cell Regulation. *Physiol. Rev.* **93**, 1019–1137
140. Curthoys, N. M., Parent, M., Mlodzianoski, M., Nelson, A. J., Lilieholm, J., Butler, M. B., Valles, M., and Hess, S. T. (2015) Dances with Membranes: Breakthroughs from Super-resolution Imaging. in *Current Topics in Membranes*, pp. 59–123, Elsevier, **75**, 59–123
141. Wu, E. L., Qi, Y., Song, K. C., Klauda, J. B., and Im, W. (2014) Preferred Orientations of Phosphoinositides in Bilayers and Their Implications in Protein Recognition Mechanisms. *J. Phys. Chem. B.* **118**, 4315–4325
142. Bigay, J., and Antonny, B. (2012) Curvature, Lipid Packing, and Electrostatics of Membrane Organelles: Defining Cellular Territories in Determining Specificity. *Dev. Cell.* **23**, 886–895
143. McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., and Murray, D. (2002) PIP₂ and Proteins: Interactions, Organization, and Information Flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 151–175
144. Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature.* **443**, 651–657
145. Sprong, H., van der Sluijs, P., and van Meer, G. (2001) How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 504–513
146. Cross, A. R., and Curnutte, J. T. (1995) The Cytosolic Activating Factors p47^{phox} and p67^{phox} Have Distinct Roles in the Regulation of Electron Flow in NADPH Oxidase. *J. Biol. Chem.* **270**, 6543–6548
147. Faure, M. C., Sulpice, J.-C., Delattre, M., Lavielle, M., Prigent, M., Cuif, M.-H., Melchior, C., Tschirhart, E., Nüße, O., and Dupré-Crochet, S. (2013) The recruitment of p47^{phox} and Rac2G12V at the phagosome is transient and phosphatidylserine dependent: PS and phagosomal accumulation of p47^{phox} and Rac2. *Biol. Cell.* **105**, 501–518

148. Dagher, M., Fuchs, A., Bourmeyster, N., Jouan, A., and Vignais, P. (1995) Small G proteins and the neutrophil NADPH oxidase. *Biochimie*. **77**, 651–660
149. Heyworth, P. G., Knaus, U. G., Settleman, J., Curnutte, J. T., and Bokoch, G. M. (1993) Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Mol. Biol. Cell*. **4**, 1217–1223
150. Parkos, C. A., Allen, R. A., Cochrane, C. G., and Jesaitis, A. J. (1988) The quaternary structure of the plasma membrane *b*-type cytochrome of human granulocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. **932**, 71–83
151. 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
152. 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**, 583–585
153. von Löhneysen, K., Noack, D., Jesaitis, A. J., Dinauer, M. C., and Knaus, U. G. (2008) Mutational Analysis Reveals Distinct Features of the Nox4-p22^{phox} Complex. *J. Biol. Chem.* **283**, 35273–35282
154. Lewis, E. M., Sergeant, S., Ledford, B., Stull, N., Dinauer, M. C., and McPhail, L. C. (2010) Phosphorylation of p22^{phox} on Threonine 147 Enhances NADPH Oxidase Activity by Promoting p47^{phox} Binding. *J. Biol. Chem.* **285**, 2959–2967
155. 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
156. Ushio-Fukai, M., Zafari, A. M., Fukui, T., Ishizaka, N., and Griendling, K. K. (1996) p22^{phox} Is a Critical Component of the Superoxide-generating NADH/NADPH Oxidase System and Regulates Angiotensin II-induced Hypertrophy in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 23317–23321
157. Stasia, M. J. (2016) CYBA encoding p22phox, the cytochrome b558 alpha polypeptide: gene structure, expression, role and physiopathology. *Gene*. **586**, 27–35
158. 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
159. 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
160. 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
161. Carrichon, L., Picciocchi, A., Debeurme, F., Defendi, F., Beaumel, S., Jesaitis, A. J., Dagher, M.-C., and Stasia, M.-J. (2011) Characterization of superoxide overproduction by the D-LoopNox4-Nox2 cytochrome b558 in phagocytes—Differential sensitivity to calcium and phosphorylation events. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808**, 78–90
162. Magnani, F., Nenci, S., Millana Fananas, E., Ceccon, M., Romero, E., Fraaije, M. W., and Mattevi, A. (2017) Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **In Press**, 201702293
163. Magnani, F., Nenci, S., Millana Fananas, E., Ceccon, M., Romero, E., Fraaije, M. W., and Mattevi, A. (2017) Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase - Supplementary Information. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **In Press**, 201702293
164. Masoud, R., Bizouarn, T., and Houée-Levin, C. (2014) Cholesterol: A modulator of the phagocyte NADPH oxidase activity - A cell-free study. *Redox Biol.* **3**, 16–24

165. Vilhardt, F., and van Deurs, B. (2004) The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly. *EMBO J.* **23**, 739–748
166. Guichard, C., Pedruzzi, E., Dewas, C., Fay, M., Pouzet, C., Bens, M., Vandewalle, A., Ogier-Denis, E., Gougerot-Pocidalo, M.-A., and Elbim, C. (2005) Interleukin-8-induced Priming of Neutrophil Oxidative Burst Requires Sequential Recruitment of NADPH Oxidase Components into Lipid Rafts. *J. Biol. Chem.* **280**, 37021–37032
167. Zhang, A. Y., Yi, F., Zhang, G., Gulbins, E., and Li, P.-L. (2006) Lipid Raft Clustering and Redox Signaling Platform Formation in Coronary Arterial Endothelial Cells. *Hypertension.* **47**, 74–80
168. 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
169. Han, W., Li, H., Villar, V. A. M., 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
170. Yang, B., Oo, T. N., and Rizzo, V. (2006) Lipid rafts mediate H₂O₂ pro-survival effects in cultured endothelial cells. *FASEB J.* **20**, E688-1503
171. Zuo, L., and Ushio-Fukai, M. (2004) Microtubules Regulate Angiotensin II Type 1 Receptor and Rac1 Localization in Caveolae/Lipid Rafts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1223–1228
172. Lee, A. G. (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1666**, 62–87
173. Ezzine, A., Souabni, H., Bizouarn, T., and Baciou, L. (2014) Recombinant form of mammalian gp91^{phox} is active in the absence of p22^{phox}. *Biochem. J.* **462**, 337–345
174. Souabni, H., Machillot, P., and Baciou, L. (2014) Contribution of lipid environment to NADPH oxidase activity: Influence of sterol. *Biochimie.* **107**, 33–42
175. Souabni, H., Wien, F., Bizouarn, T., Houée-Levin, C., Réfrégiers, M., and Baciou, L. (2017) The physicochemical properties of membranes correlate with the NADPH oxidase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1861**, 3520–3530
176. Ostuni, M. A., Lamanuzzi, L. B., Bizouarn, T., Dagher, M.-C., and Baciou, L. (2010) Expression of functional mammal flavocytochrome b558 in yeast: Comparison with improved insect cell system. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1798**, 1179–1188
177. Shpungin, S., Dotan, I., Abo, A., and Pick, E. (1989) Activation of the Superoxide Forming NADPH Oxidase in a Cell-free System by Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Biol. Chem.* **264**, 9195–9203
178. Souabni, H., Thoma, V., Bizouarn, T., Chatgililoglu, C., Sifaka-Kapadai, A., Baciou, L., Ferreri, C., Houée-Levin, C., and Ostuni, M. A. (2012) trans Arachidonic acid isomers inhibit NADPH-oxidase activity by direct interaction with enzyme components. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818**, 2314–2324
179. 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 BBA - Biomembr.* **1663**, 201–213
180. 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 b₅₅₈. *J. Biol. Chem.* **276**, 31105–31112
181. 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 BBA - Bioenerg.* **1657**, 1–22

182. Zoski, C. G. (ed.) (2007) *Handbook of electrochemistry*, 1st ed, Elsevier, Amsterdam ; Boston
183. Saleh, F. S., Rahman, M. R., Okajima, T., Mao, L., and Ohsaka, T. (2011) Determination of formal potential of NADH/NAD⁺ redox couple and catalytic oxidation of NADH using poly(phenosafranin)-modified carbon electrodes. *Bioelectrochemistry*. **80**, 121–127
184. Rodkey, F. L., and Donovan, J. A. (1959) Oxidation-Reduction Potentials of the Triphosphopyridine Nucleotide system. *J. Biol. Chem.* **234**, 677–680
185. Kakinuma, K., Kaneda, M., Chiba, T., and Ohnishi, T. (1986) Electron spin resonance studies on a flavoprotein in neutrophil plasma membranes. Redox potentials of the flavin and its participation in NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **261**, 9426–9432
186. Cross, A. R., Jones, O. T. G., Harper, A. M., and Segal, A. W. (1981) Oxidation-reduction properties of the cytochrome b found in the plasma-membrane fraction of human neutrophils. A possible oxidase in the respiratory burst. *Biochem. J.* **194**, 599–606
187. Cross, A. R., Rae, J., and Curnutte, J. T. (1995) Cytochrome *b*₂₄₅ of the Neutrophil Superoxide-generating System Contains Two Nonidentical Hemes. *J. Biol. Chem.* **270**, 17075–17077
188. Wood, P. M. (1988) The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochem. J.* **253**, 287–289
189. Huang, X., and Groves, J. T. (2018) Oxygen Activation and Radical Transformations in Heme Proteins and Metalloporphyrins. *Chem. Rev.* **118**, 2491–2553
190. Agledal, L., Niere, M., and Ziegler, M. (2010) The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP. *Redox Rep.* **15**, 2–10
191. Pollak, N., Niere, M., and Ziegler, M. (2007) NAD Kinase Levels Control the NADPH Concentration in Human Cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 33562–33571
192. Horecker, B. L. (2002) The Pentose Phosphate Pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 47965–47971
193. Lewis, C. A., Parker, S. J., Fiske, B. P., McCloskey, D., Gui, D. Y., Green, C. R., Vokes, N. I., Feist, A. M., Vander Heiden, M. G., and Metallo, C. M. (2014) Tracing Compartmentalized NADPH Metabolism in the Cytosol and Mitochondria of Mammalian Cells. *Mol. Cell.* **55**, 253–263
194. Schwarzer, M., and Doenst, T. (eds.) (2016) *The scientist's guide to cardiac metabolism*, First Edition, Elsevier, Amsterdam ; Boston
195. Maddocks, O. D. K., Labuschagne, C. F., and Vowsden, K. H. (2014) Localization of NADPH Production: A Wheel within a Wheel. *Mol. Cell.* **55**, 158–160
196. Maddocks, O. D. K., Labuschagne, C. F., and Vowsden, K. H. (2014) Localization of NADPH Production: A Wheel within a Wheel - Errata. *Mol. Cell.* **56**, 158–160
197. Bauldry, S. A., Nasrallah, V. N., and Bass, D. A. (1992) Activation of NADPH Oxidase in Human Neutrophils Permeabilized with *Staphylococcus aureus* α -Toxins. *J. Biol. Chem.* **267**, 323–330
198. Gatto, G. J., Ao, Z., Kearse, M. G., Zhou, M., Morales, C. R., Daniels, E., Bradley, B. T., Goserud, M. T., Goodman, K. B., Douglas, S. A., Harpel, M. R., and Johns, D. G. (2013) NADPH oxidase-dependent and -independent mechanisms of reported inhibitors of reactive oxygen generation. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **28**, 95–104
199. Babior, B. M., Curnutte, J. T., and Kipnes, R. S. (1975) Pyridine nucleotide-dependent superoxide production by a cell-free system from human granulocytes. *J. Clin. Invest.* **56**, 1035–1042

200. Wakeyama, H., Takeshige, K., Takayanagi, R., and Minakami, S. (1982) Superoxide-forming NADPH oxidase preparation of pig polymorphonuclear leucocytes. *Biochem. J.* **205**, 593–601
201. Tauber, A. I., and Goetzl, E. J. (1979) Structural and catalytic properties of the solubilized superoxide-generating activity of human polymorphonuclear leukocytes. Solubilization, stabilization in solution, and partial characterization. *Biochemistry.* **18**, 5576–5584
202. Tarnura, M., Takeshita, M., Curnutte, J. T., Uhlinger, D. J., and Lambeth, J. D. (1992) Stabilization of Human Neutrophil NADPH Oxidase Activated in a Cell-free System by Cytosolic Proteins and by 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide. *J. Biol. Chem.* **267**, 7529–7538
203. Tamura, M., Tamura, T., Tyagi, S. R., and Lambeth, J. D. (1988) The Superoxide-generating Respiratory Burst Oxidase of Human Neutrophil Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **263**, 17621–17626
204. Gaetani, G. F., Ferraris, A. M., Sanna, P., and Kirkman, H. N. (2005) A novel NADPH:(bound) NADP⁺ reductase and NADH:(bound) NADP⁺ transhydrogenase function in bovine liver catalase. *Biochem. J.* **385**, 763–768
205. Hillar, A., and Nicholls, P. (1992) A mechanism for NADPH inhibition of catalase compound II formation. *FEBS Lett.* **314**, 179–182
206. Almarsson, Ö., Sinha, A., Gopinath, E., and Bruice, T. C. (1993) Mechanism of One-Electron Oxidation of NAD(P)H and Function of NADPH Bound to Catalase. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7093–7102
207. Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M., and Gaetani, G. F. (1999) Mechanisms of Protection of Catalase by NADPH. *J. Biol. Chem.* **274**, 13908–13914
208. Kirkman, H. N., Galiano, S., and Gaetani, G. F. (1987) The Function of Catalase-bound NADPH. *J. Biol. Chem.* **262**, 660–666
209. Farrington, J. A., Land, E. J., and Swallow, A. J. (1980) The one-electron reduction potentials of NAD. *Biochim. Biophys. Acta.* **590**, 273–276
210. Anderson, R. F. (1980) Energetics of the one-electron steps in the NAD⁺/NADH redox couple. *Biochim. Biophys. Acta.* **590**, 277–281
211. Moiroux, J., and Elving, P. J. (1980) Mechanistic aspects of the electrochemical oxidation of dihydronicotinamide adenine dinucleotide (NADH). *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 6533–6538
212. Schmakel, C. O., Santhanam, K. S. V., and Elving, P. J. (1975) Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and related compounds. Electrochemical redox pattern and allied chemical behavior. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 5083–5092
213. Elving, P. J., Bresnahan, W. T., Moiroux, J., and Samec, Z. (1982) NAD/NADH as a Model Redox System: Mechanism, Mediation, Modification by the Environment. *J. Electroanal. Chem.* **141**, 365–378
214. Miller, M., Czochralska, B., and Shugar, D. (1982) Red-Ox Transformations of NAD⁺ Model Compounds. *J. Electroanal. Chem.* **141**, 287–298
215. Hashida, S., Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Takikawa, T., Sumimoto, H., Inagaki, F., and Fujii, H. (2004) Binding of FAD to Cytochrome *b*₅₅₈ Is Facilitated during Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase, Leading to Superoxide Production. *J. Biol. Chem.* **279**, 26378–26386
216. 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

217. Giancaspero, T. A., Busco, G., Panebianco, C., Carmone, C., Miccolis, A., Liuzzi, G. M., Colella, M., and Barile, M. (2013) FAD Synthesis and Degradation in the Nucleus Create a Local Flavin Cofactor Pool. *J. Biol. Chem.* **288**, 29069–29080
218. Doussi re, J., and Vignais, P. V. (1992) Diphenylene iodonium as an inhibitor of the NADPH oxidase complex of bovine neutrophils. *Eur. J. Biochem.* **208**, 61–71
219. Cross, A. R., Yarchover, J. L., and Curnutte, J. T. (1994) The Superoxide-generating System of Human Neutrophils Possesses a Novel Diaphorase Activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 21448–21454
220. Cross, A. R., Heyworth, P. G., Rae, J., and Curnutte, J. T. (1995) A Variant X-linked Chronic Granulomatous Disease Partient (X91⁺) with Partially Functional Cytochrome *b*. *J. Biol. Chem.*
221. Doussiere, J., Bouzidi, F., Poinas, A., Gaillard, J., and Vignais, P. V. (1999) Kinetic Study of the Activation of the Neutrophil NADPH Oxidase by Arachidonic Acid. Antagonistic Effects of Arachidonic Acid and Phenylarsine Oxide. *Biochemistry.* **38**, 16394–16406
222. Cross, A. R., Erickson, R. W., and Curnutte, J. T. (1999) Simultaneous Presence of p47^{phox} and Flavocytochrome *b*_{–245} Are Required for the Activation of NADPH Oxidase by Anionic Amphiphiles. *J. Biol. Chem.* **274**, 15519–15525
223. Li, J., and Guillory, R. J. (1997) Purified Leukocyte Cytochrome *b*₅₅₈ Incorporated into Liposomes Catalyzes a Cytosolic Factor Dependent Diaphorase Activity. *Biochemistry.* **36**, 5529–5537
224. Han, C.-H., Nisimoto, Y., Lee, S.-H., Kim, E. T., and Lambeth J. David (2001) Characterization of the Flavoprotein Domain of gp91phox Which Has NADPH Diaphorase Activity. *J. Biochem. (Tokyo).* **129**, 513–520
225. Nisimoto, Y., Ogawa, H., Miyano, K., and Tamura, M. (2004) Activation of the Flavoprotein Domain of gp91^{phox} upon Interaction with N-Terminal p67^{phox} (1–210) and the Rac Complex. *Biochemistry.* **43**, 9567–9575
226. Poinas, A., Gaillard, J., Vignais, P., and Doussiere, J. (2002) Exploration of the diaphorase activity of neutrophil NADPH oxidase: Critical assessment of the interaction of iodonitrotetrazolium with the oxidase redox components. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1243–1252
227. Hurst, J. K., Loehr, T. M., Curnutte, J. T., and Rosen, H. (1991) Resonance Raman and Electron Paramagnetic Resonance Structural Investigations of Neutrophil Cytochrome *b*₅₅₈. *J. Biol. Chem.* **266**, 1627–1634
228. Miki, T., Fujii, H., and Kakinuma, K. (1992) EPR Signals of Cytochrome *b*₅₅₈ Purified from Porcine Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **267**, 19673–19675
229. Fujii, H., and Kakinuma, K. (1992) Electron paramagnetic resonance studies on cytochrome *b*-558 and peroxidases of pig blood granulocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1136**, 239–246
230. Fujii, H., Johnson, M. K., Finnegan, M. G., Miki, T., Yoshida, L. S., and Kakinuma, K. (1995) Electron Spin Resonance Studies on Neutrophil Cytochrome *b*₅₅₈. *J. Biol. Chem.* **270**, 12685–12689
231. Doussi re, 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
232. 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 Amphiphil. *J. Biochem. (Tokyo).* **126**, 708–714
233. Sbarra, A. J., and Karnovsky, M. L. (1959) The Biochemical Basis of Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **234**, 1355–1362

234. Morel, F., Doussiere, J., and Vignais, P. V. (1991) The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur. J. Biochem.* **201**, 523–546
235. Marcoux, J., Man, P., Castellan, M., Vivès, 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
236. Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D., and Sumimoto, H. (2003) Phosphorylation of p47^{phox} directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4474–4479
237. Belambri, S. A., Rolas, L., Raad, H., Hurtado-Nedelec, M., Dang, P. M.-C., and El-Benna, J. (2018) NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *Eur. J. Clin. Invest.* 10.1111/eci.12951
238. El-Benna, J., Dang, P. M.-C., Gougerot-Pocidalò, M.-A., Marie, J.-C., and Braut-Boucher, F. (2009) p47^{phox}, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp. Mol. Med.* **41**, 217–225
239. Pick, E. (2014) Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: Outsourcing a key task. *Small GTPases.* **5**, e27952
240. Bokoch, G. M. (2002) Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood.* **100**, 2692–2695
241. Dang, P. M.-C., Cross, A. R., Quinn, M. T., and Babior, B. M. (2002) Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: A direct interaction between p67^{PHOX} and cytochrome *b*₅₅₈ II. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 4262–4265
242. Dang, P. M.-C., Cross, A. R., and Babior, B. M. (2001) Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: A direct interaction between p67^{PHOX} and cytochrome *b*₅₅₈. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 3001–3005
243. Yuzawa, S., Miyano, K., Honbou, K., Inagaki, F., and Sumimoto, H. (2009) The Domain Organization of p67^{phox}, a Protein Required for Activation of the Superoxide-Producing NADPH Oxidase in Phagocytes. *J. Innate Immun.* **1**, 543–555
244. Maehara, Y., Miyano, K., Yuzawa, S., Akimoto, R., Takeya, R., and Sumimoto, H. (2010) A Conserved Region between the TPR and Activation Domains of p67^{phox} Participates in Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase. *J. Biol. Chem.* **285**, 31435–31445
245. 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
246. Han, C.-H., Freeman, J. L. R., Lee, T., Motalebi, S. A., and Lambeth, J. D. (1998) Regulation of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. *J. Biol. Chem.* **273**, 16663–16668
247. Raad, H., Paclat, M.-H., Boussetta, T., Kroviarski, Y., Morel, F., Quinn, M. T., Gougerot-Pocidalò, M.-A., Dang, P. M.-C., and El-Benna, J. (2009) Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91^{phox}/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67^{phox}, and p47^{phox}. *FASEB J.* **23**, 1011–1022
248. Beaumel, S., Picciocchi, A., Debeurme, F., Vivès, C., Hesse, A.-M., Ferro, M., Grunwald, D., Stieglitz, H., Thepchatry, P., Smith, S. M. E., Fieschi, F., and Stasia, M. J. (2017) Down-regulation of NOX2 activity in phagocytes mediated by ATM-kinase dependent phosphorylation. *Free Radic. Biol. Med.* **113**, 1–15
249. Suh, C.-I., Stull, N. D., Li, X. J., Tian, W., Price, M. O., Grinstein, S., Yaffe, M. B., Atkinson, S., and Dinauer, M. C. (2006) The phosphoinositide-binding protein p40^{phox} activates the NADPH oxidase during FcγIIA receptor-induced phagocytosis. *J. Exp. Med.* **203**, 1915–1925

250. Leusen, J. H. W., Fluiter, K., Hilarius, P. M., Roos, D., Verhoeven, A. J., and Bolscher, B. G. J. M. (1995) Interactions between the Cytosolic Components p47^{phox} and p67^{phox} of the Human Neutrophil NADPH Oxidase That Are Not Required for Activation in the Cell-free System. *J. Biol. Chem.* **270**, 11216–11221
251. Massenet, C., Chenavas, S., Cohen-Addad, C., Dagher, M.-C., Brandolin, G., Pebay-Peyroula, E., and Fieschi, F. (2005) Effects of p47^{phox} C Terminus Phosphorylations on Binding Interactions with p40^{phox} and p67^{phox}. *J. Biol. Chem.* **280**, 13752–13761
252. Fuchs, A., Dagher, M.-C., Faure, J., and Vignais, P. V. (1996) Topological organization of the cytosolic activating complex of the superoxide-generating NADPH-oxidase. Pinpointing the sites of interaction between p47^{phox}, p67^{phox} and p40^{phox} using the two-hybrid system. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1312**, 39–47
253. Tamura, M., Shiozaki, I., Ono, S., Miyano, K., Kunihiro, S., and Sasaki, T. (2007) p40^{phox} as an alternative organizer to p47^{phox} in Nox2 activation: A new mechanism involving an interaction with p22^{phox}. *FEBS Lett.* **581**, 4533–4538
254. Swain, S. D., Helgerson, S. L., Davis, A. R., Nelson, L. K., and Quinn, M. T. (1997) Analysis of Activation-induced Conformational Changes in p47^{phox} Using Tryptophan Fluorescence Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **272**, 29502–29510
255. Park, J.-W., and Babior, B. M. Activation of the Leukocyte NADPH Oxidase Subunit p47^{phox} by Protein Kinase C. A Phosphorylation-Dependent Change in the Conformation of the C-Terminal End of p47^{phox}
256. 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 p47^{phox} and p67^{phox}, Both in C Terminally Truncated Forms. *J. Biol. Chem.* **273**, 4232–4236
257. 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.* **91**, 10650–10654
258. 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. *J. Biol. Chem.* **271**, 22152–22158
259. 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.* **91**, 5345–5349
260. Shiose, A., and Sumimoto, H. (2000) Arachidonic Acid and Phosphorylation Synergistically Induce a Conformational Change of p47^{phox} to Activate the Phagocyte NADPH Oxidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 13793–13801
261. Park, H.-S., and Park, J.-W. (1998) Fluorescent Labeling of the Leukocyte NADPH Oxidase Subunit p47^{phox}: Evidence for Amphiphile-Induced Conformational Changes. *Arch. Biochem. Biophys.* **360**, 165–172
262. Zhan, Y., Virbasius, J. V., Song, X., Pomerleau, D. P., and Zhou, G. W. (2002) The p40^{phox} and p47^{phox} PX Domains of NADPH Oxidase Target Cell Membranes via Direct and Indirect Recruitment by Phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* **277**, 4512–4518
263. Kanai, F., Liu, H., Field, S. J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G. E., Cantley, C., and Yaffe, M. B. (2001) The PX domains of p47^{phox} and p40^{phox} bind to lipid products of
264. Brown, G. E., Stewart, M. Q., Liu, H., Ha, V.-L., and Yaffe, M. B. (2003) A Novel Assay System Implicates PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3)P, and PKC δ in Intracellular Production of Reactive Oxygen Species by the NADPH Oxidase. *Mol. Cell.* **11**, 35–47

265. Stampoulis, P., Ueda, T., Matsumoto, M., Terasawa, H., Miyano, K., Sumimoto, H., and Shimada, I. (2012) Atypical Membrane-embedded Phosphatidylinositol 3,4-Bisphosphate (PI(3,4)P₂)-binding Site on p47^{phox} Phox Homology (PX) Domain Revealed by NMR. *J. Biol. Chem.* **287**, 17848–17859
266. Ellson, C. D., Gobert-Gosse, S., Anderson, K. E., Davidson, K., and Erdjument-, H. (2001) PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40phox. *Nat. Cell Biol.* **3**, 679–682
267. Bissonnette, S. A., Glazier, C. M., Stewart, M. Q., Brown, G. E., Ellson, C. D., and Yaffe, M. B. (2008) Phosphatidylinositol 3-Phosphate-dependent and -independent Functions of p40^{phox} in Activation of the Neutrophil NADPH Oxidase. *J. Biol. Chem.* **283**, 2108–2119
268. Bravo, J., Karathanassis, D., Pacold, C. M., Pacold, M. E., Ellson, C. D., Anderson, K. E., Butler, P. J. G., Lavenir, I., Perisic, O., Hawkins, P. T., Stephens, L., and Williams, R. L. (2001) The Crystal Structure of the PX Domain from p40phox Bound to Phosphatidylinositol 3-Phosphate. *Mol. Cell.* **8**, 829–839
269. Shao, D., Segal, A. W., and Dekker, L. V. (2010) Subcellular localisation of the p40phox component of NADPH oxidase involves direct interactions between the Phox homology domain and F-actin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1736–1743
270. Wientjes, F. B., Reeves, E. P., Soskic, V., Furthmayr, H., and Segal, A. W. (2001) The NADPH Oxidase Components p47phox and p40phox Bind to Moesin through Their PX Domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 382–388
271. Dusi, S., Donini, M., and Rossi, F. (1996) Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox. *Biochem. J.* **314**, 409–412
272. Li, X. J., Marchal, C. C., Stull, N. D., Stahelin, R. V., and Dinauer, M. C. (2010) p47^{phox} Phox Homology Domain Regulates Plasma Membrane but Not Phagosome Neutrophil NADPH Oxidase Activation. *J. Biol. Chem.* **285**, 35169–35179
273. Heyworth, P. G., Curnutte, J. T., Nauseef, W. M., Volpp, B. D., Pearson, D. W., Rosen, H., and Clark, R. A. (1991) Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. *J. Clin. Invest.* **87**, 352–356
274. Durand, D., Cannella, D., Dubosclard, V., Pebay-Peyroula, E., Vachette, P., and Fieschi, F. (2006) Small-Angle X-ray Scattering Reveals an Extended Organization for the Autoinhibitory Resting State of the p47^{phox} Modular Protein. *Biochemistry.* **45**, 7185–7193
275. 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
276. Yuzawa, S., Ogura, K., Horiuchi, M., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Kataoka, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2004) Solution Structure of the Tandem Src Homology 3 Domains of p47^{phox} in an Autoinhibited Form. *J. Biol. Chem.* **279**, 29752–29760
277. Meijles, D. N., Fan, L. M., Howlin, B. J., and Li, J.-M. (2014) Molecular Insights of p47^{phox} Phosphorylation Dynamics in the Regulation of NADPH Oxidase Activation and Superoxide Production. *J. Biol. Chem.* **289**, 22759–22770
278. Groemping, Y., and Rittinger, K. (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J.* **386**, 401–416
279. Autore, F., Pagano, B., Fornili, A., Rittinger, K., and Fraternali, F. (2010) In Silico Phosphorylation of the Autoinhibited Form of p47^{phox}: Insights into the Mechanism of Activation. *Biophys. J.* **99**, 3716–3725

280. 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
281. Lapouge, K., Smith, S. J. M., Walker, P. A., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., and Rittinger, K. Structure of the TPR Domain of p67^{phox} in Complex with Rac·GTP. *Mol. Cell*
282. 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
283. Tao, W., Filippi, M.-D., Bailey, J. R., Atkinson, S. J., Connors, B., Evan, A., and Williams, D. A. (2002) The TRQKRP motif located near the C-terminus of Rac2 is essential for Rac2 biologic functions and intracellular localization. **100**, 11
284. van Hennik, P. B., Klooster, J. P. ten, Halstead, J. R., Voermans, C., Anthony, E. C., Divecha, N., and Hordijk, P. L. (2003) The C-terminal Domain of Rac1 Contains Two Motifs That Control Targeting and Signaling Specificity. *J. Biol. Chem.* **278**, 39166–39175
285. Molnár, G., Dagher, M.-C., Geiszt, M., Settleman, J., and Ligeti, E. (2001) Role of Prenylation in the Interaction of Rho-Family Small GTPases with GTPase Activating Proteins †. *Biochemistry.* **40**, 10542–10549
286. Gorzalczany, Y., Sigal, N., Itan, M., Lotan, O., and Pick, E. (2000) Targeting of Rac1 to the Phagocyte Membrane Is Sufficient for the Induction of NADPH Oxidase Assembly. *J. Biol. Chem.* **275**, 40073–40081
287. Di-Poi, N., Fauré, J., Grizot, S., Molnár, G., Pick, E., and Dagher, M.-C. (2001) Mechanism of NADPH Oxidase Activation by the Rac/Rho-GDI Complex †. *Biochemistry.* **40**, 10014–10022
288. Lanning, C. C., Daddona, J. L., Ruiz-Velasco, R., Shafer, S. H., and Williams, C. L. (2004) The Rac1 C-terminal Polybasic Region Regulates the Nuclear Localization and Protein Degradation of Rac1. *J. Biol. Chem.* **279**, 44197–44210
289. Kao, Y.-Y., Gianni, D., Bohl, B., Taylor, R. M., and Bokoch, G. M. (2008) Identification of a Conserved Rac-binding Site on NADPH Oxidases Supports a Direct GTPase Regulatory Mechanism. *J. Biol. Chem.* **283**, 12736–12746
290. Diebold, B. A., Fowler, B., Lu, J., Dinauer, M. C., and Bokoch, G. M. (2004) Antagonistic Cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases Regulates Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Biol. Chem.* **279**, 28136–28142
291. Diebold, B. A., and Bokoch, G. M. (2001) Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat. Immunol.* **2**, 211–215
292. Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V., and Kokotos, G. (2011) Phospholipase A₂ Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem. Rev.* **111**, 6130–6185
293. Walsh, C. E., Waite, B. M., Thomas, M. J., and DeChatelet, L. R. (1981) Release and Metabolism of Arachidonic Acid in Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **256**, 7228–7234
294. Parker, C. W., Kelly, J. P., and Falkenhein, S. F. (1979) Release of arachidonic acid from human lymphocytes in response to mitogenic lectins. *J. Exp. Med.* **149**, 1487–1503
295. Walsh, C. E., Dechatelet, L. R., Chilton, F. H., Wykle, R. L., and Waite, M. (1983) Mechanism of arachidonic acid release in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **750**, 32–40
296. van Rossum, D. B., and Patterson, R. L. (2009) PKC and PLA₂: Probing the complexities of the calcium network. *Cell Calcium.* **45**, 535–545

297. Yonker, L. M., Pazos, M. A., Lanter, B. B., Mou, H., Chu, K. K., Eaton, A. D., Bonventre, J. V., Tearney, G. J., Rajagopal, J., and Hurley, B. P. (2017) Neutrophil-Derived Cytosolic PLA2 α Contributes to Bacterial-Induced Neutrophil Transepithelial Migration. *J. Immunol.* **199**, 1–12
298. Vázquez-Medina, J. P., Dodia, C., Weng, L., Mesaros, C., Blair, I. A., Feinstein, S. I., Chatterjee, S., and Fisher, A. B. (2016) The phospholipase A₂ activity of peroxiredoxin 6 modulates NADPH oxidase 2 activation *via* lysophosphatidic acid receptor signaling in the pulmonary endothelium and alveolar macrophages. *FASEB J.* **30**, 2885–2898
299. Maridonneau-Parini, I., and Tauber, A. I. (1986) Activation of nadph-oxidase by arachidonic acid involves phospholipase A₂ in intact human neutrophils but not in the cell-free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**, 1099–1105
300. 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
301. Zhao, X., Bey, E. A., Wientjes, F. B., and Cathcart, M. K. (2002) Cytosolic Phospholipase A₂ (cPLA₂) Regulation of Human Monocyte NADPH Oxidase Activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 25385–25392
302. Krishnaiah, S. Y., Dodia, C., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2013) p67phox terminates the phospholipase A₂-derived signal for activation of NADPH oxidase (NOX2). *FASEB J.* **27**, 2066–2073
303. Lindsay, M. A., and Giembycz, M. A. (1997) Signal transduction and activation of the NADPH oxidase in eosinophils. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **92**, 115–123
304. 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 - α Is Necessary for Platelet-activating Factor Biosynthesis, Efficient Neutrophil-mediated Bacterial Killing, and the Innate Immune Response to Pulmonary Infection. *J. Biol. Chem.* **280**, 7519–7529
305. Wooten, R. E., Willingham, M. C., Daniel, L. W., Leslie, C. C., Rogers, L. C., Sergeant, S., and O’Flaherty, J. T. (2008) Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A₂ α fluorescent proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**, 1544–1550
306. Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T., and Yamamoto, K. (2011) Recent progress in phospholipase A₂ research: From cells to animals to humans. *Prog. Lipid Res.* **50**, 152–192
307. Hinkovska-Galcheva, V., and Shayman, J. A. (2010) Ceramide-1-Phosphate in Phagocytosis and Calcium Homeostasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **688**, 131–140
308. Shmelzer, Z., Karter, M., Eisenstein, M., Leto, T. L., Hadad, N., Ben-Menahem, D., Gitler, D., Banani, S., Wolach, B., Rotem, M., and Levy, R. (2008) Cytosolic Phospholipase A₂ α Is Targeted to the p47^{phox}-PX Domain of the Assembled NADPH Oxidase via a Novel Binding Site in Its C2 Domain. *J. Biol. Chem.* **283**, 31898–31908
309. Newton, A. C. (1995) Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation. *J. Biol. Chem.* **270**, 28495–28498
310. Newton, A. C. (2001) Protein Kinase C: Structural and Spatial Regulation by Phosphorylation, Cofactors, and Macromolecular Interactions. *Chem. Rev.* **101**, 2353–2364
311. O’Flaherty, J. T., Chadwell, B. A., Kearns, M. W., Sergeant, S., and Daniel, L. W. (2001) Protein Kinases C Translocation Responses to Low Concentrations of Arachidonic Acid. *J. Biol. Chem.* **276**, 24743–24750
312. Huang, X. P., Pi, Y., Lokuta, A. J., Greaser, M. L., and Walker, J. W. (1997) Arachidonic acid stimulates protein kinase C- ϵ redistribution in heart cells. *J. Cell Sci.* **110**, 1625–1634

313. Farooqui, A. A., and Horrocks, L. A. (2006) Phospholipase A₂-Generated Lipid Mediators in the Brain: The Good, the Bad, and the Ugly. *The Neuroscientist*. **12**, 245–260
314. Farooqui, A. A., and Horrocks, L. A. (2004) Brain phospholipases A₂: a perspective on the history. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. **71**, 161–169
315. Corda, D., Iurisci, C., and Berrie, C. P. (2002) Biological activities and metabolism of the lysophosphoinositides and glycerophosphoinositols. *Biochim. Biophys. Acta*. **1582**, 52–69
316. Selvy, P. E., Lavieri, R. R., Lindsley, C. W., and Brown, H. A. (2011) Phospholipase D: Enzymology, Functionality, and Chemical Modulation. *Chem. Rev.* **111**, 6064–6119
317. Scott, S. A., Xiang, Y., Mathews, T. P., Cho, H. P., Myers, D. S., Armstrong, M. D., Tallman, K. A., O'Reilly, M. C., Lindsley, C. W., and Brown, H. A. (2013) Regulation of Phospholipase D Activity and Phosphatidic Acid Production after Purinergic (P2Y₆) Receptor Stimulation. *J. Biol. Chem.* **288**, 20477–20487
318. Singer, W. D., Brown, H. A., Jiang, X., and Sternweis, P. C. (1996) Regulation of Phospholipase D by Protein Kinase C Is Synergistic with ADP-ribosylation Factor and Independent of Protein Kinase Activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 4504–4510
319. Gomez-Cambronero, J. (2014) Phospholipase D in Cell Signaling: From a Myriad of Cell Functions to Cancer Growth and Metastasis. *J. Biol. Chem.* **289**, 22557–22566
320. Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (1999) Ang II-Stimulated Superoxide Production Is Mediated via Phospholipase D in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension*. **34**, 976–982
321. Regier, D. S., Greene, D. G., Sergeant, S., Jesaitis, A. J., and McPhail, L. C. (2000) Phosphorylation of p22^{phox} Is Mediated by Phospholipase D-dependent and -independent Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **275**, 28406–28412
322. Mahankali, M., Peng, H.-J., Henkels, K. M., Dinauer, M. C., and Gomez-Cambronero, J. (2011) Phospholipase D2 (PLD2) is a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for the GTPase Rac2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 19617–19622
323. Kadamur, G., and Ross, E. M. (2013) Mammalian Phospholipase C. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 127–154
324. Palicz, A., Foubert, T. R., Jesaitis, A. J., Marodi, L., and McPhail, L. C. (2001) Phosphatidic Acid and Diacylglycerol Directly Activate NADPH Oxidase by Interacting with Enzyme Components. *J. Biol. Chem.* **276**, 3090–3097
325. Qualliotine-Mann, D., Agwu, D. E., Ellenburg, M. D., McCall, C. E., and McPhail, L. C. (1993) Phosphatidic Acid and Diacylglycerol Synergize in a Cell-free System for Activation of NADPH Oxidase from Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **268**, 23843–23849
326. Erickson, R. W., Langel-Peveri, P., Traynor-Kaplan, A. E., Heyworth, P. G., and Curnutte, J. T. (1999) Activation of Human Neutrophil NADPH Oxidase by Phosphatidic Acid or Diacylglycerol in a Cell-free System. *J. Biol. Chem.* **274**, 22243–22250
327. Burnham, D. N., Tyagi, S. R., Uhlinger, D. J., and Lambeth, J. D. (1989) Diacylglycerol generation and phosphoinositide turnover in human neutrophils: Effects of particulate versus soluble stimuli. *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 345–353
328. Goñi, F. M., and Alonso, A. (1999) Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes. *Prog. Lipid Res.* **38**, 1–48
329. Dang, P. M.-C., Raad, H., Derkawi, R. A., Boussetta, T., Paclet, M.-H., Belambri, S. A., Makni-Maalej, K., Kroviarski, Y., Morel, F., Gougerot-Pocidallo, M.-A., and El-Benna, J. (2011) The NADPH oxidase cytosolic component p67^{phox} is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochem. Pharmacol.* **82**, 1145–1152

330. Dang, P. M.-C., Morel, F., Gougerot-Pocidalò, M.-A., and Benna, J. E. (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
331. Benna, J. E., Dang, P. M.-C., Gaudry, M., Fay, M., Morel, F., Hakim, J., and Gougerot-Pocidalò, M.-A. (1997) Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Subunit p67^{phox} during Human Neutrophil Activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 17204–17208
332. Paine, E., Palmantier, R., Akiyama, S. K., Olden, K., and Roberts, J. D. (2000) Arachidonic Acid Activates Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase-activated Protein Kinase 2 and Mediates Adhesion of a Human Breast Carcinoma Cell Line to Collagen Type IV through a p38 MAP Kinase-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 11284–11290
333. Gong, M. C., Fuglsang, A., Alessi, D., Kobayashi, S., Cohen, P., Somlyo, A. V., and Somlyo, A. P. (1992) Arachidonic Acid Inhibits Myosin Light Chain Phosphatase and Sensitizes Smooth Muscle to Calcium. *J. Biol. Chem.* **267**, 21492–21498
334. Belambri, S. A., Hurtado-Nedelec, M., Senator, A., Makni--Maalej, K., Fay, M., Gougerot-Pocidalò, M.-A., Marie, J.-C., My-Chan Dang, P., and El-Benna, J. (2012) Phosphorylation of p47^{phox} is required for receptor-mediated NADPH oxidase/NOX2 activation in Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *Am. J. Blood Res.* **2**, 187–193
335. Dewas, C., Fay, M., Gougerot-Pocidalò, M.-A., and El-Benna, J. (2000) The Mitogen-Activated Protein Kinase Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway Is Involved in formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-Induced p47^{phox} Phosphorylation in Human Neutrophils. *J. Immunol.* **165**, 5238–5244
336. Dang, P. M.-C., Stensballe, A., Boussetta, T., Raad, H., Dewas, C., Kroviarski, Y., Hayem, G., Jensen, O. N., Gougerot-Pocidalò, M.-A., and El-Benna, J. (2006) A specific p47^{phox}-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* **116**, 2033–2043
337. Hoyal, C. R., Gutierrez, A., Young, B. M., Catz, S. D., Lin, J.-H., Tschlis, P. N., and Babior, B. M. (2003) Modulation of p47^{PHOX} activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 5130–5135
338. Bey, E. A., Xu, B., Bhattacharjee, A., Oldfield, C. M., Zhao, X., Li, Q., Subbulakshmi, V., Feldman, G. M., Wientjes, F. B., and Cathcart, M. K. (2004) Protein Kinase C δ Is Required for p47^{phox} Phosphorylation and Translocation in Activated Human Monocytes. *J. Immunol.* **173**, 5730–5738
339. El Benna, J., Hayem, G., Dang, P. M.-C., Fay, M., Chollet-Martin, S., Elbim, C., Meyer, O., and Gougerot-Pocidalò, M.-A. (2002) NADPH Oxidase Priming and p47^{phox} Phosphorylation in Neutrophils from Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis and Spondylarthropathy. *Inflammation*. **26**, 273–278
340. Lopes, L. R., Dagher, M.-C., Gutierrez, A., Young, B., Bouin, A.-P., Fuchs, A., and Babior, B. M. (2004) Phosphorylated p40^{PHOX} as a Negative Regulator of NADPH Oxidase. *Biochemistry*. **43**, 3723–3730
341. Grandvaux, N., Elsen, S., and Vignais, P. V. (2001) Oxidant-Dependent Phosphorylation of p40^{phox} in B Lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 1009–1016
342. Chessa, T. A. M., Anderson, K. E., Hu, Y., Xu, Q., Rausch, O., Stephens, L. R., and Hawkins, P. T. (2010) Phosphorylation of threonine 154 in p40^{phox} is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Blood*. **116**, 6027–6036
343. 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. *J. Biol. Chem.* **273**, 30097–30103
344. Rastogi, R., Geng, X., Li, F., and Ding, Y. (2017) NOX Activation by Subunit Interaction and Underlying Mechanisms in Disease. *Front. Cell. Neurosci.* **10**, 1–13

345. Neufeld, E. J., and Majerus, P. W. (1983) Arachidonate Release and Phosphatidic Acid Turnover in Stimulated Human Platelets. *J. Biol. Chem.* **258**, 2461–2467
346. Bills, T. K., Smith, J. B., and Silver, M. J. (1977) Selective release of arachidonic acid from the phospholipids of human platelets in response to thrombin. *J. Clin. Invest.* **60**, 1–6
347. Cao, Y., Pearman, A. T., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M. (2000) Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 11280–11285
348. Marcus, A. J., Ullman, H. L., and Safier, L. B. (1969) Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *J. Lipid Res.* **10**, 108–114
349. Cohen, P., and Derksen, A. (1969) Comparison of Phospholipid and Fatty Acid Composition of Human Erythrocytes and Platelets. *Br. J. Haematol.* **17**, 359–371
350. Nunes, P., Demaurex, N., and Dinauer, M. C. (2013) Regulation Of The NADPH Oxidase And Associated Ion Fluxes During Phagocytosis. *Traffic.* **14**, 1118–1131
351. Green, T. R., and Shangguan, X. (1993) Stoichiometry of O₂ Metabolism and NADPH Oxidation of the Cell-free Latent Oxidase Reconstituted from Cytosol and Solubilized Membrane from Resting Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **268**, 857–861
352. 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
353. Patriarca, P., Cramer, R., Moncalvo, S., Rossi, F., and Romeo, D. (1971) Enzymatic Basis of Metabolic Stimulation in Leucocytes During Phagocytosis: The Role of Activated NADPH Oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **145**, 255–262
354. Curnutte, J. T., Kipnes, R. S., and Babior, B. M. (1975) Defect in pyridine nucleotide dependent superoxide production by a particulate fraction from the granulocytes of patients with chronic granulomatous disease. *N. Engl. J. Med.* **293**, 628–632
355. Green, T. R., and Wu, D. E. (1986) The NADPH:O₂ Oxidoreductase of Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **261**, 6010–6015
356. Iverson, D., DeChatelet, L. R., Spitznagel, J. K., and Wang, P. (1977) Comparison of NADH and NADPH oxidase activities in granules isolated from human polymorphonuclear leukocytes with a fluorometric assay. *J. Clin. Invest.* **59**, 282–290
357. Babior, G. L., Rosin, R. E., McMurrich, J., Peters, W. A., and Babior, B. M. (1981) Arrangement of the respiratory burst oxidase in the plasma membrane of the neutrophil. *J. Clin. Invest.* **67**, 1724–1728
358. 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
359. Chibber, R., and Castle, A. G. (1983) Subcellular fractionation of porcine neutrophils by nitrogen cavitation and sucrose-density-gradient centrifugation. *Eur. J. Biochem.* **136**, 383–389
360. Klempner, M. S. (1980) Neutrophil plasma membranes. I. High-yield purification of human neutrophil plasma membrane vesicles by nitrogen cavitation and differential centrifugation. *J. Cell Biol.* **86**, 21–28
361. Sengeløv, H., Nielsen, M. H., and Borregaard, N. (1992) Separation of Human Neutrophil Plasma Membrane from Intracellular Vesicles Containing Alkaline Phosphatase and NADPH Oxidase Activity by Free Flow Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **267**, 14912–14917

362. Holtz, R. B., Stewart, P. S., Patton, S., and Schisler, L. C. (1972) Isolation and Characterization of Membranes from the Cultivated Mushroom. *PLANT Physiol.* **50**, 541–546
363. Dagher, M., and Pick, E. (2007) Opening the black box: Lessons from cell-free systems on the phagocyte NADPH-oxidase. *Biochimie.* **89**, 1123–1132
364. 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**, 251–255
365. Butler, J., Koppenol, W. H., and Margoliash, E. (1982) Kinetics and Mechanism of the Reduction of Ferricytochrome *c* by the Superoxide Anion. *J. Biol. Chem.* **254**, 10747–10750
366. Koppenol, W. H., Van Buuren, K. J. H., Butler, J., and Braams, R. (1976) The kinetics of the reduction of cytochrome *c* by the superoxide anion radical. *Biochim. Biophys. Acta.* **449**, 157–168
367. Butler, J., Jayson, G. G., and Swallow, A. J. (1975) The reaction between the superoxide anion radical and cytochrome *c*. *Biochim. Biophys. Acta.* **408**, 215–222
368. Bielski, B. H. J., Cabelli, D. E., Arudi, R. L., and Ross, A. B. (1985) Reactivity of HO₂/O₂⁻ Radicals in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* **14**, 1041–1100
369. Bielski, B. H. J., and Allen, A. O. (1977) Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals. *J. Phys. Chem.* **81**, 1048–1050
370. Seifert, R., and Schultz, G. (1987) Fatty-acid-induced activation of NADPH oxidase in plasma membranes of human neutrophils depends on neutrophil cytosol and is potentiated by stable guanine nucleotides. *Eur. J. Biochem.* **162**, 563–569
371. Spencer, M. S. (1967) Chemistry of Sodium Dithionite. *Trans. Faraday Soc.* **63**, 2510–2515
372. Selwyn, L., and Tse, S. (2008) The chemistry of sodium dithionite and its use in conservation. *Stud. Conserv.* **53**, 61–73
373. Rinker, R. G., Lynn, S., Mason, D. M., and Corcoran, W. H. (1965) Kinetics and Mechanism of Thermal Decomposition of Sodium Dithionite in Aqueous Solution. *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **4**, 282–288
374. Lister, M. W., and Garvie, R. C. (1959) Sodium Dithionite, Decomposition in Aqueous Solution and in the Solid State. *Can. J. Chem.* **37**, 1567–1574
375. Burlamacchi, L., Guarini, G., and Tiezzi, E. (1969) Mechanism of decomposition of sodium dithionite in aqueous solution. *Trans. Faraday Soc.* **65**, 496–502
376. Alvarez-Paggi, D., Hannibal, L., Castro, M. A., Oviedo-Rouco, S., Demicheli, V., Tórtora, V., Tomasina, F., Radi, R., and Murgida, D. H. (2017) Multifunctional Cytochrome *c*: Learning New Tricks from an Old Dog. *Chem. Rev.* **117**, 13382–13460
377. Kang, X., and Carey, J. (1999) Role of Heme in Structural Organization of Cytochrome *c* Probed by Semisynthesis. *Biochemistry.* **38**, 15944–15951
378. Moore, G. R., Huang, Z.-X., Eley, C. G. S., Barker, H. A., Williams, G., Robinson, M. N., Williams, R., and Williams, R. J. P. (1982) Electron Transfer in Biology. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **74**, 311–329
379. Feinberg, B. A., Ryan, M. D., and Wei, J.-F. (1977) Comparative Kinetic-Ionic Strength Study of Two Differently Charged Cytochrome *c*: Effects are Limited to Overall Charge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**, 769–775

380. Wood, P. M. (1987) The Two Redox Potentials for Oxygen Reduction to Superoxide Anion. *TIBS*. **12**, 250–251
381. Rao, P. S., and Hayon, E. (1975) Redox potentials of free radicals. IV. Superoxide and hydroperoxy radicals O_2^- and HO_2 . *J. Phys. Chem.* **79**, 397–402
382. Taniguchi, V. T., Sailasuta-Scott, N., Anson, F. C., and Gray, H. B. (1980) Thermodynamics of metalloprotein electron transfer reactions. *Pure Appl. Chem.* **52**, 2275–2281
383. Margalit, R., and Schejter, A. (1970) Thermodynamics of the redox reaction of cytochromes *c* of five different species. *FEBS Lett.* **6**, 278–280
384. Margalit, R., and Schejter, A. (1973) Cytochrome *c*: A Thermodynamic Study of the Relationships among Oxidation State, Ion-Binding and Structural Parameters. 1. The Effects of Temperature, pH and Electrostatic Media on the Standard Redox Potential of Cytochrome *c*. *Eur. J. Biochem.* **32**, 492–499
385. Sivakolundu, S. G., and Mabrouk, P. A. (2000) Cytochrome *c* Structure and Redox Function in Mixed Solvents Are Determined by the Dielectric Constant. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1513–1521
386. Wardman, P. (1989) Reduction Potentials of One-Electron Couples Involving Free Radicals in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* **18**, 1637–1755
387. Schacter, L. P. (1985) Measurement of free radical oxygen generation by cytochrome *c* reduction requirement for cytochrome *c* oxidase blockade. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**, 354–357
388. Bielski, B. H. J. (1978) Reevaluation of the spectral and kinetic properties of HO_2 and O_2^- free radicals. *Photochem. Photobiol.* **28**, 645–649
389. Van Gelder, B. F., and Slater, E. C. (1962) The extinction coefficient of cytochrome *c*. *Biochim. Biophys. Acta.* **58**, 593–595
390. Horecker, B. L., and Kornberg, A. (1948) The Extinction Coefficients of the Reduced Band of Pyridine Nucleotides. *J. Biol. Chem.* **175**, 385–390
391. Ziegenhorn, J., Senn, M., and Bücher, T. (1976) Molar Absorptivities of β -NADH and β -NADPH. *Clin. Chem.* **22**, 151–160
392. Wu, J. T., Wu, L. H., and Knight, J. A. (1986) Stability of NADPH: Effect of Various Factors on the Kinetics of Degradation. *Clin. Chem.* **32**, 314–319
393. Kaplan, A. E., Weiss, E. R., Byrne, S. T., El-Torkey, N. M., and Margolis, S. A. (1981) Purified reduced nicotinamide adenine dinucleotide: responses to lactate dehydrogenase isozymes from three cell sources. *Science.* **212**, 553–555
394. Smith, A. C., and Hahn, C. E. W. (1969) Electrodes for the Measurement of Oxygen and Carbon Dioxide Tensions. *Br. J. Anaesth.* **41**, 731–741
395. Falck, D. (1997) Amperometric Oxygen Electrodes. *Curr. Sep.* **14**, 19–22
396. Benson, B. B., and Krause, D. (1980) The concentration and isotopic fractionation of oxygen dissolved in freshwater and seawater in equilibrium with the atmosphere. 1. Oxygen. *Limnol. Oceanogr.* **25**, 662–671
397. Koppenol, W. H. (1987) Thermodynamics of reactions involving oxyradicals and hydrogen peroxide. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **18**, 3–11
398. Lefrançois, P. (2018) *Développement d'un microréacteur biomimétique pour l'analyse in situ d'activités enzymatiques par couplage de l'électrochimie et de la microscopie de fluorescence*. Doctorat thesis, Université de Bordeaux, Bordeaux

399. Floris, R., Kim, Y., Babcock, G. T., and Wever, R. (1994) Optical spectrum of myeloperoxidase. *Eur. J. Biochem.* **222**, 677–685
400. Souabni, H., Ezzine, A., Bizouarn, T., and Baciou, L. (2017) Functional Assembly of Soluble and Membrane Recombinant Proteins of Mammalian NADPH Oxidase Complex. in *Membrane Protein Structure and Function Characterization* (Lacapere, J.-J. ed), pp. 27–43, Springer New York, New York, NY, **1635**, 27–43
401. Babior, B. M. (1979) Superoxide production by phagocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 222–226
402. Sanders, C. R., and Mittendorf, K. F. (2011) Tolerance to Changes in Membrane Lipid Composition as a Selected Trait of Membrane Proteins. *Biochemistry.* **50**, 7858–7867
403. Ibarguren, M., López, D. J., and Escribá, P. V. (2014) The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1838**, 1518–1528
404. Khmelinskaia, A., Ibarguren, M., de Almeida, R. F. M., López, D. J., Paixão, V. A., Ahyayauch, H., Goñi, F. M., and Escribá, P. V. (2014) Changes in Membrane Organization upon Spontaneous Insertion of 2-Hydroxylated Unsaturated Fatty Acids in the Lipid Bilayer. *Langmuir.* **30**, 2117–2128
405. Ibarguren, M., López, D. J., Encinar, J. A., González-Ros, J. M., Busquets, X., and Escribá, P. V. (2013) Partitioning of liquid-ordered/liquid-disordered membrane microdomains induced by the fluidifying effect of 2-hydroxylated fatty acid derivatives. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1828**, 2553–2563
406. Wassall, S. R., and Stillwell, W. (2009) Polyunsaturated fatty acid–cholesterol interactions: Domain formation in membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1788**, 24–32
407. Hamilton, J. A. (2007) New insights into the roles of proteins and lipids in membrane transport of fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **77**, 355–361
408. Zhang, G., Yi, Y.-P., and Zhang, G.-J. (2006) Effects of Arachidonic Acid on the Lysosomal Ion Permeability and Osmotic Stability. *J. Bioenerg. Biomembr.* **38**, 75–82
409. Hamilton, J. A., and Kamp, F. (1999) How are free fatty acids transported in membranes? *Diabetes.* **48**, 2255–2269
410. Kamp, F., and Hamilton, J. A. (2006) How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **75**, 149–159
411. Los, D. A., and Murata, N. (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1666**, 142–157
412. Pike, L. J., Han, X., Chung, K.-N., and Gross, R. W. (2002) Lipid Rafts Are Enriched in Arachidonic Acid and Plasmenylethanolamine and Their Composition Is Independent of Caveolin-1 Expression: A Quantitative Electrospray Ionization/Mass Spectrometric Analysis. *Biochemistry.* **41**, 2075–2088
413. Glick, J., Santoyo, G., and Casey, P. J. (1996) Arachidonate and Related Unsaturated Fatty Acids Selectively Inactivate the Guanine Nucleotide-binding Regulatory Protein, G_z. *J. Biol. Chem.* **271**, 2949–2954
414. Chattopadhyay, A., and London, E. (1984) Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Anal. Biochem.* **139**, 408–412
415. Henriksen, J. R., Andresen, T. L., Feldborg, L. N., Duelund, L., and Ipsen, J. H. (2010) Understanding Detergent Effects on Lipid Membranes: A Model Study of Lysolipids. *Biophys. J.* **98**, 2199–2205
416. Heerklotz, H., and Seelig, J. (2000) Correlation of Membrane/Water Partition Coefficients of Detergents with the Critical Micelle Concentration. *Biophys. J.* **78**, 2435–2440

417. Stubbs, C. D., and Smith, A. D. (1984) The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta.* **779**, 89–137
418. le Maire, M., Champeil, P., and Møller, J. V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta.* **1508**, 86–111
419. Schimerlik, M. I. (1998) Overview of Membrane Protein Solubilization. *Curr. Protoc. Neurosci.* **2**, 5.9.1-5.9.5
420. Matono, R., Miyano, K., Kiyohara, T., and Sumimoto, H. (2014) Arachidonic Acid Induces Direct Interaction of the p67phox-Rac Complex with the Phagocyte Oxidase Nox2, Leading to Superoxide Production. *J. Biol. Chem.* **289**, 24874–24884
421. Umeki, S. (1990) Human Neutrophil Cytosolic Activation Factor of the NAPDH Oxidase. *J. Biol. Chem.* **265**, 5049–5054
422. Ralston, J. C., Zulyniak, M. A., Nielsen, D. E., Clarke, S., Badawi, A., El-Soheemy, A., Ma, D. W. L., and Mutch, D. M. (2013) Ethnic- and sex-specific associations between plasma fatty acids and markers of insulin resistance in healthy young adults. *Nutr. Metab.* **10**, 1–9
423. Quehenberger, O., Armando, A. M., Brown, A. H., Milne, S. B., Myers, D. S., Merrill, A. H., Bandyopadhyay, S., Jones, K. N., Kelly, S., Shaner, R. L., Sullards, C. M., Wang, E., Murphy, R. C., Barkley, R. M., Leiker, T. J., Raetz, C. R. H., Guan, Z., Laird, G. M., Six, D. A., Russell, D. W., McDonald, J. G., Subramaniam, S., Fahy, E., and Dennis, E. A. (2010) Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J. Lipid Res.* **51**, 3299–3305
424. Steffen, B. T., Steffen, L. M., Tracy, R., Siscovick, D., Jacobs, D., Liu, K., He, K., Hanson, N. Q., Nettleton, J. A., and Tsai, M. Y. (2012) Ethnicity, plasma phospholipid fatty acid composition and inflammatory/endothelial activation biomarkers in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Eur. J. Clin. Nutr.* **66**, 600–605
425. Gray, R. G., Kousta, E., McCarthy, M. I., Godsland, I. F., Venkatesan, S., Anyaoku, V., and Johnston, D. G. (2013) Ethnic variation in the activity of lipid desaturases and their relationships with cardiovascular risk factors in control women and an at-risk group with previous gestational diabetes mellitus: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis.* **12**, 1–9
426. Nicolson, G. L., and Ash, M. E. (2017) Membrane Lipid Replacement for chronic illnesses, aging and cancer using oral glycerolphospholipid formulations with fructooligosaccharides to restore phospholipid function in cellular membranes, organelles, cells and tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* **1859**, 1704–1724
427. Takahashi, M.-A., and Asada, K. (1983) Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **226**, 558–566
428. Mumbengegwi, D. R., Li, Q., Li, C., Bear, C. E., and Engelhardt, J. F. (2008) Evidence for a Superoxide Permeability Pathway in Endosomal Membranes. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3700–3712
429. Mao, G. D., and Poznansky, M. J. (1992) Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. *FEBS Lett.* **305**, 233–236
430. Erickson, R. W., Malawista, S. E., Garrett, M. C., Van Blaricom, G., Leto, T. L., and Curnutte, J. T. (1992) Identification of a thermolabile component of the human neutrophil NADPH oxidase. A model for chronic granulomatous disease caused by deficiency of the p67-phox cytosolic component. *J. Clin. Invest.* **89**, 1587–1595
431. El Benna, J., Faust, L. P., and Babior, B. M. (1994) The Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Component p47^{phox} during Neutrophil Activation. *J. Biol. Chem.* **269**, 23431–23436

432. Faust, L. R. P., El Benna, J., Babior, B. M., and Chanock, S. J. (1995) The phosphorylation targets of p47^{sup}-phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. *J. Clin. Invest.* **96**, 1499–1505
433. Uhlinger, D. J., and Perry, D. K. (1992) A carboxy-terminal peptide from p47-phox is a substrate for phosphorylation by protein kinase C and by a neutrophil protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 940–948
434. Benna, J. E., Faust, L. R. P., Johnson, J. L., and Babior, B. M. (1996) Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Subunit p47^{phox} as Determined by Two-dimensional Phosphopeptide Mapping. *J. Biol. Chem.* **271**, 6374–6378
435. El Benna, J., Han, J., Park, J.-W., Schmid, E., Ulevitch, R. J., and Babior, B. B. (1996) Activation of p38 in Stimulated Human Neutrophils: Phosphorylation of the Oxidase Component p47^{phox} by p38 and ERK but Not by JNK. *Arch. Biochem. Biophys.* **334**, 395–400
436. Rotrosen, D., and Leto, T. L. (1990) Phosphorylation of Neutrophil 47-kDa Cytosolic Oxidase Factor. *J. Biol. Chem.* **265**, 19910–19915
437. Okamura, N., Curnutte, J. T., Roberts, R. L., and Babior, B. M. (1988) Relationship of Protein Phosphorylation to the Activation of the Respiratory Burst in Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **263**, 6777–6782
438. Yamaguchi, M., Saeki, S., Yamane, H., Okamura, N., and Ishibashi, S. (1996) Involvement of Several Protein Kinases in the Phosphorylation of p47-phox. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 891–895
439. Yamaguchi, M., Saeki, S., Yamane, H., Okamura, N., and Ishibashi, S. (1995) Hyperphosphorylated p47-phox lost the ability to activate NADPH oxidase in guinea pig neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 203–208
440. El Benna, J., Park, J.-W., Ruedi, J. M., and Babior, B. M. (1995) Cell-Free Activation of the Respiratory Burst Oxidase by Protein Kinase C. *Blood Cells. Mol. Dis.* **21**, 201–206
441. Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition*, Third Edition, Springer, [online] <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.2904580> (Accessed April 25, 2018)
442. Bizouarn, T., Karimi, G., Masoud, R., Souabni, H., Machillot, P., Serfaty, X., Wien, F., Réfrégiers, M., Houée-Levin, C., and Baciou, L. (2016) Exploring the arachidonic acid-induced structural changes in phagocyte NADPH oxidase p47^{phox} and p67^{phox} via thiol accessibility and SRCD spectroscopy. *FEBS J.* **283**, 2896–2910
443. Masoud, R., Serfaty, X., Erard, M., Machillot, P., Karimi, G., Hudik, E., Wien, F., Baciou, L., Houée-Levin, C., and Bizouarn, T. (2017) Conversion of NOX2 into a constitutive enzyme *in vitro* and in living cells, after its binding with a chimera of the regulatory subunits. *Free Radic. Biol. Med.* **113**, 470–477
444. Bielski, B. H. J., Arudi, R. L., and Sutherland, M. W. (1983) A Study of the Reactivity of HO₂/O₂⁻ with Unsaturated Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* **258**, 4759–4761
445. Curnutte, J. T., Karnovsky, M. L., and Babior, B. M. (1976) Manganese-dependent NADPH oxidation by granulocyte particles. The role of superoxide and the nonphysiological nature of the manganese requirement. *J. Clin. Invest.* **57**, 1059–1067
446. Bielski, B. H. J., and Chan, P. C. (1974) Kinetic Study by Pulse Radiolysis of the Lactate Dehydrogenase-catalyzed Chain Oxidation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide by HO₂ and O₂⁻ Radicals. *J. Biol. Chem.* **250**, 318–321
447. Patriarca, P., Dri, P., Kakinuma, K., Tedesco, F., and Rossi, F. (1975) Studies on the mechanism of metabolic stimulation in polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis I. Evidence for superoxide anion involvement in the oxidation of NADPH. *Biochim. Biophys. Acta.* **385**, 380–386

448. Hohn, D. C., and Lehrer, R. I. (1975) NADPH oxidase deficiency in X-linked chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* **55**, 707–713
449. Radi, R., Turrens, J. F., and Freeman, B. A. (1991) Cytochrome *c*-catalyzed membrane lipid peroxidation by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 118–125
450. Kang, J. H. (2006) Lipid Peroxidation Induced by the Reaction of Cytochrome *c* with Hydrogen Peroxide. *Bull. Korean Chem. Soc.* **27**, 830–834
451. Richardson, D., Ponka, P., and Baker, E. (1994) The Effect of the Iron(III) Chelator, Desferrioxamine, on Iron and Transferrin Uptake by the Human Malignant Melanoma Cell. *Cancer Res.* **54**, 685–689
452. Tuominen, E. K. J., Wallace, C. J. A., and Kinnunen, P. K. J. (2002) Phospholipid-Cytochrome *c* Interaction. *J. Biol. Chem.* **277**, 8822–8826
453. Hardesty, B. A., and Mitchell, H. K. (1963) The Interaction of Fatty Acids with Mammalian Cytochrome *c*. *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 1–8
454. Nantes, I. L., Zucchi, M. R., Nascimento, O. R., and Faljoni-Alario, A. (2001) Effect of Heme Iron Valence State on the Conformation of Cytochrome *c* and Its Association with Membrane Interfaces. *J. Biol. Chem.* **276**, 153–158
455. Stewart, J. M., Blakely, J. A., and Johnson, M. D. (2000) The interaction of ferrocytochrome *c* with long-chain fatty acids and their CoA and carnitine esters. *Biochem. Cell Biol.* **78**, 675–681
456. Rytömaa, M., and Kinnunen, P. K. J. (1995) Reversibility of the Binding of Cytochrome *c* to Liposomes. *J. Biol. Chem.* **270**, 3197–3202
457. Rytömaa, M., Mustonen, P., and Kinnunen, P. K. J. (1992) Reversible, Nonionic, and pH-dependent Association of Cytochrome *c* with Cardiolipin-Phosphatidylcholine Liposomes. *J. Biol. Chem.* **267**, 22243–22248
458. Rytömaa, M., and Kinnunen, P. K. (1994) Evidence for Two Distinct Acidic Phospholipid-binding Sites in Cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* **269**, 1770–1774
459. Subramanian, M., Jutila, A., and Kinnunen, P. K. J. (1998) Binding and Dissociation of Cytochrome *c* to and from Membranes Containing Acidic Phospholipids. *Biochemistry.* **37**, 1394–1402
460. Shechter, E., Gulik-Krzywicki, T., Azerad, R., and Gros, C. (1971) Correlations between structure and spectroscopic properties in membrane model systems. *Biochim. Biophys. Acta.* **241**, 431–442
461. Kinnunen, P. K. J., Kõiv, A., Lehtonen, J. Y. A., Rytömaa, M., and Mustonen, P. (1994) Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membrane surfaces. *Chem. Phys. Lipids.* **73**, 181–207
462. Kinnunen, P. K. J. (1996) On the molecular-level mechanisms of peripheral protein-membrane interactions induced by lipids forming inverted non-lamellar phases. *Chem. Phys. Lipids.* **81**, 151–166
463. Vandewalle, P. L., and Petersen, N. O. (1987) Oxidation of reduced cytochrome *c* by hydrogen peroxide. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **210**, 195–198
464. Bernofsky, C., and Wanda, S.-Y. C. (1983) Reduction of cytochrome *c* by hydrogen peroxide and its inhibition by superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**, 231–238
465. Florence, T. M. (1985) The degradation of cytochrome *c* by hydrogen peroxide. *J. Inorg. Biochem.* **23**, 131–141
466. Turrens, J. F., and McCord, J. M. (1988) How relevant is the reoxidation of ferrocytochrome *c* by hydrogen peroxide when determining superoxide anion production? *FEBS Lett.* **227**, 43–46

467. Heijman, M. G. J., Nauta, H., and Levine, Y. K. (1982) The influence of a detergent on the reactivity of cytochrome *c* towards the superoxide radical as measured by pulse radiolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* **704**, 560–563
468. Johnson, K. A., and Goody, R. S. (2011) The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry.* **50**, 8264–8269
469. Henri, V. (1903) General Laws for the Action of Diastases
470. Cornish-Bowden, A., Jamin, M., and Saks, V. (2005) *Cinétique enzymatique*, EDP Sciences, [Les Ulis, France]
471. Bodenstein, M. (1927) Analyse der Zeitgesetze zusammengesetzter chemischer Reaktionen. *Ann. Phys.* **387**, 836–840
472. Barnsley, E. A. (1990) An operational definition of the steady state in enzyme kinetics. *Biochem. Educ.* **18**, 131–132
473. Briggs, G. E., and Haldane, J. B. S. (1925) A note on the Kinetics of Enzyme Action
474. Curnutte, J. T., and Babior, B. M. (1974) Biological Defense Mechanisms, The Effect of Bacteria and Serum on Superoxide Production by Granulocytes. *J. Clin. Invest.* **53**, 1662–1672
475. Ohno, N., and Cusanovich, M. A. (1981) Reaction of c-type cytochromes with the iron hexacyanides. *Biophys. J.* **36**, 589–605
476. Creutz, C., and Sutin, N. (1973) Reduction of Ferricytochrome *c* by Dithionite Ion: Electron Transfer by Parallel Adjacent and Remote Pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**, 1701–1703
477. Burnett, R. W. (1972) Accurate Measurement of Molar Absorptivities. *J. Res. Natl. Bur. Stand. Sect. Phys. Chem.* **76A**, 483–489
478. Storer, A. C., and Cornish-Bowden, A. (1974) The kinetics of coupled enzyme reactions. *Biochem. J.* **141**, 205–209
479. Chen, Y.-R., Deterding, L. J., Sturgeon, B. E., Tomer, K. B., and Mason, R. P. (2002) Protein Oxidation of Cytochrome *c* by Reactive Halogen Species Enhances Its Peroxidase Activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 29781–29791
480. Prütz, W. A., Kissner, R., Nauser, T., and Koppenol, W. H. (2001) On the Oxidation of Cytochrome *c* by Hypohalous Acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **389**, 110–122
481. Jewell, S., and Kimball, S. M. (2013) National Field Manual for the Collection of Water-Wuality Data Chapter A6 Field Measurements Section 6.2 Dissolved Oxygen
482. Tomšič, M., Bešter-Rogač, M., Jamnik, A., Neueder, R., and Barthel, J. (2002) Conductivity of Magnesium Sulfate in Water from 5 to 35°C and from Infinite Dilution to Saturation. *J. Solut. Chem.* **31**, 19–31
483. Tsurko, E. N., Neueder, R., Barthel, J., and Apelblat, A. (1999) Conductivity of Phosphoric Acid, Sodium, Potassium, and Ammonium Phosphates in Dilute Aqueous Solutions from 278.15 K to 308.15 K. *J. Solut. Chem.* **28**, 973–999
484. Hope, A. B., and Aschberger, P. A. (1970) Effects of Temperature on Membrane Permeability to Ions. *Aust. J. Biol. Sci.* **23**, 1047–1060
485. Blicher, A., Wodzinska, K., Fidorra, M., Winterhalter, M., and Heimburg, T. (2009) The Temperature Dependence of Lipid Membrane Permeability, its Quantized Nature, and the Influence of Anesthetics. *Biophys. J.* **96**, 4581–4591

486. 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
487. Cross, A. R., Parkinson, J. F., and Jones, O. T. G. (1984) The superoxide-generating oxidase of leucocytes. *Biochem. J.* **223**, 337–344
488. Kredics, L., Szekeres, A., Czifra, D., Vágvölgyi, C., and Leitgeb, B. (2013) Recent Results in Alamethicin Research. *Chem. Biodivers.* **10**, 744–771
489. Leitgeb, B., Szekeres, A., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., and Kredics, L. (2007) The History of Alamethicin: A Review of the Most Extensively Studied Peptaibol. *Chem. Biodivers.* **4**, 1027–1051
490. Pieta, P., Mirza, J., and Lipkowski, J. (2012) Direct visualization of the alamethicin pore formed in a planar phospholipid matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 21223–21227
491. Matic, S., Geisler, D. A., Møller, I. M., Widell, S., and Rasmusson, A. G. (2005) Alamethicin permeabilizes the plasma membrane and mitochondria but not the tonoplast in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow) suspension cells. *Biochem. J.* **389**, 695–704
492. Gostimskaya, I. S., Grivennikova, V. G., Zharova, T. V., Bakeeva, L. E., and Vinogradov, A. D. (2003) In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria. *Anal. Biochem.* **313**, 46–52
493. Afanasyeva, E. F., Syryamina, V. N., and Dzuba, S. A. (2017) Communication: Alamethicin can capture lipid-like molecules in the membrane. *J. Chem. Phys.* **146**, 0111031–0111034
494. Northrop, B. H., Frayne, S. H., and Choudhary, U. (2015) Thiol–maleimide “click” chemistry: evaluating the influence of solvent, initiator, and thiol on the reaction mechanism, kinetics, and selectivity. *Polym. Chem.* **6**, 3415–3430
495. Hughes, L. D., Rawle, R. J., and Boxer, S. G. (2014) Choose Your Label Wisely: Water-Soluble Fluorophores Often Interact with Lipid Bilayers. *PLoS ONE.* **9**, e87649
496. Walde, P., Cosentino, K., Engel, H., and Stano, P. (2010) Giant Vesicles: Preparations and Applications. *ChemBioChem.* **11**, 848–865
497. Lefrançois, P., Goudeau, B., and Arbault, S. (2018) Electroformation of Phospholipid Giant Unilamellar Vesicles in Physiological Phosphate Buffer. *Integr. Biol.* **In Press**
498. Reeves, J. P., and Dowben, R. M. (1969) Formation and Properties of Thin-walled Phospholipid Vesicles. *J. Cell. Physiol.* **73**, 49–60
499. Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H., and Kinoshita, K. (1996) Preparation of Giant Liposomes in Physiological Conditions and Their Characterization Under an Optical Microscope. *Biophys. J.* **71**, 3242–3250
500. Jesorka, A., Stepanyants, N., Zhang, H., Ortmann, B., Hakonen, B., and Orwar, O. (2011) Generation of phospholipid vesicle-nanotube networks and transport of molecules therein. *Nat. Protoc.* **6**, 791–805
501. Criado, M., and Keller, B. U. (1987) A membrane fusion strategy for single-channel recordings of membranes usually non-accessible to patch-clamp pipette electrodes. *FEBS Lett.* **224**, 172–176
502. Shimanouchi, T., Umakoshi, H., and Kuboi, R. (2009) Kinetic Study on Giant Vesicle Formation with Electroformation Method. *Langmuir.* **25**, 4835–4840
503. Mertins, O., da Silveira, N. P., Pohlmann, A. R., Schröder, A. P., and Marques, C. M. (2009) Electroformation of Giant Vesicles from an Inverse Phase Precursor. *Biophys. J.* **96**, 2719–2726

504. Lefrançois, P., Vajrala, V. S. R., Arredondo, I. B., Goudeau, B., Doneux, T., Bouffier, L., and Arbault, S. (2016) Direct oxidative pathway from amplex red to resorufin revealed by in situ confocal imaging. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 25817–25822
505. Giovannetti, R. (2012) The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins
506. Gouterman, M. (1961) Spectra of Porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* **6**, 138–163
507. Williams, R. J. P. (1956) The Properties of Metalloporphyrins. *Chem. Rev.* **56**, 299–328
508. Gouterman, M. (1959) Study of the Effects of Substitution on the Absorption Spectra of Porphin. *J. Chem. Phys.* **30**, 1139–1161

RESUME GRAND PUBLIC (FRANÇAIS)

FRANÇAIS : Les outils des défenses immunitaires du corps humain sont composés de machineries biologiques très complexes et variées. Une de ces machineries est appelée ‘NADPH oxydase du phagocyte’, ou plus simplement ‘NADPH oxydase’ et contribue notamment à la défense de l’organisme contre les infections microbiennes. La ‘NADPH oxydase’ réalise cette fonction en produisant des radicaux libres toxiques pour les microbes. Dans certaines maladies la ‘NADPH oxydase’ fonctionne mal (trop ou pas assez) et peut causer des dommages à l’organisme. Ainsi, l’étude de la ‘NADPH oxydase’ est très importante et nécessite de mesurer avec une grande précision la quantité de radicaux libres produits. Mes recherches ont permis de mettre en évidence des difficultés de mesure des radicaux libres puis de les résoudre en comprenant leur origine. Un nouvel outil d’étude très prometteur de la ‘NADPH oxydase’ a aussi pu être développé. Ces résultats sont très importants pour les recherches futures, médicales ou fondamentales.

GENERAL PUBLIC ABSTRACT (ENGLISH)

ENGLISH: The tools for human body immune defences are composed of very complex and diverse biological machineries. One of them is called ‘phagocyte NADPH oxidase’, or simpler ‘NADPH oxidase’ and contributes notably to the body defence against microbial infections. To fulfil this function, the ‘NADPH oxidase’ produces free radicals, toxic for microbes. In certain diseases, the ‘NADPH oxidase’ dysfunctions (works either too much or not enough) and can causes damages to the organism. Thus, study of the ‘NADPH oxidase’ is very important and need highly accurate measurements of the produced free radicals. My researches allowed to highlight discrepancies in free radical measurements, then to solve them through the understanding of their provenance. A new very promising tool to study the ‘NADPH oxidase’ was also developed. These results are very important for future researches, medical or fundamental.

Titre : Mesures de l'activité de l'enzyme NADPH oxydase du neutrophile (NOX2) en système compartimenté et mise au point de protéoliposomes géants pour l'étude concertée de son assemblage et de sa fonction

Mots clés : *NADPH oxydase, neutrophiles, liposomes, espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, complexes multienzymatiques, cinétique chimique*

Résumé : La métalloenzyme multimérique membranaire NADPH oxydase du neutrophile (NOX2), est impliquée dans plusieurs fonctions physiologiques vitales incluant la réponse immunitaire, en contribuant fortement à la destruction des pathogènes ou autres envahisseurs du corps humain. Les fonctions physiologiques de NOX2 sont assurées par sa fonction chimique de catalyseur de la production d'anions superoxyde via la réduction monoélectronique du dioxygène à une face de la membrane, simultanément à l'oxydation biélectronique du NADPH à l'autre face de la membrane. L'étude des caractéristiques biochimiques de l'enzyme entière, incluant ses mécanismes d'activation et de régulation, en lien avec l'assemblage macromoléculaire, est réalisée *in vitro* en utilisant des fractions membranaires de neutrophile (FM), petites vésicules contenant NOX2, ainsi que les protéines cytosoliques recombinantes (p67^{phox}, p47^{phox} et Rac1/2) indispensables à sa fonction, en présence d'une molécule activatrice comme l'acide arachidonique (AA), un acide gras. La technique historiquement privilégiée de mesure de l'activité enzymatique de NOX2 implique la détection des anions superoxyde par une sonde protéique, le Cytochrome *c* (Cyt_c). Dans ce système, les anions superoxyde, dont la production est catalysée par NOX2 vers l'intérieur des vésicules de FM, sont détectés à l'extérieur. En corrélation avec la littérature, ces recherches montrent que l'activité enzymatique déterminée via la détection des anions superoxyde par le Cyt_c est plus faible que lorsqu'elle est déterminée via la mesure de la consommation du NADPH. L'origine du problème inclut potentiellement des contraintes de perméabilité membranaire, de structure de la membrane et des protéines, d'interactions des protéines entre-elles et avec les lipides membranaires, de pertinence de la sonde utilisée et de réactions secondaires. Ces hypothèses ont été testées par différents moyens incluant notamment des mesures de cinétiques globales et de l'activité de NOX2 dans différentes

conditions et avec différentes observables (NADPH, Cyt_c, dioxygène), en présence de détergent ou d'ionophore, en faisant varier la température de mesure, la concentration en Cyt_c, la concentration en substrat, la concentration en AA ou le temps de préincubation. La présence de réactions secondaires a également été testée par électrochimie. Cette étude montre que la mesure de la production des anions superoxyde est limitée par la perméabilité membranaire et par les réactions secondaires. Il a aussi été mis en exergue que la concentration en Cyt_c usuelle pour ces mesures n'est pas saturante et de façon inattendue que les FM catalysent intrinsèquement la dismutation du peroxyde d'hydrogène à l'aide d'un composant thermolabile. Il est aujourd'hui très compliqué de mesurer de façon concomitante l'activité de la NADPH oxydase et son assemblage. Le deuxième objectif de cette thèse était donc la mise au point de vésicules géantes unilamellaires (GUV) intégrant NOX2 dans leur membrane, ce qui permettrait d'observer par microscopie de fluorescence l'assemblage du complexe NADPH oxydase et de simultanément mesurer la production des anions superoxyde par électrochimie sous microscope. La formation de GUV possédant des FM (FM-GUV) à leur membrane est un succès mais sans confirmation de l'intégration de NOX2 à la membrane des GUV. L'assemblage des protéines cytosoliques à la face externe de la membrane a été étudié sur GUV et sur FM-GUV, ce qui a permis de montrer que l'ancrage membranaire de ces protéines est possible seulement en présence d'AA et dû de façon prépondérante aux lipides et que NOX2 joue un rôle minoritaire. L'étude des interactions entre les protéines cytosoliques et la face interne de la membrane des GUV reste à optimiser. Il a été possible de détecter en GUV qualitativement une activité de NOX2 par électrochimie et par fluorescence (Amplex-Red), mais ce point reste aussi à optimiser.

Title: Neutrophil NADPH oxidase enzyme (NOX2) activity measurements in compartmented system and development of giant proteoliposomes for the concerted study of its assembly and its function

Keywords: *NADPH oxidase, neutrophil, liposome, reactive oxygen species, membrane proteins complex, kinetics*

Abstract: The membrane multimeric metalloenzyme NADPH oxidase (NOX2) from neutrophil is implied in several essential physiological functions including the immune response, by strongly contributing to the destruction of pathogens or other invaders of the human body. Physiological functions of NOX2 are fulfilled by its chemical function of catalyst of superoxyde anion production via the mono-electron dioxygen reduction on one face of the membrane, simultaneously to the NADPH bi-electron oxidation on the other face of the membrane. Studies of biochemical features of the whole enzyme, including its activation and regulation mechanisms linked to the macromolecular assembly, is done *in vitro* by using neutrophil membrane fractions (MF), which are small vesicles containing NOX2, and by using the recombinant cytosolic proteins (p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} and Rac1/2) essential for its function, in presence of an activator molecule such as arachidonic acid (AA), a fatty acid. The historical technics to measure the NOX2 enzyme activity is the superoxide anion detection by a protein probe, the Cytochrome *c* (Cyt_c). In this system, NOX2 catalyses the production of superoxyde anions towards the inside of MF vesicles and the superoxide anions are detected outside. In correlation with literature, the present research shows that the enzyme activity determined via the detection of superoxide anions by the Cyt_c is lower than the activity determined from NADPH consumption measurement. The source of the problem includes potentially constraints of membrane permeability, of membrane and protein structure, of protein-protein and protein-membrane interactions, of the relevance of the probe and of secondary reactions. These hypotheses have been tested by various means including notably global kinetics measurements and NOX2

activity measurements in various conditions with three different observables (NADPH, Cyt_c, dioxygen), in presence of detergent or ionophore, by varying temperature, Cyt_c concentration, substrate concentration, AA concentration or still preincubation time. Secondary reactions existence has also been probed by electrochemistry. This study shows that the measurement of the superoxide anion production is limited by membrane permeability and secondary reactions and that the usual Cyt_c concentration is non-saturating, and unexpectedly that the MF catalyses the disproportionation of hydrogen peroxide by a thermolabile component. It is currently very hard to measure simultaneously the NADPH oxidase activity and the assembly of the whole complex. The second objective of my thesis was consequently to develop giant unilamellar vesicles (GUV) with NOX2 integrated into their membranes. This to be able to observe the complex assembly by fluorescence microscopy and simultaneously to measure the superoxide anion production by electrochemistry under microscope. The development of GUV with MF at the membrane (MF-GUV) has been successful, but without confirmation of NOX2 integration in the GUV membrane. The assembly of cytosolic proteins on the external face of the membrane was studied on GUV and on MF-GUV, leading to the discovery that membrane anchor of these proteins is possible only in presence of AA and is mostly due to lipids, NOX2 playing a minor role. Study of interactions between cytosolic proteins and internal face of the GUV membrane must be optimised. It was possible in GUV to detect qualitatively NOX2 activity by electrochemistry and by fluorescence, (Amplex-Red), but this point should still be optimised.

