



HAL
open science

Poldip2 : caractérisation et implication dans l'activité des NADPH oxydases

Aicha Bouraoui

► **To cite this version:**

Aicha Bouraoui. Poldip2: caractérisation et implication dans l'activité des NADPH oxydases. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS291 . tel-03505875

HAL Id: tel-03505875

<https://theses.hal.science/tel-03505875>

Submitted on 1 Jan 2022

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.

Poldip2 : caractérisation et implication dans l'activité des NADPH Oxydases

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n° 571 sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse de doctorat soutenue à Orsay, le 17 Octobre 2019, par

Aicha BOURAOUI

Composition du Jury :

Franck Fieschi	Rapporteur
Professeur, Université Grenoble Alpes (IBS, CEA, CNRS, UMR 5075)	
Bernard Lardy	Rapporteur
MCUPH, PhD, HDR, Université Joseph Fourier (IBP, GREPI)	
Corinne Dupuy	Examinatrice
DR, PhD, HDR, Université Paris Saclay (IGR, CNRS, UMR8200)	
Mariano A. Ostuni	Examineur
Professeur, Université Paris Diderot (INTS, INSERM, UMRS 1134)	
Marie Erard	Présidente
Professeur, Université Paris Saclay (LCP, CNRS, UMR8000)	
Laura Baciou	Directeur de thèse
DR, PhD, HDR, Université Paris Saclay (LCP, CNRS, UMR8000)	

REMERCIEMENT

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au laboratoire de Chimie Physique (LCP) au sein de l'équipe « Dynamique et fonctionnement de protéines rédox et Stress oxydant ». Au cours de ces 3 ans et demi passés à travailler sur ce projet de thèse j'ai pu profiter du soutien et des conseils de chaque membre de ce laboratoire. A ce titre je souhaite adresser mes remerciements à tout le monde pour ces 3 belles années passées ensemble.

A la direction du LCP

Je tiens à remercier Dr. Philippe Maître, directeur du laboratoire et Pedro De Oliveira, directeur adjoint du LCP de m'avoir permis de réaliser ma thèse au LCP. Un merci à Philippe Maître pour tous les entretiens que nous avons eu. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre écoute mais aussi pour la confiance que vous nous avez accordée à Thomas Noblet et Moi dans notre mission de représentants des doctorants et pour la réalisation des différentes animations et activités pour les doctorants.

Merci à Séverine Bourguignon, Stéphanie Joseph, Wafa Zaied pour votre aide dans toutes ces démarches administratives pour ma thèse ainsi que l'organisation de la journée des doctorants.

A mon jury de thèse

Merci à Franck Fieschi et Bernard Lardy d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je vous remercie pour la rédaction de mon rapport de manuscrit de thèse et vos remarques très pertinentes. Merci à Corinne Dupuy et Mariano Ostuni d'avoir accepté d'être les examinateurs de ma thèse. Merci à Marie Erard d'avoir accepté la présidence de mon jury de thèse ainsi que pour la rédaction du rapport de thèse. Merci à l'ensemble des membres du Jury ainsi qu'à ma directrice de thèse Laura Baciou pour l'intérêt porté à mon travail, vos remarques très pertinentes et la discussion très enrichissante que nous avons eu.

A ma directrice de thèse

Merci Laura pour ton encadrement tout au long de ce projet. Tu as toujours été présente et pleinement investie dans toutes les étapes depuis la préparation du concours de l'école doctorale à la soutenance de thèse. Tu as m'a fait également confiance en me laissant prendre de plus en plus d'autonomie et en restant ouverte à mes propositions. Je te remercie également de m'avoir encouragé à entreprendre de nouveaux projets (enseignement, représentation des doctorants) et d'avoir été compréhensive quand ces derniers demandaient un peu plus d'investissement de ma part. Et surtout merci pour ton soutien moral.

A l'équipe Dynamique et fonctionnement de protéines rédox et Stress oxydant

Je souhaite remercier tous les membres de mon équipe et plus particulièrement Chantal Houée-Levin, Tania Bizouarn et Florance Lederer pour votre soutien tant sur le plan moral que scientifique. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre écoute et tous les conseils prodigués.

Au groupe Biophysique et nos voisins du 1^{er} étage le groupe Rismas

Un grand merci à tous, pour votre bonne humeur (avec quelques coup de gueule au passage quand même personne n'est parfait !) et les moments de convivialités passés ensemble lors des repas organisés par « SUPER Elodie ». Merci également pour vos conseils scientifiques et professionnels. Et plus particulièrement, un grand merci et Sophie Dupré Oliver Nüsse d'avoir éclairé les faces cachées de la Bio et d'avoir répondu à toutes mes questions même les questions les plus naïve qu'un biochimiste peut se poser. Egalement un grand merci à Guillaume Van Der Rest pour ton implication dans mon travail en tant que membre de mon jury de mon suivi de thèse, pour ton écoute et tes conseils scientifiques.

Aux petites fées du labo

Merci à Celine Ferard, Elodie Hudik, Valérie Derien, Paul Machillot, et Yasmina Bousmah pour votre soutien technique et moral. C'est avec Paul que j'ai fait mes premiers pas au labo. Tu m'as formé à beaucoup de techniques. Toujours patient et prêt à répondre à toutes mes questions, tu as fait de ton mieux pour me transmettre le maximum de choses avant de partir vers d'autres aventures. Et vous les filles vous avez suivis attentivement, épisode par épisode, toutes mes aventures avec cette « chipie de Poldip2 ». Toujours disponible pour m'écouter raconter mes déboires avec cette protéine ou m'aider avec certaines expériences. Vous en avez même fait un livre que j'adore ! J'ai beaucoup apprécié vos conseils scientifiques et vos propositions de manip. Vous avez tous été des fées pour moi.

Au doctorant du labo

Un grand merci à tous les doctorants du labo pour votre soutien moral et votre solidarité. J'ai beaucoup apprécié toutes nos soirées passées ensemble à parler de science et de la vie mais aussi les rires partagés. Je souhaite remercier tout particulièrement Hanna Illichova pour avoir apporté un peu plus d'ambiance et de convivialité en organisant nos soirée doctorant et petites vadrouilles autour du LCP, Jehan Waeytens pour m'avoir initié à l'Infra Rouge et toutes les discussions scientifiques mais aussi Stephenson-Boakye Owusu pour son sourire et sa bonne humeur. Tu as été un compagnon de bureau très agréable. Je souhaite également remercier Thomas Noblet qui a été avec moi représentant des doctorants. Thomas tu as été un co-équipier remarquable. Je n'aurai jamais mené aussi bien cette mission sans toi et sans compter l'aide précieuse de Nicolas Jestin. Et enfin je souhaite remercie Xavier Serfaty mon grand frère du labo. Dès le début de ma thèse tu m'as prise sous ton aile. J'ai beaucoup apprécié ta façon de travailler, beaucoup

de rigueur et toujours consciencieux du détail. Je te remercie également pour l'intérêt que tu as porté à mes travaux. Tes conseils étaient toujours très utiles. Tu as également été d'un grand soutien lors de moments de doutes. Comme tu l'as si bien dit c'est dans la petite pièce de l'Uvikon qu'on refaisait le monde.

A l'équipe de Mychan-Pham Dang au centre de Recherche sur l'inflammation, Bichat

Je souhaite remercier tous les membres de l'équipe pour leur accueil chaleureux et leur bienveillance à mon égard lors de mes visites au laboratoire. Je remercie Jamel El Benna, Marwa Ben Khémis et Corali Pintard pour les discussions scientifiques enrichissantes que nous avons partagées, votre disponibilité et votre aide pour les manipulations et plus particulièrement Mychan-Phan Dang pour votre écoute, les conseils prodigués et votre implication dans mon travail en tant que membre de mon Jury de thèse.

A l'équipe de Corinne Dupuy à l'Institut Gustave Roussy

Je souhaite remercier tous les membres de l'IGR pour leur accueil chaleureux et leur bienveillance à mon égard lors de mes visites au laboratoire. Merci Ruy Lozada et Raphael Corre pour votre disponibilité et les discussions scientifiques très enrichissantes partagées ensemble mais aussi pour la bonne atmosphère qui régnait au laboratoire. C'est toujours un plaisir de travailler dans la joie et la bonne humeur. Un grand merci à Corinne Dupuy pour avoir accepté notre collaboration, votre implication dans mon travail et votre disponibilité.

A ma Famille

Enfin, je souhaite exprimer ma profonde gratitude à mes amis et aux membres de ma famille, et en particulier mes parents Dounia et Khaled, ma sœur Yasmine et ma tante « khalti Fatiha » pour les encouragements tout au long de mes études. Vous avez été pour moi d'un grand soutien durant cette dernière phase, toujours patients quand je ne pouvais pas être disponible. Je n'aurais jamais pu accomplir tout ça sans vous. Et enfin Martin Hullebrouck, mon ami, mon confident et mon amour, je ne trouverais jamais de mots aussi beaux que les tiens pour t'exprimer toute ma gratitude pour tes encouragements, ta patience et le soutien que tu m'as apporté alors que toi-même tu préparais ta thèse. En ce qui me concerne c'est fait ! A ton tour maintenant. Je te souhaite d'accomplir cette belle thèse que tu prépares et encore bien de belles choses.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
I. Métabolisme cellulaire, rôle des protéines et régulation	2
II. Poldip2	2
II.1. Information structurale : une organisation en domaines	2
II.2. Localisation et régulation de l'expression.....	4
II.3. Fonctions connues de Poldip2 dans les cellules.....	5
II.4. Rôles physio(patho)logiques de Poldip2.....	8
III. La famille des NADPH oxydases	16
III.1. Présentation.....	16
III.2. Transfert d'électron et génération d'Espèces Réactives de l'Oxygène	19
III.3. Distribution et localisation	21
III.4. Rôles physiologiques	22
III.5. Implication des NOX dans les granulocytes	23
III.5.a. Dans le neutrophile	23
III.5.b. Dans les monocytes et macrophages.....	24
IV. L'isoforme NOX4 : caractéristiques structurales et fonctionnelles	25
V. L'isoforme NOX2	28
V.1. Un bref historique	28
V.2. À l'échelle moléculaire	28
V.2.a. Le flavocytochrome <i>b558</i>	28
V.2.a.i. gp91 ^{phox}	29
V.2.a.ii. p22 ^{phox}	30
V.2.b. Les protéines cytosoliques, régulatrices de NOX2	31
V.2.b.i. p47 ^{phox}	31
V.2.b.ii. p67 ^{phox}	32
V.2.b.iii. p40 ^{phox}	32
V.2.b.iv. Rac	33
V.3. Assemblage et activation du cytochrome <i>b558</i>	33
V.3.a. Les interactions des protéines du complexe NADPH oxydase à l'état de repos....	33
V.3.b. Les interactions à l'état actif	35
V.3.b.i. Interactions protéine-protéine.....	36
V.3.b.ii. Interaction protéine-membrane	37
VI. Objectif de la thèse.....	38
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	40
I. Production de Poldip2 dans différents systèmes d'expression hétérologue.....	41
I.1. Production de Poldip2 de rat dans la levure.....	41
I.1.a. Clonage de gène de Poldip2 dans le vecteur d'expression pPICZαA de levure	41
I.1.b. Description du construit pPICZαA/Poldip2	41
I.1.c. Transformation des levures avec l'ADN recombinant.....	42
I.1.d. Induction de l'expression de Poldip2 à petite échelle	42
I.1.e. Induction de l'expression de Poldip2 à grande échelle	43
I.1.f. Cassage des levures et fractionnement subcellulaires	43
I.2. Production de Poldip2 humain dans <i>E. coli</i>	43
I.2.a. Transformation des bactéries avec l'ADN recombinant	43
I.2.b. Transformation des bactéries par choc thermique.....	45
I.2.c. Production de la protéine recombinante.....	45
I.2.d. Cassage des bactéries et fractionnement cellulaires.....	46
I.3. Production de Poldip2 humain <i>in vitro</i>	46
II. Méthodes de biologie moléculaire (amplification de l'ADN par PCR).....	47

III.	Méthodes biochimiques d'analyse de protéines.....	48
III.1.	Concentration des protéines par l'acide trichloroacétique (TCA).....	48
III.2.	SDS-PAGE.....	48
III.3.	Western Blot	48
III.4.	Western Blot en condition native	50
IV.	Méthodes de purification des protéines recombinantes	51
IV.1.	Précipitation au sulfate d'ammonium	51
IV.2.	Chromatographie d'affinité Ni Sepharose.....	51
IV.3.	Chromatographie d'échangeuse d'ions	52
IV.4.	Chromatographie d'exclusion de taille	52
IV.5.	Protocole de dialyse	53
IV.6.	Protocole de concentration de l'échantillon par évaporation	53
V.	Méthode de caractérisation structurale de Poldip2 de rat.....	54
V.1.	Par spectrométrie de masse	54
V.1.a.	Marquage au TMPP et digestion à la trypsine	54
V.1.b.	Analyse par LC-MS/MS couplé à un triple TOF	54
V.1.c.	Analyse par MALDI-TOF.....	54
V.2.	Par dichroïsme circulaire.....	55
V.3.	Par spectroscopie Infra rouge.....	55
VI.	Méthodes de biologie cellulaire	56
VI.1.	Cellules modèles HEH293 et COS 7	56
VI.1.a.	Les cellules HEK293.....	56
VI.1.a.i.	Culture cellulaire	56
VI.1.a.ii.	Fractionnement cellulaire par des kits de fractionnement.....	57
VI.1.a.iii.	Fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle.....	58
VI.1.b.	Les lignées de cellules Cos 7.....	59
VI.1.b.i.	Culture cellulaire	59
VI.1.b.ii.	Fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle.....	59
VI.2.	Les globules blancs issus de donneurs humains.....	59
VI.2.a.	Les neutrophiles	59
VI.2.a.i.	Séparation du sérum des globules rouges	59
VI.2.a.ii.	Isolement des neutrophiles sur gradient de sucrose	60
VI.2.a.iii.	Lyse des globules rouges restants	60
VI.2.a.iv.	Cassage des cellules et fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle.....	61
VI.2.a.v.	Mesure de la concentration en <i>cytb558</i> dans les fractions membranaire.....	61
VI.2.b.	Les cellules monocytes.....	62
VI.2.b.i.	Isolement	62
VI.2.b.ii.	Traitement des monocytes par SiRNA.....	63
VI.2.c.	Lyse des cellules avec un tampon isotonique.....	63
VI.2.d.	Les macrophages : culture et différenciation	64
VII.	Mesures de production de ROS.....	64
VII.1.	Mesure de la production de H ₂ O ₂ par l'Amplex red	64
VII.1.a.	Principe	64
VII.1.b.	<i>In cellulo</i>	65
VII.1.c.	<i>In vitro</i>	65
VII.2.	Mesure de l'activité de NOX2 (<i>in vitro</i>)	66
VII.2.a.	Principe	66
VII.2.b.	Protocoles	68
VII.2.c.	Tests statistiques.....	69
VIII.	Méthodes analytiques des interactions protéines-protéines	69
VIII.1.	Dot Blot.....	69

VIII.2. Co-précipitation par centrifugation	70
VIII.3. Co-précipitation par centrifugation sur gradient de sucrose	71
CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	72
A. Poldip2 : Production, purification, caractérisation structurale et fonctionnelle	73
A.I. Production de Poldip2 dans différents systèmes d'expression.....	73
A.I.1. Comparaison de la séquence de Poldip2 dans différentes espèces	73
A.I.2. Production de Poldip2 humain dans <i>E. coli</i>	75
A.I.2.a. Comparaison entre deux souches d'expression.....	76
A.I.2.b. Influence du milieu de culture.....	77
A.I.2.c. Optimisation de la concentration en IPTG.....	78
A.I.2.d. Effet de la température	79
A.I.2.e. Confirmation de l'identité de la protéine Poldip2 humaine par Western Blot.....	79
A.I.3. Production de Poldip2 humain <i>in vitro</i>	80
A.I.4. Production de Poldip2 de rat dans le système hétérologue de levure	82
A.I.4.a. Sélection de la souche	82
A.I.4.b. Optimisation du temps et de la densité optique d'induction	84
A.I.4.c. Optimisation de la température	85
A.I.4.d. Vérification de l'insertion du gène de Poldip2 dans le génome de <i>P. pastoris</i> <i>SMD1168</i>	86
A.I.5. Production de Poldip2 à grande échelle	87
A.I.5.a. Production de Poldip2 (Rat) à grande échelle.....	87
A.I.5.b. Vérification de l'expression de Poldip2 dans les compartiments subcellulaires de la levure	89
A.II. Purification de Poldip2 de rat.....	92
A.II.1. Mise au point du 1 ^{er} protocole de purification par chromatographie d'affinité au Nickel	92
A.II.2. Stratégie d'optimisation de la purification de Poldip2.....	94
A.II.3. Protocole de purification optimisé : précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie échangeuse d'anion	96
A.II.4. Comparaison du Poldip2 recombinant et Poldip2 endogène.....	98
A.III. Caractérisation structurale de Poldip2 recombinant de rat.....	99
A.III.1. Caractérisation de la structure primaire	99
A.III.2. Caractérisation de la structure secondaire de Poldip2	102
A.III.3. Prédiction de la structure tertiaire par comparaison de séquences	105
A.III.4. Caractérisation de l'état oligomérique de Poldip2.....	109
A.IV. Études fonctionnelle de Poldip2 recombinant de rat.....	110
A.IV.1. Mesure de l'activité de NOX4 dans les cellules HEK 293/NOX4.....	110
A.IV.2. Répartition subcellulaire de NOX4, p22 ^{phox} et Poldip2 dans les cellules HEK 293 ..	111
A.IV.3. Effet de Poldip2 recombinant sur l'activité de NOX4.....	116
B. Implication de Poldip2 dans l'activité de NOX2	118
B.I. Effet de Poldip2 sur NOX2 <i>in vitro</i>	119
B.I.1. Interaction de Poldip2 avec NOX2	119
B.I.1.a. Interaction de Poldip2 avec le complexe Cytochrome <i>b558</i>	119
B.I.1.a.i. Poldip2 endogène et co-localisation avec NOX2.....	119
B.I.1.a.ii. Effet de l'acide arachidonique sur l'interaction de Poldip2 avec la NOX2 de neutrophile	122
B.I.1.a.iii. Interaction non spécifique de Poldip2 avec la fraction membranaire des lignées de cellules Cos 7	125
B.I.1.b. Effet de Poldip2 sur l'assemblage du complexe NADPH oxydase.....	125
B.I.1.c. Interaction de Poldip2 avec les protéines cytosoliques seules	128
B.I.2. Effet de Poldip2 sur l'activité de NOX2	130

B.I.2.a.	Poldip2 : rôle d'activateur de NOX2 ?.....	131
B.I.2.b.	Effet de Poldip2 sur l'activité de NOX2	134
B.I.2.c.	Identification des partenaires et mode d'action de Poldip2	135
B.I.2.d.	Effet d'une pré-incubation avec Poldip2 sur l'activité de NOX2	138
B.II.	Discussion : Hypothèse sur une nouvelle régulation de NOX2	139
B.II.1.	Au repos (absence d'acide arachidonique).....	139
B.II.1.a.	Avec les membranes	139
B.II.1.b.	Avec les protéines cytosoliques	141
B.II.2.	Activé (en présence d'acide arachidonique)	142
B.II.2.a.	Avec les membranes seules.....	142
B.II.2.b.	En présence des protéines cytosoliques	143
B.III.	Effet de Poldip2 sur NOX2 <i>in cellulo</i>	144
	CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	148
I.	Conclusion	149
II.	Perspectives.....	151
	CHAPITRE V : ANNEXES.....	153
	REFERENCES.....	157

TABLE DES FIGURES

Figure I- 1 : Représentation de la séquence N-terminale et des deux domaines fonctionnels de Poldip2. ...	3
Figure I- 2 : Mécanisme de réparation de l'ADN par TLS (TransLesion Synthesis).....	6
Figure I- 3 : La migration cellulaire est dépendante de différentes structures des filaments d'actine.	10
Figure I- 4 : modèle proposé pour le contrôle de la migration des VSMC par Poldip2.....	11
Figure I- 5 : Mécanisme d'activation des myofibrablastes de rein (47).....	15
Figure I- 6 : Topologie du corps catalytique des NADPH oxydases.....	17
Figure I- 7 : Représentation linéaire, en domaines, de la séquence protéique des NOX.....	17
Figure I- 8 : La famille des NADPH Oxydase et leurs partenaires.	18
Figure I- 9 : Mécanisme de transfert d'électrons en 7 étapes.....	19
Figure I- 10 : Formation des dérivés réactifs de l'oxygène.....	20
Figure I- 11 : Comparaison de structure des exons des 4 variants nouvellement identifiés avec celui du prototype de NOX4.	26
Figure I- 12 : Topologie de NOX4.....	27
Figure I- 13 : Topologie de p22 ^{phox}	31
Figure I- 14 : Domaine d'interaction de p47 ^{phox}	32
Figure I- 15 : Domaine d'interaction de p67 ^{phox}	32
Figure I- 16 : Domaine d'interaction de p40 ^{phox}	33
Figure I- 17 : Interaction des protéines cytosoliques à l'état de repos.	35
Figure I- 18 : Représentation schématique du complexe actif (189).....	38
Figure II- 1 : Vecteur d'expression pPICZαA contenant le gène codant pour Poldip2.....	42
Figure II- 2 : Vecteur d'expression pETM33 contenant le gène codant pour Poldip2.....	44
Figure II- 3 : Stratégie de régulation des gènes clonés dans un vecteur pET.....	45
Figure II- 4 : Principe du système d'expression in vitro.	47
Figure II- 5 : Réaction de dérivation des amines N-terminales des protéines par le TMPP-Ac-OSu.	54
Figure II- 6 : Spectre de différence de la FM réduite moins la FM oxydée.	62
Figure II- 7 : Réaction d'oxydation de l'Amplex red par le peroxyde d'hydrogène.....	64
Figure II- 8 : Cinétique de consommation de NADPH mesurée à 340 nm.	67
Figure II- 9 : Cinétique de réduction du cytochrome c par les anions superoxyde mesurée à 550 nm.	68
Figure II- 10 : Principe du Dot Blot.....	70
Figure III- 1 : Analyse de la séquence de Poldip2.....	74
Figure III- 2 : Comparaison sur gel SDS-PAGE de l'expression de Poldip2 humain dans les souches d'E. coli BL21DE3 et SoluBL21DE3, induite ou non par de l'IPTG.....	77
Figure III- 3 : Comparaison sur gel SDS-PAGE de l'expression de Poldip2 dans E. coli soluBL21 induite ou non par l'IPTG dans deux milieux de culture M9 ou LB.....	78
Figure III- 4 : Comparaison sur gel SDS-PAGE de l'expression de Poldip2 dans E. coli SoluBL21 dans un milieu LB en fonction de la concentration en IPTG.....	78
Figure III- 5 : Comparaison sur gel SDS-PAGE de l'expression de Poldip2 dans E. coli SoluBL21 induite ou non par l'IPTG dans un milieu LB en fonction de la température.....	79
Figure III- 6 : Identification de Poldip2 dans les extraits d'E. coli.....	80
Figure III- 7 : Production de Poldip2 humain dans un système d'expression in vitro.....	81
Figure III- 8 : Analyse par Western Blot des levures recombinantes ayant poussées sur milieu YPD + Zeocine (1 mg/ml).....	83
Figure III- 9 : Analyse par Western Blot des recombinants présélectionnés.....	84
Figure III- 10 : Optimisation du temps de culture des clones 2 et 3 à une DO d'induction initiale égale à 2.....	84
Figure III- 11 : Optimisation du temps de culture des clones 2 et 3 à une DO d'induction initiale égale à 4.....	85
Figure III- 12 : Optimisation de la température de culture à une DO d'induction initiale égale à 2 pendant 72 h.....	86

Figure III- 13 : Insertion du gène de Poldip2 dans l'ADN génomique de la levure.....	86
Figure III- 14 : Expression de Poldip2 dans un grand volume de culture (1 litre).....	88
Figure III- 15 : Effet du PMSF sur l'expression de Poldip2.	89
Figure III- 16 : Expression de Poldip2 (rat) dans la levure <i>P. pastoris</i> SMD1168.....	90
Figure III- 17 : Représentation schématique des voies de sécrétion de la levure et des gènes cibles.	91
Figure III- 18 : Chromatographie d'affinité sur résine de Nickel.....	92
Figure III- 19 : Identification de Poldip2 recombinant à chaque étape de la purification.....	93
Figure III- 20 : Schéma récapitulatif des différents protocoles mis en place pour la purification de Poldip2.	94
Figure III- 21 : Profil d'élution de la chromatographie d'affinité sur résine de DEAE.	97
Figure III- 22 : Identification de Poldip2 recombinant à chaque étape de la purification.....	98
Figure III- 23 : Profils de migration de Poldip2 recombinant versus Poldip2 endogène.	99
Figure III- 24 : Analyse de la bande 75 kDa par Nano-LC-MS/MS avec une détection triple TOF après digestion à la trypsine.....	99
Figure III- 25 : Analyse de la séquence de Poldip2 bande à 39 kDa par Nano-LC-MS/MS avec une détection triple TOF après digestion à la chymotrypsine.....	100
Figure III- 26 : Analyse de la séquence de Poldip2 bande à 39 kDa par Nano-LC-MS/MS avec une détection par MALDI-TOF après marquage au TMPP et digestion à la Lys-N.	101
Figure III- 27 : Analyse de la bande 29 kDa avec détection MALDI TOF après digestion par la trypsine.	101
Figure III- 28 : Analyse de la structure secondaire de Poldip2.	103
Figure III- 29 : Variation de $\Delta\epsilon$ en fonction de la température.	105
Figure III- 30 : Prédiction de structure tridimensionnelle de Poldip2 par comparaison de séquences.....	106
Figure III- 31 : Analyse de la structure tertiaire des formes de Poldip2 produites par la levure <i>P. pastoris</i>	108
Figure III- 32 : Caractérisation de l'état oligomérique de Poldip2.....	110
Figure III- 33 : Effet du traitement de l'induction à la doxycycline sur l'expression et l'activité de NOX4.	111
Figure III- 34 : Comparaison de la répartition subcellulaire de Poldip2 NOX4 et p22 ^{phox} en fonction de la méthode d'enrichissement (centrifugation à droite ou kit à gauche).....	113
Figure III- 35 Répartition subcellulaire de l'expression de Poldip2 NOX4 et p22 ^{phox} après traitement ou non (-) à la doxycycline pendant 24 h.	115
Figure III- 36 : Mesure de l'activité de NOX4 dans les fractions enrichies après 12 h de traitement à 10 ⁻² µg/ml doxycycline.	117
Figure III- 37 : Effet de Poldip2 recombinant de rat sur l'activité de NOX4 après 12 h de traitement à 10 ⁻² µg/ml doxycycline.	118
Figure III- 38 : Interaction de Poldip2 avec NOX2.....	120
Figure III- 39 : Interaction entre Poldip2 et fraction membranaire de neutrophile en absence d'acide arachidonique.	121
Figure III- 40 : Effet de la concentration de Poldip2 sur son interaction avec la fraction membranaire de neutrophile.....	122
Figure III- 41 : Effet de l'incubation avec l'acide arachidonique sur le signal de Western Blot.	123
Figure III- 42 : Effet de l'acide arachidonique sur l'interaction entre Poldip2 et la fraction membranaire.	124
Figure III- 43 : Interaction de Poldip2 avec la fraction membranaire indépendante du cytochrome b558.	125
Figure III- 44 : Effet de Poldip2 sur l'assemblage du complexe NADPH oxydase en présence ou non d'acide arachidonique.	127
Figure III- 45 : Interaction de Poldip2 les protéines cytosolique p47 ^{phox} , p67 ^{phox} et Rac.....	129
Figure III- 46 : Effet de Poldip2 sur NOX2 en absence des fractions cytosolique (FC).....	132

Figure III- 47 : Effet de Poldip2 sur NOX2 non activé. L'activité de NOX2 a été mesurée en suivant la consommation du NADPH à 340 nm.....	132
Figure III- 48 : Effet de Poldip2 sur NOX2 non activé en présence de superoxyde dismutase (SOD).....	133
Figure III- 49 : Effet de Poldip2 sur NOX2 en présence des fractions cytosoliques et d'acide arachidonique.	134
Figure III- 50 : Effet de Poldip2 combiné à une protéine cytosolique sur l'activité de NOX2 avec ou sans acide arachidonique.....	135
Figure III- 51 : Substitution d'une des trois protéines cytosoliques dans le système cell-free par Poldip2 avec ou sans acide arachidonique.....	136
Figure III- 52 : Effet de la concentration de Poldip2 sur l'activité de NOX2 en absence de p47 ^{phox}	137
Figure III- 53 : Effet de Poldip2 dénaturé et non dénaturé sur l'activité de NOX2 en absence de p47 ^{phox}	137
Figure III- 54 : Effet de Poldip2 sur NOX2 en fonction de la séquence d'ajout dans le mélange réactionnel.	139
Figure III- 55 : Représentation schématique des interactions de Poldip2 avec p22 ^{phox} et la membrane.	140
Figure III- 56 : distribution des résidus hydrophobes sur le modèle structural de la protéine Poldip2 basé sur la structure de HspQ.....	141
Figure III- 57 : Représentation schématique des interactions entre protéines cytosoliques au repos (sans AA).....	142
Figure III- 58 : Représentation schématique des interactions des protéines cytosoliques avec le cytochrome b558 activé (avec AA).....	144
Figure III- 59 : comparaison de l'expression de gp91 ^{phox} , Poldip2 et p22 ^{phox} dans les monocytes, neutrophiles et macrophages.....	146
Figure III- 60 : Expression de Poldip2 dans les monocytes isolés de sang humain après traitement par les SiRNA pendant 60 h.....	147

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I- 1 localisation tissulaire, cellulaire et subcellulaire de Poldip2.	4
Tableau I- 2 : Localisation tissulaire et subcellulaire des isoformes de la famille NADPH oxydase.	21
Tableau II- 1 : Liste des anticorps et sonde utilisés pour les expérimentations de Western Blot décrites dans la partie « Résultats et Discussions ».....	49
Tableau II- 2 : Conditions appliquées pour l'étude de l'interaction entre Poldip2 et la FM.	71
Tableau III- 1 : Différentes stratégies d'optimisation du protocole de purification.	95
Tableau III- 2 : Variation de la structure secondaire en fonction des paramètres longueur d'onde et scale factor obtenu par le logiciel BestSel.....	104

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Précipitation au sulfate d'ammonium des protéines.	154
Annexe 2 : Analyse de la structure secondaire de Poldip2 par SRCD.	155
Annexe 3 : Effet de Poldip2 recombinant de rat sur l'activité de NOX4 dans les fractions nucléaires après 12 h de traitement à 10^{-2} μ g/ml doxycycline.	156
Annexe 4 : Effet de l'Acide Arachidonique sur la sédimentation par centrifugation des protéines cytosolique.	156

LISTE DES ABREVIATION

aa	acide(s) aminé(s)	Ect2	<i>Epithelial cell-transforming sequence 2 oncogene</i>
AA	Acide Arachidonique	E. coli	<i>Escherichia coli</i>
AD	Domaine d'Activation	EDTA	Acide ÉthylèneDiamineTétraAcétique
AIR	Région d'AutoInhibition	EFS	Etablissement Français du Sang
Akt	Serine Thréonine Kinase	EGTA	Acide Éthylène Glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	ERAD	<i>ER-Associated Degradation</i>
AOX1	Alcool Oxydase 1	ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
AS	Activité Spécifique	e-	électron
ASM	Activité Spécifique Moléculaire	FAD	Flavine Adénine Dinucléotide forme oxydée
Asn	Asparagine	FADH°	Flavine Adénine Dinucléotide forme partiellement réduite
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	FADH₂	Flavine Adénine Dinucléotide forme totalement réduite
ATR FTIR	<i>Attenuated Total Reflection ; Fourier Transform InfraRed</i>	FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
BMGY	Buffered Glycerol-complex Medium	FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
BMMY	Buffered Methanol-complex Medium	FM	Fraction(s) Membranaire(s)
BSA	Bovine Serum Albumine	fMLP	formyl-Met-Leu-Phe
CAPS	acide N-Cyclohexyl-3-AminoPropaneSulfonique	GAP	<i>GTPase-Activating-Protein</i>
CEACAM1	<i>CarcinoEmbryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 1</i>	GDI	<i>Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitor</i>
CH60	<i>60 kDa heat shock protein</i>	GDP	Guanosine DiPhosphate
cPLA2	cytosolic PhosphoLipase A2	Glu	Glutamine
C-ter	Extrémité carboxy-terminale d'une chaîne polypeptidique	GOPH4	<i>Golgi integral membrane protein</i>
C-terminale	Extrémité carboxy-terminale d'une chaîne polypeptidique	GST	Glutathion S-Transférase
Cys	Cystéine	GTP	Guanosine TriPhosphate
Cytb558	Flavocytochrome <i>b558</i>	Hic-5	<i>H₂O₂-inducible clone 5</i>
Cytc	Cytochrome <i>c</i>	HIF-1	<i>Hypoxia-Inducible Factor-1</i>
DEAE	DiEthylAmnoEthyl	His	Histidine
DH	Domaine DésHydrogénase	HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Hsp	<i>Heat shock protein</i>
DO₆₀₀	Densité Optique à 600 nm	HSR	<i>Heat Shock Response</i>
DPBS	<i>Dulbecco Phosphate Buffer Salin</i>	Ile	Isoleucine
DTT	DiThioThrétol	IPTG	l'IsoPropyl-β-D ThioGalactopyranoside
DUF525	<i>Domaine of Unknown Function 525</i>	Ka	Kanamycine

Kb	Kilobase	Phox	<i>Phagocyte oxidase</i>
Kd	Constante de dissociation	PI	Point Isoélectrique
LB	<i>Luria-Bertani Broth</i>	PI3K	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
LC	Chromatographie Liquide	PKC	Protéine Kinase C
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>	PMA	Phorbol Myristate Acétate
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>	PMMA	Poly(Methyl MethAcrylate),
MASM	<i>Mouse Aortic Smooth Muscle</i>	PMSF	Fluorure de PhénylMéthylSulfonyle
MCT	Mercure Cadmium Tellure	Pol	Polymérase
MIP	<i>Mitochondrial Intermediate Peptidase</i>	Poldip2	Polymerase delta interacting protein 2
MPO	MyeloPerOxydase	Poly+	Région Polybasique
MPP	<i>Mitochondrial Processing Peptidase</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
MR	Récepteur Minéralocorticoïde	PRC1	protéases carboxypeptidase Y
MS	Spectrométrie de Masse	PRB1	protéinase B
mTOR	<i>mechanistic Target Of Rapamycin</i>	PrimPol	Primase/Polymerase
mtSSB	<i>mitochondrial Single-Stranded DNA-Binding protein</i>	PRR	Région Riche en Prolines
M9	Milieu minimum	PtdIns(3)P	PhosphatidylInositol-3-Phosphate
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide forme réduite	PtdIns(3,4)P₂	PhosphatidylInositol-3,4-bisPhosphate
NADP+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate forme oxydée	PX	<i>Phox homology</i>
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate forme réduite	RE	Reticulum Endoplasmique
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i>	REHBD	<i>Regulatory EF-Hand Binding Domain</i>
NCF	<i>Neutrophil Cytosolic Factor</i>	Rev1	Protéine de réparation de l'ADN
NOX	NADPH OXYdase	Rev 7	Sous unité de l'ADN polymérase ζ
N-ter	Extrémité amino-terminale d'une chaîne polypeptidique	RhoA	Ras homologue A
N-terminal	Extrémité amino-terminale d'une chaîne polypeptidique	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
PBR	Région conservée PolyBasique	ROS	Reactive Oxygen Species
PBS	<i>Phosphate Buffer Salin</i>	rpm	rotations par minute
PB1	<i>Phox and Bem 1</i>	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
PDB	<i>Protein Data Bank</i>	SAXS	Small Angle X-rays Scattering
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>	SDS	DodécylSulfate de Sodium
PDI	Protéine Disulfure Isomérase	SDS- PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate PolAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
PDIP38	<i>Polymerase Delta Interacting Protein 38</i>	Ser	Serine
PhosR	Segment Phosphorylable	SHR	Rat Spontanément Hypertensifs

SH3	Sarco H omology 3	TM	Domaine T rans M embranaire (N-Succinimidylloxycarbonylmethyl)
SOD	Super O xide D ismutase	TMPP	tris (2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium bromide
SP	Sulpho P ropyle	TOF	<i>Time Of Flight</i>
SRCD	Synchrotron R adiation C ircular D ichroism	TPR	<i>TetratricoPeptide-Rich region</i>
TBST	Tris B uffered S alin T ween	TS	<i>error free Template Switching</i>
TCA	Acide T ri C hloroacétique	UBZ	<i>Ubiqutin-Binding Zinc finger</i>
TEMED	tetramethylethylenediamine	UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
TGF-β1	<i>Transforming Growth Factor β 1</i>	UV	Ultraviolets
ThOX	T hyroid O Xydase	Val	Valine
Thr	Thréonine	VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cell</i>
Tks	Tyrosine K inase S ubstrate	WB	Western Blot
TLR4	<i>Toll-Like Receptor 4</i>	YPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
TLS	<i>TransLesion Synthesis</i>	YPS1	Protéase aspartyl Yapsin1

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I. Métabolisme cellulaire, rôle des protéines et régulation

D'après Lehninger. (1982) (1) ; Lesk. (2016) (2) ; Pawson et Gish. (2005) (3) ; Voet et Voet. (1995) (4).

Le métabolisme d'une cellule regroupe l'ensemble des voies métaboliques nécessaires à assurer les fonctions vitales. Ces différentes voies consistent (i) à produire de l'énergie chimique à partir de la dégradation de nutriments riches en énergie, (ii) à convertir ces nutriments en précurseurs moléculaires, (iii) à assembler ces précurseurs pour former des macromolécules de protéines, de lipides, d'acides nucléiques ou de polysaccharides et (iv) à former ou dégrader les biomolécules requises pour certaines fonctions spécifiques de la cellule. Toutes ces voies consistent en des milliers de réactions biochimiques catalysées par des enzymes qui fonctionnent en coordination pour assurer la survie des cellules mais également leur adaptabilité à des changements d'environnements, ou en réponses à des signaux intrinsèques ou extrinsèques. Cette coordination nécessite que ces réactions soient finement régulées. Pour cela, la cellule possède d'autres protéines tout aussi importantes qui assurent d'autres fonctions biologiques nécessaires à son bon fonctionnement. Parmi ces protéines, il y a celles dites régulatrices. Ces protéines n'ont pas d'activité biologique propre en elle-même et possèdent souvent des domaines (dont le nombre peut varier ainsi que la longueur en acides aminés) qui sont capables de se reconnaître et de s'assembler entre eux pour former un complexe protéique. Ainsi, après certains signaux spécifiques (phosphorylation, fixation de ligand), ces protéines passent d'une conformation inactive à une conformation active parfaitement adaptée pour s'assembler à ces enzymes *via* des interactions protéine-protéine et par conséquent contrôlent l'état actif ou inactif de ces enzymes. Ces protéines régulatrices, comme c'est le cas de Poldip2, sont ainsi capables de réguler l'activité d'autres protéines en formant des complexes avec ces dernières.

II. Poldip2

II.1. Information structurale : une organisation en domaines

Poldip2 (*Polymerase Delta-Interacting Protein 2*) connue aussi sous le nom de PDIP38 (5–8) ou mitogenin I (9) est une protéine soluble de 42 kDa (368 aa) avec une séquence d'adressage à la mitochondrie qui, lorsqu'elle est clivée, conduit à une protéine de 37 kDa. Le gène de cette protéine est localisé chez l'homme sur le chromosome 17 q11.1-q11.2 (10). En plus de la séquence d'adressage à mitochondrie, cette protéine possède deux domaines fonctionnels (Figure I- 1) : le domaine « DUF525 » et le domaine « YccV-like » (11).

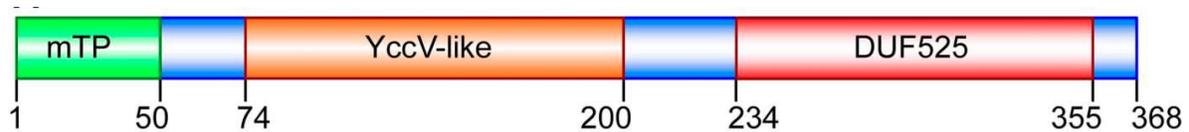


Figure I-1 : Représentation de la séquence N-terminale et des deux domaines fonctionnels de Poldip2.
D'après Hermandes *et al.* (2017) (11).

L'analyse de séquence de Poldip2 par BLAST montre une homologie de séquence avec différentes protéines. Poldip2 présente 30 % d'identité de séquence avec la protéine ApaG. Le domaine DUF525 de la protéine Poldip2 présente une séquence conservée de 111 résidus présents au sein de la protéine ApaG (126 aa) d'*E. coli* (8). Ce domaine, impliqué dans les interactions protéine-protéine (12), est également présent dans la partie C-terminal de certaines protéines de la famille des F-box protéines (13). Cette famille de protéine présente 32 % d'identité de séquence avec Poldip2.

Le domaine YccV-like est un domaine qui se retrouve dans la superfamille des YccV protéines et qui est hautement conservé chez les eucaryotes. On retrouve notamment ce domaine dans la protéine HspQ (**H**eat **s**hock **p**rotein **Q**), une protéine chaperonne de la bactérie *E. coli*. Il serait également impliqué dans la fixation de l'ADN hémiméthylé et dans la régulation de l'expression du gene *dnaA* (14), ainsi que dans la dégradation des protéines dénaturées en réponse à un choc thermique (15).

Les données de la littérature suggèrent donc que la protéine Poldip2 serait impliquée dans les processus d'interactions protéine-protéine, dans le transport de cations, et la régulation de l'ADN. La structure de Poldip2 n'étant pas encore résolue, seules des prédictions de structure basées sur l'analogie avec d'autres structures présentes dans des banques de donnée sont possibles pour l'instant. Ce manque d'information structurale peut être lié à la difficulté d'exprimer cette protéine de manière hétérologue. Depuis sa découverte en 2003 par Liu *et al.* (8) des tests d'expression et de purification ont été fait par différentes équipes en système bactérien, *E. coli* (5, 6, 16, 17). Aucune information quant au rendement de purification ou à la concentration de l'échantillon en fin de purification n'est disponible dans la littérature. Le seul fait mentionné consiste en ce que cette protéine est peu soluble, que 90 % de cette protéine est sous forme de corps d'inclusion (5) et que sa solubilité est améliorée lorsque un tag GST est ajouté en N-terminal de la séquence (16). Des essais d'expression de Poldip2 dans des lignées de cellules mammifères (HeLa¹, MCF7², 293T³, C2C12⁴, H1229⁵) ont également été faits (5, 7, 9, 18). Ces essais ayant pour objectif d'effectuer des études fonctionnelles, aucune purification de la protéine recombinante n'y a été décrite.

¹ HeLa : lignée de cellules cancéreuses isolées de cancer du col de l'utérus (humain)

² MCF7 : lignée cellulaire d'adénocarcinome de sein (humain)

³ 293T : lignée de cellules embryonnaire de rein (humain)

⁴ C2C12 : lignée cellulaire de myoblast (souris)

⁵ H1299 : lignée de cellule épithéliale cancéreuse de poumon (humain)

II.2. Localisation et régulation de l'expression

Depuis sa découverte En 2003 par Liu *et al.* à partir d'un test de double hybride utilisant une banque d'ADNc de placenta humain (8), les études sur cette protéine se sont multipliées et ont démontré qu'elle est localisée dans différents organes et types cellulaires (Tableau I- 1) où elle interagit avec une pléthore de partenaires lui permettant de jouer différents rôles importants dans l'organisme.

Tableau I- 1 localisation tissulaire, cellulaire et subcellulaire de Poldip2.
D'après *Hernandes et al. (2017) (11).*

Organes	Cellules et lignées cellulaires	Compartiments subcellulaires
Aorte, poumon, rein, cœur, thyroïde, foie, os	cellules du muscle lisse vasculaire (VSMC), cellules endothéliales du cerveau, cellules épithéliales, fibroblastes, myoblastes, cellules endothéliales du cordon ombilical, cellules corticales des neurones, osteoblastes, HeLa, MRC5 ⁶ , HEK293 ⁷ ,	Noyau, mitochondrie, membrane plasmique, cytoplasme, fibre de stress

Comme mentionné dans le Tableau I- 1, Poldip2 est présente dans plusieurs organes. L'analyse comparative de l'expression de Poldip2 dans des tissus isolés du rat faite par Lyle *et al.* (2009) montre que Poldip2 est fortement exprimé dans le rein. Il est présent en moindre quantité dans le cœur, l'aorte, le diaphragme et le poumon et complètement absent de la rate et du thymus (19). La différence des niveaux d'expression de cette protéine est sans doute liée aux rôles assurés dans ces organes.

La **localisation subcellulaire** de Poldip2 n'est pas identique dans toutes les cellules. Elle dépend du type cellulaire. Poldip2 est exprimé dans le cytoplasme, le noyau et les fibres de stress des cellules du muscle lisse vasculaire VSMC (*Vascular Smooth Muscle Cell*) (19). Dans les lignée de cellules HeLa, 293T et MCF7, il est majoritairement présent dans les mitochondries, avec une localisation à la matrice mitochondriale pour les cellules HeLa (5). Une faible expression dans le noyau de ces cellules est aussi détectée (5, 7). Dans les lignées de cellules myoblastes C2C12, il est fortement exprimé dans les mitochondries, mais aucune localisation au noyau n'est décrite (9). Dans de nombreuses lignées cellulaires (IEC18⁸, HeLa, RBE⁹, et NBT-II¹⁰), il est présent dans le noyau, le cytoplasme et la membrane plasmique. Dans le dernier type cellulaire, sa localisation subcellulaire est sous le contrôle de l'antigène

⁶ MRC5 : lignée de fibroblaste embryonnaire de poumon humain (humain)

⁷ HEK293 : lignée de cellules embryonnaire de rein (humain)

⁸ IEC18 : lignée de cellules épithéliales d'intestin grêle (rat)

⁹ RBE : cellules endothéliales de cerveau (rat)

¹⁰ NBT-II : lignée cellulaire isolée de carcinome de vessie (rat)

carcinoembryonnaire CEACAM1 (*CarcinoEmbryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 1*) et dépend de l'état quiescent de la cellule. Pour les cellules non confluentes, le marquage de l'antigène CEACAM1 par un anticorps induit une translocation de Poldip2 à la membrane plasmique, alors que ce même traitement effectué aux cellules confluentes, induit une translocation de Poldip2 au noyau. Ces différences de localisation subcellulaire suggèrent que Poldip2 joue le rôle de médiateur de signaux en naviguant entre les compartiments cellulaires pour transférer les informations de la surface de la cellule jusqu'à la machinerie génétique (6). Arakaki *et al.* (2006) observe également une distribution de Poldip2, initialement localisée dans la mitochondrie (phase S), entre les mitochondries et le noyau lorsque la cellule est en phase G2/M de son cycle cellulaire et jusqu'à la fin de la phase G1 (9). En plus de l'antigène CEACAM1, Poldip2 est aussi régulé par le facteur de croissance de fibroblastes FGF (*Fibroblast Growth Factor*), cytokine qui favorise la formation des os et l'équilibre entre formation et résorption osseuse. En présence de cette cytokine, l'expression de Poldip2 est inhibée dans les ostéoblastes, supprimant leur capacité migratoire et par conséquent la formation osseuse. Par ailleurs, les auteurs observent une augmentation, avec l'âge, de son expression dans les os de souris. Par conséquent, cette protéine pourrait être un marqueur de vieillissement des os (20). Poldip2 serait aussi un des marqueurs lié au dimorphisme sexuel de la thyroïde. En effet, l'expression de cette protéine est augmentée dans les thyrocytes de rat femelle et serait en lien avec l'importance de la prévalence des maladies thyroïdiennes chez les femmes (21). L'expression de Poldip2 est aussi sensible à la concentration à l'oxygène. Dans des conditions d'hypoxie l'expression de Poldip2 est diminuée ce qui induit un chagement du catabolisme cellulaire permettant à la cellule de s'adapter à son nouvel environnement (22).

II.3. Fonctions connues de Poldip2 dans les cellules

La localisation quasi-ubiquitaire de Poldip2 permet à cette protéine d'intervenir dans plusieurs fonctions biologiques et d'être également impliquée dans différentes pathologies.

- **Rôle dans la réparation de l'ADN**

Grace à un test double hybride, Liu *et al.* (2003) identifie une nouvelle protéine qui interagit avec la protéine p50 sous-unité de la polymérase δ , enzyme responsable de la réplication de l'ADN, qu'ils nommeront PDIP38, et rebaptisé plus tard Poldip2. Ils montrent également que Poldip2 interagit avec PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), connu chez les eucaryotes, comme étant un homotrimère qui forme un anneau autour de l'ADN pour orienter et stabiliser les ADN polymérases. Il a donc été proposé que Poldip2 intervient dans la réplication et la réparation de l'ADN en renforçant l'interaction entre la polymérase δ et le PCNA (8) en se fixant à la sous-unité p50. Le rôle de cette interaction n'a pas été identifié. Néanmoins cette information est un premier indice de l'implication de Poldip2 dans la réplication de l'ADN (8). Plus tard, d'autres études montrent que Poldip2 interagit avec différentes familles de

polymérase impliquées dans la réparation de l'ADN. Lorsque des dommages de l'ADN sont présents la progression de la polymérase δ est bloquée. D'autres polymérase plus spécialisées prennent le relais pour effectuer les réparations nécessaires et contourner l'obstacle. Ce mécanisme de réparation, décrit dans la Figure I- 2, est appelé « *TransLesion Synthesis (TLS)* ».

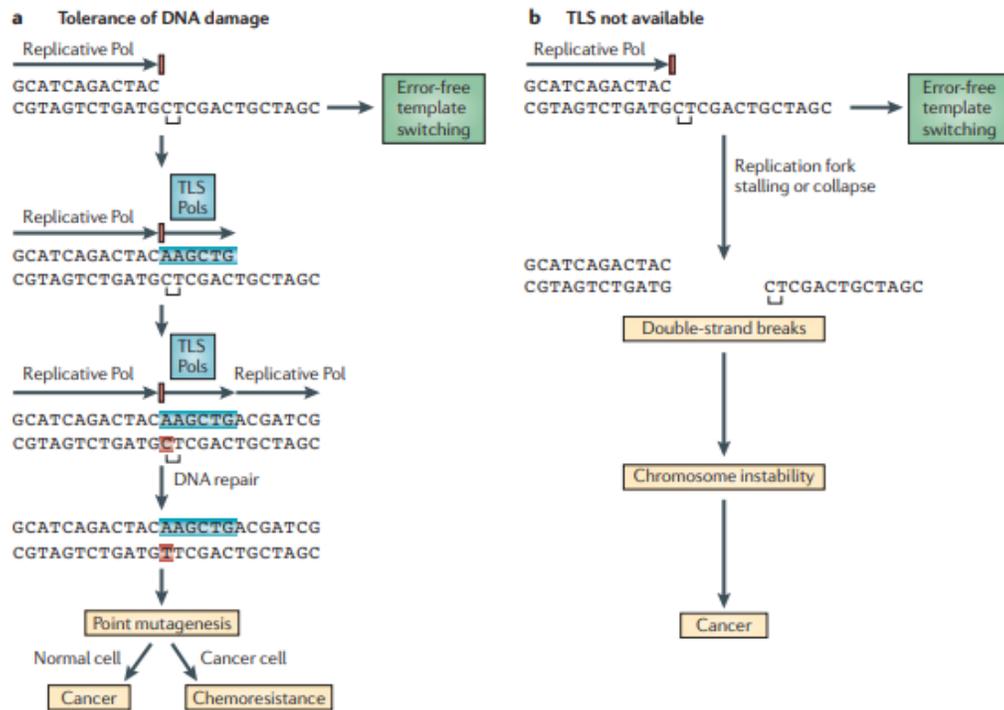


Figure I- 2 : Mécanisme de réparation de l'ADN par TLS (TransLesion Synthesis).

Lorsque les polymérase TLS (TransLesion Synthesis) (*Pol* ; bleu) sont disponibles, la lésion de l'ADN peut être contournée par le système TLS et causer éventuellement des mutations (surlignées en rouge) ou peut être restaurée par un système dit « template switching ». En absence d'une polymérase TLS, la réparation par le système TLS ne peut pas se faire et conduit la cassure dans le double brin d'ADN, à l'instabilité du chromosome et l'augmentation du risque de cancer (23).

Tissier *et al.* (2010) montre que Poldip2 interagit avec les Polymérase rev1, Pol ζ (via rev7) et Pol η . L'interaction avec cette dernière se fait sur son domaine de liaison de l'ubiquitine au doigt de zinc UBZ (*Ubiquitin-Binding Zinc finger*) impliqué également dans la reconnaissance du PCNA. L'interaction de Poldip2 avec PCNA induirait un échange entre Pol η et les polymérase répliquatives pendant le TLS. Les auteurs observent une augmentation du nombre des cellules contenant des foyers d'accumulation de Pol η en absence de dommage à l'ADN après déplétion du gène de Poldip2. Selon leur hypothèse, la fixation de Poldip2 à Pol η empêche cette dernière d'entrer en compétition avec les polymérase répliquatives sur les fourches d'ADN non endommagées (24). Poldip2 interagit également avec une autre polymérase du système TLS, la polymérase λ (pol λ), responsable des corrections des bypass des 8-oxo-7,8dihydroguanine qui sont des lésions de l'ADN dues au stress oxydatif. Cette interaction permettrait d'augmenter l'efficacité

catalytique et la processivité¹¹ des polymérase (17). Au vu de ces différentes interactions de Poldip2 avec les différentes polymérase précédemment citées, il a été proposé que Poldip2 joue le rôle d'une protéine chaperonne qui coordonne l'interaction des polymérase avec le PCNA (17). Il a également été montré que Poldip2 interagit avec la polymérase PrimPol¹². Cette interaction entraîne les mêmes effets (efficacité catalytique et processivité) à la différence que pour cette polymérase, l'interaction n'implique pas la protéine PCNA. L'interaction entre PrimPol et Poldip2 est spécifique de deux résidus présents sur la séquence d'adressage à la mitochondrie dans Poldip2. PrimPol est, comme Poldip2, une protéine localisée à la fois à la mitochondrie et au noyau. En tenant compte du fait que lorsque Poldip2 est localisé à la mitochondrie, cette séquence est clivée, cette interaction entre ces deux protéines n'est plus possible dans ce compartiment. Le rôle de Poldip2 serait donc dépendant de sa localisation (16).

Poldip2 n'intervient pas seulement dans le système de réparation TLS, il est également impliqué dans le mécanisme de réparation « *error-free Template Switching (TS)* ». Dans les cellules DT40¹³ et TK6B¹⁴, il a été montré que la diminution de l'expression de Poldip2 diminue le taux de réparation par TLS au profit du mécanisme TS. De plus, Poldip2 serait capable d'augmenter le taux de réparation par TLS sans faire intervenir les polymérase pol η , pol λ et PrimPol. Cette protéine serait donc capable de contrôler le mécanisme de tolérance aux dommages de l'ADN en passant du mécanisme TS au mécanisme TLS (25). Il a été montré dans la littérature que les cellules où le gène codant pour Poldip2 a été délété, étaient plus sensibles aux rayons UV suggérant un rôle de Poldip2 dans le mécanisme de tolérance à ce type de rayonnement (16, 24–26). Wong *et al.* (2013) montre que, suite à un traitement aux UV, Poldip2 n'est pas recruté au niveau de l'ADN sur les sites altérés par les UV, mais transloqué aux spliceosomes nucléaires. Par ailleurs, les auteurs suggèrent que, bien que Poldip2 ne possède pas de domaine de fixation de l'ARN, il jouerait un rôle dans l'épissage de l'ARNm de gène impliqué dans le cancer et la réponse au stress génotoxique. Ce rôle serait assuré soit par un domaine non spécifique à la fixation de l'ARN soit en servant de protéine chaperonne permettant des interactions protéine–protéine facilitant ainsi l'épissage de ces ARNm. Poldip2 répondrait donc à un stress génotoxique en transloquant au spliceosome où il participerait à la régulation de l'épissage de l'ARNm des gènes impliqués (26).

¹¹ La processivité est la capacité d'une enzyme à catalyser des réactions successives sur une même molécule, sans la relâcher. C'est le cas des polymérase qui catalysent la polymérisation d'une chaîne d'ADN

¹² PrimPol est une enzyme eucaryote qui joue le rôle d'ADN Polymérase et d'ADN primase (ARN polymérase qui permet la synthèse de courts segments d'ARN qui sont ensuite utilisés comme amorces par l'ADN polymérase répllicative)

¹³ DT40 : lignée de lymphoblaste isolé de rate (humain)

¹⁴ TK6B : lignée de lymphoblaste (poulet)

- **Rôle dans la mitochondrie**

Un des premiers travaux réalisé sur Poldip2 par Xie *et al.* En 2005, montre que cette protéine est localisée dans la mitochondrie, ce qui est cohérent avec la présence de la séquence d'adressage à la mitochondrie présente en N-terminal (7). Dans un deuxième article, publié peu après, ils montrent que Poldip2 n'est pas capable de s'associer directement à l'ADN mais interagit avec trois protéines mitochondriales capables de fixer l'ADN mitochondrial simple brin : la mtSSB (*mitochondrial Single-Stranded DNA-Binding protein*), une *heat-shock* protéine CH60 et une protéine homologue de la Lon protéase. Ces premières informations suggèrent que Poldip2 serait impliqué dans le métabolisme mitochondrial (5). En 2006, Arakaki *et al.* confirme la co-localisation de Poldip2 et mtSSB dans la mitochondrie. Une augmentation de l'expression de Poldip2 augmente le nombre de mitochondries allongées. En revanche son inhibition augmente le nombre de mitochondries fragmentées. L'augmentation ou l'inhibition de mtSSB provoque l'effet inverse sur la morphologie des mitochondries. Ces deux protéines régulent donc respectivement les processus de fusion et fission des mitochondries, processus impliqués dans la régulation de l'apoptose (9). Plus récemment, il a été montré que Poldip2 est impliqué dans la régulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les mitochondries puisqu'une diminution de l'expression de cette protéine entraîne une diminution de la production des ROS dans ces organelles (27). Les auteurs suggèrent deux hypothèses à ces observations dont une diminution de l'activité de la NADPH oxydase, NOX4 (qui sera décrite plus loin), impactée par la diminution de l'expression de Poldip2.

II.4. Rôles physio(patho)logiques de Poldip2

- **Rôle dans la survie et la prolifération cellulaire**

Il semble que Poldip2 soit une protéine essentielle dont l'absence ne peut pas être compensée par d'autres acteurs puisque les souris homozygote *knockout* Poldip2^{-/-} naissent plus petites que les souris normales et ne survivent pas au-delà de quelques jours qui suivent leur naissance, suggérant que la délétion de son gène est létale (28, 29). Par ailleurs, la délétion du gène de cette protéine réduit la croissance des fibroblastes embryonnaires de souris et augmente l'autophagie de ces cellules. Une accumulation des cellules en phase G1 est observée avec une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans l'initiation de la synthèse de l'ADN. La prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire est également impacté lorsque le gène de Poldip2 est déleté (29). Chez les souris Poldip2^{+/-}, une diminution de l'expression de Poldip2 a été observée associée à une diminution du PCNA en parallèle d'une augmentation de l'expression d'une protéine (p21) inhibitrice du cycle cellulaire. La diminution de l'expression de Poldip2 chez ces souris impacte la formation et la régénération des cellules de l'artère lésée. Une diminution de la prolifération cellulaire a également été observée *in vitro* après traitement des cellules du muscle lisse aortique de rat par des SiRNA dirigés contre Poldip2. Un des mécanismes suggérés est que la diminution

de l'expression de Poldip2 déstabilise l'interaction entre la polymérase δ et PCNA favorisant l'interaction de ce dernier avec la protéine p21 ce qui participerait à la réduction de la progression du cycle cellulaire (30). Poldip2 serait également impliqué dans la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire *via* la voie d'activation de la protéine RhoA par le facteur de transformation des cellules épithéliale (Ect2) (31). Dans les myoblastes de souris, un traitement par des SiRNA dirigés contre Poldip2 diminue le nombre de cellules vivantes d'un facteur 2 (9). De même, les fibroblastes MRC5 deviennent plus sensibles aux traitements UV lorsque l'expression de Poldip2 est diminuée (24). Ces éléments suggèrent que Poldip2 joue un rôle essentiel dans le déroulement normal de la croissance et la prolifération cellulaire en modulant l'expression de certains gènes impliqués dans la division cellulaire (18, 29). Le rôle de Poldip2 dans la division cellulaire est consolidé par une étude de Klaile *et al.* En 2008. Les auteurs observent une désorganisation du fuseau mitotique, une ségrégation aberrante des chromosomes ainsi que des cellules multi-nucléées lorsque celles-ci sont traitées par des anticorps ou des ARN dirigés contre Poldip2. Par conséquent, Poldip2 serait impliqué à différents stades du cycle cellulaire en permettant une division cellulaire correcte (32).

- **Implication de Poldip2 dans le système cardiovasculaire**

Dans les cellules du muscle lisse vasculaire, Poldip2 régule l'enzyme NADPH oxydase NOX4 (19). NOX4, comme on le verra plus loin, est une enzyme qui produit du peroxyde d'hydrogène. Dans ces cellules, les espèces réactives de l'oxygène générées par NOX4 activent la protéine RhoA, ce qui renforce, au final, l'adhésion focale et augmente la formation des fibres de stress¹⁵. Par ailleurs, la délétion de Poldip2 ou de NOX4 induit une perte de ces ultrastructures cellulaires. La surexpression ou la délétion de Poldip2 impacte la dynamique des points d'adhésion focale¹⁶ suggérant un rôle dans la régulation de la migration des cellules du muscle lisse vasculaire (19, 33) dont le mécanisme est décrit dans la Figure I- 3.

¹⁵ Fibre de stress : est une structure contractile composée de filaments d'actine associés à des filaments de myosine. Les fibres de stress fournissent une force contractile qui contribue à la migration cellulaire.

¹⁶ Point d'adhésion focale : est un complexe de protéines (taline, FAK, paxilline) qui s'associe au filament d'actine pour former les fibres de stress.

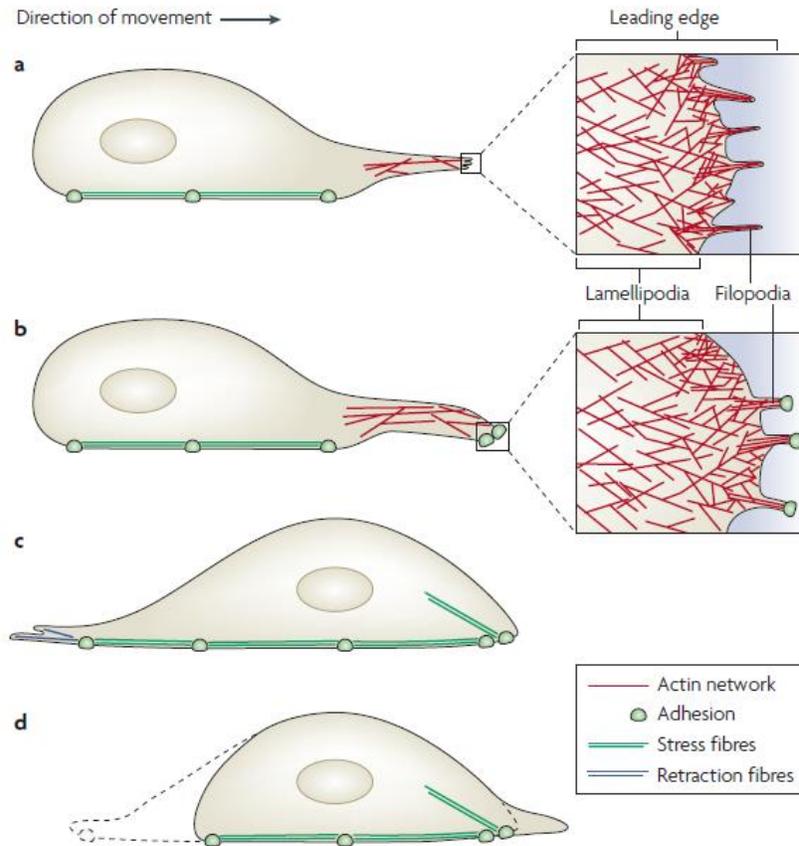


Figure I- 3 : La migration cellulaire est dépendante de différentes structures des filaments d'actine. (a) La migration débute par la polarisation de la cellule avec l'établissement de protrusions à l'avant de la cellule (leading edge), composées de lamellipodes et de filopodes. (b) Durant l'extension de la membrane plasmique, de nouvelles adhésions s'établissent à l'avant de la cellule. (c) Ensuite, le noyau et le corps cellulaire sont amenés vers l'avant grâce aux forces générées par les filaments d'acto-myosine des fibres de stress sur le support de culture, via des sites d'adhésions focales associés aux fibres de stress. (d) Enfin, l'arrière de la cellule est rétracté grâce au désassemblage des adhésions à ce site et la rétractation des fibres (34).

En effet le modèle proposé par Dalta *et al.* (2014) montre que Poldip2 contrôle la migration cellulaire *via* une voie de signalisation impliquant l'activation de la protéine Rho A et l'autophosphorylation de la protéine FAK (*Focal Adhesion Kinase*) induite par l'augmentation du peroxyde d'hydrogène (Figure I- 4). La surexpression de Poldip2 qui augmente la production de peroxyde d'hydrogène prévient la dissolution des points d'adhésion focale à l'arrière de la cellule. Le maintien de ces points d'adhésions provoque une extension de la cellule avec une incapacité à polariser et à migrer. De même, un niveau faible de Poldip2 inhibe la phosphorylation des protéine FAK ce qui empêche la cellule de former de nouveaux points d'adhésion focale et de migrer (35).

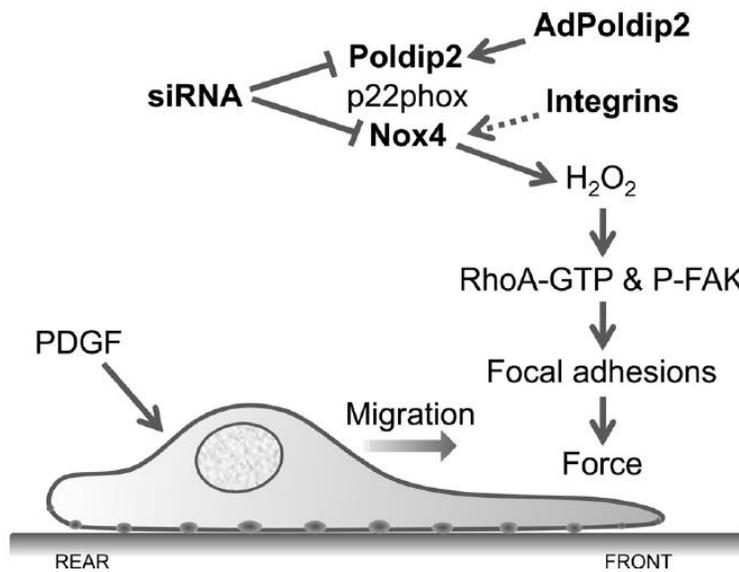


Figure I- 4 : modèle proposé pour le contrôle de la migration des VSMC par Poldip2.
 La migration cellulaire est stimulée par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF).

Le rôle de Poldip2 dans la maturation des points d'adhésion focale qui impliquent les filaments d'actine et la migration cellulaire fait appel à un autre mécanisme. Vukelic *et al.* (2018) montre que l'oxydation des filaments d'actine est exacerbée par une surproduction de Poldip2 dans les cellules du muscle lisse vasculaire. Une diminution de l'expression de Poldip2 ou NOX4 ou une neutralisation du peroxyde d'hydrogène inhibe l'oxydation des filaments d'actine ce qui impacte la maturation des points d'adhésion focale, et empêche alors la migration cellulaire. (36).

Poldip2 est impliqué dans la formation de la matrice extracellulaire du système vasculaire. Chez les souris *knockout* Poldip2^{+/-}, la diminution du niveau d'expression de Poldip2 altère la matrice extracellulaire aortique, entrave la contractilité de l'aorte et augmente la rigidité vasculaire. Par ailleurs, une diminution de production de peroxyde d'hydrogène induit une augmentation de la production de collagène I chez ces souris, ce qui, par conséquent, les protègent du risque de développer une dilatation aortique (28). Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Fujii *et al.* (2016) qui propose un autre mécanisme par lequel Poldip2 est impliqué dans l'augmentation de la matrice extracellulaire. Une déplétion de Poldip2 dans les cellules du muscle lisse aortique de souris (MASM) induit une augmentation de l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR¹⁷, impliquée dans la régulation de synthèse des protéines et qui est associée à une augmentation de l'expression de l'intégrine β -1. Cela conduit à l'augmentation de production du

¹⁷ PI3K/Akt/mTOR : voie de signalisation qui régule l'apoptose, la croissance et le cycle cellulaire d'une cellule.

collagène I (37). Poldip2 est aussi impliqué dans le processus de néovascularisation. En condition d'ischémie, les souris hétérozygote Poldip2^{+/-} présentent une diminution de la production de ROS associée à une diminution de l'activité des métalloprotéases, de la prolifération des cellules endothéliale et de la formation d'artérioles (38). Du fait de sa localisation dans les cellules du muscle lisse vasculaire et des différentes fonctions dont il est responsable, Poldip2 est donc associé à certaines pathologies cardiaques. Chez les patients atteints de sténose valvulaire aortique, on a observé un niveau d'expression de Poldip2 et NOX4 plus faible au niveau du tissu du myocarde que chez les sujets sains. Cette diminution est probablement corrélée à une diminution de peroxyde d'hydrogène qui, en fonction de sa dose, détermine l'évolution (apoptose ou hypertrophie) des cardiomyocytes (39). Un diagnostic prénatal chez un bébé mâle montre une duplication d'un fragment du chromosome 17. Le suivi postnatal du bébé montre qu'il présente en plus d'un retard de développement néonatal et d'un retard de développement du langage, une déficience ventriculaire septale. Ce dernier symptôme a été attribué à la duplication du gène de Poldip2 (10).

- **Implication de Poldip2 dans le système nerveux central**

Les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington ou encore la sclérose amyotrophique latérale sont généralement caractérisées par une accumulation des agrégats des protéines Tau associé à une dégénérescence fibrillaire et une dérégulation du mécanisme de l'autophagie. Il a été montré que Poldip2 joue un rôle dans ces tauopathies en augmentant l'agrégation des protéines Tau en activant la protéine RhoA *via* l'augmentation des ROS produits par NOX4. De plus, Poldip2 impacte le mécanisme d'autophagie et l'activité du protéasome. Par conséquent, Poldip2 joue un rôle de régulateur positif des maladies neurodégénératives *via* la stimulation de production de ROS et l'inhibition du mécanisme de dégradation de protéines (40). En plus des maladies neurodégénératives, Poldip2 joue un rôle dans l'ischémie cérébrale. Suite à une attaque cérébrale, les souris *knockout* Poldip2^{+/-} présentent un taux de survie plus important que les souris normale. La sous-expression de Poldip2 chez ces souris limite la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et l'expression de cytokines et de métalloprotéases impliquées dans ce processus. Poldip2 serait donc une nouvelle cible dans le développement de thérapie pour prévenir les œdèmes cérébraux en cas d'ischémie cérébrale (41). Des effets similaires sont aussi observés dans le syndrome de détresse respiratoire aigüe. Il a été montré qu'une diminution de l'expression de Poldip2 minimise la perméabilité vasculaire pulmonaire et la réaction inflammatoire pulmonaire en limitant l'infiltration des leucocytes (monocytes et neutrophiles) dans les poumons réduisant ainsi les œdèmes pulmonaires. Poldip2 serait, comme dans le cas de l'ischémie cérébrale, une cible thérapeutique régulatrice des complications rencontrées lors du syndrome de détresse respiratoire aigüe (27).

- **Implication de Poldip2 dans le cancer**

L'implication de Poldip2 dans les maladies cancéreuses n'a été étudiée que plus récemment. Plusieurs études génétiques ont identifié le gène de cette protéine comme étant oncogène. En 2010, Grinchuk *et al.* ont été les premiers à montrer dans leur étude un lien entre le gène de Poldip2 et le cancer du sein (42). Plus tard, en 2016, Chian *et al.* montrent que les cellules mononuclées du sang périphérique expriment l'ARNm de Poldip2. Les patients qui expriment ces ARNm sont souvent des hommes et sont plus à risque de développer le cancer du poumon (43). Chen *et al.* (2018) observe une diminution de l'ARNm de Poldip2 dans 14 tissus du cancer du poumon. Ils montrent également qu'une diminution de Poldip2 dans des lignées cellulaires de poumon (H1299 et A549¹⁸) diminue la tumorigénicité, la métastase et l'expression de marqueurs de prolifération cellulaire. Poldip2 est un oncogène qui favorise la prolifération des cellules tumorales. L'expression de Poldip2 contribue donc à la progression et la métastase du cancer de poumon en régulant l'expression des gènes associés au cycle cellulaire et la voie de signalisation de transition épithélio-mésenchymateuse (18). La caractérisation de l'exome de sarcome non différencié de la langue chez un patient de 31 ans a mis en évidence 19 mutations dont une sur le gène de Poldip2. Ces mutations révèlent un profil génétique unique qui caractérise ce cancer (44). Pour déterminer les gènes impliqués dans la chimiorésistance du cancer sarcome d'Ewing, l'expression de certains gènes est comparée avant et après traitement par deux molécules (la doxorubicine et la vincristine) classiquement utilisées pour traiter ce type de cancer. Cette étude de comparaison a permis de mettre en évidence que la résistance à la chimiothérapie dans le cas du cancer sarcome d'Ewing est associée à la surexpression de Poldip2 (45). Dans les cellules cancéreuses ou sous condition hypoxie, la lipoylation¹⁹ des enzymes pyruvate déshydrogénase et α -cétoglutarate déshydrogénase (enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale) est inhibée pour maintenir la respiration mitochondriale. Dans les cellules déficientes en Poldip2, la diminution de la lipoylation réduit les fonctions mitochondriales et induit la stabilisation du facteur d'hypoxie HIF-1 (**Hypoxia-Inducible Factor-1**) qui joue un rôle majeur dans les processus d'angiogenèse et de prolifération cellulaire. Les auteurs observent également que Poldip2 est réprimé dans les cellules cancéreuses ou cellules sous hypoxie provoquant une diminution de la lipoylation. Par ailleurs, la surexpression de Poldip2 augmente la lipoylation mitochondriale ce qui induit une augmentation de la respiration mitochondriale et une diminution du taux de croissance des cellules cancéreuses. Par conséquent,

¹⁸ A549 : lignée de cellule épithéliale de poumon

¹⁹ Modification post-traductionnelle qui consiste à ajouter un lipoamide à un résidu lysine *via* une liaison amide.

Poldip2 régule la lipoylation mitochondriale permettant une adaptation des cellules cancéreuses et des cellules normales aux conditions d'hypoxie à leur nouvel environnement (22).

- **Rôle de Poldip2 dans le rein**

Dans le rein, l'association de Poldip2 avec NOX4 augmente la production de ROS ce qui a pour conséquence d'activer différentes voies de signalisation dans les cellules rénales afin d'assurer certaines fonctions biologiques de cet organe dont la diurèse (46) ou encore la formation de fibroblastes (47, 48). Ces deux protéines peuvent également être associées à des pathologies rénales. En 2016, Saez *et al.* décrivent une co-localisation de Poldip2 et NOX4 dans le cytoplasme des cellules médullaire rénales. Suite à son interaction avec Poldip2, NOX4 migre vers le noyau *via* un mécanisme impliquant les **Protéines Kinase C** (PKC). Cela conduit à une augmentation de la concentration en H₂O₂ dans le noyau pour activer la transcription de certains gènes (49). En 2015, Lin *et al.* observent également une co-localisation de NOX4 et de Poldip2 dans le pelvis rénal. L'interaction entre ces deux protéines est augmentée par la pression intrapelvique ce qui induit une augmentation de la génération de peroxyde d'hydrogène par NOX4 dans ce compartiment. Ce mécanisme est impliqué dans le contrôle de la réponse diurétique médiée par le nerf sensoriel rénal (46). Dans le rein, Poldip2 est également responsable de l'activation des myofibroblastes *via* une voie de signalisation impliquant plusieurs acteurs. Il a été montré que le TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor β 1*) augmente d'une part l'expression de NOX4 et son activité. D'autre part, le TGF- β 1 stimule la protéine RhoA-GTP et active Rho kinase qui régulent, toutes deux, l'expression de Poldip2. L'augmentation de l'expression de NOX4/Poldip2 active les myofibroblastes (Figure I- 5) (47). Il est à noter que l'activation des fibroblastes dermiques est aussi induite par le couple NOX4/Poldip2. La diminution de l'expression de NOX4 dans ces cellules réduit la synthèse de collagène de la peau et l'expression des marqueurs d'activation de fibroblastes de la peau (48).

En plus des voies de signalisation, Poldip2 est impliqué dans certaines complications associées aux maladies rénales. En voici quelques exemples :

Un régime alimentaire riche en graisse administré à des rats induit une obésité, une résistance à l'insuline et à une augmentation des lésions hépatiques et rénales médiées très probablement par la voie de signalisation associant NOX4 et le **Récepteur Minéralocorticoïde (MR)**, protéine de la superfamille des récepteurs nucléaires et stéroïdes. Les auteurs suggèrent que l'association « récepteur minéralocorticoïde/NOX4/Poldip2 » serait impliquée dans le changement de morphologie de l'ultrastructure du rein (tubules basophiles du rein) et du foie (foyer prénéoplastique) (50). Les contractions myogéniques protègent le rein de certaines complications associées aux maladies rénales chroniques. Ces contractions sont contrôlées par une balance entre anions superoxydes produits par NOX2 (rôle activateur) et peroxyde d'hydrogène produits par NOX4 (rôle inhibiteur). L'augmentation de la pression de perfusion

chez souris souffrant de maladies rénales chroniques induit une augmentation d'anions superoxydes et de peroxyde d'hydrogène associée à une diminution des contractions myogéniques. Les souris hétérozygotes déficientes en Poldip2^{+/-} présentent une diminution du niveau de peroxyde d'hydrogène, mais le niveau d'anion superoxyde est maintenu avec une activité myogénique normale. Par conséquent, Poldip2/NOX4 serait impliqué dans la réponse myogénique *via* la production de peroxyde d'hydrogène (51). La concentration élevée en sel, les ROS et l'angiotensine II favorisent la progression des maladies rénales chroniques. Il a été montré chez les souris qui ont subi une réduction de la masse rénale et auxquelles on a administré un régime riche en sel que l'anion superoxyde produit par NOX2, isoforme de NOX4, et le peroxyde d'hydrogène produit par NOX4/Poldip2, augmentent la contraction de l'artériole induite par l'angiotensine II (52).

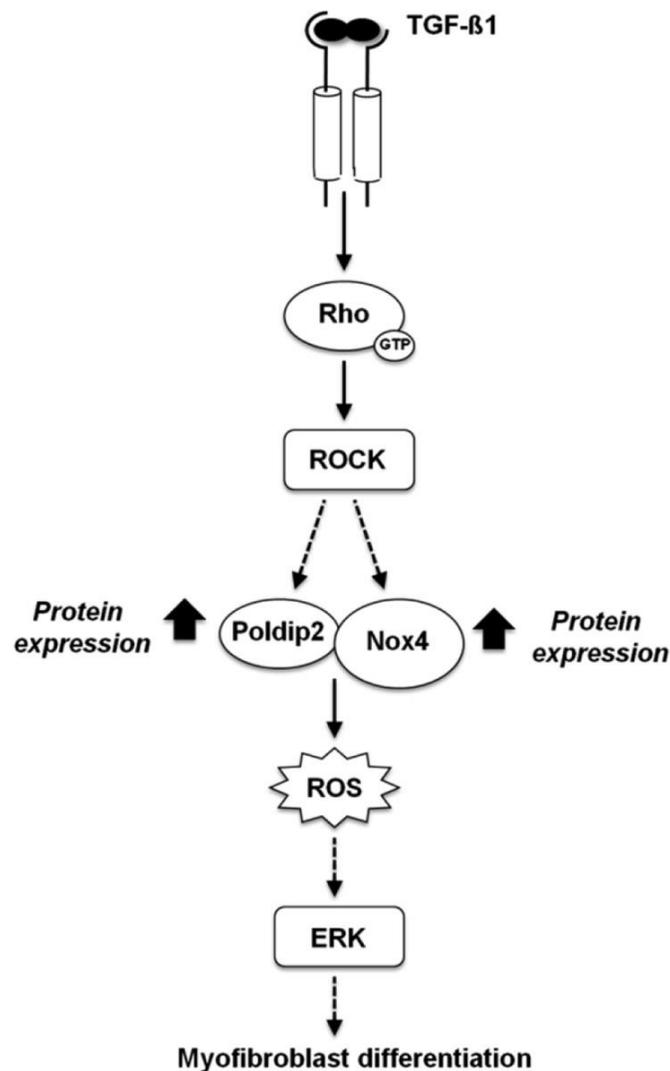


Figure I- 5 : Mécanisme d'activation des myofibrablastes de rein (47).

III. La famille des NADPH oxydases

III.1. Présentation

NOX4 et NOX2 font partie de la famille des NADPH oxydases qui sont des complexes enzymatiques transmembranaires dont la seule fonction est de transférer les électrons à travers la membrane biologique pour réduire l'oxygène en anion superoxyde selon la réaction suivante :



Cette famille d'enzyme n'est pas spécifique au règne animal étant donné qu'elle est retrouvée également chez les bactéries (53, 54), les plantes et les champignons (55, 56). Les membres de cette famille sont classés en fonction des caractéristiques structurales et fonctionnelles de la protéine membranaire catalytique appelée NOX. Il existe sept isoformes de cette protéine (NOX1-5 et DUOX1-2) contenant des domaines structuraux conservés qui sont responsables de cette fonction. Une grande partie des informations structurales connues à ce jour reposent sur la caractérisation biochimique de NOX2, très largement étudié, et sur la structure tridimensionnelle NOX5, récemment déterminée (57). La topologie des autres isoformes est déduite de l'homologie de séquence avec NOX2 et NOX5, et des programmes de prédiction de structures. Ces enzymes comportent deux domaines : l'un transmembranaire, noté domaine TM, l'autre cytoplasmique appelé domaine déshydrogénase (DH). Ce dernier comporte le site catalytique de l'enzyme qui fixe le substrat le NADPH.

En partant de la partie N-terminale (Figure I- 6), ces protéines comportent le domaine transmembranaire (TM) constitué de 6 hélices α transmembranaires reliées par 5 boucles situées de part et d'autre de la membrane. Les boucles A, C et E sont extracellulaires et les boucles B et D sont cytoplasmiques. Quatre histidines (His101, His115, His209, His222) hautement conservées sont localisées sur les troisième et cinquième hélices α transmembranaires et fixent deux hèmes *b*, localisés côté cytoplasmique (hème A) et extracellulaire (hème B) (57, 58). Enfin le domaine déshydrogénase, présent en C-terminal, fixe le cofacteur FAD et possède le site de fixation du substrat de l'enzyme, le NADPH.

NOX5 et les DUOX se différencient des autres isoformes par la présence de certaines parties supplémentaire (Figure I- 7). NOX 5 comporte en N-terminal 4 motifs EF-hand permettant de lier le calcium, deux région polybasiques en C et N terminal, deux sites consensus en C-ter appelés REHBD (*Regulatory EF-Hand Binding Domain*) et PhosR intervenant dans le repliement intramoléculaire de la protéine. Les DUOX1/2 comportent en N-ter une séquence homologue à la déshydrogénase, 2 motifs EF-hand et un 7^{ème} pilier transmembranaire (59).

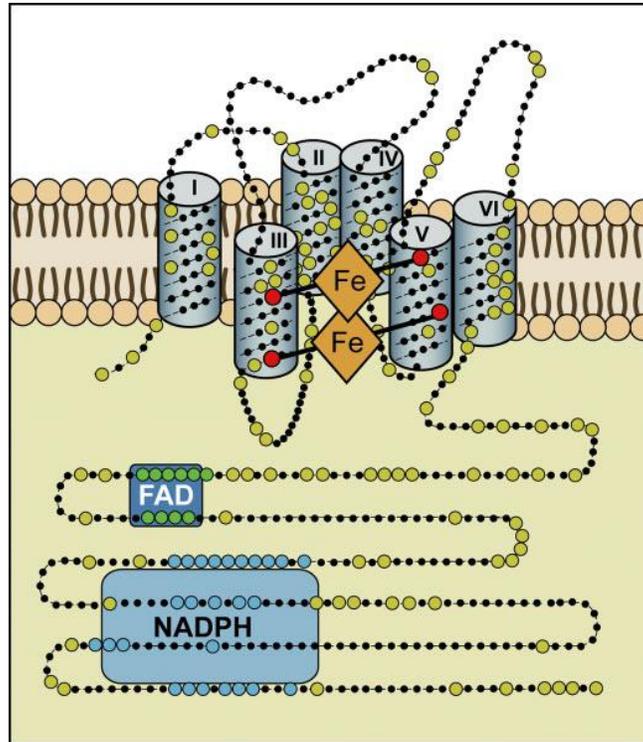


Figure I- 6 : Topologie du corps catalytique des NADPH oxydases.
 Les cercles en couleur représentent les acides aminés conservés chez les isoformes NOX 1-4. En rouge sont représentées les 4 histidines (60).

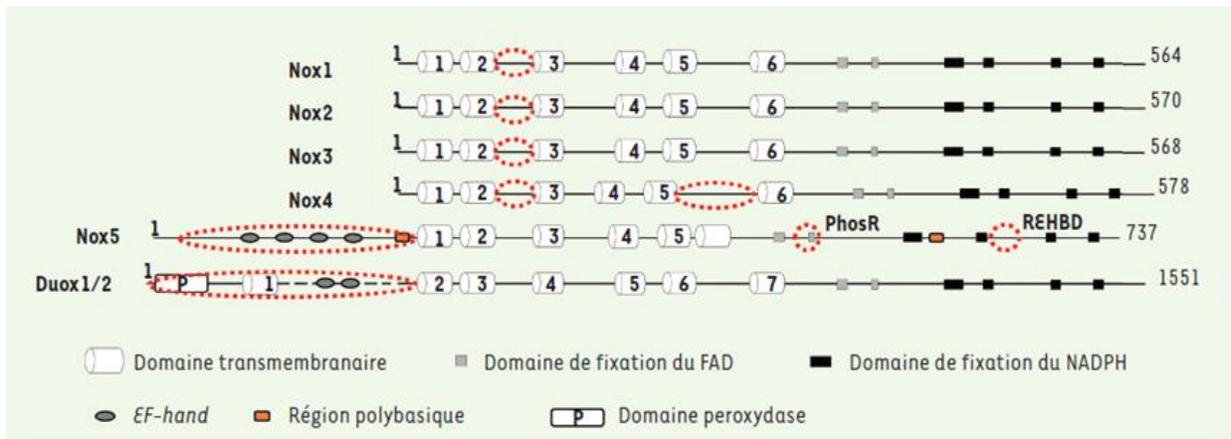


Figure I- 7 : Représentation linéaire, en domaines, de la séquence protéique des NOX.
 Les cercles discontinus soulignent les régions importantes impliquées dans la régulation de l'activité de chaque protéine (59).

Les autres NOX (NOX1-4) ont tous un partenaire membranaire p22^{phox} dont la fonction est de stabiliser l'enzyme (Figure I- 8). NOX5 semble se stabiliser en formant des oligomères (61). Quant aux DUOX1/2, ils s'associent à leurs partenaires respectifs DUOXA1/2 qui assurent leur maturation et bon fonctionnement (62, 63). En plus de p22^{phox}, le complexe NADPH oxydase constitué de NOX 1-3 comporte d'autres protéines cytosoliques : organisatrice (p47^{phox} ou NOXO1), activatrice (p67^{phox} ou NOXA1), et modulatrice p40^{phox}. Ces protéines régulatrices sont nécessaires pour former un complexe enzymatique actif capable de produire des ROS. L'isoforme NOX4 se différencie des autres NOXs par le fait que NOX4 est fonctionnel et produit des ROS sans avoir besoin d'être activé par un assemblage avec ces protéines régulatrices. Par contre, il s'associe comme nous l'avons déjà vu à une autre protéine régulatrice, Poldip2 qui augmente son activité (19). En ce qui concerne NOX5 et DUOX1/2 c'est le calcium qui joue le rôle de régulateur chez ces isoformes (64, 65).

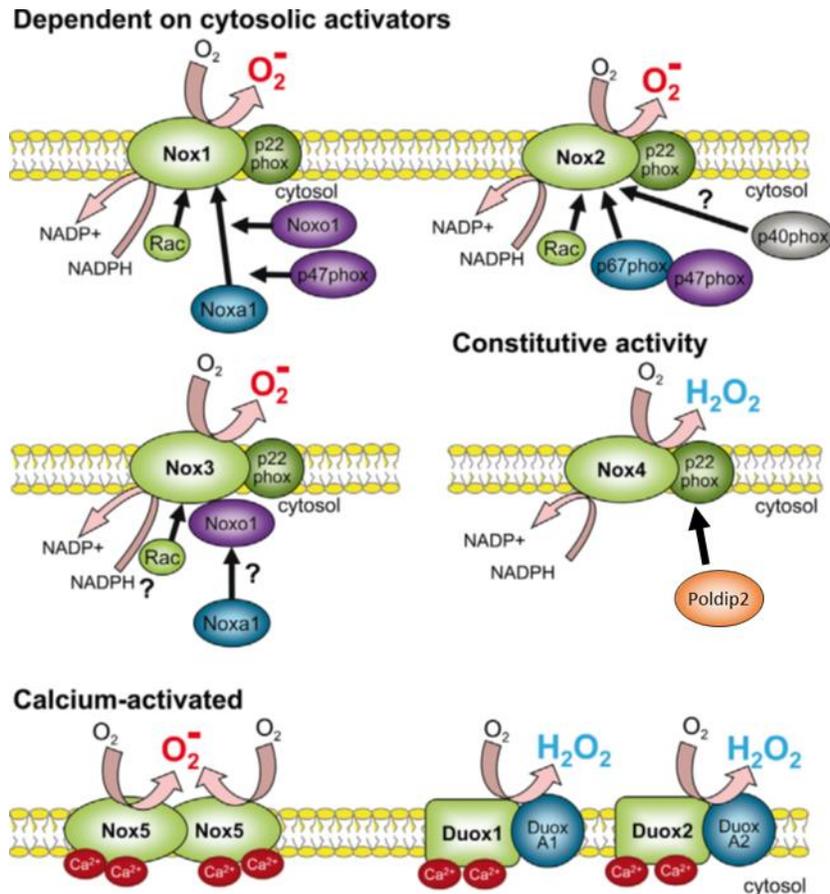


Figure I- 8 : La famille des NADPH Oxydase et leurs partenaires.
Adapté de Brandes et al. (2014) (66).

III.2. Transfert d'électron et génération d'Espèces Réactives de l'Oxygène

La NADPH Oxydase réduit l'oxygène par transfert de deux électrons depuis le NADPH. NOX2 peut utiliser le NADH comme substrat mais elle capte préférentiellement du NADPH. Les constantes d'association pour le NADPH et le NADH sont estimées à 40–45 μM et 25 mM respectivement (67). C'est un mécanisme séquentiel qui consiste à transférer deux électrons, un par un, et se fait en 7 étapes (Figure I- 9). Au cours de la première étape, le NADPH transfère deux électrons au FAD pour former FADH_2 . Cette première étape connue sous le nom d'activité diaphorase, est activée par le **Domaine d'Activation (AD)** de p67^{phox} décrit plus loin dans ce chapitre (68). Ensuite un seul électron est transféré depuis FADH_2 au premier hème. Le centre fer de l'hème A ne peut accepter qu'un seul électron à la fois. L'électron doit donc passer au second hème B puis à l'oxygène (étapes 2, 3 et 4) pour libérer la place au second électron. Le second électron, transféré par la flavine partiellement réduite FADH^\bullet , va suivre le même cheminement que le premier pour réduire une autre molécule d'oxygène (étapes 5, 6 et 7) (59, 69). *Via* ce mécanisme une molécule de NADPH oxydase réduit deux oxygènes en deux anions superoxydes, précurseurs d'autres molécules réactives à l'oxygène.

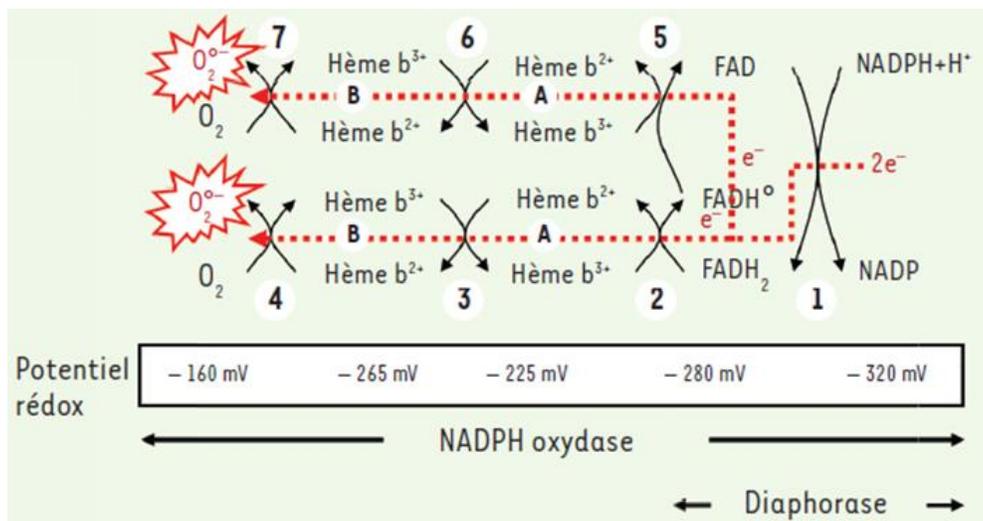


Figure I- 9 : Mécanisme de transfert d'électrons en 7 étapes.

Dans le cadre blanc sont indiqués les potentiels redox de chaque couple (59).

Une fois formé, l'anion superoxyde va générer des espèces réactives de l'oxygène ou **Reactive Oxygen Species (ROS)** suite à une cascade de réactions (Figure I- 10). Les anions superoxydes se dismutent en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) de manière spontanée ou catalysée par la **Superoxyde Dismutase (SOD)** « réaction1 ». Le peroxyde d'hydrogène est une molécule à fort potentiel oxydant capable de réagir avec les méthionines et cystéine présentes dans certaines enzymes. Il est ensuite converti en ions hypochlorite (OCl^-) par la myéloperoxydase « réaction2 ». En solution aqueuse, l'acide hypochloreux (HClO) est en équilibre acido-basique avec sa base conjuguée, ions hypochlorite (OCl^-). Il est capable de générer une

variété de réactions oxydatives dont la chlorination des tyrosines et l'oxydation de certaines enzymes. Il peut être réduit par les anions superoxydes en radical hydroxyle (OH^\bullet) « réaction 3 ». Celui-ci réagit avec un grand nombre de biomolécules et est capable d'initier une chaîne de réaction oxydative causant beaucoup de dommages. L'association de H_2O_2 et OCl^- produit de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ « réaction 4 ». Ce dernier cible les doubles liaisons des acides gras insaturés (70). Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 peut être décomposé par action du fer Fe^{2+} selon la réaction de fenton « réaction 5 » pour générer le radical hydroxyle (OH^\bullet) et l'ion hydroxyde OH^- .

- 1) $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{HO}_2^\bullet + \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
- 2) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{OCl}^-$ et $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HClO}$
- 3) $\text{HClO} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{O}_2 + \text{Cl}^-$
- 4) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{OCl}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}^- + ^1\text{O}_2$
- 5) $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$

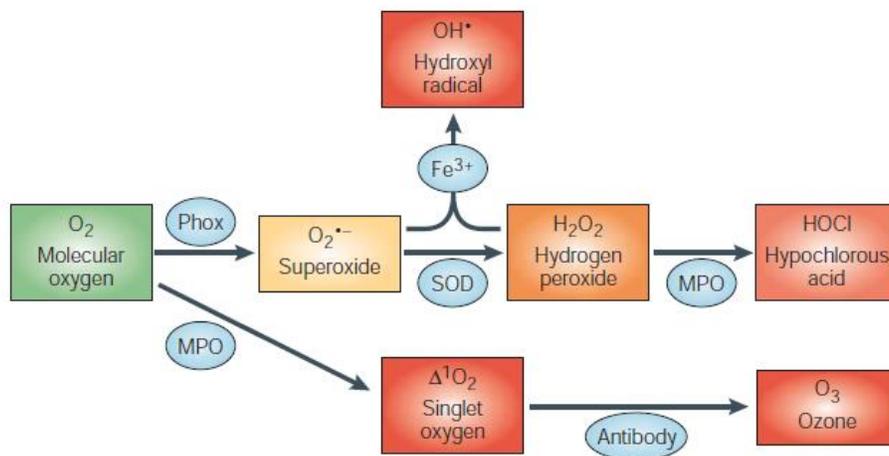


Figure I- 10 : Formation des dérivés réactifs de l'oxygène.

$\text{O}_2^{\bullet-}$: anions superoxyde, OH^\bullet : radical hydroxyle, HOCl : acide hypochlorique, O_3 : ozone, $^1\text{O}_2$: oxygène singulet, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, MPO : myéloperoxydase, SOD : superoxyde dismutase, NOX : NADPH oxydase (70).

À des concentrations élevées, les ROS deviennent délétères pour les organismes vivants et endommagent tous les principaux constituants cellulaires : oxydation des protéines, cassures et mutations de l'ADN, peroxydations lipidiques. Néanmoins leur présence est primordiale. Au sein des cellules (phagocytes) du système immunitaire inné, ils jouent un rôle bactéricide sans lequel l'organisme n'est plus capable de se défendre contre les infections bactériennes et fongiques. La production de ROS n'est pas spécifique aux cellules phagocytaires. Elle peut avoir lieu dans d'autres types cellulaires. Les ROS sont alors impliqués dans un bon nombre de fonctions biologiques.

III.3. Distribution et localisation

Les 7 isoformes de NOX sont localisés dans différents types de tissus, cellules et compartiments subcellulaires. Dans le Tableau I- 2 est présentée une liste non exhaustive de ces localisations.

Tableau I- 2 : Localisation tissulaire et subcellulaire des isoformes de la famille NADPH oxydase.
D'après Bedard et Krause. (2007) (60) ; Chuong Nguyen et al. (2015) (59) ; Li et Shah. (2003) (71) ; Guo et Chen. (2015) (72) ; George et al. 2014 (73).

Isoforme	Homologie *	Locus	Distribution tissulaire	Distribution subcellulaire
NOX 1 (MOX1)	56 %	Xq22	Colon, muscle lisse, endothélium, utérus, placenta, prostate, ostéoclastes, péricytes rétinien, globules rouges	Endosome, noyau, cytoplasme, membrane plasmique.
NOX 2 (gp91^{phox})	-	YCBB Xp21.1	Phagocytes, lymphocytes B, neurones, cardiomyocytes, globules rouges, muscles squelettiques, hépatocytes, endothélium, des cellules souches hématopoïétiques, muscles lisses	Membrane plasmique, membrane des différentes populations de granule.
NOX 3	58 %	6q25.1.26	Oreille interne, rein fœtal, la rate fœtale, os du crâne, le cerveau	Membrane plasmique
NOX 4 (Renox)	39 %	11q14.2-q21	Rein, vaisseaux sanguins, globules rouges, ostéoclastes, endothélium, muscle lisse, cellules souches hématopoïétiques, macrophage, monocytes, fibroblastes, kératinocytes, cellules de mélanome, neurones	Complexe d'adhérence, noyau, mitochondrie, réticulum endoplasmique, membrane plasmique.
NOX 5	27 %	15q22.31	Tissu lymphoïde, testicule, globules rouges, endothélium, muscle lisse, pancréas, placenta, ovaire, utérus, estomac, divers tissus fœtaux	Membrane plasmique
DUOX 1 (ThOX1)	53 %	15q21	Thyroïde, Épithélium des voies respiratoires, épithélium de la langue, cervelet, testicule	Membrane plasmique
DUOX 2 (ThOX2)	47 %	15q15.3-q21	Thyroïde, glandes salivaires et rectales, épithélium gastro-intestinal, épithélium des voies respiratoires, utérus, vessie, îlots pancréatiques	Membrane plasmique

*Les homologies de séquences en acides aminés sont calculées par rapport à NOX2.

Les localisations décrites ci-dessus ne sont pas spécifiques à chaque isoforme. Il est courant de retrouver dans un même tissu ou cellule, voire un même compartiment subcellulaire, une colocalisation de

deux ou trois, voire quatre isoformes. Les isoformes DUOX2 et NOX5 colocalisent dans le tissu utérin, le pancréas ou encore la thyroïde (74, 75). NOX1 et NOX4 colocalisent dans les cellules du muscle lisse vasculaire (19). NOX5 et NOX4 se retrouve dans le tissu de rein fœtal (74). Dans le macrophage, on retrouve une forte expression de NOX2 et NOX1. NOX4 et DUOX1 sont également présents mais à des taux beaucoup plus faibles (76). NOX2 colocalise avec NOX4 dans plusieurs types cellulaires. Cela est, en effet, le cas du tissu adipeux (77), de la prostate (78), des ovaires (74), du placenta (74), des cellules hépatocytes (74), des cellules rénales du cortex et de la médullaire (46, 74) des cellules du muscle lisse vasculaire (VSMC) (79, 80). Cette co-localisation peut être aussi subcellulaire, comme par exemple dans les cellules endothéliales du cordon ombilical et la lignée de cellules endothéliales EaHy926 où NOX2 et NOX4 sont tous deux identifiés au niveau du réticulum endoplasmique (81, 82).

III.4. Rôles physiologiques

Étant donné que les NADPH oxydases présentent différentes localisations tissulaires, elles sont impliquées dans différentes fonctions biologiques. Ces fonctions ont été largement décrites dans différentes revues (60, 66, 69, 71, 72). Ne sont citées ici que quelques unes des fonctions les plus connues.

NOX1 : NOX1 est impliquée dans la régulation de la pression artérielle (83) et le remodelage vasculaire mais aussi l'hypertension (84) et l'athérosclérose (85). NOX1 joue aussi un rôle dans le tractus gastro-intestinal. Elle est impliquée dans la défense immunitaire et la régulation de la prolifération cellulaire au niveau de cet organe. Il a été montré que le niveau d'expression de NOX1 est augmenté pendant la différenciation et dans la phase d'arrêt de croissance dans les colonocytes (86).

NOX2 : NOX2 a été intensément étudiée dans les cellules phagocytaires. Bien que présente principalement dans les cellules phagocytaires, elle est également identifiée dans plusieurs organes ou types cellulaires, où elle est impliquée dans plusieurs fonctions biologiques et plusieurs pathologies. Au niveau des poumons, cette enzyme joue un rôle de senseur de l'oxygène, plus spécifiquement dans le corps neuro-épithélial (87). Les souris déficiente en NOX2 ont une réponse plus faible aux conditions d'hypoxie (88). NOX2 joue également un rôle dans la régulation des métalloprotéases. Ces protéases sont présentes à des taux plus élevés chez des souris déficientes en NOX2 (89). Elle est aussi impliquée dans plusieurs pathologies cardiovasculaire tels que l'hypertension (90), l'infarctus du myocarde (91), la fibrillation artérielle (92). Les patients souffrant d'infarctus du myocarde et de maladie cardiaque coronaire présentent un taux élevé de NOX2 et de ROS (91). Au niveau du cœur, l'activité de NOX2 est augmentée par activation de la voie aldostérone/angiotensine II (93). Dans les cellules endothéliales de l'artère coronaire, NOX2 induit l'angiogenèse *via* la production de ROS (94). Elle est également impliquée dans la régulation d'une cascade de réactions de signalisation, telle que la modulation de kinase et phosphatase (95), l'expression de gènes et l'activation de protéase (96). Le rôle de NOX2 a été démontré dans les maladies neurodégénératives

telles que la maladie d'Alzheimer (97) ou la maladie de Parkinson (98). Au niveau du cerveau, elle impacte la capacité de mémorisation et d'apprentissage (99). Au niveau du foie, elle joue un rôle dans les lésions d'ischémie-réperfusion (100). Elle participe aussi à la résorption osseuse par les ostéoclastes mature et stimule leur activité *via* l'INF γ (INterFeron γ) (101).

NOX3 : NOX3 joue un rôle dans la génération de l'otoconie, petits cristaux responsables de la détection de la sensation de vitesse et de gravité. Une déficience en NOX3 dans l'oreille interne induit des troubles d'équilibre (102).

NOX4 : Cet enzyme a été initialement identifié dans le rein où il est fortement exprimé (103). Il semblerait que cet enzyme soit impliqué dans la régulation de la prolifération et la mort cellulaire des cellules rénales (104), mais aussi des cellules du muscle lisse vasculaire (105). NOX4 joue un rôle de senseur de l'oxygène au niveau du cortex du rein (103, 104). Elle est aussi impliquée dans certaines pathologies rénales entre autres la néphropathie diabétique (106). NOX4 joue aussi un rôle dans la régulation hormonale puisqu'elle est exprimée au niveau de la prostate (78) et des ovaires (74). La présence de NOX4 dans la membrane interne de la mitochondrie (107, 108) peut induire une accumulation de ROS ce qui provoque son disfonctionnement par perméabilisation des pores, relargage du cytochrome *c* et formation d'apoptosome (109–111).

NOX5 : NOX5 jouerait un rôle dans la reproduction, la maturation et le bon fonctionnement des spermatozoïdes. Les ROS produits interviennent dans l'étape finale de la maturation du sperme, la formation d'acrosome et leur capacitation (112, 113).

DUOX1/2 : les DUOX1/2 ont été identifiées en tant que système générateur d'H₂O₂ de la peroxydase thyroïdienne, enzyme impliquée dans la synthèse des hormones (114, 115). Mais l'identification de cas d'hypothyroïdie congénitale associés à des mutations du gène DUOX2 et non du gène DUOX1 montre que la NADPH oxydase DUOX2 est l'enzyme impliquée dans la biosynthèse d'hormones thyroïdiennes (63). Le rôle de DUOX1 dans la thyroïde demeure à ce jour inconnu.

III.5. Implication des NOX dans les granulocytes

Dans les cellules du système immunitaire inné, NOX2 est présent dans plusieurs types cellulaires. Dans ce travail nous nous sommes intéressés à certains d'entre eux : le neutrophile principalement, mais aussi le monocyte et le macrophage.

III.5.a. Dans le neutrophile

Les neutrophiles représentent la première ligne de défense contre les pathogènes. L'activation rapide de NOX2 dans les neutrophiles constitue un mécanisme de défense en urgence, destiné à neutraliser les pathogènes, qui prend place suite à une réponse à un stimulus tel que les particules opsonisées. Suite à

ce stimulus, NOX2, présente dans la membrane plasmique, libère des ROS dans l'espace extracellulaire, alors que celle présente dans les granules cible le pathogène présent dans la phagosome (116).

NOX2 joue un rôle important dans la fonction de défense contre le pathogène assuré par le neutrophile. Cette enzyme est l'acteur d'un mécanisme multi-étapes : (i) la neutralisation directe du pathogène *via* les ROS générés par le couple NOX2-MyeloPerOxydase (MPO) (117–119) ; (ii) l'activation de protéases des granules primaires qui ciblent le pathogène phagocyté (120) ; (iii) la génération de NET (*Neutrophil Extracellular Trap*)²⁰ qui ciblent les pathogènes extracellulaires (121–123).

NOX2 est également un modulateur de l'inflammation qui est médiée par le neutrophile. En effet, les neutrophiles sont rapidement recrutés au niveau du site de l'infection et il s'ensuit alors la production de cytokines pro-inflammatoires. L'arrêt de la réaction inflammatoire induite par le neutrophile est important pour limiter les dommages des tissus. Cela implique l'élimination des neutrophiles par apoptose (124).

III.5.b. Dans les monocytes et macrophages

Les monocytes circulant dérivent des cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse et migrent dans le sang périphérique. Dans les tissus, les monocytes sont capables de se différencier en macrophage.

Les monocytes et macrophages sont une population de cellules très hétérogène. Leur classification en fonction d'un phénotype donné est très complexe. Après différenciation des monocytes en macrophages, on obtient généralement deux populations de macrophages : d'une part, les macrophages M1 classiquement activés, connus pour être pro inflammatoires et bactéricides, et, d'autre part, les macrophages M2 alternativement activés, connus pour être anti-inflammatoires (125, 126). Dans les conditions physiologiques normales, il y a un équilibre entre les types M1/M2 mais on peut observer un *shift* vers le type M1 ou le type M2 lors de l'installation d'une pathologie. Ce *shift*, connu sous le nom de « polarisation », est contrôlé par NOX2 (127).

Les macrophages alvéolaires sont les phagocytes de la première ligne de défense, qui permet de contrecarrer le pathogène inhalé. Ils phagocytent et éliminent les micro-organismes mais coordonnent aussi la réponse inflammatoire. Comme pour le neutrophile, NOX2 est essentielle au macrophage pour assurer la fonction de défense (128–130) par phagocytose des pathogènes et production de ROS (131, 132).

²⁰ NET : Les NETs, re-largués lors de la NETose, consistent en des filaments de chromatine extracellulaires associés aux protéines de la granule telle que la MPO qui fixent le microorganisme, limitant leur dissémination et dégradant leur facteur de virulence.

Dans le macrophage, NOX2 joue un rôle important dans les voies de signalisation qui permettent la communication entre les cellules, et limite l'inflammation causé par les neutrophiles. L'activation de NOX2 permet de stimuler la reconnaissance et l'élimination des neutrophiles apoptotiques par les macrophages (133–136). Au sein du site inflammatoire le neutrophile meurt par apoptose. Il libère les protéines des granules qui permettent de recruter les monocytes et macrophages sur le site de l'inflammation (137–139). Les macrophages reconnaissent alors les neutrophiles apoptotiques et les ingèrent (140). Ce phénomène est connu sous le nom d'efferocytose.

Il existe une corrélation entre la production de ROS et le recrutement des monocytes au niveau d'un site. En effet le peroxyde d'hydrogène servirait de chemoattractant pour les monocytes (141, 142). La migration des monocytes à un site infectieux est induite par une augmentation de NOX4 et de production de ROS intracellulaire (143).

IV. L'isoforme NOX4 : caractéristiques structurales et fonctionnelles

NOX4, appelée également Renox (car identifiée pour la première fois dans le rein), est une homologue de NOX2 avec 39 % d'identité de séquence en acides aminés (103, 104). L'association de NOX4 à la protéine p22^{phox} est nécessaire pour sa maturation et la production de ROS (144). La séquence de NOX4 est constituée de 578 acides aminés et conduit à une protéine d'environ 75 kDa (108). Malgré la présence de 4 sites de N-glycosylation, cette forme de NOX4 ne semble pas être glycosylée (104). D'autres variants de plus petites tailles ont également été décrits. Dans les cellules pulmonaires épithéliales humaines A549, Goyal *et al.* (2005) ont observé l'expression de 4 nouvelles formes notées NOX4(B), NOX4(C), NOX4(D) et NOX4(E) dont les structures des exons sont décrites dans la Figure I- 11 (145).

Le site de fixation du NADPH manque dans la forme B qui fait 63 kDa. Dans la forme C de NOX4 (de 26 kDa), le site de fixation du FAD est absent. Ces deux dernières formes ne produisent pas de ROS. Dans les formes D et E, une partie des régions transmembranaires est absente. Ces formes ont une taille de 32 kDa et 28 kDa respectivement. Néanmoins la perte de ces domaines transmembranaires n'empêche pas un niveau de production de ROS (activité diaphorase) équivalent au variant complet. Néanmoins, l'absence de certains de ces domaines a une influence sur leur localisation subcellulaire. Les formes B et C, comme le variant complet, sont prédites dans le réticulum endoplasmique (78 et 67 % respectivement). Les formes D et E sont prédites majoritairement dans le cytoplasme (70 %), mais aussi très faiblement dans le noyau (17 %). Ces formes D et E sont glycosylées et cette glycosylation semble importante pour leur activité.

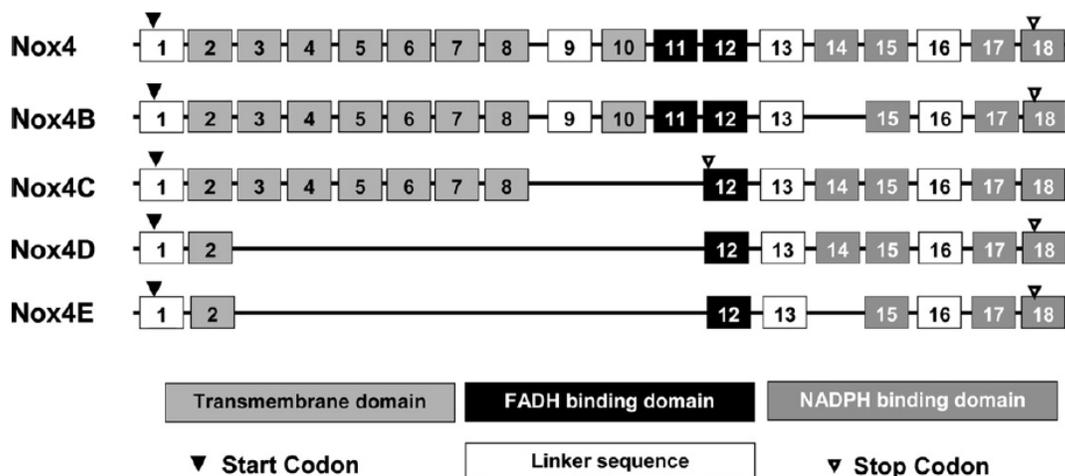


Figure I- 11 : Comparaison de structure des exons des 4 variants nouvellement identifiés avec celui du prototype de NOX4.

Les numéros représentent le numéro de chaque exon. Les codes d'accès des séquences déposées dans la banque de donnée EMBL sont comme suit : variant B (AJ704726), variant C (AJ704727), variant D (AJ704728), et variant E (AJ704729)(145).

Contrairement aux autres NOXs, cette enzyme génère principalement du peroxyde d'hydrogène au lieu d'anions superoxydes. Cette activité a été attribuée à des propriétés structurales spécifiques de cette enzyme (Figure I- 12). La boucle E de NOX4 est plus longue de 28 acides aminés que celle de NOX2 et contient une histidine en position 222 qui pourrait être un donneur de proton et accélérerait la dismutation spontanée d' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 (146). Les deux cystéines Cys226 et Cys270 présentes sur cette boucle sont aussi importantes pour assurer le bon fonctionnement de l'enzyme et la dismutation d' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 (146, 147). La délétion de cette boucle induit une production d'anions superoxyde au lieu du peroxyde d'hydrogène (72). Plusieurs mécanismes à cette dismutation ont été proposés (72). Les données apportées par les expériences de dynamiques moléculaires et thermodynamique du groupe de Yukio Nisimoto sont en faveur du modèle suivant : 90 % du flux d'électron produit du H_2O_2 , contre 10 % qui produit de l' $O_2^{\cdot-}$. Un proton est donné par l'His222 au voisinage de l'hème B: $O^{\cdot-}_2$. Ce transfert de proton génère un potentiel de l'hème B: $HO^{\cdot-}_2$, énergétiquement plus favorable qui facilite le transfert d'un second électron associé à un autre proton donné par le solvant pour former du H_2O_2 (148).

Il a été montré que la boucle B, région conservée dans les isoformes NOX1-4, servirait d'interface entre le domaine transmembranaire et le domaine déshydrogénase. Le repliement de ce dernier domaine permettrait un rapprochement entre les sites FAD/NADPH et l'hème A facilitant le transfert d'électrons (149).

Une autre particularité de cette enzyme est qu'elle produit du peroxyde d'hydrogène de manière constitutive et ne nécessite pas une activation par les protéines régulatrices comme p47^{phox} ou NOXO1, et p67^{phox} ou NOXA1. Cette particularité a été attribuée au domaine déshydrogénase de NOX4. En effet l'équipe de Nisimoto a produit deux protéines chimère NOX2/4 et NOX4/2 et ont comparé leur activité en présence et en absence des protéines cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox}. La première chimère, qui est constituée du domaine transmembranaire de NOX2 et du domaine déshydrogénase de NOX4, n'a pas besoin des protéines cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox} pour être active contrairement à la deuxième qui est constituée du domaine transmembranaire de NOX4 et du domaine déshydrogénase de NOX2 (150). Des mutations dans le domaine déshydrogénase ont permis d'identifier une séquence de 22 acides aminés stratégiques en C-terminal dont deux résidus essentiels His557 et His571 responsables de ce caractère constitutif (151).

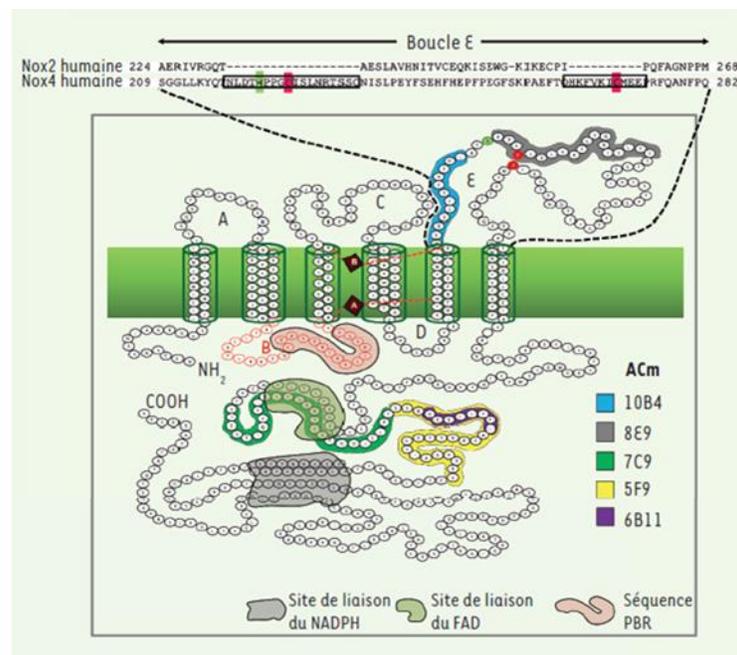


Figure I- 12 : Topologie de NOX4.

ACm : Les épitopes des anticorps monoclonaux dirigés contre Nox4 (10B4, 8E9, 7C9, 5F9 et 6B11) sont représentés sur la séquence protéique de Nox4 ; *PBR* : Région conservée PolyBasique dans les isoformes NOX1-4 (59).

Pendant longtemps, l'augmentation de la production de H₂O₂ par NOX4, observée dans certaines situations, a été attribuée à une augmentation de l'expression de cette enzyme au niveau des tissus et non à une activation au sens propre. Cependant, Lyle *et al.* (2009) ont identifié que cette augmentation est liée à la protéine Poldip2. D'autres protéines régulatrices de NOX4 ont été identifiées : les protéines adaptatrices *Tyrosine Kinase Substrate* 4 et 5 (Tks4, Tks5) analogues de la protéine p47^{phox} s'associent également à p22^{phox} et activent NOX4 mais également NOX1 (152). De même, le récepteur TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*) et la **Protéine Disulfure Isomérase** (PDI) (153) sont aussi capables d'augmenter l'activité de NOX4. À

l'inverse, la protéine Hsp70²¹ régule négativement le complexe NOX4/p22^{phox} dans les cellules vasculaires du muscle lisse isolées chez des Rats Spontanément Hypertensifs (SHR) (154). La protéine Hic-5 (*H₂O₂-inducible clone 5*) inhiberait également NOX4 en induisant sa dégradation par le protéasome. Il a également été décrit que certains dérivés de la famille des quinones régulent positivement l'activité de NOX4 (147).

V. L'isoforme NOX2

V.1. Un bref historique

Cette protéine est le premier isoforme de cette famille à avoir été découvert dans les cellules phagocytaires. Tout a commencé dans les années 1960 quand le phénomène de « flambée respiratoire » (« *respiratory burst* ») a été identifié dans les cellules phagocytaires (155–157). Ce phénomène consiste en une consommation importante d'oxygène conduisant à une production massive d'anions superoxydes. Par la suite, des observations cliniques ont montré que ce phénomène était absent des cellules phagocytaires chez les patients souffrant de la maladie granulomateuse chronique (158–160). En 1978, Segal, Jones et leurs collègues ont découvert que le cytochrome *b558* était absent des leucocytes de ces patients (161, 162). Dans les phagocytes, le cytochrome *b558* joue un rôle très important dans le système immunitaire. Un défaut de fonctionnement ou d'activation de cette enzyme résulte en une incapacité des phagocytes à détruire les micro-organismes ingérés. Plus tard, dans les années 1980, le gène de la sous-unité catalytique gp91^{phox} de la NADPH oxydase phagocytaire, également appelé NOX2, a été cloné par Royer-Pokora *et al.* en 1986 (163) et Teahan *et al.* en 1987 (164). À partir de là, NOX2 a été intensément étudiée dans les cellules phagocytaires puis il a été découvert que la protéine NOX2 est également identifiée dans plusieurs organes ou types cellulaires, où elle est impliquée dans plusieurs fonctions biologiques. Les travaux effectués sur NOX2 ont ouvert le champ à la découverte, dans les années 2000, des autres isoformes de cette famille d'enzymes.

V.2. À l'échelle moléculaire

V.2.a. Le flavocytochrome *b558*

Le cytochrome *b558* est un complexe membranaire hétérodimérique constitué de deux sous-unités : la protéine gp91^{phox} également appelée NOX2 (sous-unité β) produit du gène *CYBB* et la protéine p22^{phox}

²¹ Les protéines de choc thermique ou Hsp (*Heat shock proteins*) sont des protéines synthétisées par l'organisme en réponse à un stress (température, exposition à des métaux lourds, infections...). En s'associant à des peptides ou des protéines qui ne sont pas correctement repliés, ces protéines évitent l'accumulation de protéines incorrectement repliées. Les protéines Hsp peuvent être associées à des maladies chroniques. Par exemple, les tumeurs humaines ont tendance à surexprimer les protéines de la famille de Hsp70.

(sous-unité α) produit du gène *CYBA* (165). Ces deux protéines sont présentes à un ratio de 1:1 et se stabilisent l'une l'autre dans le neutrophile (166, 167).

V.2.a.i. gp91^{phox}

La protéine NOX2 (ou gp91^{phox}) est une glycoprotéine dont la séquence fait 570 acides aminés. Son gène se trouve sur le chromosome Xp21.1. C'est le coeur catalytique du cytochrome *b558* car il possède tous les intermédiaires redox pour le transfert d'électrons et la réduction de l'oxygène.

Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur de 65 kDa. Après glycosylation, en premier lieu dans le réticulum endoplasmique, ensuite dans l'appareil de golgi, sa taille augmente à 91 kDa (168, 169). Les sites de N-glycosylation sont présent sur les 2^{ème} et 3^{ème} boucles extracellulaires au niveau des résidus asparagine Asn132, Asn149 et Asn240 (170). Cependant ces glycosylations ne sont pas essentielles pour l'activité catalytique de l'enzyme (171). En plus d'être glycosylée, NOX2 possède un site de phosphorylation sur la région C-terminale du domaine déshydrogénase. La phosphorylation de NOX2 permet d'augmenter le transfert d'électrons ainsi que la fixation de p47^{phox}, p67^{phox} et Rac2 (172).

À l'heure actuelle, seul le domaine de fixation du NADPH de NOX2 a pu être cristallisé (Code PDB : 3A1F). Jusqu'à très récemment, les informations structurales disponibles reposaient sur des caractérisations biochimiques poussées et des données basées sur des modélisations bio-informatiques. Des études de séquençage et de marquage d'épitope à l'aide d'anticorps monoclonaux révèlent que les extrémités amino (164, 173) et carboxy (174–176) terminaux de NOX2 sont cytoplasmiques. Puis récemment, Magnani *et al.* (2017) ont publié une structure d'un homologue NOX5 exprimé chez *Cylindrospermum stagnale*. Cet homologue présente 40 % d'identité de séquence avec l'isoforme NOX5 humain. Cette structure a apporté une avancée des plus importantes dans le domaine des NOXs. En effet, elle vient confirmer et consolider les informations topologiques connues sur la famille des NOXs dont :

- La présence de six hélices transmembranaires positionnées perpendiculaires au plan de la membrane. Le domaine transmembranaire présente une forme pyramidale ;
- Les deux hèmes hexacoordonnés sont positionnés dans une cavité formée par les hélices transmembranaires h2, h3, h4 et h5 avec leur plan orthogonal à la bicouche lipidique ;
- la flavine est proche de l'hème A interne du domaine transmembranaire ;
- Les résidus en C-terminal du domaine déshydrogénase sont très proches des boucles internes B et D, réputées pour être impliquées dans la régulation de NOX2 et NOX4. Cette partie C-terminale fonctionnerait comme une chaise à bascule contrôlant l'accessibilité du substrat NADPH à l'enzyme et par conséquent son activité.

La structure de NOX5 apporte également des éléments nouveaux. Le positionnement d'un tryptophane 378 entre les deux hèmes, supposé faciliter le transfert de l'électron intramoléculaire. La structure du domaine transmembranaire abrite une petite cavité située au-dessus de l'hème externe qui contient une molécule d'eau. Les éléments apportés indiquent que cette molécule d'eau occupe la position du dioxygène dont la séquestration est favorisée par les interactions entre les résidus présents dans cette cavité (57).

V.2.a.ii. p22^{phox}

p22^{phox} est une protéine de 194 acides aminés qui migre vers 22 kDa sur gel SDS. Son gène se trouve sur le chromosome 16q24. C'est une protéine membranaire qui s'associe avec NOX2 pour permettre sa stabilisation et sa maturation (177, 178). Le nombre d'hélices transmembranaires est très discuté dans la littérature. Le profil hydrophobique révèle la présence d'au moins 2 ou 3, voire 4 hélices transmembranaires (Figure I- 13). Les données expérimentales apportées par la méthode de *peptide walking* et la localisation des parties N et C terminale qui se trouvent dans la zone cytosolique sont en faveur de la configuration contenant 2 ou 4 domaines transmembranaires (179, 180). Plus récemment le modèle apporté par Meijles *et al.* (2017) montre une configuration contenant 3 domaines transmembranaires (Figure I- 13 B). Dans ce modèle la partie N-terminale est extracellulaire avec une boucle extracellulaire entre la 2^{ème} et la 3^{ème} hélice (181), ce qui serait en contradiction avec les analyses biochimiques.

Sur la partie C- terminale de la protéine se trouve une **Région Riche en Prolines** (PRR) de Lys149 à Glu169 contenant le motif consensus PxxP. Cette région de la protéine a été cristallisé avec le domaine *Sarco Homology 3* (SH3) de p47^{phox} (182, 183). Cette région est importante pour l'assemblage et l'activation de NOX2 (180).

p22^{phox} possède un site de phosphorylation situé sur la Thr147. Ce site de phosphorylation est important pour l'activation et l'assemblage du complexe car la mutation de ce site annule l'interaction de p22^{phox} avec p47^{phox} (184).

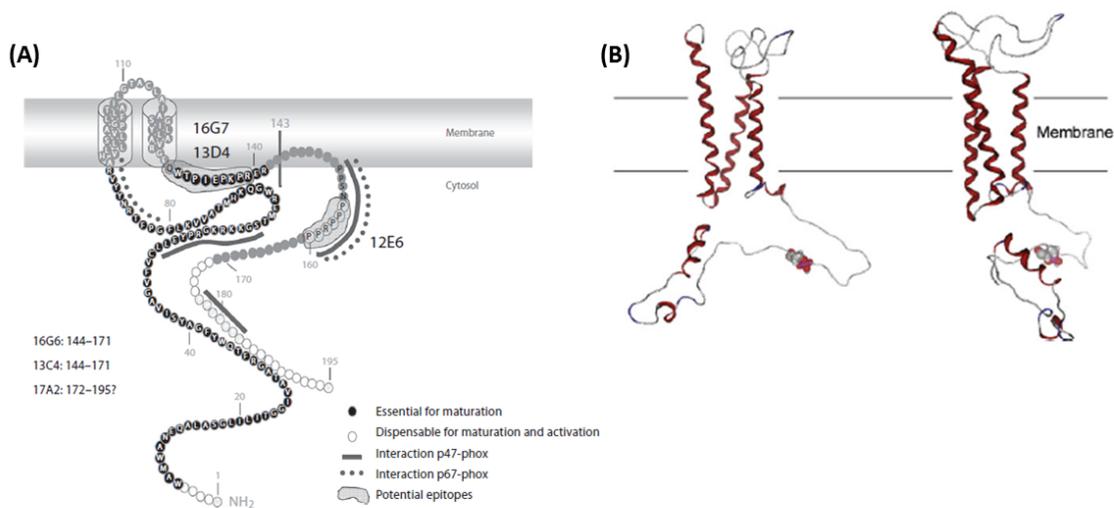


Figure I- 13 : Topologie de p22^{phox}.

A : modèle proposant deux domaines transmembranaires (179). B : modèle tridimensionnelle prédit in silico proposant trois domaines transmembranaires (181).

V.2.b. Les protéines cytosoliques, régulatrices de NOX2

V.2.b.i. p47^{phox}

p47^{phox} également appelé NCF1 (*Neutrophil Cytosolic Factor 1*) est une protéine cytosolique, de 390 acides aminés, qui migre vers 47 kDa sur SDS-PAGE (185, 186). Son gène est localisé sur le locus 7q11.23. En partant de l'extrémité N-terminale (Figure I- 14), sa séquence contient un domaine PX (*Phox Homology*) (4-121 aa) suivi de deux domaines SH3 (SH3A, 159-214 aa ; SH3B, 229-284 aa) permettant respectivement l'interaction avec la membrane et la région PRR de p22^{phox}. Sa partie C-terminale est très basique et riche en serine et arginine. Sur cette partie, elle possède un domaine appelé AIR (*AutoInhibitory Region* ; 292-340 aa) et une région PRR (363-368 aa) pour l'interaction avec p67^{phox} (187–189). Elle possède 11 sites de phosphorylation (190–193). Des études de simple mutation réalisées sur les sérines ont montré que la serine Ser379 est importante pour l'activation de NOX2 (194). Les études de doubles mutations révèlent que deux paires de sérines phosphorylées Ser(303+304) et Ser(359+370) sont nécessaires pour l'activation de NOX2 (191, 195).

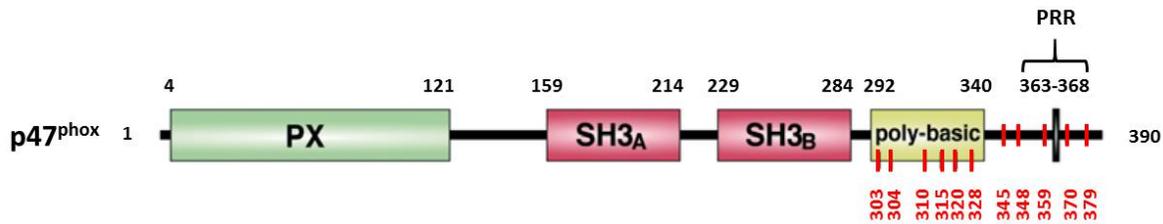


Figure I- 14 : Domaine d’interaction de p47^{phox}.
 En rouge les sites de phosphorylation (187).

V.2.b.ii. p67^{phox}

p67^{phox}, également appelé NCF2 (*Neutrophil Cytosolic Factor 2*), est une protéine cytosolique contenant 526 acides aminés qui migre vers 67 kDa sur SDS-PAGE (196). Son gène est localisé sur le locus 1q27. En partant de l’extrémité N-terminale (Figure I- 15), sa séquence contient 4 régions TPR (*Tetratricopeptide-Rich region* ; 3-36, 37-70, 71-104, 121-154 aa) permettant l’interaction avec Rac, suivi d’un **D**omaine d’**A**ctivation (AD ; 199-210 aa) puis une région PRR (226-236 aa) et un domaine SH3A (243-298 aa) (197, 198). Sa partie C-terminale contient un domaine PB1 (**P**hox and **B**em 1 ; 351-429 aa) et un domaine SH3B (460-515 aa) (187, 189) permettant l’interaction respectivement avec p40^{phox} et p47^{phox}. À ce jour, un seul site de phosphorylation a été identifié sur p67^{phox} au niveau de la thréonine Thr233. Cependant l’existence d’autres sites est envisageable, des études de phosphorylation approfondie doivent être réalisées (199). Cette phosphorylation ne semble pas impacter la fixation de p67^{phox} sur NOX2.

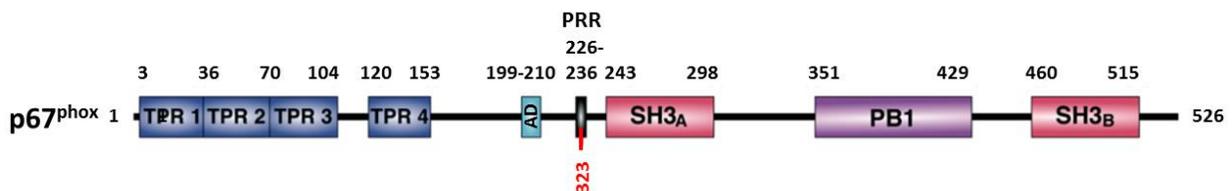


Figure I- 15 : Domaine d’interaction de p67^{phox}.
 En rouge les sites de phosphorylation (187).

V.2.b.iii. p40^{phox}

p40^{phox}, également appelé NCF4 (*Neutrophil Cytosolic Factor 4*), est une protéine cytosolique contenant 336 acides aminés qui migre vers 40 kDa sur SDS-PAGE (200, 201). Son gène est localisé sur le locus 22q1,3.1. En partant de l’extrémité N-terminale (Figure I- 16) sa séquence contient un domaine PX (18-136 aa) permettant l’interaction avec la membrane, suivi d’un domaine SH3 (173-228 aa) (202). Sa

partie C-terminale contient un domaine PB1 (237-329 aa). p40^{phox} possède deux sites de phosphorylation au niveau de la serine Ser315 et la thréonine Thr154 (203).

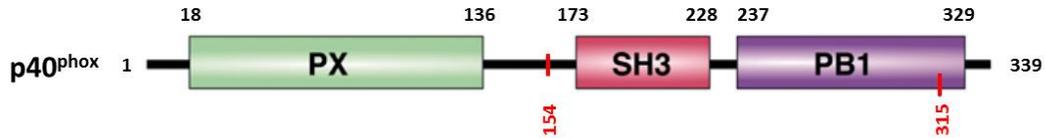


Figure I- 16 : Domaine d'interaction de p40^{phox}.
En rouge les sites de phosphorylation (187).

V.2.b.iv. Rac

Rac est un membre de la famille Rho GTPase qui joue un rôle important dans l'activation du cytochrome *b558*. Egalement appelé aussi NCF3 (*Neutrophil Cytosolic Factor 3*), elle est composée de 192 acides aminés. Il existe deux isoformes de cette protéine Rac1 et Rac2 identique à 92 % dont la séquence diffère de 14 résidus. Le neutrophile humain exprime majoritairement Rac2 contrairement aux monocytes et macrophages qui expriment Rac1 (204–206). Rac possède deux domaines, Switch I (30-40 aa) et Switch II (60-67 aa), mais seul le domaine Switch 1 interagit avec le complexe NADPH oxydase via le domaine TPR de p67^{phox} (187). Une petite séquence d'acide aminé (123-135 aa) lui permet une interaction directe avec le cytochrome *b558*. Rac est prénylé sur la cystéine en C-terminale par une geranyl-geranyl transférase qui ajoute ce groupement sur le motif CAAX en C-terminal de la séquence (207, 208). À l'état inactif, Rac forme un complexe avec Rho-GDI (*GDP Dissociation Inhibitor*) via son domaine Switch II (205) qui masque sa queue hydrophobe (le groupement prényl) et fixe un nucléotide GDP (209–211). Le GDP (*Guanosine DiPhosphate*) est échangé par un GTP (*Guanosine TriPhosphate*) lors de l'activation de la protéine induite par le facteur GEF (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*) (212, 213). Lorsque la protéine est activée le groupement prényl est libéré ce qui permet un ancrage de Rac à la membrane.

V.3. Assemblage et activation du cytochrome *b558*

V.3.a. Les interactions des protéines du complexe NADPH oxydase à l'état de repos

À l'état de repos, les protéines cytosoliques sont dissociées du complexe membranaire NOX2/p22^{phox} et baignent dans le cytosol. Les protéines p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} forment un trimère avec une stœchiométrie 1 : 1 : 1 (Figure I- 17) (131, 214, 215). Il n'est pas exclu non plus que p47^{phox} existe séparément du dimère p40^{phox}-p67^{phox} (216–218).

Dans le cytosol et au repos, p47^{phox} se trouve dans un état auto-inhibé. Il présente une conformation fermée qui l'empêche de se fixer sur la région PRR de p22^{phox}. À l'état inactif les sérines présentes sur le

domaine AIR ne sont pas phosphorylés. Par conséquent, les deux domaines SH3A et B se replient sur la partie C-terminale comprenant la région polybasique de la protéine *via* des interactions intramoléculaires entre ces deux domaines et le domaine AIR (182, 183, 219). De la même manière le domaine PX se fixe sur le domaine SH3A *via* des interactions intramoléculaires (220). p47^{phox} est donc sous une forme globulaire compacte où tous les domaines d'interaction avec le cytochrome *b558* sont inaccessibles. Néanmoins, le domaine PRR de p47^{phox} est accessible et fixe le domaine SH3B de p67^{phox}. L'interaction entre ces deux domaines est très forte avec une constante de dissociation Kd 20 nM. La structure par RMN entre le SH3B de p67^{phox} et p47^{phox} (359-390) (code PDB : 1K4U) montre que les résidus 360-370 de la région PRR de p47^{phox} forment deux hélices antiparallèles qui créent un contact étroit avec le domaine SH3 de p67^{phox}(221).

Les données sur la phosphorylation de p67^{phox} suggèrent que cette protéine puisse également être dans un état auto-inhibé. Un nouveau site de phosphorylation présent sur la partie C-terminale (244-526 aa) ne devient accessible aux kinases ERK 1/2 et p38 MAPK que lorsque la partie N-terminale est détachée (222). Les données de SAXS apportées par Durand *et al.* (2010) confirment la présence d'interactions intramoléculaires au sein de p67^{phox} qui impliqueraient le domaine SH3 A et le domaine TPR (223, 224).

Dans le complexe formé par les trois protéines cytosoliques, p67^{phox} sert de pont entre p47^{phox} et p40^{phox}. Les protéines p67^{phox} et p40^{phox} se lient l'une à l'autre *via* leurs domaines PB1 respectifs. L'interaction entre ces deux protéines est constitutive et très forte avec un Kd de 10 nM (131, 225). La structure cristallographique du complexe formé par ces deux domaines (code PDB : 1OEY) montre que les domaines interagissent de manière non symétrique. Le domaine PB1 de p67^{phox} interagit *via* les résidus basiques présents sur la face arrière avec les résidus acides présents sur la face avant du domaine PB1 de p40^{phox} (225). Il a aussi été suggéré que p40^{phox} agit comme une protéine chaperonne pour stabiliser p67^{phox} (226, 227).

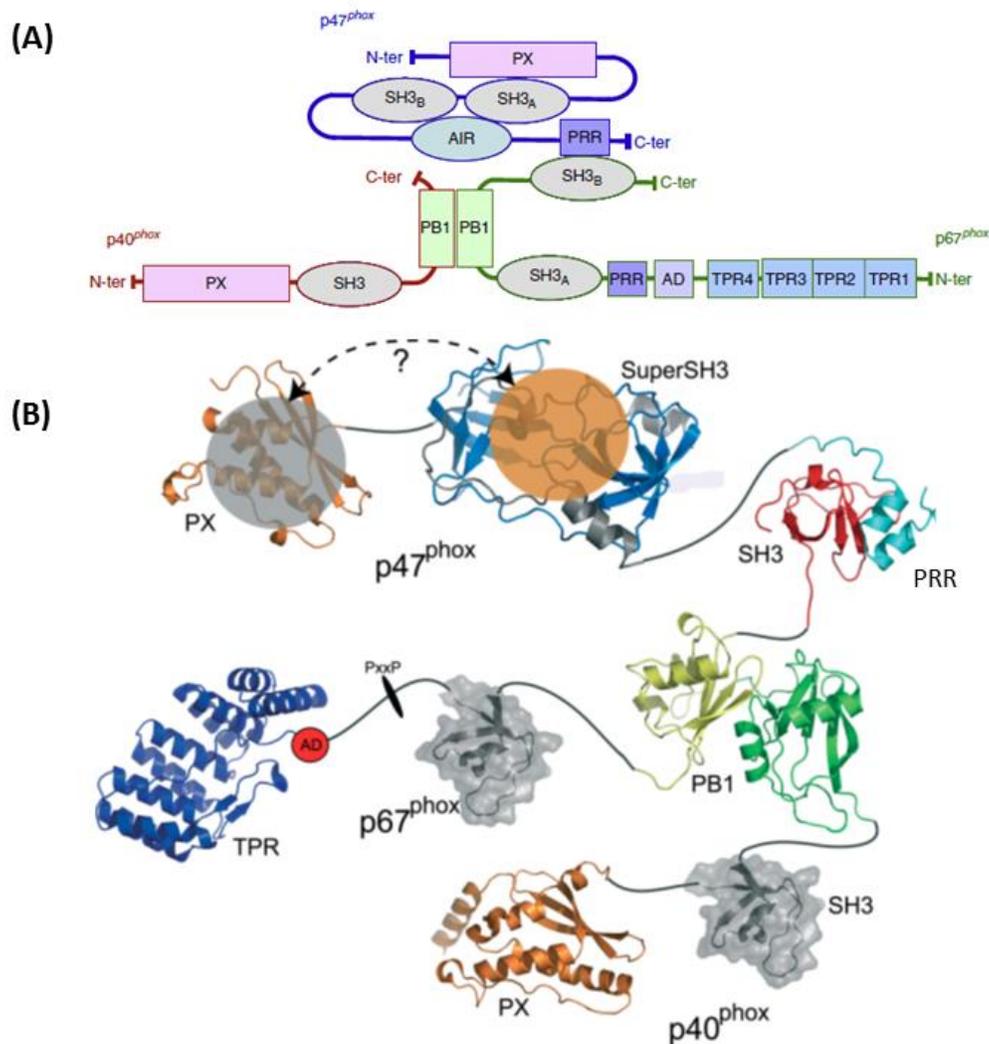


Figure I- 17 : Interaction des protéines cytosoliques à l'état de repos.

(A) Représentation schématique (189) ; (B) Représentation basée sur les structures cristallographiques et RMN (187). Codes PDB 1O7K, 1NG2, 1KU4, 1OEY, 1E96 et 1H6H. Les structures des domaines SH3 de p67^{phox} (SH3 A) et de p40^{phox} n'ont pas encore été résolues et leurs partenaires d'interaction n'ont pas encore été identifiés non plus. À la place de ces domaines est montré en gris une représentation de surface d'une structure archétype du domaine SH3 (Code PDB : 2SEM). Les positions du domaine d'activation AD et du motif PxxP de p67^{phox} sont indiquées en rouge et noir respectivement. Actuellement, les détails moléculaires impliqués dans l'interaction entre le domaine PX et le super-domaine SH3 de p47^{phox} ne sont pas bien définis. Ceci est représenté par des cercles gris et orange au-dessus des domaines PX et du super-domaine SH3 de p47^{phox}.

V.3.b. Les interactions à l'état actif

L'état actif de l'enzyme implique l'assemblage du complexe et la translocation des protéines cytosoliques à la membrane et leur positionnement sur leurs sites d'interaction respectifs. L'activation de l'enzyme est induite par un stimulus qui permet la phosphorylation de p47^{phox} au niveau de la région AIR. Cette phosphorylation est la première étape d'une cascade de réactions permettant de transloquer les

protéines cytosoliques vers la membrane et d'activer NOX2. *In vivo* cette phosphorylation peut être induite par des stimuli physiologiques tels que des motifs microbiens reconnus par les récepteurs membranaires des neutrophiles. Il s'ensuit alors un relargage de calcium dans le cytosol et la production d'acide arachidonique par la PhosphoLipase cytosolique **A2** (cPLA2) activée par la PKC α . L'acide arachidonique régule la translocation de p47^{phox} et p67^{phox} qui ne peut se faire qu'après phosphorylation de ces protéines par la PKC δ (228). En laboratoire ces cascades de réaction peuvent être induites par différents stimuli. *In cellulo* la NADPH oxydase peut être activée par des particules opsonisées, par l'activateur **Phorbol Myristate Acétate** (PMA) ou encore par le peptide **formyl-Met-Leu-Phe** (fMLP) (229). *In vitro* l'activation de l'enzyme peut être réalisée par des molécules amphiphiles anioniques telles que le SDS ou l'acide arachidonique qui miment des phosphorylations en fournissant des charges négatives (230, 231). L'activation de l'enzyme fait intervenir deux types d'interactions : les interactions protéine-protéine et les interactions protéine-membrane (Figure I- 18).

V.3.b.i. Interactions protéine-protéine

La phosphorylation de p47^{phox} est l'évènement clé qui va initier un certain nombre d'interactions entre les protéines cytosoliques et le complexe membranaire NOX2/p22^{phox}. La phosphorylation des sérines Ser379 ou Ser (303+304) ou Ser (359+370) va éliminer les interactions des deux domaines SH3 et la région AIR et induire l'ouverture de p47^{phox} (191, 194, 195). Les domaines SH3 vont se fixer sur la région PRR sur la partie C-terminale de p22^{phox} (149-166 aa) (232). La structure cristallographique (code PDB : 1OV3) montre que les deux domaines SH3 sont impliqués dans cette interaction. Les domaines SH3A et B de p47^{phox} forment un super-domaine SH3 et se fixent simultanément à travers des résidus conservés provenant des deux domaines (183).

L'interaction de p47^{phox} avec p22^{phox} va entraîner avec elle la protéine p67^{phox} qui va se fixer sur NOX2 *via* son domaine AD (199-210 aa) pour faciliter le transfert d'électron (68, 197, 233). Il semble que d'autres évènements interviennent pour renforcer l'interaction de p67^{phox} et NOX2. Ces évènements concernent (i) la phosphorylation de p40^{phox} (234), (ii) des interactions supplémentaires de p47^{phox} avec NOX2 au niveau de la première boucle cytosolique et de deux régions sur le domaine cytosolique de NOX2, l'une étant proche du site de fixation du NADPH et l'autre étant sur l'extrême partie C-terminale de NOX2 (235-237).

Simultanément Rac se fixe sur NOX2 et p67^{phox}. Ces interactions nécessitent l'activation de la protéine Rac qui est finement régulée par le facteur GEF qui permet l'échange de nucléotide GDP en GTP, ainsi que la protéine GAP (*GTPase-Activating-Protein*) qui augmente le taux d'hydrolyse du GTP (212, 213). Cet échange induit des changements de structure régis par les deux régions Switch I et Switch II (187). La structure cristallographique de la partie N-terminale de p67^{phox} contenant les 4 motifs TPR et Rac-GTP

(code PDB : 1E96) révèle les éléments importants de cette interaction. Chaque motif TPR forme deux hélices antiparallèles qui se tassent l'une contre l'autre de façon régulière. Entre les 3^{ème} et 4^{ème} hélices, se trouve une séquence de 20 acides aminés qui forment deux feuillets β antiparallèles nommés « épingle d'insertion β ». Cette épingle, en plus des deux boucles entre TPR1 et TPR2 et entre TRP2 et TRP3, représente les zones d'interaction protéine–protéine entre Rac et p67^{phox} (238, 239). L'interaction de p67^{phox} avec Rac se fait sur la région hautement conservée nommée switch I (30-40 aa) ainsi qu'une région de la partie C-terminale de Rac. L'interaction de Rac-GTP avec NOX2 se fait *via* une petite hélice α comprenant les acides aminés 123 à 135. Cette interaction stimulerait la première étape de transfert d'électrons (240). Les données récentes apportées par la chimère Rac-p67^{phox} de Pick *et al.* suggèrent que Rac est nécessaire pour l'ancrage de p67^{phox} à la membrane. Cette étude renforce la théorie selon laquelle le complexe formé par p67^{phox} et Rac (ancré à la membrane) est nécessaire pour amener p67^{phox} correctement à sa position pour interagir avec le cytochrome *b558* (241).

V.3.b.ii. Interaction protéine–membrane

L'interaction entre les domaines PX de p40^{phox} et p47^{phox} avec les phospholipides de la membrane est un moyen supplémentaire pour orchestrer correctement l'association des protéines cytosoliques avec la membrane. Les domaines PX ont une longueur de 120 acides aminés et reconnaissent un certain nombre de phosphoinositides. La spécificité des phosphoinositides est variable en fonction du domaine (242, 243). Le domaine PX de p40^{phox} interagit spécifiquement avec PtdIns(3)P (216, 244) alors que le domaine PX de p47^{phox} interagit sélectivement avec PtdIns(3,4)P₂ (216, 245). Le domaine PX de p47^{phox} a une structure assez plate contenant en N-terminal 3 feuillets β antiparallèles assemblés avec 4 hélices α sur la partie C-terminale (245, 246). Le domaine PX de p40^{phox} a une structure similaire avec une hélice supplémentaire (244).

La protéine Rac possède un groupement prényl sur son C-terminal qui représente un point d'ancrage dans la bicouche lipidique et lui permet par conséquent de s'associer à la membrane. Ce groupement, caché par RhoGDI à l'état inactif de la protéine, est libéré après échange du nucléotide GDP en GTP (204).

Le mécanisme d'activation de NOX2 implique un certain nombre d'interactions protéine–protéine et d'interactions protéine–membrane assurées par différents domaines présents sur ces protéines. Néanmoins, les domaines SH3 de p40^{phox}, SH3A de p67^{phox} ainsi que son domaine PRR ne sont pas requis pour l'assemblage et l'activation du complexe enzymatique. Se pose alors la question du rôle de ces domaines et de leurs interactions possibles avec d'autres protéines non identifiées qui interviendraient dans la modulation de l'activité de l'enzyme.

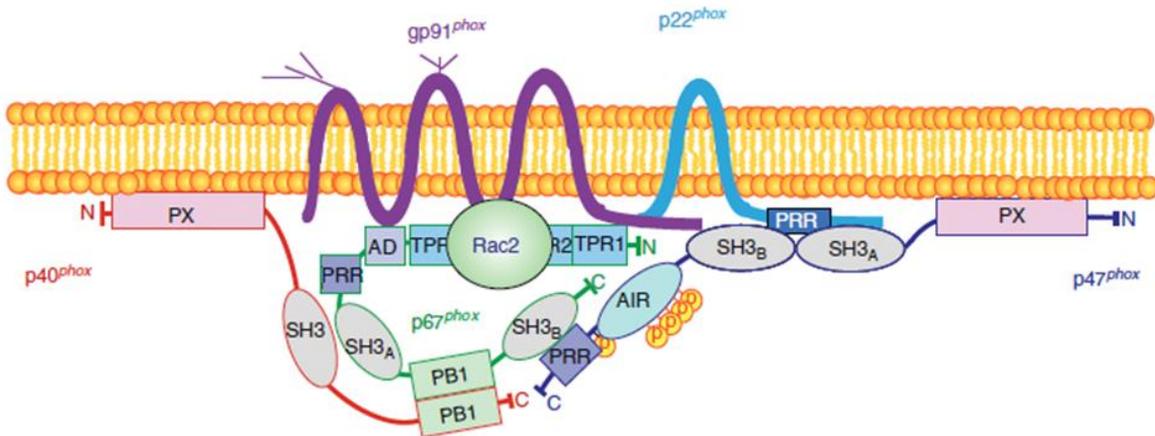


Figure I- 18 : Représentation schématique du complexe actif (189).

VI. Objectif de la thèse

Depuis l'identification de Poldip2 comme étant un régulateur de NOX4, son mécanisme de régulation reste encore inconnu. Par ailleurs, l'équipe de Lyle a aussi montré une co-localisation de Poldip2 avec NOX1 au niveau des cellules du muscle lisse vasculaire mais sans effet régulateur de Poldip2 sur cet enzyme. Il a été proposé que Poldip2 s'associe à ces deux isoformes en se fixant sur la sous-unité membranaire p22^{phox}. Ce dernier point nous amène à soupçonner une éventuelle association de Poldip2 à d'autres isoformes de NOX qui sont associés également à p22^{phox}, comme cela est le cas de NOX2. Outre le fait que cet isoforme est associé à la sous-unité p22^{phox}, NOX2 colocalise avec NOX4 dans plusieurs types cellulaires. Cela est en effet le cas du tissu adipeux (77), de la prostate (78), des ovaires (74), du placenta (74), des cellules hépatocytes (74), des cellules rénales du cortex et de la médullaire (46, 74), des cellules vasculaires du muscle lisse (VSMC) (79, 80). Cette co-localisation peut aussi être subcellulaire, comme par exemple dans les cellules endothéliales du cordon ombilical où NOX2 et NOX4 sont identifiées toutes deux au niveau du réticulum endoplasmique (81). Plus récemment, deux études publiées par Li *et al.* (2017 et 2018) montrent une co-expression de Poldip2 et de NOX2 au niveau des artérioles rénales (51, 52). Toutes ces données posent la question d'une possible activation croisée. L'effet régulateur de Poldip2 sur NOX2 mérite donc d'être étudié.

Dans cette perspective, l'objectif de ma thèse est de voir si Poldip2 peut interagir avec NOX2 et si cette interaction a un effet sur l'activité et l'assemblage du complexe enzymatique. Pour cela, nous nous sommes placés tout d'abord dans un contexte biochimique ayant pour objectif de produire la protéine recombinante Poldip2 (rat) de manière hétérologue. Des analyses en dichroïsme circulaire et infrarouge ont été réalisées pour avancer vers des informations structurales de cette protéine. La fonctionnalité de la

protéine recombinante produite a été vérifiée en mesurant son effet sur l'activité de NOX4. Enfin, l'étude du rôle régulateur de Poldip2 sur l'activité de NOX2 est abordée dans ce travail *in vitro* en utilisant le système dit « *acellulaire* » (« *cell-free assay*»). Les interactions de Poldip2 avec les différents acteurs sur complexe enzymatique sont déterminées par des tests de co-sédimentation et de Dot Blot. Les effets de Poldip2 sur NOX2 observés *in vitro* sont vérifiés *in cellulo* en utilisant des monocytes isolés de sang humain comme modèle cellulaire.

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Production de Poldip2 dans différents systèmes d'expression hétérologue

I.1. Production de Poldip2 de rat dans la levure

I.1.a. Clonage de gène de Poldip2 dans le vecteur d'expression pPICZ α A de levure

Le plasmide KLCF-N contenant le gène de Poldip2 de rat nous a été fourni par le Pr B. Lassègue, Université d'Emory, État de Georgie, États-Unis (19). Une PCR est réalisée sur ce plasmide pour amplifier le gène de Poldip2 comme décrit dans le paragraphe « Méthodes de biologie moléculaire (amplification de l'ADN par PCR) ». Le produit de cette PCR ainsi que le vecteur d'expression en levure, pPICZ α A, sont digérés par les enzymes de restriction *SacII* et *XbaI* puis analysés sur gel d'agarose. Les bandes du gel correspondantes au gène de Poldip2 (1100 pb) et au plasmide pPICZ α A (3,6 kb) sont coupées et purifiées à l'aide d'un kit « GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Microkit » (# K0831). Le gène est par la suite inséré dans le vecteur à l'aide d'une ligase. Des bactéries DH5 α compétentes sont transformées par le produit de la ligation. Les bactéries ayant intégré le plasmide pPICZ α A/Poldip2 sont sélectionnées sur boîte LB agar contenant 25 mg/ml de zéocine. Des colonies de cette boîte sont mises en culture dans du milieu LB contenant de la zéocine (25 mg/ml) sur la nuit à 37 °C. Les plasmides de ces bactéries recombinantes sont extraits et purifiés avec le kit « GeneJET Plasmid Miniprep Kit » (# K0503) puis envoyés à séquencer. Une quantité de ces plasmides est linéarisée avec l'enzyme *PmeI* puis déposée sur gel d'agarose pour vérifier la taille du plasmide pPICZ α A/Poldip2 obtenue (4,7 kb).

I.1.b. Description du construit pPICZ α A/Poldip2

Le gène codant pour Poldip2, issu du rat, de 1100 pb a été cloné avec une étiquette polyhistidine (6xHis) en C-terminal de la protéine. Ce gène a été inséré dans le vecteur d'expression pPICZ α A (Invitrogen). La construction a une taille totale de 4,7 kb. Le gène de Poldip2 est cloné dans le vecteur pPICZ α A sous le contrôle du promoteur AOX1 (Alcool OXYdase) inductible au méthanol. Ce promoteur, également présent dans *P. pastoris*, permet ainsi l'insertion du gène dans le génome de la levure par recombinaison homologue. Ce plasmide contient aussi le facteur α qui code pour le pré-propeptide du facteur α de *Saccharomyces cerevisiae* et qui permet la sécrétion de la protéine recombinante dans le milieu extracellulaire. Enfin ce plasmide contient un gène de résistance à un antifongique, la zéocine, qui permet la sélection des clones qui ont intégrés le gène d'intérêt (Figure II- 1).

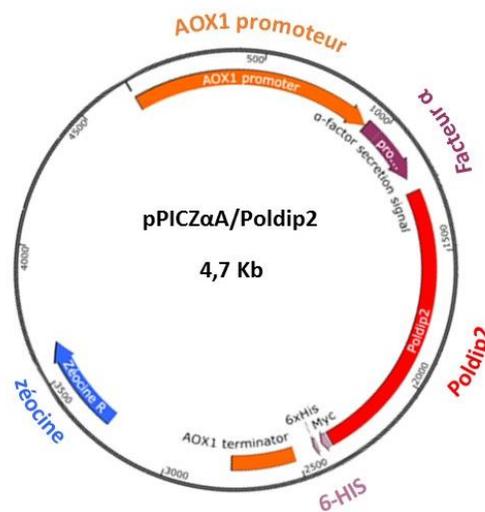


Figure II- 1 : Vecteur d'expression pPICZαA contenant le gène codant pour Poldip2.

I.1.c. Transformation des levures avec l'ADN recombinant

Le vecteur pPICZαA vide et celui contenant le gène de Poldip2 (pPICZαA/Poldip2) sont linéarisés par l'enzyme *PmeI* dont le site de restriction est localisé dans le promoteur AOX1. Des levures compétentes sont décongelées puis centrifugées. Le culot est repris dans 50 µl de Sorbitol 1M. 80 µl de levures sont mélangées dans une cuve d'électroporation avec 12 µl (2,5 µg) d'ADN et soumises à un champ électrique de 1500 V pendant 1 ms puis incubées dans la glace pendant 2 min. 500 µl de Sorbitol 1 M et 500 µl d'YPD sont ajoutés. La solution de levure est incubée à 30 °C pendant 1 h. Les levures sont par la suite étalées sur boîte d'YPD agar contenant de la Zéocine à 500 µg/ml et 1000 µg/ml et incubées pendant 72 h à 30 °C permettant la sélection des clones ayant intégré le vecteur à leur génome.

I.1.d. Induction de l'expression de Poldip2 à petite échelle

Une colonie est utilisée pour inoculer 5 ml de milieu de culture BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*) de composition 1 % extrait de levure, 2 % peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6,0, 1,34 % YNB, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotine, 1 % glycérol, 100 µg/ml Zeocine™ (Invitrogen). La préculture est incubée à 30 °C sous agitation à 250 rpm pendant 24 h jusqu'à atteindre une densité optique à 600 nm (DO_{600}) d'environ 15–18. La préculture est centrifugée à $3000 \times g$ pendant 15 min et les levures sont resuspendues dans 5 ml de milieu BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*) à DO_{600} de 2. Ce milieu est composé de 1 % extrait de levure, 2 % peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6,0, 1,34 % YNB, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotine, 0,5 % méthanol. Du méthanol est ajouté à une concentration finale de 0,5 % toutes les 24 h pour maintenir l'expression. L'ensemble du milieu de culture (5 ml) est récupéré après élimination des levures par centrifugation à $3000 \times g$ pendant 15 min. Pour évaluer le niveau

d'expression de la protéine dans le milieu de culture par Western Blot, le surnageant de milieu de culture contenant la protéine d'intérêt sera préalablement concentré par TCA (méthode décrite plus loin, voir *infra*, III.1).

I.1.e. Induction de l'expression de Poldip2 à grande échelle

L'induction à grande échelle est réalisée comme décrit dans le paragraphe précédent avec les modifications suivantes : une colonie est utilisée pour inoculer 5 ml de milieu de culture BMGY. La préculture est incubée à 30 °C sous agitation à 250 rpm pendant 24 h. Deux millilitres de cette première préculture sont utilisés pour inoculer une deuxième préculture de 250 ml dans le même milieu. Celle-ci est incubée à 29 °C sous agitation à 180 rpm pendant environ 48 h jusqu'à atteindre une densité optique à 600 nm (DO_{600}) de 15–18. La préculture est centrifugée à $3000 \times g$ pendant 15 min et le culot de levures est resuspendu dans du milieu BMMY à DO_{600} de 2. Du méthanol est ajouté à une concentration finale de 0,5 % toutes les 24 h pour maintenir l'expression de la protéine pendant 48 h. L'ensemble du milieu de culture (1 L) est récupéré après élimination des levures par centrifugation à $3000 \times g$ pendant 15 min. Le milieu de culture contenant la protéine d'intérêt sera utilisé ultérieurement pour la purification de celle-ci.

I.1.f. Cassage des levures et fractionnement subcellulaires

Après 48 h d'induction, un millilitre de culture est centrifugé à $3000 \times g$ pendant 15 min. Le culot de levures est lavé deux fois avec de l'eau froide stérile. Le culot est repris dans 500 µl de Tampon TES (50 mM Tris HCl, 0,6 M Sorbitol, 1mM EDTA, 1mM PMSF, pH 7,5). Un volume de billes de verre stériles de taille 0.5 µm est ajouté aux levures. Les tubes contenant le mélange de billes et de levures sont agités à l'aide d'un vortex pendant 20 min en alternant 1 min d'agitation et 1 min de repos sur la glace. Le lysat cellulaire est récupéré et les billes sont lavées avec 200 µl de Tampon TES. Le lysat est centrifugé à $11\ 000 \times g$ pendant 20 min pour isoler les mitochondries, le noyau et débris cellulaires. Le surnageant de cette centrifugation est de nouveau centrifugé à $175\ 000 \times g$ pendant 1 h pour isoler les membranes plasmiques. Le culot membranaire est repris dans 200 µl de tampon TES et homogénéisé par ultrasonication dans un bain à ultrason.

I.2. Production de Poldip2 humain dans *E. coli*

I.2.a. Transformation des bactéries avec l'ADN recombinant

Deux souches bactériennes d'*E. coli* BL21DE3 et SoluBL21DE3 sont utilisées ici pour comparer l'expression de Poldip2 humain en bactéries. Ces deux souches contiennent un vecteur d'expression pET33M (Novagen), modifié comme décrit dans Maga *et al.* (2013) (17), portant le gène codant pour

Poldip2 humain (Figure II- 2) formant des systèmes d'expression (souche plus vecteur) appelés respectivement BL21DE3/Poldip2 et SoluBL21DE3/Poldip2. Des séquences correspondantes à une étiquette poly histidine (6xHis) puis une protéine Glutathion S-transférase (GST) de 25 kDa sont présentes en N-terminal de la séquence codant pour Poldip2.

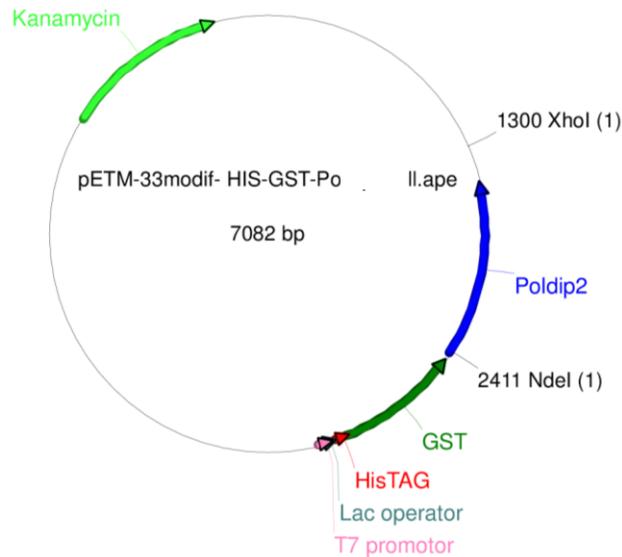


Figure II- 2 : Vecteur d'expression pETM33 contenant le gène codant pour Poldip2.
Schématisé à partir des données publiées par Maga et al. (2013) (17).

Le plasmide pET33M possède de plus un gène de résistance à l'antibiotique Kanamycine (Ka) permettant la sélection et la propagation des clones recombinants. Le vecteur d'expression pET33M possède aussi un promoteur pour la T7 polymérase (Lac), permettant la synthèse de la protéine d'intérêt. Le terme DE3 indique que la souche porte une copie du gène de l'ARN polymérase T7 au sein de son chromosome sous le contrôle du promoteur LacUV5 inductible par l'Isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG) (Systeme pET, Novagen, (Figure II- 3)). L'IPTG est un inducteur non métabolisant de la transcription des gènes bactériens, capable d'induire l'expression de l'opéron Lac qui code pour des enzymes impliquées dans le métabolisme du lactose, en se fixant sur le répresseur Lac I l'empêchant ainsi d'agir. De ce fait, la bactérie produira l'ARN T7 polymérase qui se fixera sur le promoteur présent sur le plasmide et initiera la transcription du gène cible, qui sera par la suite traduit en protéine.

La souche SoluBL21 (Genlantis) dérive de la souche BL21DE3. Elle contient des mutations non caractérisées qui lui permettent d'exprimer des protéines insolubles sous forme soluble. Cette souche a été choisie ici dans le but de faciliter l'expression de Poldip2 qui a tendance à former des corps d'inclusion.

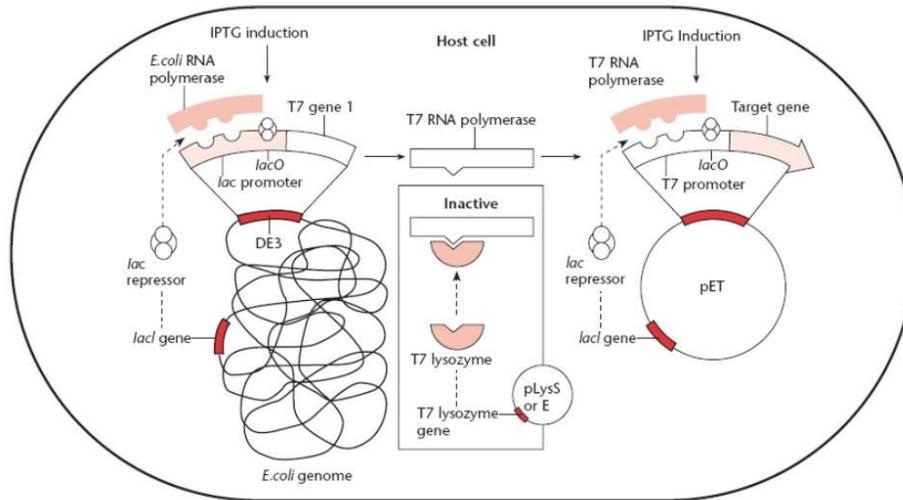


Figure II- 3 : Stratégie de régulation des gènes clonés dans un vecteur pET.

I.2.b. Transformation des bactéries par choc thermique

Les bactéries BL21DE3 et SoluBL21 sont transformées avec le vecteur d'expression portant le gène codant pour Poldip2. Pour cela, le mélange cellules et ADN est incubé sur la glace pendant 30 min. Le tube est par la suite plongé dans un bain à 42°C pendant exactement 30 s puis remis sur la glace. 250 µl de milieu LB contenant 4 % de glucose sont ajoutés. Le tube est ensuite placé dans un incubateur à 37 °C sous agitation à 225 rpm pendant 1 h. Finalement, les cellules sont étalées sur boîte de LB agar contenant de 50 µg/ml de Kanamycine et incubées sur la nuit à 37 °C.

I.2.c. Production de la protéine recombinante

Une préculture est préparée dans 3 ml de LB contenant 50 µg/ml de Kanamycine. Cette préculture est incubée pendant la nuit à 37 °C sous agitation à 200 × rpm. Ensuite, 2,5 ml de la préculture est ajoutée dans un erlenmeyer contenant 50 ml de milieu souhaité, soit du LB soit du M9 dans le cas de la souche SoluBL21, supplémenté en antibiotique (50 mg/ml de Kanamycine). Le milieu M9 est un milieu minimum minéral enrichi, constitué de 42,3 mM de Na₂HPO₄, 22,06 mM de KH₂PO₄, 8,6 mM de NaCl, 18,7 mM de NH₄Cl, 0,1 mM de CaCl₂, 1 mM de mgSO₄, 0,3 % de glycérol. L'erlenmeyer est placé dans un incubateur à 30 °C sous agitation à 140 rpm jusqu'à obtenir une absorbance à 600 nm de 0,6 (environ 2 h). L'expression de la protéine d'intérêt est induite par l'ajout d'IPTG à une finale de 0,5 mM. Des cultures dans lesquelles l'IPTG n'a pas été ajoutées, servent de contrôle négatif. La culture se poursuit par une incubation à 18 °C (durant la nuit) sous agitation à 140 rpm pendant 16 h.

I.2.d. Cassage des bactéries et fractionnement cellulaires

Les cultures sont centrifugées à $3000 \times g$ durant 15 min. Après élimination du surnageant (ici le milieu de culture) le culot bactérien est plongé dans l'azote liquide pour provoquer un choc thermique qui fragilise les membranes des bactéries et permet d'augmenter l'efficacité du cassage par sonication. Ce procédé a pour but de casser les parois bactériennes par émission d'ondes ultrasonores et de libérer les protéines du cytosol. Ensuite, 3 ml du Tampon de cassage (25 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 1 mM d'EDTA, 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF, une pointe de spatule (1–2 mg) de DNase) sont ajoutés pour resuspendre le culot bactérien. La pointe du sonicateur est plongée dans la suspension de bactérie afin de procéder au cassage. L'appareil (Branson Sonifer 250) est paramétré à une puissance de 3 à 50 %. On effectue 4 passages de 1 min de sonication par tube avec un temps de repos de 2 min sur la glace entre chaque passage pour éviter une surchauffe excessive du milieu. 50 μ l d'extrait brut sont prélevés de chaque solution soniquée, qui sont stockés à -20°C jusqu'à une analyse ultérieure. Les différents constituants cellulaires sont séparés par centrifugation. Les solutions sont centrifugées par centrifugation à une vitesse de $17\,000 \times g$ pendant 60 min. On obtient un culot contenant les débris cellulaires et les corps d'inclusion. Le surnageant qui contient les protéines solubles et les membranes. Pour avoir des conditions comparables, tous les culots sont repris dans le même volume (3 ml) puis homogénéisés par une courte sonication (une minute, puissance de 30 %). Des aliquots de 50 μ l de chaque culot et surnageant sont conservés à -20°C jusqu'à une analyse ultérieure.

I.3. Production de Poldip2 humain *in vitro*

- **Principe**

À cause de leur propriété à former des corps d'inclusion ou leur toxicité, certaines protéines sont difficiles à exprimer de manière hétérologue. Le système d'expression *in vitro* appelé également « *cell-free* », décrit dans la Figure II- 4, présente dans ce cas une bonne alternative. Cette technique a été tentée ponctuellement pour produire du Poldip2 humain en collaboration avec Marie-France Giraud (IBGC, Bordeaux). Le protocole d'après Lariou *et al.* (2017) (247) consiste à mélanger dans un système ouvert tous les substrats et enzymes nécessaires pour la transcription et la traduction de protéines recombinantes en présence du plasmide contenant la séquence codante pour la protéine d'intérêt.

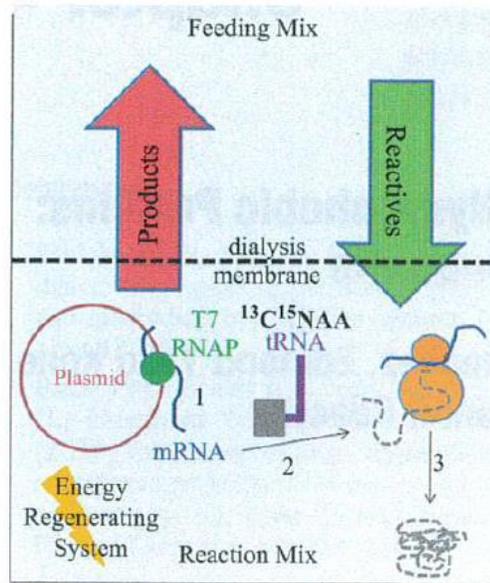


Figure II- 4 : Principe du système d'expression in vitro.
D'après Larrieu et al. (2017) (247).

II. Méthodes de biologie moléculaire (amplification de l'ADN par PCR)

La PCR (Polymerase Chain Réaction) est utilisée ici pour amplifier le gène de Poldip2 dans le génome de la levure à l'aide d'un *primer Forward* [CAT CCG CGG TAA GGC TGG TTG TGT GGC C] (25 μ M), d'un *primer Reverse* [CGC GTC TAG AGC CCA GTG AAG GCC TGA GGG TG] (25 μ M) localisés de part et d'autre du gène de Poldip2. Pour cela, l'ADN génomique (ADNg) de la levure *P. pastoris* est extrait à l'aide du kit E.Z.N.A[®] Yeast DNA Kit (Omega Bio-teck, VWR). 200 ng de cet ADNg est placé dans du tampon Thermo 5X en présence de dNTP (10 mM chacun), des primers Forward et Reverse et 0.5 U de PhusionTM High Fidelity DNA Polymerase. Pour le contrôle négatif on utilisera 10 ng d'ADNg de la souche de *P. pastoris* contenant le vecteur pPICZ α A vide. Le contrôle positif est quant à lui de l'ADN plasmidique du vecteur pPICZ α A contenant la séquence codante pour la protéine Poldip2. Le mélange est placé dans le thermocycleur. La PCR est effectuée selon le programme suivant :

- (1) Dénaturation initiale de 2 min 95 °C ;
- (2) Dénaturation de 30 s 95 °C ;
- (3) Hybridation de 30 s 61 °C ;
- (4) Élongation de 1 min à 72 °C ;
- (5) Élongation finale 10 min à 72 °C.

Les étapes de 2 à 4 sont répétées 30 fois.

L'ADN est ensuite analysé sur gel d'agarose 1 %. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le GenRuler 1kb DNA Ladder.

III. Méthodes biochimiques d'analyse de protéines

III.1. Concentration des protéines par l'acide trichloroacétique (TCA)

Le surnageant de culture des levures est récupéré après centrifugation à $3000 \times g$ pendant 15 min. Une solution d'Acide TriChloroacétique (TCA) à 10 % est ajoutée pour un ratio 1:9 (V/V) TCA/surnageant de culture. Ce mélange est incubé pendant 30 min en rotation en chambre froide. Ce mélange est par la suite centrifugé pendant 10 min à $14\,000 \times g$. 200 μ l d'acétone froid sont ajoutés au culot obtenu. Le culot est incubé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1 h puis de nouveau centrifugé pendant 10 min à $14\,000 \times g$. Cette opération est répétée deux fois. Le culot est finalement séché à l'aide d'un *speed-vac* pendant 5 min pour éliminer l'excès d'acétone puis repris dans 20 μ l de tampon de Laemli contenant 10 % de glycérol, 60 mM Tris HCl pH 6,8, 100 mM DTT, 1,5 % SDS, 0,01 % bleu de bromophénol.

III.2. SDS-PAGE

Le gel SDS-PAGE est réalisé à partir (i) d'un gel de concentration composé de 5 % d'acrylamide, 0,13 % de bisacrylamide, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1 % persulfate d'ammonium, 0,1 % TEMED et (ii) d'un gel de séparation constitué de 12 % acrylamide, 0,27 % bisacrylamide, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1 % persulfate d'ammonium, 0,04 % TEMED. La polymérisation des gels s'effectue en ajoutant extemporanément le TEMED avant de couler les gels (i) puis (ii) entre deux plaques de verre. Une fois que le gel a polymérisé, les échantillons de protéines qui ont été repris dans le tampon de Laemli 5 fois concentré contenant 50 % de glycérol, 0,3 M Tris HCl pH 6,8, 0,5 M DTT, 7,5 % SDS, 0,05 % bleu de bromophénol et incubés à $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 5 min, sont déposés dans un volume maximal de 25 μ l. Un marqueur de masse moléculaire (Precision Plus Protein™ Standard, BIO-RAD) est déposé en même temps que les échantillons. La migration est effectuée à 25 mA par gel pendant 1 h 30. Le tampon de migration est constitué de 25 mM Tris pH 8,5, 192 mM glycine, 0,1 % SDS. Les gels sont colorés pendant 30 min dans une solution de bleu de Coomassie (40 % éthanol, 10 % acide acétique et 0,4 % bleu de Coomassie) puis décolorés dans une solution composée 10 % éthanol, 10 % acide acétique.

III.3. Western Blot

La vérification de l'expression de protéine d'intérêt est réalisée par Western Blot. Cette méthode permet, après séparation des protéines d'un échantillon par gel d'électrophorèse et transfert sur une

membrane, de détecter la présence d'une protéine grâce au marquage spécifique par un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt.

Après migration sur gel de polyacrylamide 12 %, les protéines sont électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare). Le montage est placé dans un tampon CAPS à 20 mM pH 11 contenant 10 % de méthanol. Le transfert s'effectue à froid et sous agitation pendant 1 h à 150 V ; 250 mA. Suite au transfert, la membrane est saturée par une incubation pendant 1 h sous agitation à température ambiante dans une solution de BSA (*Bovine Serum Albumine*) à 2,5 % préparée dans 20 ml de TBST (*Tris Buffered Salin Tween* à contenant 25 mM Tris HCl, 150 mM NaCl et 0,075 % Tween-20 à pH 7,4.

La détection de la protéine d'intérêt se fait de la manière suivante. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire, dilué comme indiqué dans le Tableau II- 1 dans la solution de BSA à 0,5 %, dans du TBST, pendant 1 h à température ambiante. La membrane est ensuite lavée trois fois pendant 10 min dans une solution TBST, puis incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP dilué 1/15000 dans la solution de BSA à 0,5 %, préparée dans du TBST, pendant 1 h à température ambiante. La membrane est de nouveau lavée trois fois dans du TBST pendant 10 min.

Tableau II- 1 : Liste des anticorps et sonde utilisés pour les expérimentations de Western Blot décrites dans la partie « Résultats et Discussions »

Anticorps dirigé contre :	Origine	Dilution	Marque	Référence	Lot	Taille attendue
Poldip2 (H300) (61-360)	Lapin (poly) ²²	1/1500	Santa Cruz	Sc-292117	E0114	38 kDa
Poldip2 (300-368)	Lapin (mono) ²³	1/1500	Abcam	ab 181841	GR3198289-1	38 kDa
6-His (H-3)	Souris (mono)	1/500	Santa Cruz	Sc-8036	E2011	Protéine de fusion
Sonde anti-His HisProbe™-HRP	-	1/4000	Thermo Scientific	15165	-	-
gp91 ^{phox} (54.1) (383-390)	Souris (mono)	1/1500	Santa Cruz	sc-130543	F1011	91 kDa
p22 ^{phox} (44.1) (29-33) (182-188)	Souris (mono)	1/1500	Santa Cruz	sc-130550	H1111	22 kDa
NOX4 (500-578)	Lapin (mono)	1/1500	Abcam	ab109225	GR189791-12	65 kDa
p67 ^{phox}	Lapin	1/1000	Millipore	07-002	2837065	65 kDa

²² Poly : anticorps polyclonal

²³ Mono : anticorps monoclonal.

(séquence totale)	(poly)					
p47 ^{phox} (18-197)	Souris (mono)	1/1000	BD Bioscience	BD 610354	37541	47 kDa
Rac1 NS ²⁴	Souris (mono)	1/500	cytoskeleton	ARC03	103	22 kDa
GOLPH4 ²⁵ (50-150)	Lapin (poly)	1/2000	Abcam	ab139261	GR134834-1	88 kDa
Calreticuline ²⁶ (383-399)	Souris (mono)	1/2000	Sigma- aldrich	C7492	108K4756	63kDa
VDAC ²⁷ (185-197)	Lapin (poly)	1/1000	Invitrogen	#PA1- 954A	RJ239646	31 kDa
Lamin A/C ²⁸ (NS ²⁹)	Souris (mono)	1/1000	Santa Cruz	sc-7292	J0306	70 kDa
IgG anti-souris ³⁰	Chèvre	1/15000	Santa Cruz	sc-2005	H0415	–
IgG anti-lapin ³¹	Chèvre	1/15000	Santa Cruz	sc-2004	H1015	–

La révélation se fait par incubation de la membrane en présence du substrat de la HRP afin de mesurer la luminescence produite. Pour cela, la membrane est incubée dans 3 ml de tampon (Luminol/péroxydes d'hydrogène, 1:1) du kit « ECL West Pico Amersham® » pendant 5 min. Le signal luminescent est détecté par Bioluminescence.

III.4. Western Blot en condition native

Ce protocole reprend les mêmes étapes principales que celles du Western Blot en condition dénaturante à quelques différences précisées ci-après.

Les échantillons de protéines sont repris dans du tampon de Laemli concentré 5 fois non dénaturant ne contenant pas de SDS composé de 0.3 M Tris HCl pH 6,8, 50 % glycérol. Ces échantillons migrent par la suite sur un gel de polyacrylamide « MiniPROTEAN® TGX™ Gels » (4–20 % ; Biorad # 456-1093) contre un tampon de contenant 25 mM Tris pH 8,5, 192 mM glycine, 0,1 % SDS. Le transfert du gel se fait contre un tampon contenant 25 mM Tris pH 8,5, 192 mM glycine, 0,01 % SDS. La suite du protocole se fait comme décrit dans le paragraphe précédent.

²⁴ Rac1 NS : la position de l'épitope n'est pas donnée dans la fiche technique du produit.

²⁵ GOLPH4 : golgi et endosome de membrane.

²⁶ Calreticuline : marqueur de réticulum endoplasmique et de mitochondrie.

²⁷ VDAC : marqueur de mitochondrie.

²⁸ Lamine A/C : marqueur de noyau.

²⁹ NS : La position de l'épitope n'est pas donnée dans la fiche technique du produit. La seule information mentionnée est l'anticorps qui est préparé à partir d'extrait de lamine d'origine porcine.

³⁰ IgG anti-souris : anticorps secondaire.

³¹ IgG anti-lapin : anticorps secondaire.

IV. Méthodes de purification des protéines recombinantes

IV.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

La technique de précipitation différentielle au sulfate d'ammonium se base sur le phénomène de « *salting out* » c'est-à-dire la déshydratation des protéines. Le sulfate d'ammonium de force ionique élevée agit de deux manières sur les protéines : premièrement, il va neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité, et deuxièmement, il va entrer en compétition avec les protéines pour les molécules d'eau disponibles en solution. Quand la concentration en sel est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci précipite. Toutes les protéines n'ayant pas la même solubilité, peuvent alors être séparées en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique du milieu.

Du sulfate d'ammonium à une concentration finale de 30 % est ajouté au surnageant de culture sous une agitation douce à 4 °C. Après 20 min d'agitation, la solution est centrifugée à 10 000 × g pendant 20 min. Le culot est resuspendu dans un minimum de volume de tampon (25 mM Sodium phosphate pH 7,4, 150 mM NaCl) puis dialysé selon le protocole décrit ci-dessous.

IV.2. Chromatographie d'affinité Ni Sepharose

Cette technique permet de séparer les protéines en se basant sur leur affinité vis-à-vis de la résine de Nickel. La protéine Poldip2 possédant une étiquette 6 histidines, elle devrait présenter plus d'affinité pour la résine que les autres protéines et se fixer sur cette résine. Pour éluer les protéines fixées, on utilise un tampon contenant de l'imidazole. Celui-ci a plus d'affinité pour la résine de Nickel que les protéines porteuses d'une étiquette histidine. La chromatographie d'affinité est réalisée avec une résine Ni Sepharose™ Excel (GE Healthcare). La résine est équilibrée à un débit de 5 ml/min avec du tampon d'équilibration (25 mM sodium phosphate pH 7,4 ; 500 mM NaCl) (5 volumes de colonne). Le surnageant de culture³² (1 litre de volume) est chargé sur la colonne à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit de 1 ml/min pendant la nuit. Cette étape ne peut pas être réalisée quand la colonne est connectée aux systèmes de chromatographie ÄKTA Prime (Amersham pharmacia biotech) car le surnageant de culture, trop corrosif, peut endommager le système de la machine. La colonne contenant la résine est ensuite reliée à un système de chromatographie ÄKTA Prime qui permet de contrôler le débit des tampons et de collecter l'élution en fractions de volume désiré. Le lavage de la colonne se fait à un débit de 5 ml/min avec le tampon de lavage

³² Si le surnageant est concentré au sulfate d'ammonium avant le chargement sur la colonne, le volume est alors d'une part beaucoup plus faible, de l'ordre de 20 ml, d'autre part l'échantillon est repris dans un tampon adapté aux conduits fluidiques du système de chromatographie ÄKTA Prime.

(25 mM sodium phosphate pH 7,4 ; 500 mM NaCl ; 50 mM Imidazole) jusqu'à ce que la DO à 280 nm soit stable et proche de 0. Cette étape permet de décrocher les protéines fixées non spécifiquement à la résine. Les protéines d'intérêt fixées sont ensuite éluées de la colonne à un débit de 5 ml/min avec le tampon d'éluion (20 mM sodium phosphate pH 7,4 ; 500 mM NaCl ; 300 mM Imidazole) et collectées par fraction de 2 ml. Des aliquots sont conservés à chaque étape afin de pouvoir *a posteriori* les analyser sur gel SDS-PAGE ou Western Blot.

IV.3. Chromatographie d'échangeuse d'ions

Les protéines en solution portent une charge soit négative soit positive en fonction de leur **Point Isoélectrique (PI)**. Celles-ci se fixent *via* des interactions ioniques avec des charges opposées fixées sur la phase stationnaire. Cette méthode de chromatographie va donc séparer les protéines en fonction de leur charge. En fonction du PI de la protéine, on utilisera soit une résine cationique **DiEthylAmnoEthyl (DEAE Sepharose™ Fast Flow, GE Healthcare)** soit une résine anionique **SulphoPropyl (SP Sepharose™ Fast Flow, GE Healthcare)**. En fonction de sa taille Poldip2 va avoir différents PI. La forme à 46 kDa (taille attendue pour Poldip2 recombinant de rat) a un PI de 8,34. Les formes à 39 kDa et 29 kDa produites par la levure ont respectivement un PI de 6,16 et 5,92. La colonne contenant la résine est équilibré à un débit de 1 ml/min avec un tampon d'équilibration de même composition que le tampon contenant la protéine (25 mM sodium phosphate, 1mM EDTA, pH 7,4). La protéine est ensuite chargée sur la colonne avec ce même débit. La colonne est lavée avec le tampon d'équilibration pour éliminer les protéines fixées de manière non spécifique. Le profil d'éluion est suivi en observant l'absorbance des protéines à 280 nm. Une fois que l'absorbance à 280 nm est proche de 0, la protéine est éluée à l'aide d'un tampon contenant 25 mM sodium phosphate, 700 mM NaCl, mM EDTA, pH 7,4. Le sel ayant des interactions ioniques plus fortes avec la résine va entrer en compétition avec la protéine et par conséquent la décrocher. Ce même protocole avec un volume de résine faible (environ 1 mL) peut être aussi utilisé pour concentrer l'échantillon.

IV.4. Chromatographie d'exclusion de taille

Cette technique permet de séparer les protéines selon leur taille moléculaire. Elle nous permettra d'améliorer encore plus la pureté de la protéine. La chromatographie d'exclusion est effectuée avec une résine **Superdex™ 75 prep grade**. Cette résine permet de séparer des protéines d'une taille comprise entre 3-70 kDa. La colonne de résine est équilibrée avec du tampon d'équilibration (25 mM sodium phosphate pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM sulfate de magnésium) (5 volumes de colonne). Avant d'être déposée sur la colonne, la solution protéique est concentrée puis chargée à un débit de 1 mL/min. Les protéines sont éluées à un débit de 1 ml/min et récupérées dans des fractions de 0.5 ml. Des aliquots sont conservés à chaque

étape afin de les analyser sur gel SDS-PAGE ou Western Blot. Le reste est congelé rapidement dans l'azote liquide avant d'être conservé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IV.5. Protocole de dialyse

Afin d'éliminer l'Imidazole ou le sel, une dialyse est réalisée. Pour cela, les échantillons sont placés dans des boudins constitués d'une membrane (4 Spectra/Por® Dialysis Membrane) de pores de *cut-off* 10 kDa. Le boudin de dialyse contenant l'échantillon est placé dans un bain de 5 L de tampon souhaité (par exemple pour éliminer l'imidaole, le tampon de dialyse contient 20 mM sodium phosphate pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM mgSO_4). Le boudin est ainsi mis sous agitation pendant 1 h à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis dans un second bain de 5 L de tampon (4 mM sodium phosphate pH 7,4, 50 mM NaCl, 2 mM mgSO_4)³³ toute la nuit.

IV.6. Protocole de concentration de l'échantillon par évaporation

À la sortie de colonne, l'échantillon purifié est trop dilué. La concentration est de l'ordre d'une centaine de $\mu\text{g/ml}$. Il ne peut donc être utilisé en l'état, que ce soit pour les tests d'activité ou pour des analyses biophysiques. Une étape de concentration est donc nécessaire. Ici nous avons choisi la concentration à l'aide d'un rotavapeur (Heidolph Hei-VAP Advantage). Cette technique a l'avantage d'être relativement rapide et de préserver l'échantillon par rapport à d'autres méthodes. La concentration *via* les unités de concentration s'avère totalement inadaptée pour Poldip2 qui adhère aux membranes, ce qui aboutit à une perte totale de l'échantillon.

Environ 20 ml d'échantillon de la solution protéique purifiée sont placés dans le ballon d'évaporation. Le ballon est plongé dans un bain marie thermostaté à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'évaporation est réalisée sous rotation à 65 rpm à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ à une pression comprise entre 50 et 10 mbar³⁴ pendant environ 30 min. Quand le volume de l'échantillon est réduit environ 5 fois, le dispositif est démonté et l'échantillon est récupéré. Il est par la suite centrifugé pendant 5 min à $14\ 000 \times g$. Le surnageant est récupéré et de nouveaux dialysés³⁵

³³ Ce tampon est très dilué car une étape de concentration par évaporation de l'eau va suivre. Cette méthode implique que les sels seront concentrés également. Il faut donc adapter la composition du tampon de telle sorte que la protéine soit après concentration dans un tampon proche des conditions physiologiques. D'une manière générale la composition du tampon varie en fonction de l'utilité. Il est dix fois plus concentré lorsque la protéine est dialysée avant une étape de chromatographie. Il ne contient pas de NaCl ni de mgSO_4 mais de l'EDTA à 1mM lorsque la dialyse précède une étape de chromatographie échangeuse d'ions.

³⁴ L'appareil à notre disposition ne permet pas de contrôler la pression. On a donc installé un baromètre raccordé aux tuyaux pour faire cette mesure. Le baromètre n'étant pas très précis d'où l'incertitude des valeurs énoncées.

³⁵ Ne pouvant pas contrôler exactement le volume final après concentration, on réalise une dialyse pour être sûr de la composition saline du tampon d'autant plus que celle-ci est très importante dans le cas des tests d'activité enzymatique réalisé sur NOX2. En effet il faut respecter exactement 10 mM de mgSO_4 .

contre un tampon de composition suivante 20 mM sodium phosphate pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgSO_4 . Deux dialyses successives (1 h puis sur la nuit) à 4 °C sont ensuite réalisées.

V. Méthode de caractérisation structurale de Poldip2 de rat

V.1. Par spectrométrie de masse

Les expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées en collaboration avec la plateforme SICaPS (Coll. D. Cornu et L. Sago ; Gif/Yvette).

V.1.a. Marquage au TMPP et digestion à la trypsine

Le marquage au TMPP (N-Succinimidylloxycarbonylmethyl) tris (2,4,6-triméthoxyphényl) phosphonium bromide (TMPP-Ac-Osu) a pour but de modifier sélectivement le peptide N-terminal des protéines de manière à améliorer sa détection lors des analyses LC-MS/MS après digestion enzymatique en laissant intact les peptides internes (Figure II- 5). Le peptide en N-terminal marqué subit une augmentation de masse. Son signal est par conséquent augmenté ce qui permet d'améliorer sa détection.

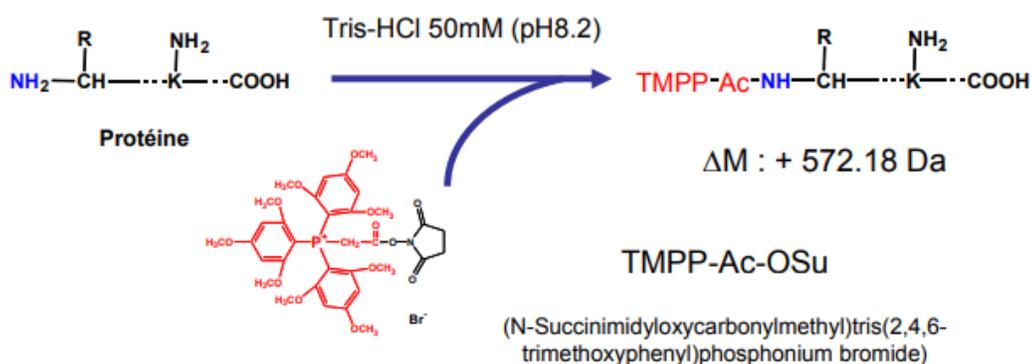


Figure II- 5 : Réaction de dérivation des amines N-terminales des protéines par le TMPP-Ac-OSu.

V.1.b. Analyse par LC-MS/MS couplé à un triple TOF

Après digestion des protéines et extraction du gel, l'échantillon est analysé par nanoLC-MS/MS avec le spectromètre de masse triple-TOF 4600 (ABSciex) couplé au système de Chromatographie Liquide Ultra performante (UPLC) nanoRSLC (Thermo Scientific) équipé d'une colonne trap (Acclaim PepMap100C18, 75 μm i.d. \times 2 cm, 3 μM) et d'une colonne analytique (Acclaim PepMapRSLCC18, 75 μm i.d. \times 25 cm, 2 μM , 100 Å). Le protocole est réalisé comme décrit dans Szabó *et al.* (2018) (248).

V.1.c. Analyse par MALDI-TOF

Les protéines digérées sont analysées par MALDI-TOF-TOF 5800 (ABSciex) selon le protocole décrit par Bou-Nader *et al.* (2017) (249).

V.2. Par dichroïsme circulaire

Avant analyse par dichroïsme circulaire, les échantillons sont dialysés contre un tampon de composition 100 mM NaF et 10 mM NaPO₄ pH 7,4. Environ 200 µl d'échantillon sont introduits dans une cassette de dialyse d'un *cut-off* de 10 kDa. La cassette est plongée dans un bain contenant 1 litre de tampon pendant 1 h à 4 °C puis dans un second bain à 4 °C pendant la nuit.

Dans le cadre d'une collaboration avec Dr F. Wien (au synchrotron Soleil), les spectres SRCD (*Synchrotron Radiation Circular Dichroism*) sont enregistrés sur la ligne DISCO au synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette. L'appareil est calibré (longueur d'onde et intensité de signal) avec de l'acide camphre sulphonique concentré à 6,19 mg/ml. 25 µl d'échantillon de Poldip2 concentrés à 59,6 µM (2,33 mg/ml) sont introduits dans une cuve de CaF₂ d'un trajet optique 0,1 mm. 2 cuves sont superposées pour aboutir à un trajet optique de 0,2 mm. Les spectres sont mesurés entre 280 et 170 nm, en utilisant la mi-hauteur de la HT (haute tension) avec un *cut-off* à 175 nm. Trois scans consécutifs sont enregistrés et moyennés pour l'échantillon et pour le blanc. Ce dernier correspond au tampon (100 mM NaF et 10 mM NaPO₄ pH 7,4). Le spectre moyen du blanc est soustrait du spectre moyen de l'échantillon. Puis, le spectre obtenu est lissé en utilisant l'algorithme de Savitsky–Golay. La température est maintenue à 25 °C tout au long de l'expérience. Les spectres sont exprimés en delta epsilon et calculés en utilisant le poids moléculaire moyen de 39 075 Da pour la protéine de Poldip2 correspondant à une séquence 337 acides aminés. La composition en structures secondaires est déterminée en utilisant le logiciel *BestSel* (<https://bestsel.elte.hu/index.Php>). L'analyse est faite pour un intervalle allant de 190 à 250 nm avec un « *scaling factor* » de 1.

L'analyse de la stabilité en température est réalisée comme décrit précédemment avec les modifications suivantes. 95 µl d'échantillon de Poldip2 concentrés à 12,9 µM (0,435 mg/ml) sont introduit dans une cuve de CaF₂ d'un trajet optique 0,5 mM. Les spectres sont enregistrés à des températures allant de 15 °C à 95 °C avec un pas de 5 °C. Pour chaque température 4 scans sont enregistrés.

V.3. Par spectroscopie Infra rouge

Les spectres ATR FTIR (*Attenuated Total Reflection ; Fourier Transform InfraRed*) ont été obtenus en collaboration avec J. Waytens (ULB, Bruxelles) avec l'appareil Equinox 55 de la marque Bruker, équipé d'un détecteur MCT (*Mercurie Cadmium Tellure*), refroidi à l'azote liquide, avec une résolution de 4 cm⁻¹ et un diaphragme de 3,5 mM. Le spectromètre est purgé en continue avec de l'air sec.

2 µl d'échantillon sont déposés sur un cristal de diamant (modèle Goldengate de chez Specac) et séché avec un léger flux d'azote. 128 scans sont enregistrés entre 4000 cm⁻¹ et 800 cm⁻¹ que ce soit pour l'échantillon ou pour le blanc (air).

Les structures secondaires sont déterminées à partir des bandes spécifiques à l'amide I (1700–1620 cm^{-1}) et l'amide II (1600–1510 cm^{-1}) en appliquant la calibration développée par le laboratoire du Dr Goormaghtigh (250) et calculé avec le logiciel *Kinetics* sous Matlab.

VI. Méthodes de biologie cellulaire

VI.1. Cellules modèles HEK293 et COS 7

VI.1.a. Les cellules HEK293

Les cellules HEK293 sont une lignée de fibroblastes embryonnaires de rein qui expriment de manière endogène NOX4, p22^{phox} et Poldip2. Ces cellules ont été transfectées de manière stable par le gène de NOX4 inséré dans le vecteur pDEST 30. L'induction de NOX4 recombinant est contrôlée par un système Tet-On³⁶ (251).

VI.1.a.i. Culture cellulaire

- **Milieux de culture**

Dans le cadre de la collaboration avec Dr C. Dupuy (IGR, Villejuif), nous disposons de cellules HEK293 exprimant NOX4 de manière inductible sous l'effet de la doxycycline. Ces cellules sont mises en culture dans un milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contenant 4,5 g/l de D-glucose. Le milieu est supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF) dépourvu de tétracycline (TET-free)³⁷, 1 mM de sodium pyruvate, 2 mM L-alanyl-L-glutamine (GlutaMAXTM-I), 100 U/ml de pénicilline, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine et 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de généticine. Tous les produits sont de la marque gibco® by life technologiesTM sauf le sérum de veau fœtale (TET-free) qui est de la marque Clontech.

- **Entretien des cellules**

Les cellules, cultivées en boîte de 100 mM, sont repiquées lorsque leur confluence atteint 80 à 90 %. Pour cela, elles sont traitées par 1 ml de trypsine (TrypLETM Express) pendant 2 min pour les détacher après les avoir lavées au préalable par 10 ml de PBS. L'action de la trypsine est stoppée par addition de 5 ml de milieu contenant 5 % de SVF. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 min à 1500 rpm. Le culot cellulaire est repris par 10 ml de milieu et les cellules, remises en suspension, sont comptées. Après

³⁶ Tet-On : dans ce système, la transcription du gène est induite par la tetracycline ou un de ses dérivés, la doxycycline.

³⁷ L'expression de NOX4 dans les cellules HEK293 est induite par ajout de Doxycycline. Il n'est donc pas recommandé de mettre en culture ces cellules dans un milieu de culture contenant du sérum de veau fœtale classique. Celui-ci contient en effet des traces de tétracycline ce qui peut induire l'expression de la protéine d'intérêt par reconnaissance croisée tetracycline-doxycycline.

comptage, les cellules sont ensemencées dans une boîte de 100 mM à la concentration de $4,5 \cdot 10^5$ /ml puis mises en culture dans un incubateur à 37 °C sous atmosphère contenant 5 % de CO₂.

- **Traitement à la doxycycline**

Quand les cellules ont atteint 80 % de confluence, elles sont traitées par la doxycycline pour induire l'expression de NOX4. Une solution à une concentration de 1 mg/ml est fraîchement préparée dans du PBS Dulbecco puis filtrée. Des concentrations de doxycycline de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} à 10^{-5} µg/ml sont ajoutées dans le milieu de culture. La condition sans doxycycline sert de contrôle pour l'expression des protéines endogènes. Les cellules sont incubées 24 h puis détachées à l'aide de la trypsine comme décrit dans le paragraphe précédent, centrifugées et le culot cellulaire est lysé pour isoler les différents compartiments cellulaires.

VI.1.a.ii. Fractionnement cellulaire par des kits de fractionnement

Le culot de cellules HEK293/NOX4, récupéré à partir d'une culture dans une boîte de Petri de 100 mm, est lavé avec du PBS Dulbecco (sans Ca²⁺ sans Mg²⁺). Le milieu de culture est aspiré et 5 ml de PBS sont ajoutés au tapis cellulaire, lequel est gratté avec un grattoir pour favoriser le décollement des cellules. La suspension cellulaire est ensuite transférée dans un tube Falcon avant d'être centrifugée pendant 5 min à $500 \times g$.

- **Isolement du compartiment nucléaire**

L'isolement des noyaux se fait à l'aide du kit « Nuclei EZ Prep Nuclei Isolation Kit » de chez Sigma® (NUC-101). 4 ml de tampon de lyse froid « Nuclei EZ » sont ajouté à une boîte de Petri de 100 mM. La plaque est grattée à l'aide d'un grattoir pour décoller et lyser les cellules. Le lysat cellulaire est transféré dans des tubes falcon de 15 ml. Les noyaux sont récupérés après centrifugation à $500 \times g$ pendant 5 min à 4 °C. Le culot contenant les noyaux est repris dans 4 ml de tampon « Nuclei EZ » et incubé sur la glace pendant 5 min puis centrifugé de nouveau. Les noyaux sont finalement repris dans 200 µl de tampon A2 contenant 50 mM de sodium phosphate à pH 7, avec 2 mM MgCl₂ et 250 mM de saccharose.

- **Isolement des mitochondries**

L'isolement des mitochondries se fait l'aide du kit « Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells » de Thermo Scientific™ (89874). Le culot de cellules est repris dans 800 µl de tampon A du kit mélangé à l'aide d'un vortex et incubé sur la glace pendant 2 min. 10 µl de tampon B du kit sont ajoutés. Il s'ensuit une incubation de 5 min au cours de laquelle la suspension est vortexée toutes les minutes. 800 µl de tampon C du kit sont ensuite ajoutés et l'échantillon est mélangé par inversion de tube avant d'être

centrifugé à $700 \times g$ pendant 10 min à 4°C . Le surnageant est récupéré et centrifugé à $3000 \times g$ pendant 15 min à 4°C . Le culot est finalement repris dans 500 μl de tampon C.

- **Isolement de fractions microsomales ou fractions membranaires (FM)**

L'isolement des fractions membranaires (FM) se fait l'aide du kit « Endoplasmic Reticulum Isolation Kit » de chez Sigma® (ER0100). Après centrifugation des cellules à $600 \times g$ pendant 5 min, le Volume du Culot (VC) est mesuré. Le culot est repris dans l'équivalent de 3 fois le VC de tampon hypotonique $1 \times$ et incubé pendant 20 min à 4°C . Les cellules sont de nouveau centrifugées à $600 \times g$ pendant 5 min, le surnageant est éliminé et le nouveau volume de culot est mesuré. Le culot cellulaire est repris dans l'équivalent de 2 fois le VC de tampon isotonique $1 \times$ puis transféré dans un homogénéiseur de Dounce pour être cassées. Le lysat cellulaire est centrifugé à $1000 \times g$ pendant 10 min à 4°C . Le surnageant est par la suite centrifugé à $12\,000 \times g$ pendant 15 min à 4°C . Le surnageant contenant les fractions membranaires est centrifugé à $100\,000 \times g$ pendant 1 h ; le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 100 μl de tampon isotonique et homogénéisé à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce.

VI.1.a.iii. Fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle

Le culot de cellules HEK293/NOX4, issu d'une culture de 3 boîtes de Petri de 100 mM, est lavé avec du PBS Dulbecco (sans Ca^{2+} sans Mg^{2+}) puis repris dans 4 ml d'un tampon de 50 mM de phosphate de sodium à pH 7 contenant 1 mM d'EGTA et 2 mM MgCl_2 (Tampon H) supplémenté extemporanément de PMSF à une concentration finale de 1 mM et d'inhibiteurs de protéases et phosphatases. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée 5 min à $500 \times g$. Le culot est constitué de débris cellulaires et des noyaux. Le surnageant, quant à lui, contient les mitochondries, les membranes et le cytosol. Le culot est repris dans 1 ml de tampon 50 mM de sodium phosphate à pH 7, contenant 2 mM MgCl_2 et 250 mM de saccharose (Tampon A2) supplémenté extemporanément de PMSF à une concentration finale de 1 mM et d'inhibiteurs de protéases et phosphatases, puis congelé. Le surnageant est de nouveau centrifugé à $12\,000 \times g$ pendant 15 min. Le culot, qui contient notamment les mitochondries, est repris dans 500 μl de tampon A2. Le surnageant restant est centrifugé à $200\,000 \times g$ pendant 45 min pour séparer les fractions cytosoliques des fractions membranaires. Le culot membranaire est homogénéisé dans 200 μl de Tampon A2. Le surnageant qui correspond aux fractions cytosoliques est concentré 4 fois en utilisant des unités de concentration de *cut-off* de 10 kDa. Toutes les fractions isolées sont aliquotées et conservées à -80°C avant d'être analysées.

VI.1.b. Les lignées de cellules Cos 7

VI.1.b.i. Culture cellulaire

Les cellules Cos 7 sont des cellules fibroblastes de rein du singe vert africain. Ces cellules sont obtenues chez American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginie. Les cellules Cos NOX sont des cellules Cos 7 transfectées de manière stable avec les gènes codant pour gp91^{phox} et p22^{phox}. Ces cellules ont été données par le Dr M. Dinauer, Université de Washington, St. Louis, Missouri (166). Les cellules Cos 7 et Cos NOX sont cultivées à 37 °C à 5% de CO₂ dans du milieu DMEM contenant 10 % de SVF dans des flasks de 75 cm². Pour les cellules Cos Nox le milieu est supplémenté d'antibiotique G418 à 1,8 mg/ml et de Puromycine à 1 µg/ml. Quand les cellules sont confluentes, elles sont diluées et remises en culture. Les cellules Cos 7 sont lavées 3 fois avec du DPBS et incubées avec 2 ml de trypsine pendant 5 min à 37 °C. La réaction est stoppée en ajoutant 8 ml de milieu de culture. Les cellules Cos NOX sont détachées avec du tampon « *enzyme free cell dissociation* » (TermoFisher # 13151014). Les cellules sont lavées 2 fois avec du DPBS et incubé à 37 °C pendant 5 min avec 1 ml de tampon « *enzyme free cell dissociation* ». Par la suite, le surnageant est éliminé et les cellules sont détachées en tapant sur la flask. Les cellules sont diluées de 1/5 à 1/7 et, de nouveau, mises en culture. Le nombre de passage maximum est de 20.

VI.1.b.ii. Fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle

Les cellules sont détachées comme décrit dans le paragraphe précédent. Le culot correspondant à 10⁷ cellules est lavé 2 fois avec du tampon DPBS puis repris dans 500 µl tampon de cassage froid contenant 20 mM phosphate pH 7,4, 340 mM Saccharose, 7 mM mgSO₄, 200 µM leupeptine, 1 mM PMSF. Les cellules sont cassées par sonication, puissance 3, efficacité 30 %, (*i.e.* impulsions de 300 ms interrompues par 700 ms de pause), dans la glace, 12 fois 10 secondes avec un intervalle de 1 min entre les sonications. Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé pendant 15 min à 10 000 × g à 6°C. Cette centrifugation permet d'éliminer les cellules non cassées. Le surnageant est ensuite centrifugé pendant 1 h 45 à 240 000 × g à 6 °C, afin de séparer les fractions membranaires (culot) du cytosol (surnageant). Le culot de fraction membranaire est repris dans 100 µl de tampon de cassage et homogénéisé par ultrasonication dans un bain à ultrason.

VI.2. Les globules blancs issus de donneurs humains

VI.2.a. Les neutrophiles

VI.2.a.i. Séparation du sérum des globules rouges

Le contenu de la poche de sang frais (EFS, Cabanel, Paris) est versé dans une éprouvette de 1 L propre et stérile en polypropylène. Dans l'éprouvette contenant un volume V de sang, est ajouté délicatement

un même volume V d'une solution de Dextran à 2 % dilué dans du sérum physiologique (NaCl 0,9 % dans de l'eau milliQ), filtré et stérile. Le contenu de l'éprouvette est mélangé par retournement lent et continu, en fermant l'éprouvette à l'aide d'un Parafilm maintenu fermement par la paume de la main puis laissé reposer entre 30 et 45 min à température ambiante sur la paillasse. Le Dextran provoque l'agrégation des hématies, qui sédimentent en grande partie. Il y a donc une partie inférieure, opaque et rouge très foncée, contenant la majorité des hématies ayant sédimenté et une partie supérieure, translucide et jaune-orangée, contenant les leucocytes – dont les neutrophiles – et quelques hématies restantes. La partie supérieure contenant les leucocytes est prélevée et est répartie dans des Falcons de 50 mL. Les tubes sont centrifugés pendant 8 min à $400 \times g$ puis, les surnageants sont précautionneusement prélevés et jetés dans un flacon poubelle pour déchets biologiques. Les culots sont resuspendus doucement par agitation délicate des tubes et puis dans du PBS (Dulbecco) jusqu'à obtenir environ 30 à 50 mL de suspension de cellules.

VI.2.a.ii. Isolement des neutrophiles sur gradient de sucrose

30 mL de suspension cellulaire sont déposés délicatement à la surface de 15 mL de Ficoll (système biphasique). Les tubes sont centrifugés 30 min à $400 \times g$. Le surnageant est jeté (sauf l'anneau de monolymphocytes qui est utilisé ultérieurement pour isoler les monocytes). Le culot cellulaire (neutrophiles et hématies restantes) est remis doucement en suspension en remuant doucement dans les quelques gouttes de liquide qui restent.

VI.2.a.iii. Lyse des globules rouges restants

Dans chaque culot, 12 mL d'eau stérile refroidie en glace sont rapidement ajoutés, le tube est fermé et est mélangé doucement par retournement pendant 30 secondes. À 40 secondes, 4 mL de KCl 0,6 M refroidi en glace sont ajouté rapidement. Les tubes sont mélangés et complétés à 50 mL avec du PBS (Dulbecco) refroidi en glace, mélangés une dernière fois puis centrifugés 8 min à $400 \times g$ à 4 °C. Après avoir jeté le surnageant, une deuxième lyse des hématies est effectuée de la même façon. Les tubes sont centrifugés 8 min à $400 \times g$ à 4 °C et les surnageants sont jetés. Chaque culot est repris doucement dans 5 mL de PBS (Dulbecco) froid puis la suspension regroupée dans un seul tube. Les cellules sont ensuite comptées puis centrifugées 8 min à $400 \times g$. Le culot cellulaire est repris dans 10 à 20 mL de tampon de cassage froid contenant 20 mM phosphate pH 7,4, 340 mM Saccharose, 7 mM $MgSO_4$, 200 μM leupeptine, 1 mM PMSF.

VI.2.a.iv. Cassage des cellules et fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle

Les cellules sont cassées comme décrit dans le protocole de cassage des cellules Cos. Le culot de fraction membranaire est repris dans 1 à 2 ml de tampon de cassage et homogénéisé par ultrasonication dans un bain à ultrason. Des aliquots de 50 µl de fractions sont réalisés et stockés à -80 °C.

VI.2.a.v. Mesure de la concentration en *cytb558* dans les fractions membranaire

La concentration en *cytb558* est déterminée à partir du le spectre de différence du *cytb558* réduit moins le *cytb558* oxydé. La fraction membranaire (FM) doit être diluée, au maximum deux fois pour obtenir des spectres de qualité suffisante, dans un volume final de 200 µl DPBS contenant du détergent neutre *n*-dodécyl β-D-maltoside (DDM) à une concentration finale de 1%. Pour une bonne solubilisation, la FM est incubée pendant 70 min à température ambiante avec une homogénéisation toutes les 10 min. Le mélange est introduit dans un premier temps dans une cuve en quartz le spectre d'absorption du *cytb558* oxydé est alors réalisé entre 900 et 300 nm avec un pas de 0,25 nm contre un blanc contenant du tampon DPBS et du DDM à 1 % final. Puis dans un deuxième temps, quelques grains de de dithionite de sodium sont ajoutés à solution de FM + DDM et homogénéisés par aspiration-refoulement. Le spectre d'absorption du *cytb558* réduit est réalisé entre 900 et 300 nm comme décrit pour le spectre d'absorption du *cytb558* oxydé.

Le spectre de différence « Red-Ox » (Figure II- 6) est calculé en soustrayant le spectre de la FM oxydée au spectre de la FM réduite. Sur ce spectre, est calculée la différence ΔA_{Red-Ox} , entre le maximum d'absorbance noté A_{Red} vers 427 nm et le minimum d'absorbance noté A_{Ox} vers 411 nm. La concentration en *cytb558*, notée $[cytb558]$ ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), dans la suspension de fractions membranaires est calculée en utilisant l'équation déduite de la loi de Beer-Lambert :

$$[cytb558] = FD \cdot \frac{\Delta A_{Red-Ox}}{\ell \cdot \Delta \epsilon_{Red-Ox}}$$

Où F_D est le facteur de dilution de la suspension de FM, $\Delta \epsilon_{Red-Ox}$ le coefficient d'extinction molaire du *cytb558* 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, $\Delta \epsilon_{Red-Ox} = 2.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ et ℓ est le trajet optique en cm ($\ell = 1\text{cm}$).

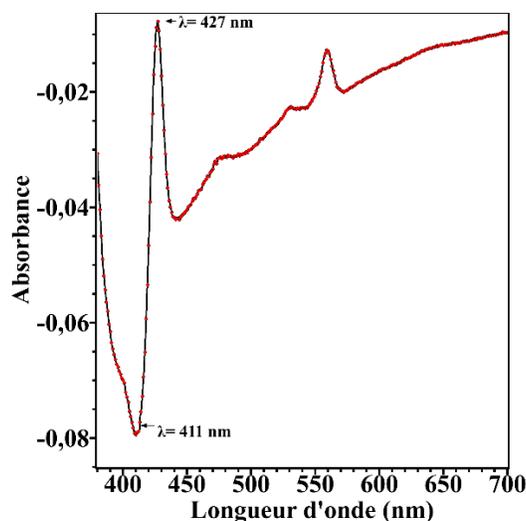


Figure II- 6: Spectre de différence de la FM réduite moins la FM oxydée.

VI.2.b. Les cellules monocytes

VI.2.b.i. Isolement

L'anneau de mono-lymphocyte récupéré lors de l'isolement des neutrophiles est réparti dans 4 tubes de Falcon de 50 ml. Chaque tube est complété jusqu'à 50 ml de tampon PBS froid contenant 0,5 % de BSA et 1 mM d'EDTA. Les tubes sont centrifugés à $400 \times g$ pendant 8 min à 20 °C. Le surnageant est éliminé et les 4 culots sont rassemblés dans un seul Falcon et repris dans 50 ml du même tampon. Après centrifugation à $400 \times g$ pendant 8 min à 20 °C, le culot est repris dans 1 à 2 ml de tampon. Les cellules sont diluées au $1/100^{\text{ème}}$ dans du bleu de Türk et comptées sur lame de Malassez. Ces cellules sont par la suite diluées à 5.10^7 cellules/ml dans un volume compris entre 0,5 ml et 2 ml.

Pour la suite du protocole, en collaboration avec Dr M.C. Dang (CRI, Hôpital Bichat, Paris), nous avons utilisé le kit d'isolement de monocytes « EasySep™ Human Monocyte Enrichment » (#19059). Les cellules sont transvasées dans des tubes Falcon 14 ml polystyrène à fond rond (BD Sciences, #352057). Un volume du cocktail EasySep est ajouté à raison de 50 $\mu\text{l/ml}$ de cellules. Le mélange est incubé sur la glace pendant 10 min. Par la suite, les particules magnétiques proposées dans le kit sont mélangées par vortex pendant 30 s et ajoutées au mélange cellules + cocktail à raison de 50 $\mu\text{l/ml}$ de cellules. Le mélange est placé de nouveau sur glace pendant 5 min. Le volume est complété à 5 ml final avec du tampon PBS froid contenant 0,5 % de BSA et 1 mM d'EDTA pour un volume initial de cellules inférieur à 2 ml. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'une pipette. Le Falcon est placé dans l'aimant et incubé à température ambiante pendant 2,5 minutes. À la fin de cette étape, les lymphocytes sont fixés aux billes au fond du tube et les

monocytes restent en suspension. Les monocytes sont transvasés dans un nouveau Falcon par simple renversement du tube. Ce dernier doit être maintenu dans l'aimant. Les cellules sont diluées au 1/5^{ème} dans du bleu de Türk et comptées sur lame de Malassez. Un rendement de 20 % est généralement obtenu. Finalement les cellules sont lavées avec du tampon PBS. Les cellules sont ensuite soit mises en culture, soit lysées pour réaliser des tests biochimiques.

VI.2.b.ii. Traitement des monocytes par SiRNA

Les cellules de monocytes sont traitées par des concentrations croissantes (0, 10, 25, 50, 75, 100, 200 nM) soit de SiRNA dirigé contre Poldip2 « ON-TARGET plus Human Poldip2 (26073) siRNA smart pool » (Darmacon # L-013009-01-0005), soit des SiRNA contrôle noté Scramble (SCR) « ON-TARGETplus Non-targeting Pool » (Darmacon # D-001810-10-05).

Une solution mère de transfection est fraîchement préparée avant transfection. Dans 100 µl final de milieu RPMI (sans SVF et sans antibiotiques) sont mélangés 6 µl de réactif de transfection (HiPerFect Transfection Reagent ; Qiagen # 301704) et le volume de SiRNA correspondant à chaque concentration. Le mélange est incubé pendant 20 min à température ambiante avec agitation par retournement du tube toutes les 3 min. Dans une plaque de 12 puits, sont d'abord ajoutés les 100 µl de la solution de transfection puis 2.10^5 de cellules de monocyte dans un volume de 200 µl de milieu RPMI contenant 10 % de SVF supplémenté des antibiotiques pénicilline et streptomycine. La plaque est incubée pendant 2 h à 37 °C et 5 % de CO₂. Finalement 900 µl de milieu RPMI contenant 10 % de SVF supplémenté de pénicilline et de streptomycine sont ajoutés dans chaque puit. La plaque est, de nouveau incubée, pendant 2 jours à 37 °C et 5 % de CO₂.

Après transfection, le milieu de culture est récupéré et le tapis cellulaire est décollé par trypsination. 200 µl de trypsine sont ajoutés à chaque puits. Après 2 min d'incubation la réaction est arrêtée par ajout de 1 ml de milieu RPMI contenant 10 % SVF. Le culot de cellule est récupéré après centrifugation à 14 000 × g pendant 30 s. Le culot de cellules est lysé par avec un tampon isotonique comme décrit dans le paragraphe suivant. L'expression de Poldip2 après traitement avec SiRNA est vérifiée par Western Blot.

VI.2.c. Lyse des cellules avec un tampon isotonique

5.10^6 cellules sont reprises dans 300 µl de tampon de lyse composé de 100 mM Tris HCl pH 7, 2,5 % SDS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 4 M Urée supplémenté extemporanément de PMSF à 1 mM et d'inhibiteurs de protéases (leupetine, pepstatine et aprotinine) à 10 µg/ml. Le tube est mélangé par vortex puis soniqué pendant 30 s à puissance 3. Le lysat cellulaire est par la suite centrifugé à 14 000 × g pendant 15 min. Le surnageant est récupéré pour être analysé.

VI.2.d. Les macrophages : culture et différenciation

5.10⁶ cellules de monocytes sont ensemencées dans des plaques de 6 puits du milieu RPMI contenant du SVF à 10% de la pénicilline et de la streptomycine. Les facteurs de différenciation MCSF et GMCSF sont ajoutés à une concentration finale de 50 ng/ml pour différencier respectivement les monocytes en macrophage type M2 et type M1. Les cellules sont mises en culture à 37 °C à 5 % de CO₂ pendant 6 jours.

VII. Mesures de production de ROS

VII.1. Mesure de la production de H₂O₂ par l'Amplex red

VII.1.a. Principe

Ce test permet de détecter le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit par l'enzyme NOX4 *in vitro* dans les différents compartiments cellulaires des cellules HEK 293. L'Amplex red est un réactif incolore qui réagit avec le peroxyde d'hydrogène avec une stoechiométrie 1:1 en présence d'une peroxydase (HRP), catalyseur de la réaction, pour produire la résorufine selon la réaction de la Figure II- 7.

La résorufine est une molécule fluorescente qui présente une longueur d'onde d'excitation maximale à 571 nm et une longueur d'onde d'émission maximale à 585 nm.

In cellulo, la vitesse de production de peroxyde d'hydrogène est mesurée indirectement en suivant l'augmentation de la fluorescence de la résorufine au cours du temps. Une gamme étalon en H₂O₂ est nécessaire pour rapporter la fluorescence à la quantité de peroxyde d'hydrogène produit. L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en mol H₂O₂ produits/min/nombre de cellules.

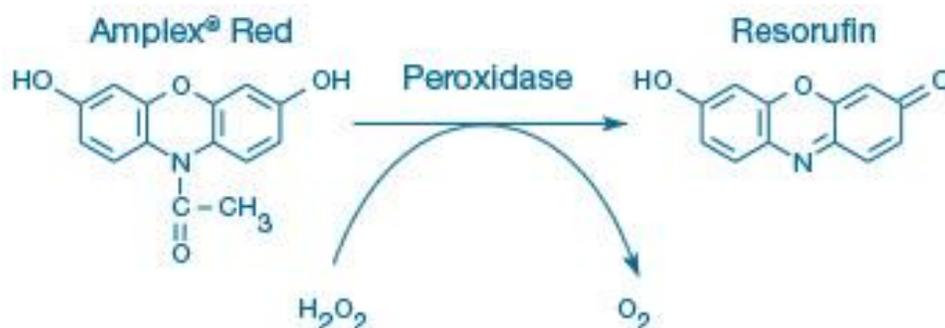


Figure II- 7 : Réaction d'oxydation de l'Amplex red par le peroxyde d'hydrogène.

In vitro, la vitesse de production de peroxyde d'hydrogène est mesurée de la même manière qu'*in cellulo* à une différence près. Il faut rajouter du NADPH pour déclencher l'activité de l'enzyme

NOX4. L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en mol H₂O₂ produits/min/mg de protéines membranaires totales.

VII.1.b. *In cellulo*

Dans un premier temps, la solution d'Amplex red est fraîchement préparée dans du DPBS à la concentration de 100 µM d'Amplex red en présence de 1 U/ml de HRP, 2 mg/ml de D-glucose. Ensuite, sont ajoutés dans chacun des puits d'une plaque de 96 puits, 100 µl contenant 10 000 cellules et un volume de 100 µl du mix Amplex red. Le mélange des réactifs est fait dans les puits d'une plaque noire à 96 puits, adaptés à la mesure de la fluorescence. Pendant la préparation d'échantillons, la plaque est posée sur un bac de glace à une température à 4 °C pour maintenir les cellules au repos et limiter la production de H₂O₂. Elle est par la suite introduite dans un lecteur de plaque « Victor II de chez Perkin Elmer ». La cinétique de la réaction est mesurée par fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 571$; $\lambda_{\text{émission}} = 585$) en continu à une température de 37 °C sur une durée de 30 min.

Une gamme étalon allant de 0 à 2 µM en H₂O₂ est préparée dans 100 µl de volume réactionnel final dans une plaque noire de 96 puits. Chaque puits contient 100 µl de mix Amplex red et 100 µl d'une solution d'H₂O₂ préparée dans du PBS. La réaction est immédiate et la mesure de la fluorescence est faite au lecteur de plaque Victor.

Le calcul de l'activité de l'enzyme se fait comme suit :

- pente de la cinétique : $p_c = \Delta \text{fluorescence} / \Delta t$;
- pente de la gamme étalon : $p_e = \Delta \text{fluorescence} / \Delta [\text{H}_2\text{O}_2]$;
- Activité spécifique de l'enzyme : $A_s = (p_c/p_e) * 60 \text{sec} * V \text{ réactionnel} / \text{nombre de cellules}$
= mol H₂O₂ produits/min/ nombre de cellules

VII.1.c. *In vitro*

Dans un premier temps, une solution mère d'Amplex red est fraîchement préparée dans 200 mM de tampon phosphate à pH 7,2 à la concentration de 100 µM d'Amplex red en présence de 0,50 U/ml de HRP, 2 mM d'EGTA et 400 U/ml SOD.

Sont ajoutés dans chacun des puits d'une plaque de 96 puits et dans un volume final de 50 µl, 30 µg de fractions nucléaires, mitochondriales ou membranaires, en présence ou en absence de la protéine Poldip2 recombinante à une concentration finale de 183 nM ou 367 nM ou 550 nM. Un volume de 50 µl du mix Amplex red est ensuite ajouté. La réaction est initiée par addition de 200 µM de NADPH. Le volume final du milieu réactionnel est ajusté à 100 µL avec du tampon A2 composé de 50 mM de sodium phosphate à pH 7, contenant 2 mM MgCl₂ et 250 mM de saccharose.

Le mélange des réactifs est fait dans les puits d'une plaque noire à 96 puits, adaptés à la mesure de la fluorescence. La plaque est posée sur un bac de glace pour maintenir la température à 4 °C. Tout de suite après ajout du NADPH, la plaque est introduite dans le lecteur de plaque Victor. La cinétique de la réaction est mesurée par fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 571$; $\lambda_{\text{émission}} = 585$) en continue à une température de 30 °C sur une durée de 30 min.

Une gamme étalon allant de 0 à 50 μM en H_2O_2 est préparée dans 100 μl de volume réactionnel final dans une plaque noire de 96 puits. Chaque puits contient 50 μl de mix Amplex red et 10 μl d'une solution d' H_2O_2 préparée dans du PBS. Le volume est ajusté à 100 μl tel que les concentrations finales en H_2O_2 dans les puits soient de 0 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 3 μM , 5 μM . La réaction est immédiate et la mesure de la fluorescence est faite au lecteur de plaque Victor.

Le calcul de l'activité de l'enzyme se fait comme suit :

- pente de la cinétique : $p_c = \Delta\text{fluorescence}/\Delta t$;
- pente de la gamme étalon : $p_e = \Delta\text{fluorescence}/\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$;
- Activité spécifique de l'enzyme : $A_s = (p_c/p_e) * 60\text{sec} * V \text{ réactionnel} / \text{quantité de protéines}$;
= mol H_2O_2 produits/min/mg de protéine.

VII.2. Mesure de l'activité de NOX2 (*in vitro*)

VII.2.a. Principe

Contrairement à NOX4, l'enzyme NADPH oxydase NOX2 produit principalement des anions superoxydes selon la réaction suivante :



L'activité NADPH oxydase est suivie *in vitro* à l'aide du test d'activité acellulaire appelé « *cell-free assay* » classiquement utilisé au laboratoire. Ce système permet de mesurer l'activité de l'enzyme en dehors du milieu cellulaire (très complexe). Les différentes composantes nécessaires pour former un complexe NADPH oxydase fonctionnel sont mises en présence : (i) la fraction membranaire contenant NOX2/p22^{phox} obtenue à partir de neutrophiles purifiés de sang humain, et (ii) les protéines cytosoliques humaines p67^{phox}, p47^{phox} et Rac produites de manière hétérologue en système bactérien (*E. coli*) puis purifiées (252). À ce mélange, un activateur, l'acide arachidonique (AA), est ajouté. Celui-ci induit des changements structuraux des protéines solubles similaires à ceux induits par la signalisation cellulaire *in vivo* autorisant ainsi, *in vitro*, leur assemblage à la membrane.

L'activité du complexe NADPH oxydase est déclenchée par ajout du substrat de l'enzyme, le NADPH. L'activité de l'enzyme en fonction du temps est alors déterminée en suivant spectrophotométriquement soit :

- La vitesse de consommation du NADPH qui se traduit par une diminution de l'absorbance à 340 nm (Figure II- 8). L'équivalent en quantité d'ions superoxydes produit est calculé à partir du coefficient d'extinction molaire du NADPH $\Delta\epsilon$ de $6,3 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 340 nm (253, 254)

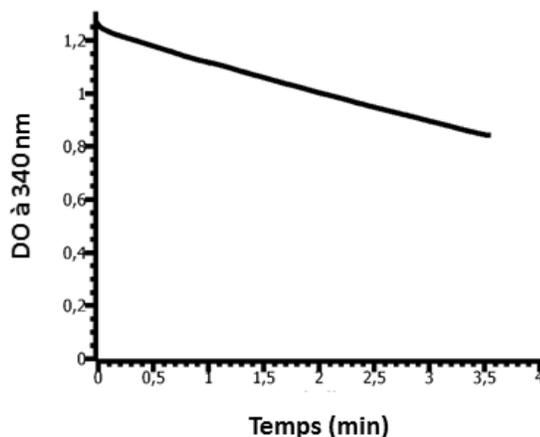
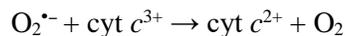


Figure II- 8 : Cinétique de consommation de NADPH mesurée à 340 nm.

- La vitesse de réduction du cytochrome *c* (ajouté préalablement à la mixture protéique) selon la réaction suivante :



qui permet de suivre, indirectement, la production d'anions superoxyde. La réduction du cytochrome *c* par les anions superoxydes au cours du temps se traduit par une augmentation de l'absorption à 550 nm (Figure II- 9). La quantité d'ions superoxyde est calculée en tenant compte du coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* ($\Delta\epsilon$ du cytochrome *c* réduit - oxydé) de $21 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 550 nm (255, 256).

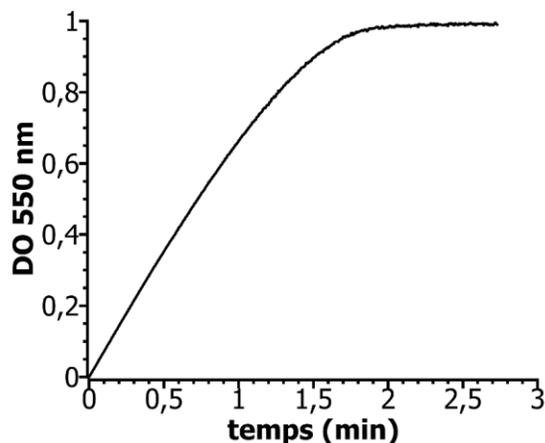


Figure II- 9 : Cinétique de réduction du cytochrome *c* par les anions superoxyde mesurée à 550 nm.

VII.2.b. Protocoles

Dans une cuvette de PMMA (Poly(Methyl MethAcrylate)), ajouter dans l'ordre suivant : du tampon PBS contenant 10 mM phosphate pH 7,4 ; 2,7 mM KCl ; 137 mM NaCl, et 10 mM mgSO₄, la fraction membranaire de neutrophile (classiquement 4 nM de *cytb558*), p67^{phox} (269 nM), p47^{phox} (175,5 nM), Rac1Q61L (136,6 nM)³⁸, Poldip2 à 183 nM ou 336 nM ou 702 nM, et 50 μM d'acide arachidonique. La cuvette contenant 600 μl de volume réactionnel est mélangé par retournement et incubée dans un bain marie pendant 5 min à 25 °C. Ensuite, le cytochrome *c* est ajouté à une concentration de 50 μM (dans le cas de la mesure de la réduction du cytochrome *c* par les anions superoxydes) et, enfin, le NADPH à 200 μM. La cuvette est de nouveau mélangée par retournement est tout de suite mise dans le spectrophotomètre Uvikon pour la mesure de la cinétique contre un blanc contenant le même tampon PBS. La cinétique est mesurée à 25 °C pendant 2 min.

L'activité spécifique moléculaire (A_{s_m}) de l'enzyme est déterminée à partir des formules suivantes :

- Dans le cas de la mesure de la **réduction du cytochrome *c*** par les anions superoxydes :

$$A_{s_m} = \text{pente à l'origine de la droite} / (\Delta\epsilon \text{ du cytochrome } c \text{ réduit - oxydé}) * [\text{cytochrome } b558] * \text{temps}$$

Elle est exprimée en mol O₂⁻ produits/min/mol de cytochrome *b558*.

- Dans le cas de la mesure de la **consommation de NADPH** :

$$A_{s_m} = - (\text{pente à l'origine de la droite} * 2) / (\Delta\epsilon \text{ NADPH}) * [\text{cytochrome } b558] * \text{temps}$$

³⁸ Cette mutation rend la protéine Rac constitutivement active.

Le facteur 2 dans cette formule vient du fait qu'il faut une molécule de NADPH pour produire 2 anions superoxyde. Elle est exprimée en équivalent mol $O_2^{\cdot-}$ produits/min/mol de cytochrome *b558*.

VII.2.c. Tests statistiques

Les valeurs représentées pour les mesures d'activité sont des moyennes de 3 répétitions plus ou moins l'erreur type (SEM ; *standard Error of the Mean*). Des analyses statistiques ont été faites avec le logiciel Excel en appliquant le test statistique T.TEST moyennant une distribution bilatérale et sur deux échantillons de variance égale.

VIII. Méthodes analytiques des interactions protéines-protéines

VIII.1. Dot Blot

Cette technique permet de mettre en évidence les interactions entre protéines. Le principe est similaire à celui d'un Western Blot (Figure II- 10), la principale différence étant que les protéines ne sont pas séparées en fonction de leur taille par gel d'électrophorèse. 3 μ l (entre 10 et 100 pg de protéines) de la protéine d'intérêt sont déposés directement sur la membrane de nitrocellulose. La membrane est par la suite saturée avec une solution protéique pour éviter que les anticorps et la 2^{ème} protéine qu'on cherche à faire interagir (Poldip2) se fixent sur la surface libre. Elle est donc incubée pendant 1 h sous agitation à température ambiante dans une solution de BSA à 2,5 % préparée dans 20 ml de TBST 1X contenant 0,075 % Tween-20. La membrane est lavée trois fois dans du TBST pendant 10 min. Le test d'interaction se fait en incubant de nouveau cette membrane dans une solution contenant 100 nM de Poldip2 et 0,5 % de BSA préparée dans 20 ml de TBST contenant 0,075 % Tween-20. La membrane est de nouveau lavée trois fois dans du TBST pendant 10 min.

La détection d'une interaction entre Poldip2 et la protéine d'intérêt se fait de la manière suivante. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine Poldip2, dilué à 1/1500 dans la solution de BSA à 0,5 %, préparée dans du TBST, pendant 1 h à température ambiante. La membrane est ensuite lavée trois fois pendant 10 min dans une solution TBST, puis incubée une deuxième fois avec un anticorps secondaire couplé à la HRP dilué 1/15000 dans la solution de BSA à 0,5 %, préparée dans du TBST, pendant 1 h à température ambiante. La membrane est de nouveau lavée trois fois dans du TBST pendant 10 min.

La révélation de la membrane se fait comme décrit dans le protocole de Western Blot. Si des spots circulaires apparaissent cela indique la présence de la protéine Poldip2 ce qui traduit une interaction de cette dernière avec la protéine d'intérêt.

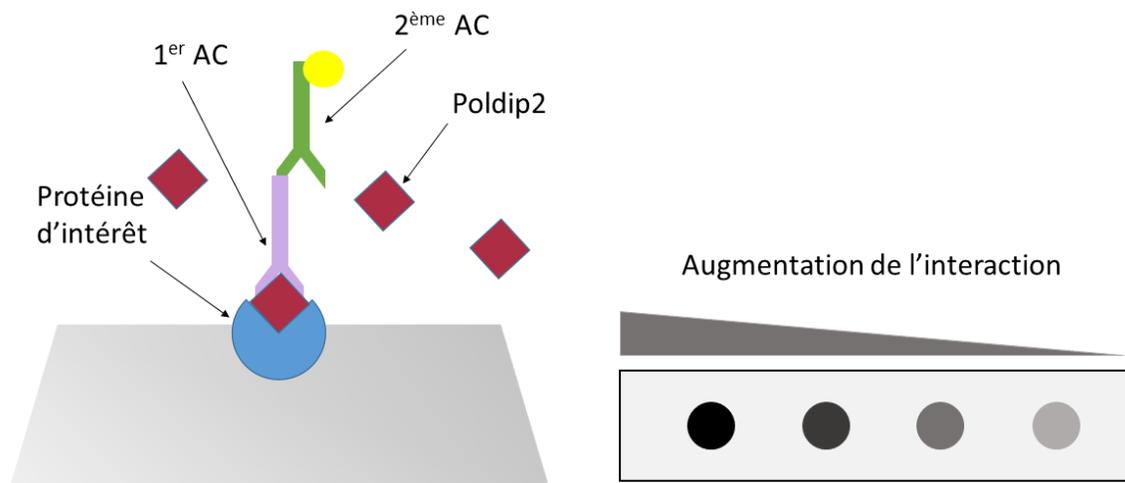


Figure II- 10 : Principe du Dot Blot.
AC : anticorps.

VIII.2. Co-précipitation par centrifugation

Afin de déterminer si des protéines solubles comme Poldip2 (mais aussi p47^{phox}, p67^{phox} ou Rac) s'attachent à des fractions membranaires, nous avons effectué des expériences de co-précipitation par centrifugation. Dans un tube Eppendorf, les fractions membranaires de neutrophiles (FM) sont mélangées avec la protéine Poldip2 à un ratio de 1:20, 1:10 ou 1:5 (mol:mol). Le volume est ajusté à 400 μ l avec du tampon contenant 20 mM de phosphate à pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF. Des contrôles négatifs contenant uniquement, soient des fractions membranaires, soient la protéine Poldip2 sont également réalisés. Le mélange est incubé pendant 1 h à 4 °C sur roue. Les mélanges sont ensuite centrifugés pendant 1 h 30 à 190 000 \times g à 4 °C. Après centrifugation, le culot contient les fractions membranaires de neutrophiles et éventuellement les protéines solubles en interaction avec la membrane. Dans le surnageant sont présentes les protéines solubles (ou bien les protéines en excès) qui n'ont pas interagité. Après élimination du surnageant le culot est repris dans le même volume de départ avec du tampon phosphate. Des fractions du culot et surnageant sont stockés à -20 °C pour des analyse ultérieures.

Ce protocole est également utilisé pour mettre en évidence l'effet de Poldip2 sur l'assemblage du complexe NADPH oxydase. Dans ce cas les fractions membranaires sont mélangées en présence ou en absence des protéines cytosoliques (p47^{phox}, p67^{phox} et Rac1Q61L), de Poldip2 ou d'acide arachidonique (AA) dans un volume final de 600 μ l en respectant les mêmes ratios de protéines que le test d'activité. Dans le Tableau II- 1Tableau II- 2 sont indiquées les différentes conditions expérimentales et les concentrations finales utilisées. La suite du protocole est réalisée comme décrit plus haut.

Tableau II- 2 : Conditions appliquées pour l'étude de l'interaction entre Poldip2 et la FM.

Essaie	1	2	3	4	5	6
FM (40 nM)	+	+	+	+	+	+
Poldip2 (3 µM)	+	+			+	+
p47 ^{phox} (3,03 µM)			+	+	+	+
p67 ^{phox} (2,69 µM)			+	+	+	+
Rac1Q61L (7,89 µM)			+	+	+	+
AA (328 µM)		+		+		+

VIII.3. Co-précipitation par centrifugation sur gradient de sucrose

Une autre méthode pour séparer les composantes interagissant ensemble est de déposer les mélanges protéiques sur un gradient de sucrose puis de centrifuger pour séparer les différentes formes. Les gradients de sucrose sont préparés 4 h avant le dépôt de l'échantillon afin de les laisser se stabiliser à 4 °C. Les différentes solutions de sucrose (50 %/15 %/10 %) sont préparées dans du tampon contenant 10 mM Tris HCl pH 7,5 et 1 mM EDTA. Dans un tube de centrifugation, trois couches de concentrations différentes de sucrose sont déposées successivement : 2 ml 50 % (au fond)/ 6,5 ml 15 % (au milieu) / 1,5 ml 10 % (en haut).

En parallèle, les fractions membranaires de neutrophiles (FM) en présence ou en absence de Poldip2 et/ou d'acide arachidonique (AA) sont mélangées dans 1 ml final avec du tampon PBS contenant 10 mM phosphate pH 7,4 ; 2,7 mM KCl ; 137 mM NaCl, et 10 mM mgSO₄, 1mM EDTA. Les mélanges de protéines sont incubés pendant 1 h à 4 °C sur roue puis déposés délicatement sur le gradient. La séparation se fait par centrifugation à 110 000 × g pendant 16 h à 4 °C (rotor SW32). Après centrifugation, des fractions de 1 ml sont prélevés du haut vers le bas du tube. Les fractions sont aussitôt congelées à -80 °C pour des caractérisations ultérieures.

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

A. Poldip2 : Production, purification, caractérisation structurale et fonctionnelle

A.I. Production de Poldip2 dans différents systèmes d'expression

Dans le but de réaliser une caractérisation fonctionnelle et structurale de la protéine Poldip2, le gène de cette protéine a été intégré dans différents vecteurs et systèmes d'expression pour produire cette protéine de manière hétérologue. Dans ce paragraphe sont présentées les différentes constructions et souches employées pour produire Poldip2, soit d'origine humaine, soit issus du rat. Suite à une optimisation des différents paramètres d'expression de la protéine, un système d'expression sera sélectionné pour une production à plus grande échelle.

A.I.1. Comparaison de la séquence de Poldip2 dans différentes espèces

La comparaison de séquences de Poldip2 (Figure III- 1B) entre différentes espèces (rat, souris, bovin, chien, humain) montre que la séquence de Poldip2 est très bien conservée, avec 95 % d'identité de séquence entre le rat et l'espèce humaine. La région de la séquence qui présente le plus grand nombre de résidus variables se trouve en N-terminale de la séquence. Cette région, d'environ 57 résidus, correspond à la séquence d'adressage à la mitochondrie. Une analyse plus poussée de la séquence de rat faite par des logiciels de prédiction de localisation subcellulaire de la protéine a révélé deux sites de coupure différents au niveau de cette séquence d'adressage à la mitochondrie. Le logiciel pSORT II prédit une localisation de Poldip2 à la mitochondrie avec 95,7 % contre 4,3 % pour le noyau. Le site de clivage est défini sur le résidu 57. L'analyse de cette séquence faite avec le logiciel TargetP prédit également une localisation à la mitochondrie avec un pourcentage identique. Néanmoins dans ce cas le site de clivage est défini sur le résidu 21. Cette différence entre les deux prédictions est assez inattendue. Or ces deux sites correspondent à 2 séquences consensus reconnue par la protéine MPP (*Mitochondrial Processing Peptidase*) qui peut couper la séquence d'adressage à la mitochondrie à l'intérieur de la matrice mitochondriale selon les deux motifs (257) R-2 et R-3 comme décrit sur la Figure III- 1 A. Il est peut être possible que ce clivage se fasse en deux temps ; premièrement sur le résidu 21 puis sur le résidu 57. En ce qui concerne la séquence humaine la prédiction faite par le logiciel pSORT II prédit, comme pour la séquence de rat, un site de clivage au niveau du résidu 57. Ce clivage serait fait également par la protéine MPP selon un motif de type R-3. Même si l'analyse faite pour les deux séquences (humaines et rat) est similaire, elle est néanmoins différente de celle décrite pour Poldip2 humain par Xie *et al.* (2005) (7). Cette équipe décrit deux sites de clivage de la séquence d'adressage à la mitochondrie sur la séquence humaine. Le premier sur le résidu 50 fait par la protéine MPP, le deuxième sur le résidu 58 fait par protéine MIP (*Mitochondrial Intermediate Peptidase*)

selon un motif R-10 [xRx↓(F/L/I)xx(S/T/G)xxxx↓] dans la matrice mitochondriale. Cette analyse est toutefois cohérente avec une localisation de Poldip2 principalement au niveau de la matrice mitochondriale (5).

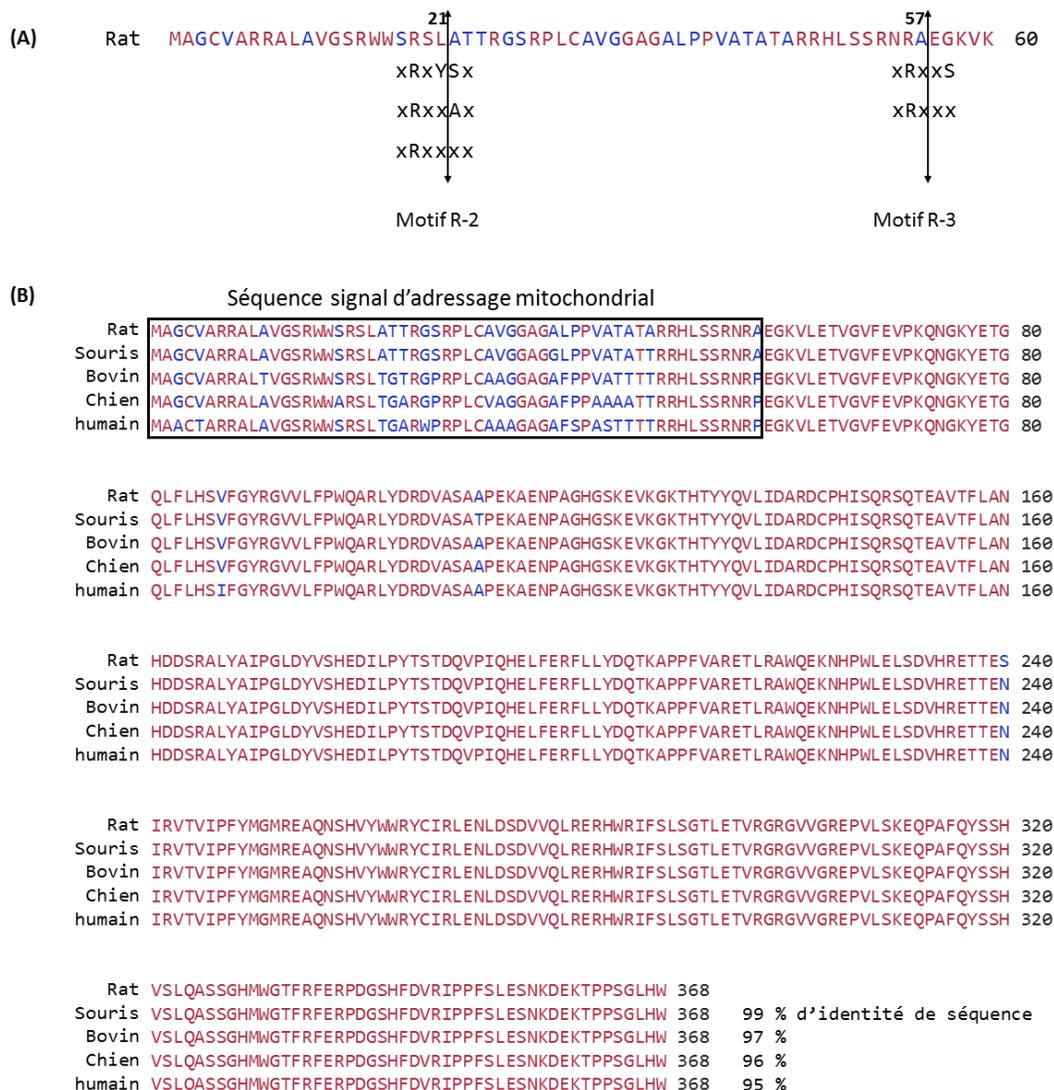


Figure III- 1 : Analyse de la séquence de Poldip2.

A : Sites de clivage de la séquence d'adressage à la mitochondrie identifiés par pSORT II (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) pour le motif R-3 et TargetP pour le motif R-2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). B : Comparaison de séquences de Poldip2 de différentes espèces par BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

En plus de sa fonction d'adressage, il n'est pas exclu que la séquence signal jouent un rôle dans la fonction de la protéine. En effet Guilliam *et al.* (2016) (16) ont démontré que, pour Polip2 humain, la méthionine en position 1 et que la thréonine en position 5 de la protéine Poldip2 humaine sont importantes

pour sa fixation avec la protéine PrimPol³⁹. Ainsi lorsque Poldip2 est clivé en N-terminal, ces deux acides aminés sont absents. La forme obtenue suite à ce clivage ne se fixe plus à PrimPol et donc n'est plus active. La protéine PrimPol étant localisée à la fois à la mitochondrie et au noyau, cela suggère que Poldip2 interagit avec PrimPol uniquement dans le noyau pour augmenter sa capacité à fixer l'ADN et que cette fonction est perdue au niveau de la mitochondrie puisque la séquence d'adressage à la mitochondrie est clivée dans ce compartiment.

Après adressage à la mitochondrie la séquence signal est coupée pour libérer une protéine fonctionnelle de 38 kDa. La protéine est donc débarrassée de la majeure partie de sa région variable. Cela suggère que la séquence signal n'intervient pas dans la fonction finale de la protéine. En effet Xie *et al.* (2005) (7) montrent que la forme tronquée Poldip2₅₁₋₃₆₈ est capable d'interagir avec la sous-unité p50 de la polymérase δ et d'inhiber son activité. Sur le reste de la séquence on recense seulement deux résidus différents entre la séquence humaine et celle du rat. Chez l'humain la valine en position 86 est remplacée par une isoleucine, toutes deux étant des acides aminés à chaîne latérale apolaires. Également, la sérine en position 240 chez le rat est remplacée par une asparagine chez l'homme, tous les deux étant des acides aminés à chaîne latérale polaire. Ces résidus sont faiblement polaires et hydrophiles. La similitude entre les propriétés de ces acides aminés Val/Ile et Ser/Asn suggère que la variabilité au niveau de ces deux sites n'apporte pas de différences majeures à la séquence. Néanmoins, l'isoleucine et l'asparagine possèdent des groupements sur la chaîne latérale plus longs. De plus la serine peut être phosphorylée alors que la l'asparagine peut être glycosylée. Ces différences pourraient donc favoriser ou, au contraire, déstabiliser certaines interactions si ces acides aminés se trouvent à la surface de la protéine. Il faudra donc tenir compte de ces différences dans l'étude fonctionnelle de Poldip2.

A.I.2. Production de Poldip2 humain dans *E. coli*

La bactérie *E. coli* est classiquement utilisée en laboratoire pour produire des protéines recombinantes. En plus d'une simplicité de manipulation, cette bactérie a un temps de génération assez court d'environ 20 minutes ce qui permet d'obtenir une masse cellulaire assez conséquente au bout de 24 h de culture. Précédemment, des équipes ont réussi à produire, en relativement faible quantité, Poldip2 humain dans *E. coli* (6, 7, 17). Nous avons ainsi décidé de tester ce système d'expression pour exprimer Poldip2 humain.

Le gène de Poldip2 humain, introduit dans un vecteur d'expression pETM33 d'*E. coli*, possède une étiquette de 6 histidines suivie de la protéine GST de 25 kDa en N-terminal. La protéine produite associée

³⁹ PrimPol est une polymérase qui initie la réplication de l'ADN.

à ces étiquettes a une taille attendue de 66 kDa. L'expression de Poldip2 est sous contrôle du promoteur inductible par l'IPTG. Ce vecteur d'expression est introduit dans deux souches d'*E.coli* : la souche BL21DE3 classiquement utilisée pour l'expression de protéines recombinantes en laboratoire, et la souche SoluBL21DE3 qui a la propriété d'exprimer avec plus de facilité les protéines recombinantes insolubles qui ont tendance à former des corps d'inclusion, comme cela pourrait être le cas pour Poldip2 (6, 16).

La production de Poldip2 en bactéries peut être influencée par plusieurs facteurs, à savoir la nature des souches bactériennes, la nature du milieu, la concentration en IPTG, la température. Ces paramètres ont été variés afin de déterminer les conditions optimales pour la production de Poldip2 recombinant.

A.I.2.a. Comparaison entre deux souches d'expression

Les deux souches BL21DE3/Poldip2 et SoluBL21DE3/Poldip2 sont mises en culture dans un milieu LB avant d'être induites par addition d'IPTG (0,5 mM) afin de comparer le niveau d'expression de Poldip2. La Figure III- 2 montre l'ensemble des protéines produites dans les bactéries avec ou sans induction par l'IPTG : soit dans l'extrait brut cellulaire, soit après séparation par centrifugation dans le cytosol (surnageant) ou dans les membranes et débris cellulaires (culot). Sur le gel SDS-PAGE, on observe pour les deux souches induites une bande très intense vers 66 kDa dans les extraits bruts et les culots. Cette bande est particulièrement intense pour BL21DE3/Poldip2 et correspond à la taille attendue de Poldip2 recombinant soit 66 kDa. On observe également une bande vers 150 kDa exprimé dans le culot et l'extrait brut de la souche BL21DE3/Poldip2. Comme ces bandes sont absentes dans les souches non-induites, elles correspondent probablement à la protéine surexprimée. Étant donnée la taille de ces protéines elles pourraient correspondre très probablement à monomère de 66 kDa et un dimère de 150 kDa. La présence de Poldip2 dans le culot, qui est une protéine soluble, suggère qu'elle est produite dans ces souches majoritairement sous forme de corps d'inclusion car cette bande n'est pas visible dans les surnageants. La souche BL21DE3/Poldip2 semble produire proportionnellement plus de protéine Poldip2 sous forme de corps d'inclusion que la souche SoluBL21DE3/Poldip2. Comme nous cherchons à privilégier l'expression de Poldip2 sous sa forme soluble (c'est-à-dire dans le surnageant) et non sous forme de corps d'inclusion (plus difficile à exploiter), nous poursuivons les expériences d'optimisation avec la souche SoluBL21DE3/Poldip2 dans le but d'améliorer l'expression de la protéine recombinante dans le cytosol.

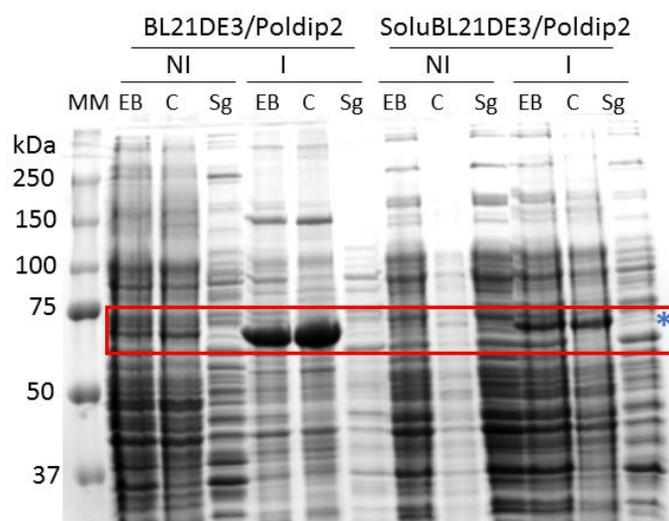


Figure III- 2 : Comparaison sur gel SDS-PAGE de l'expression de Poldip2 humain dans les souches d'*E. coli* BL21DE3 et SoluBL21DE3, induite ou non par de l'IPTG.
 Puits : 5 μ l d'extrait protéique dans 15 μ l au total (7 μ l d'eau + 3 μ l de Tampon de charge). I : induit par l'IPTG ; NI : non induit ; EB : extrait brut ; C : culot ; Sg : surnageant ; * la bande correspondant à Poldip2.

A.I.2.b. Influence du milieu de culture

La souche SoluBL21DE3/Poldip2 est mise en culture parallèlement dans du milieu LB et du milieu M9, milieu recommandé par le fabricant pour la production de protéine recombinante avec cette souche. Sur le gel (Figure III- 3) on observe, globalement, que la quantité de protéines produites est plus faible dans le milieu M9 que dans le milieu LB, ce qui est normal puisque le milieu LB est un milieu plus riche que le milieu M9. On remarque qu'une surexpression de Poldip2 recombinant apparaît au niveau des extraits induits qui est par ailleurs plus importante dans le milieu LB que dans le milieu M9, ce qui nous conforte dans notre décision de garder le milieu LB. La bande d'expression qui apparaît au niveau du surnageant induit du milieu LB bien plus visible que dans le surnageant du milieu M9 nous intéresse particulièrement car elle pourrait traduire une production de Poldip2 dans le cytosol.

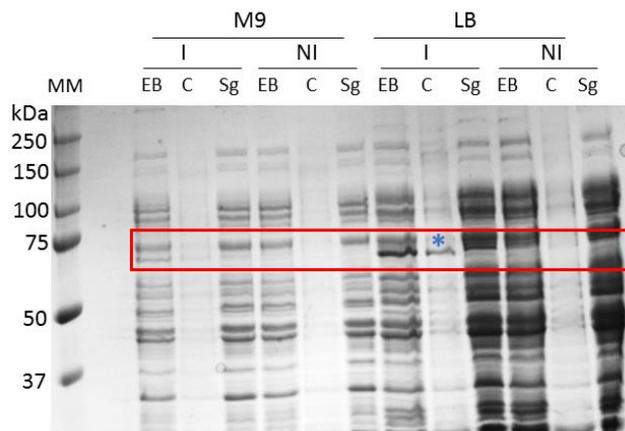


Figure III- 3 : Comparaison sur gel SDS-PAGE de l'expression de Poldip2 dans E. coli soluBL21 induite ou non par l'IPTG dans deux milieux de culture M9 ou LB.
 Puits : 5 μ l d'extrait protéique dans 15 μ l au total (7 μ l d'eau + 3 μ l de Tampon de charge) ; * la bande correspondante à Poldip2.

A.I.2.c. Optimisation de la concentration en IPTG

La souche SoluBL21DE3/Poldip2 a été mise en culture en milieu LB (Figure III- 4) à 18 °C en présence de concentrations croissantes d'IPTG. De manière cohérente, on constate l'apparition d'une surexpression de Poldip2 après induction qui croit avec l'augmentation de la concentration en IPTG. Cela est observé de manière équivalente dans l'extrait brut, le culot et le surnageant. Par ailleurs, il semble que, dans ces conditions de culture, la protéine est produite de manière significative dans le surnageant. Les bandes de surexpression semblent équivalentes pour les concentrations de 0,25 et 0,5 mM d'IPTG. Pour la suite des expériences, on choisira une concentration de 0,5 mM en IPTG.

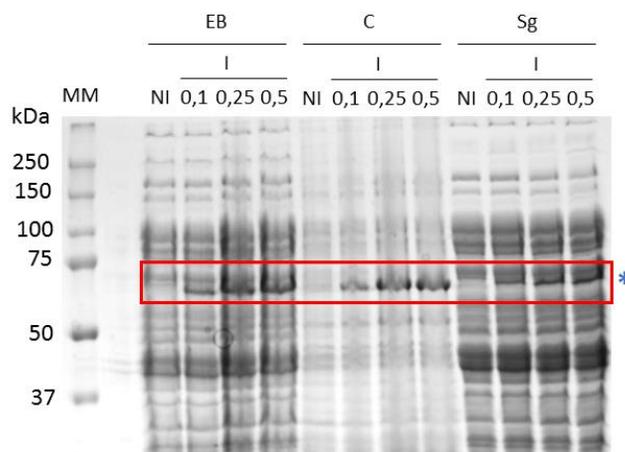


Figure III- 4 : Comparaison sur gel SDS-PAGE de l'expression de Poldip2 dans E. coli SoluBL21 dans un milieu LB en fonction de la concentration en IPTG.

Puits : 5 μ l d'extrait protéique dans 15 μ l au total (7 μ l d'eau + 3 μ l de Tampon de charge). Les concentrations en IPTG 0,1, 0,25 et 0,5 sont données en mM. NI : non induit. * la bande correspondante à Poldip2.

A.I.2.d. Effet de la température

La souche SoluBL21DE3/Poldip2 a été mise en culture en milieu LB (Figure III- 5) et son expression induite à 0,5 mM d'IPTG. Après induction, la souche est incubée à 15 °C et 18 °C. Des cultures à des températures basses sont susceptibles de favoriser l'expression de protéines recombinantes toxiques pour leur hôte. On constate nettement une surexpression des protéines vers 66 kDa, qui correspondent vraisemblablement à Poldip2, plus importante dans les souches induites à 18 °C plutôt que 15 °C. Par conséquent, la température de 18 °C sera conservée pour les productions à plus grande échelle.

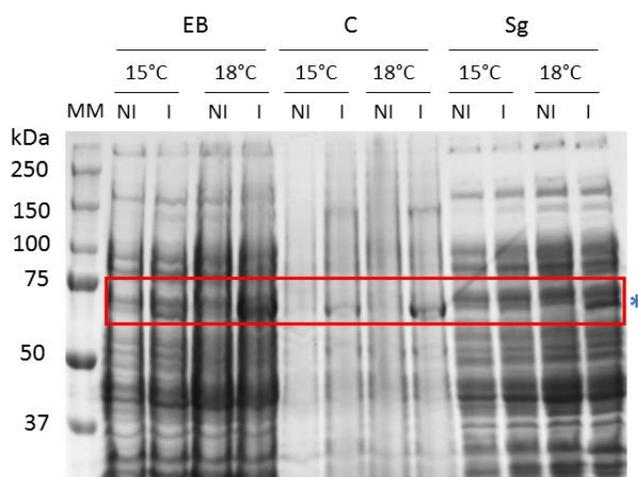


Figure III- 5 : Comparaison sur gel SDS-PAGE de l'expression de Poldip2 dans E. coli SoluBL21 induite ou non par l'IPTG dans un milieu LB en fonction de la température.
Puits : 5 µl d'extrait protéique dans 15 µl au total (7 µl d'eau+ 3 µl de Tampon de charge). * La bande correspondante à Poldip2.

A.I.2.e. Confirmation de l'identité de la protéine Poldip2 humaine par Western Blot

Afin de confirmer que la bande de surexpression observée précédemment sur les gels SDS-PAGE correspond bien à la protéine Poldip2 humaine, des Western Blots ont été réalisés sur l'extrait brut (EB), le culot (C) et le surnageant (Sg) avec deux anticorps différents soit un anticorps dirigé contre la protéine Poldip2 humaine, soit un anticorps dirigé contre l'étiquette 6xhistidines. Les deux Westerns Blots (Figure III- 6) révèlent une bande de surexpression qui a le même profil de migration. Cette bande est présente dans toutes les fractions cellulaires. Sur le Western Blot marqué avec l'anticorps anti-Poldip2 on observe d'autres bandes reconnues par cet anticorps. Ces bandes pourraient correspondre à des formes tronquées de cette protéine. Ce résultat confirme donc que la bande observée est bien la protéine Poldip2. De plus seule la protéine à 66 kDa a conservé l'étiquette 6-his ce qui permettra de la purifier par chromatographie d'affinité sur résine de Nickel. La protéine GST présente également en N-terminal pourra aussi être mise à profit pour purifier d'avantage la protéine recombinante.

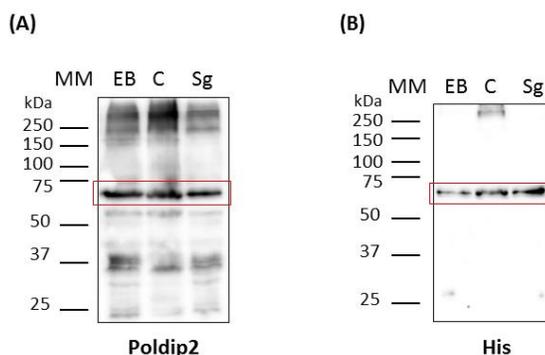


Figure III- 6 : Identification de Poldip2 dans les extraits d'E. coli.

(A) Western Blot marqué par un anticorps anti-Poldip2 (Abcam) ; (B) Western Blot marqué par un anticorps anti-histidine (Santa Cruz). 5 μ l d'échantillon sont déposés sur gel. Encadré en rouge bande correspondante à Poldip2.

En conclusion de cette partie, nous avons sélectionné la souche SoluBL21DE3 pour l'expression de Poldip2 (humain). La production a été optimale lorsque la souche est mise en culture dans du milieu LB sur la nuit à 18 °C après induction à 0,5 mM en IPTG. L'analyse par Western Blot a révélé que la protéine produite est entière et a conservé ses deux étiquettes 6 histidines et GST en N-terminale de la séquence ce qui permettra de la purifier (étape suivante non réalisée dans les délais de la thèse).

A.I.3. Production de Poldip2 humain *in vitro*

Une approche différente est décrite ici pour la production de Poldip2 humain et a été faite en collaboration avec Dr M.-F. Giraud (IBGC-CNRS, UMR 5095, Université de Bordeaux). Elle consiste à produire Poldip2 (humain) *in vitro*. Cette méthode de production est intéressante car elle permet un gain de temps assez considérable. En seulement quelques heures il est possible d'obtenir la protéine recombinante en quantité suffisante pour la purifier. De plus certaines protéines recombinantes sont difficiles à produire car elles sont toxiques pour leur hôte, cette méthode permet donc de palier à cette contrainte. En effet ce système consiste à mettre le vecteur d'expression portant la séquence codante pour la protéine d'intérêt avec toute la machinerie nécessaire pour la traduction et la transcription du gène en protéine (ribosomes, ARNt, facteur d'initiation d'élongation et de terminaison, les acides aminés, une source d'énergie, etc.).

Ici, deux constructions sont comparées. Dans un premier cas, la même construction que précédemment décrite a été utilisée : pETM33/ 6his-GST-Poldip2. Dans un deuxième cas, le gène codant pour Poldip2 (humain) est introduit dans le vecteur pET28a avec en N-terminal une étiquette de 6 histidines. Cette construction est notée pET28a-6his-Poldip2. Les protéines recombinantes 6his-GST-Poldip2 et 6his-Poldip2 font respectivement 66 et 42 kDa.

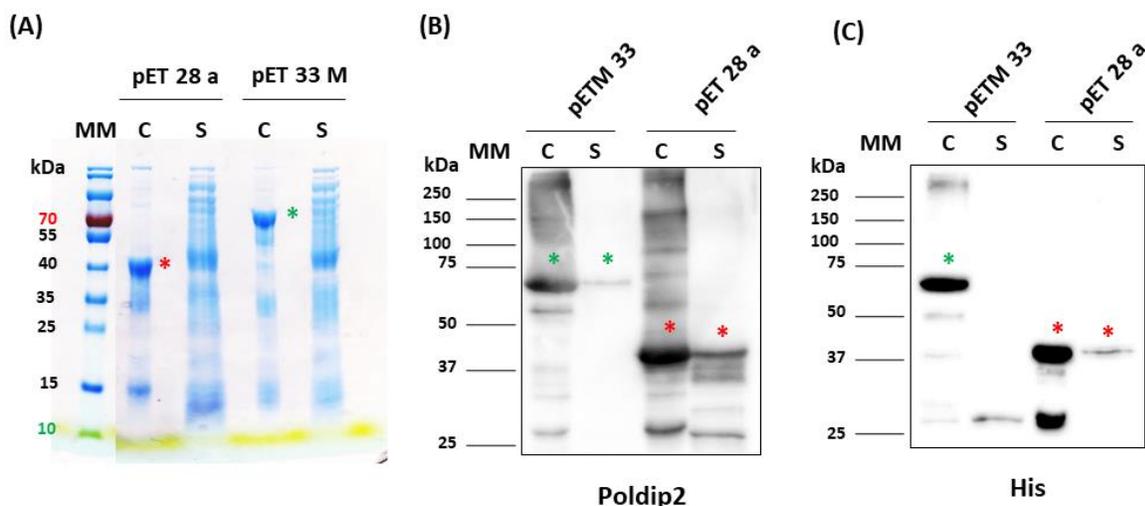


Figure III- 7 : Production de Poldip2 humain dans un système d'expression in vitro.
 (A) SDS-PAGE réalisé sur les culots (C) et surnageant (S). (B) Western Blot marqué avec l'anticorps dirigé contre Poldip2 (Abcam). (C) Western Blot marqué avec l'anticorps dirigé contre l'étiquette 6xhistidines (Santa Cruz). * pET28a-6his-Poldip2 ; * pETM33-6his-GST-Poldip2.

À la fin de la synthèse de la protéine d'intérêt, le mélange réactionnel est centrifugé pendant 10 minutes à 14 000 xg. Dans le culot noté (C) se trouvent les protéines insolubles sous forme de corps d'inclusion et dans le surnageant noté (S) se trouvent les protéines solubles. L'analyse de ces fractions sur gel SDS-PAGE (Figure III- 7 A) révèle que la protéine est exprimée majoritairement sous forme de corps d'inclusion, seulement une petite partie est exprimée sous forme soluble avec un meilleur rendement pour la construction pET28a-6his-Poldip2 que pour la construction pETM33-6his-GST-Poldip2. Ce résultat n'est pas surprenant car Poldip2 est également produite sous forme de corps d'inclusion dans le système d'expression d'*E. coli*. Néanmoins on s'attendait à avoir un meilleur rendement pour la construction pETM33-6his-GST-Poldip2 puisqu'il a été décrit que la protéine GST favorise la solubilité de Poldip2 (16) or il ne semble pas que ce soit le cas ici. L'analyse par Western Blot (Figure III- 7B et C) avec les anticorps dirigés contre Poldip2 et contre l'étiquette 6 histidines de ces fractions confirme les observations décrites pour le gel SDS-PAGE. Sur le Western Blot révélé avec l'anticorps anti-histidine, aucune bande vers 66 kDa n'est observé au niveau du surnageant obtenu à partir de la construction pETM33-6his-GST-Poldip2 ce qui suggère que la protéine produite a perdu son étiquette 6xhis et qu'il sera donc impossible de la purifier par chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel. En revanche sur ce même Western Blot on observe une bande vers 25 kDa. Cette taille correspond à la taille de la protéine GST ce qui suggère qu'il y a eu un clivage en aval de la GST. Au vu de ces résultats, la construction pET28a-6his-Poldip2 qui a permis de produire la protéine recombinante dans le surnageant et a conservé son étiquette 6xhis, semble plus adaptée pour poursuivre des essais de purification par chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel (qui n'ont pas pu être exploités dans la thèse).

A.I.4. Production de Poldip2 de rat dans le système hétérologue de levure

Bien que des essais de production de Poldip2 aient été réalisés dans *E. coli* avec succès, nous avons choisi d'exprimer Poldip2 dans un organisme eucaryote, la levure *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) pour sa capacité à effectuer des modifications post-traductionnelles absentes chez *E. coli*. Les premiers clonages de Poldip2 dans un plasmide pPICZB, avec une expression attendue intracellulaire, n'ont pas abouti à une expression détectable de la protéine dans la levure (258). Ceci a été attribué à une éventuelle toxicité de la protéine ou bien à un adressage ne permettant une surexpression comme par exemple une possible localisation de Poldip2 dans la mitochondrie. Cette hypothèse est envisageable compte tenu du fait que Poldip2 possède une séquence d'adressage à la mitochondrie dans sa partie N-terminale (Figure III- 1B). Pour contourner cette difficulté, le gène de Poldip2 a été cloné dans le vecteur d'expression pPICZ α A (259). Ce vecteur contient un facteur α (de sécrétion) qui permet l'adressage de la protéine dans le milieu extracellulaire (le milieu de culture). Une fois secrétée par la levure, la protéine ne représente plus un danger pour l'organisme hôte qui peut conserver une physiologie proche de la norme. La position du tag a également été modifiée. Un tag c-myc et un tag 6-histidines sont présents à l'extrémité c-terminale de la protéine. Le plasmide linéarisé s'intègre dans le génome de la levure par recombinaison homologue.

A.I.4.a. Sélection de la souche

Deux souches de *P. pastoris* ont été transformées : X-33, une souche sauvage de phénotype mut⁺, et SMD1168, une souche déficiente en protéase A (pep4 Δ). Cette dernière est très avantageuse pour l'expression de protéines recombinantes puisque cette mutation les protège d'une éventuelle dégradation. Les levures transformées sont mises en culture sur des boîtes d'YPD contenant de la Zéocine. Cette étape permet de sélectionner les clones qui ont intégré le plasmide pPICZ α A ou pPICZ α A/Poldip2 contenant le gène de résistance à la Zéocine. Deux concentrations de Zéocine ont été utilisées, 500 et 1000 μ g/ml, pour sélectionner les levures qui ont intégrés le plus grand nombre de copies du plasmide dans leur génome. Pour chaque souche, 7 clones recombinants ayant poussés sur 1000 μ g/ml de Zéocine, sont mis en culture pendant 24 h à 28 °C en présence de méthanol 0,5 %. La protéine d'intérêt, Poldip2, est excrétée dans le milieu de culture par les levures. Les protéines de ce milieu sont concentrées par la méthode TCA et le niveau d'expression de Poldip2 pour chaque clone est déterminé par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-Poldip2 pour l'identifier (Figure III- 8). Pour chaque clone, plusieurs bandes de protéines sont reconnues par l'anticorps. Néanmoins on distingue que les clones 1, 2 et 3 de la souche SMD1168 et les clones 2 et 3 de la souche X-33 expriment des protéines qui migrent au même niveau (vers 37 kDa) que les bandes du témoin positif (souche X-33 dont l'expression de Poldip2 a été vérifiée dans l'étude préliminaire (259). Cependant les niveaux d'expression sont assez faibles probablement dus aux faibles dépôts du milieu de

culture (225 μ l concentré par TCA). Il est donc difficile à ce stade de correctement sélectionner le meilleur clone.

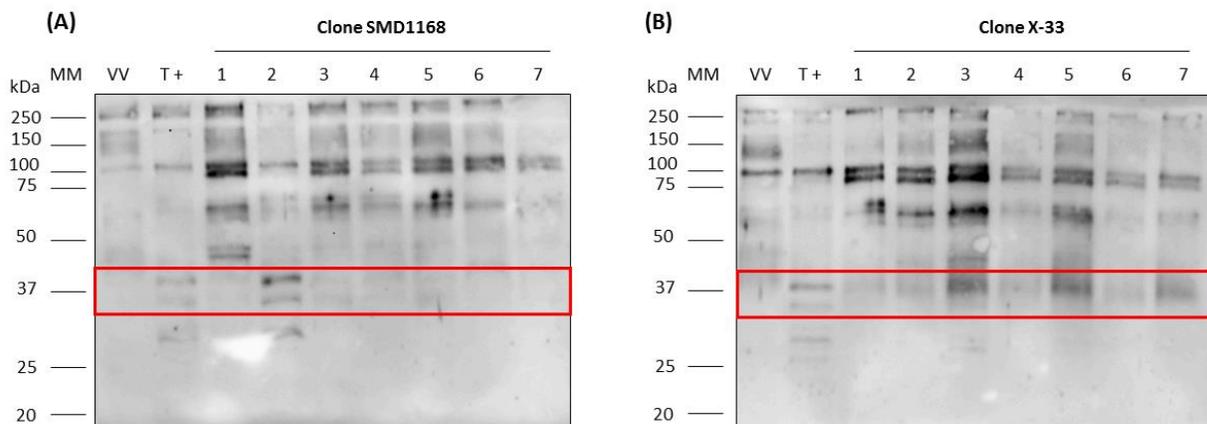


Figure III- 8 : Analyse par Western Blot des levures recombinantes ayant poussées sur milieu YPD + Zeocine (1 mg/ml).

L'équivalent de 225 μ l de milieu de culture concentré au TCA est déposé sur le gel. Le Western Blot est marqué par un anticorps dirigé contre la protéine Poldip2 (Santa Cruz). (A) les clones de la souche SMD1168. (B) Les clones de souche X-33. T+ : témoin positif souche X-33 dont l'expression de Poldip2 a été vérifiée dans l'étude préliminaire. VV : vecteur vide, souche transfectée par le vecteur vide pPICZ α A.

Cinq clones, pour lesquels des bandes entre 37 et 50kDa sont présentes, sont pré-sélectionnés et sont réunis dans la Figure III- 9. Cette fois-ci le dépôt est 4 fois plus important pour bien pouvoir visualiser les bandes correspondantes à Poldip2. Sur cette figure, seuls les clones 2 et 3 de la souche SMD1168 présentent des bandes similaires au témoin positif (entre 37 et 50 kDa). Pour ces deux clones les bandes sont plus intenses suggérant une meilleure expression de Poldip2 que dans le clone 1. L'anticorps reconnaît également une protéine très fortement exprimée à 75 kDa pouvant être un dimère Poldip2. Néanmoins étant donné que l'anticorps utilisé est un anticorps polyclonal donc peu spécifique de la protéine d'intérêt on ne peut à ce stade ni confirmer ni infirmer cette hypothèse. En se basant sur les bandes attendues (entre 37 et 50 kDa), les clones 2 et 3 sont donc sélectionnés pour optimiser le niveau d'expression de Poldip2.

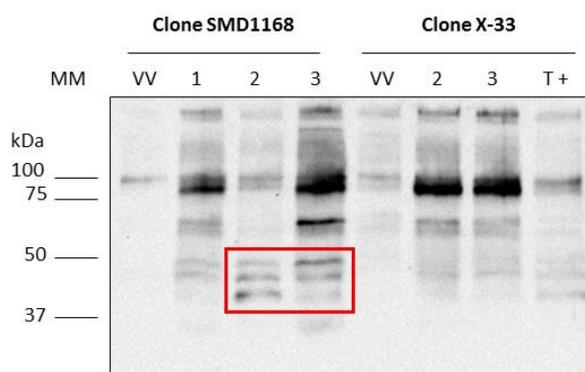


Figure III- 9 : Analyse par Western Blot des recombinants présélectionnés.

L'équivalent de 900 μ l de milieu de culture concentré au TCA est déposé sur le gel. Le Western Blot est marqué par un anticorps dirigé contre la protéine Poldip2 (Santa Cruz). T+ : témoin positif souche X-33 dont l'expression de Poldip2 a été vérifiée dans l'étude préliminaire. VV : souche transfectée par le vecteur vide pPICZ α A. Encadré en rouge bande correspondante à Poldip2.

A.I.4.b. Optimisation du temps et de la densité optique d'induction

Les clones 2 et 3 de la souche SMD1168 sont mis en culture pendant 72 h à 28 °C dans le milieu BMMY. Les cultures sont induites au méthanol à une concentration de 0,5 % à une densité optique initiale (mesurée à 600 nm) soit de 2, soit de 4. Toutes les 24 h, le surnageant des cultures est prélevé, concentré par la méthode TCA et analysé par Western Blot. Pour une induction à partir d'une culture à DO_{600nm} de 2, dans le clone 2, une augmentation de l'expression de Poldip2 est observée en fonction du temps, que ce soit avec l'anticorps anti-Poldip2 ou avec la sonde anti-histidine. Pour le clone 3, l'expression de Poldip2 reste très faible même après 72 h d'induction (Figure III- 10).

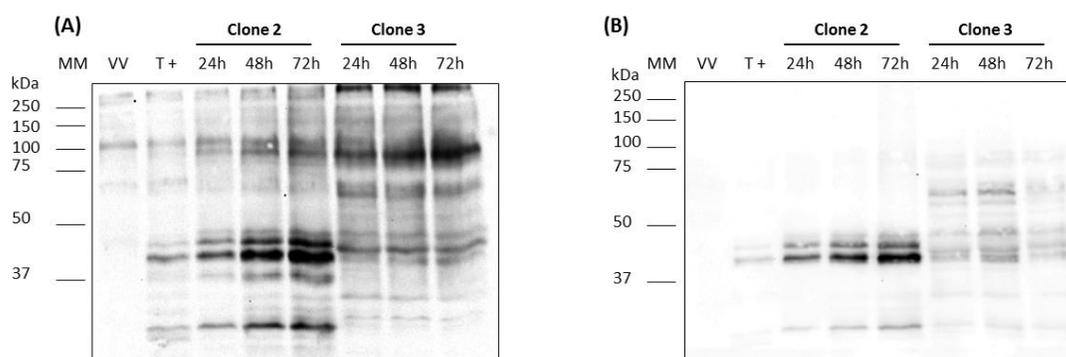


Figure III- 10 : Optimisation du temps de culture des clones 2 et 3 à une DO d'induction initiale égale à 2.

900 μ l de milieu de culture prélevé toutes les 24 h sont concentrés par TCA et déposés sur gel. La révélation du Western Blot a été effectuée en utilisant un anticorps dirigé contre Poldip2 (Santa Cruz) (A) et une sonde anti-histidine (Thermo Scientifique) (B).

Des résultats similaires sont observés avec une induction à partir d'une culture ayant une DO_{600} initiale de 4 (Figure III- 11). Néanmoins le niveau d'expression reste dans l'ensemble plus important pour les cultures induites à une DO_{600} 2. De manière surprenante on remarque que le maximum d'expression détecté avec l'anticorps antiPoldip2 est à 48 h contre 72 h pour le Western Blot révélé avec la sonde anti-histidine. Ce résultat est obtenu pour 2 expériences indépendantes. Cela peut être expliqué par une surexpression de cette protéine à 48 h accompagné par un clivage du tag histidine qui est compensé à 72 h par une surexpression encore plus importante. Par ailleurs, nous constatons que d'autres bandes, en dehors de la bande de 46 kDa attendue, sont présentes : soient de plus faible poids moléculaire suggérant une dégradation de la protéine, soient de plus haut poids moléculaires, pouvant correspondre à la protéine Poldip2 oligomérisée pour les bandes vers 60 et 100 kDa ou bien porteuse de modification post-traductionnelles (telles que des phosphorylations) pour les bandes de poids légèrement plus haut que 46 kDa.

Finalement c'est le clone 2 qui est sélectionné pour une culture pendant 72 h à une densité optique d'induction égale à 2.

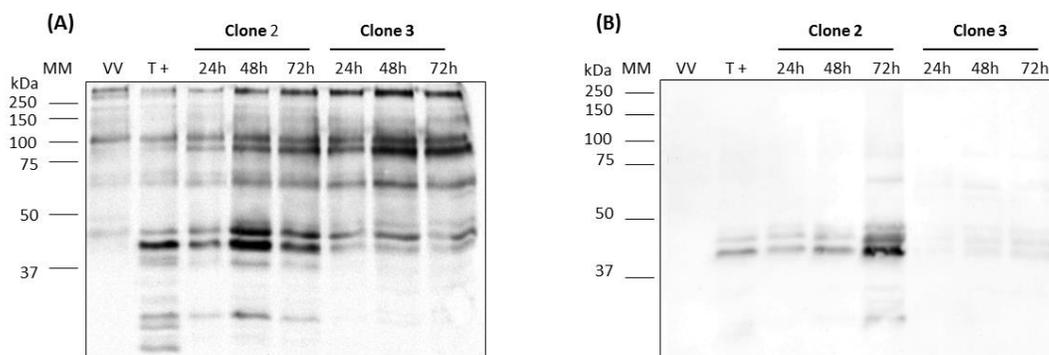


Figure III- 11 : Optimisation du temps de culture des clones 2 et 3 à une DO d'induction initiale égale à 4.

900 μ l de milieu de culture prélevé toutes les 24 h sont concentrés par TCA et déposés sur gel. La révélation du Western Blot a été effectuée en utilisant un anticorps dirigé contre Poldip2 (Santa Cruz) (A) et une sonde anti-histidine (Thermo Scientifique) (B).

A.I.4.c. Optimisation de la température

Trois valeurs de température de culture (20, 25, 28 °C) sont testées pour optimiser le niveau d'expression de Poldip2 dans le clone 2. La culture est faite selon les paramètres optimisés précédemment, soit une durée de 72 h et densité optique d'induction DO_{600} égale à 2. Après concentration des protéines du milieu de culture par la méthode TCA, les échantillons sont analysés par Western Blot (Figure III- 12). Le niveau d'expression le plus élevé est observé pour les cultures des levures recombinantes à 25 °C. Par conséquent, nous pouvons conclure que les conditions optimales d'expression de Poldip2 sont : culture de la souche SMD1168 avec une induction à une DO_{600} 2 pendant 72 h à 25 °C.

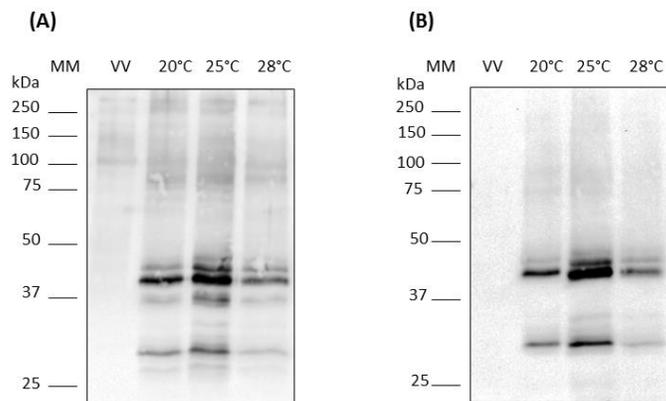


Figure III- 12 : Optimisation de la température de culture à une DO d'induction initiale égale à 2 pendant 72 h.

900 µl du milieu de cultures prélevées à 72 h de culture et concentrées au TCA sont déposés sur gel. La révélation du Western Blot a été effectuée en utilisant un anticorps dirigé contre Poldip2 (Santa Cruz) (A) et une sonde anti-histidine (Thermo Scientifique) (B).

A.I.4.d. Vérification de l'insertion du gène de Poldip2 dans le génome de *P. pastoris* SMD1168

Une PCR est réalisée sur de l'ADN génomique extrait d'une culture du clone n° 2 de la souche SMD1168 pour vérifier que ce clone a bien intégré le gène complet dans son ADN génomique. Les amorces utilisées sont complémentaires en amont (forward) et en aval (reverse) du gène *Poldip2* comme indiqué sur la Figure III- 13 A. L'ADN du clone n° 2 amplifié par PCR est d'environ 1100 pb (Figure III- 13 B). Il est de même taille que l'ADN amplifié à partir du vecteur pPICZαA/Poldip2. Ce résultat confirme donc que le gène codant pour Poldip2 s'est bien intégré dans le génome du clone n° 2.

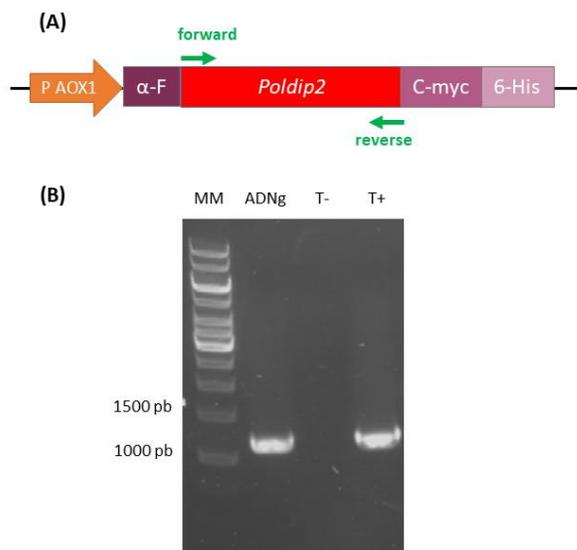


Figure III- 13 : Insertion du gène de Poldip2 dans l'ADN génomique de la levure. (A) Schéma de l'amplification du gène codant pour Poldip2 à l'aide des primers forward et reverse. (B) Gel d'agarose des produits de PCR de l'ADN génomique de *P. Pastoris* : ADNg : ADN génomique de la levure transformé par le vecteur pPICZαA-Poldip2 ; T- : ADN génomique de la levure transformé par le vecteur vide pPICZαA et ; T+ : produits de PCR du vecteur pPICZαA-Poldip2.

A.I.5. Production de Poldip2 à grande échelle

Les 3 systèmes d'expression décrits jusque-là s'avèrent être de bon moyen pour exprimer la protéine recombinante. Ils présentent tous des avantages et des inconvénients. Finalement nous choisissons de poursuivre la production de Poldip2 (rat) à grande échelle dans le système d'expression de levure et de l'exploiter pour le reste du projet pour des études fonctionnelles. Notre choix s'est porté vers ce type de système d'expression pour plusieurs raisons. Premièrement, la protéine Poldip2 présente plusieurs sites de phosphorylation potentiels dans sa séquence. Ces sites de phosphorylation ont été déterminés par le logiciel NetPhos2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/>). La phosphorylation de la protéine pourrait jouer un rôle important dans la fonction de la protéine et son implication dans certaines voies de signalisation. Seule la levure est capable d'effectuer ce type de modification post-traductionnelle. De plus, la levure *P. pastoris* sécrète très peu de protéines endogènes dans le milieu de culture (260). La protéine recombinante secrétée représenterait la majorité des protéines totales présentes dans le milieu de culture. Dans ces conditions il serait donc plus facile de purifier la protéine recombinante à partir du surnageant de culture d'autant plus que cela ne nécessite aucun traitement au préalable tel que le cassage des bactéries pour récupérer le cytosol, ou encore la solubilisation des corps d'inclusion. Ce dernier traitement en plus d'être contraignant présente le risque de dénaturer la protéine recombinante qui perdrait donc sa fonctionnalité.

A.I.5.a. Production de Poldip2 (Rat) à grande échelle

Une fois les conditions de culture optimales définies, une culture à grande échelle (1 litre) a été réalisée et le niveau d'expression est comparé à la culture réalisée sur petit volume (5 ml) (Figure III- 14 A et B). Le niveau d'expression sur grand volume semble plus important que celui obtenu sur petit volume. Cette amélioration de l'expression de la protéine recombinante obtenue dans un erlenmeyer pourrait être due à une meilleure oxygénation du milieu de culture dans ce contenant. La surface large d'un erlenmeyer offre plus de surface de contact avec l'air et donc un meilleur échange de l'oxygène. Par ailleurs, la croissance des levures ainsi que le niveau d'expression de Poldip2 ont été suivis au cours du temps pendant 72 h de culture. La Figure III- 14 C indique que les levures restent en phase exponentielle tout au long de la culture que ce soit dans un petit ou un grand volume de culture. Elles sont donc dans une phase favorable pour la surexpression de protéines recombinantes. Le Western Blot (Figure III- 14 D) réalisé sur les échantillons de surnageants prélevés toutes les 24 h indique que l'expression de Poldip2 est maximale dès 48 h d'induction et semble rester stable jusqu'à 72 h. Le passage à une culture dans un grand volume permet donc une bonne expression de la protéine recombinante. Néanmoins plusieurs bandes de protéines sont reconnues à la fois par l'anti-Poldip2 et l'anti-histidine (Figure III- 14 A, B et D). Il semble que la levure sécrète plusieurs formes de Poldip2 dont certaines sont tronquées soit en N-terminale étant donné qu'elle présente une taille plus faible que 46 kDa, soit en C-terminale puisqu'elles sont absentes du Western

Blot marqué par la sonde anti-histidine. Ces phénomènes de clivage peuvent apparaître à différents stades de la sécrétion de la protéine soit dans le milieu de culture par des protéases sécrétées par la levure dans le milieu de culture, soit par des protéases à l'intérieur de la levure lors de son adressage au milieu extracellulaire.

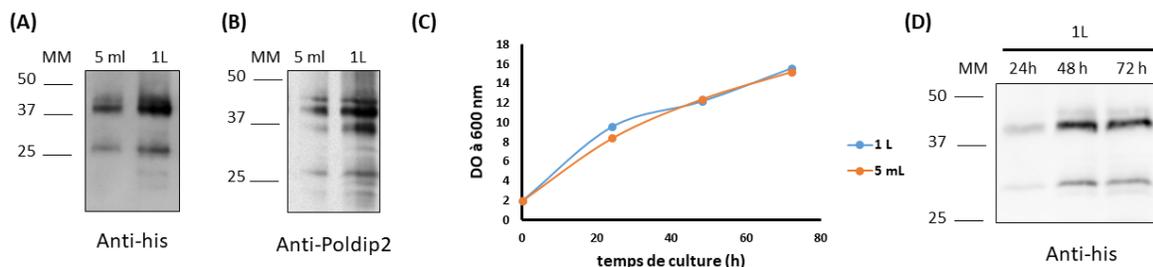


Figure III- 14 : Expression de Poldip2 dans un grand volume de culture (1 litre).

(A et B) comparaison de l'expression de Poldip2 entre un petit (5 ml) et un grand volume de culture (1 litre) pour une induction pendant 72 h. Le Western Blot est marqué avec une sonde anti-histidine. (A) et un anticorps dirigé contre Poldip2 (Santa Cruz) (B). (C) Suivi de croissance du clone n° 2. (D) Suivi de l'expression de Poldip2 au cours du temps dans un litre de culture. La révélation du Western Blot a été effectuée par une sonde anti-histidine (Thermo Scientifique). 900 μ l d'échantillons concentré au TCA sont déposés sur le gel.

Pour essayer de remédier à ces phénomènes de clivage, du PMSF à une concentration finale de 1mM (préparé dans de l'éthanol) a été ajouté au milieu de culture à t0. La culture a été faite dans un petit volume (5 ml) à 25 °C pendant 72 h. En présence de PMSF la culture atteint un plateau plus rapidement (Figure III- 15 A). À 48 h de culture, il y a deux fois plus de levures dans le milieu contenant le PMSF par rapport à celui qui n'en contient pas (Figure III- 15 A). Les levures ont atteint la phase stationnaire de leur croissance alors que dans le milieu sans PMSF les levures continue à croître suite à la 3^{ème} induction par le méthanol. Le milieu de culture a été prélevé en fin de culture, soit 72 h de culture, et analysé par SDS-PAGE et Western Blot pour visualiser les protéines totales sécrétées ainsi que le niveau d'expression de Poldip2 (Figure III- 15 B et C). En présence de PMSF, plus de protéines sont sécrétées dans le milieu de culture (Figure III- 15 B) de même, la quantité de Poldip2 produite augmente également (Figure III- 15 C). Le PMSF n'augmente pas spécifiquement l'expression de la protéine recombinante, mais toutes les protéines sécrétées par la levure. Cette augmentation de la quantité de protéines totales observée dans le milieu ne vient pas d'un effet direct du PMSF sur le mécanisme d'expression de protéine par la levure mais tout simplement d'une augmentation de la quantité de levure dans le milieu de culture. De plus, les formes clivées de Poldip2 sont toujours présentes avec le même ratio que sans PMSF. Il semble donc que le PMSF n'empêche pas le clivage de la protéine recombinante dans le milieu de culture. Etant donné que le PMSF inhibe spécifiquement les protéases à serine, ceci suggère que d'autres protéases présentes dans le milieu de

culture pourraient induire ces clivages. Cependant on ne peut pas exclure non plus que ces événements n'interviennent pas dans le milieu de culture mais en amont de la sécrétion de la protéine.

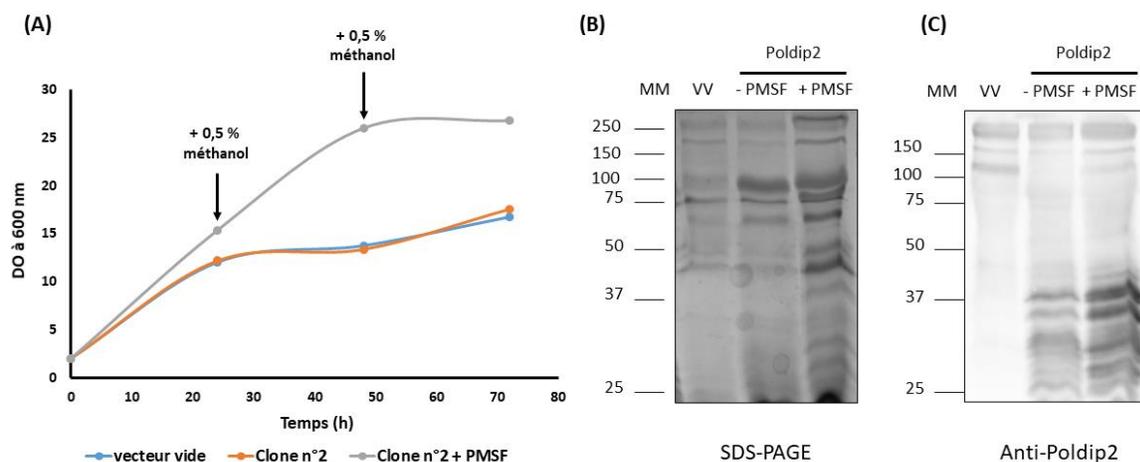


Figure III- 15 : Effet du PMSF sur l'expression de Poldip2.

(A) Suivi de la croissance du clone n° 2. Comparaison de l'expression de Poldip2 en présence (+) et en absence (-) de PMSF vérifié par SDS-PAGE (B) et Western Blot révélé par un anticorps dirigé contre Poldip2 (Santa Cruz) (C).

A.I.5.b. Vérification de l'expression de Poldip2 dans les compartiments subcellulaires de la levure

La protéine recombinante Poldip2 fusionnée au tag histidine et à l'épitope c-myc, a une taille de 46 kDa. Lorsque le facteur α n'est pas encore clivé la protéine produite devrait atteindre une taille de 55 kDa (Figure III- 16 A). La présence de Poldip2 est vérifiée dans le surnageant de milieu de culture et dans les différents compartiments subcellulaires de la levure recombinante par Western Blot (Figure III- 16 B) en utilisant un anticorps dirigés contre Poldip2. Cette analyse confirme, dans le milieu de culture, la présence des différentes bandes correspondantes à Poldip2, comme mentionné plus haut. La présence d'une bande majoritaire d'une taille d'environ 46 kDa suggère des clivages de la protéine recombinante au cours de l'acheminement de celle-ci vers le milieu extracellulaire dans lequel le PMSF n'a pas eu d'effet (Figure III- 15).

Trois fractions subcellulaires (membrane plasmique, cytosol et mitochondrie/noyau) ont été obtenues par centrifugation différentielle puis analysées par Western Blot. Une fraction contenant à la fois les mitochondries et les fractions nucléaires est obtenue après centrifugation à $10\,000 \times g$ pendant 20 min. Les membranes plasmiques sont obtenues après centrifugation à $180\,000 \times g$ pendant 1 h. L'analyse de l'extrait brut des levures recombinantes indique que, dans la levure, Poldip2 serait majoritairement sous une forme associée au facteur α d'environ 55 kDa. Cette forme semble s'accumuler dans la fraction mitochondriale et nucléaire lorsqu'elle n'est pas sécrétée. Des résultats similaires ont déjà été observés par

Lin-Cereghino *et al.* (2013) pour d'autres protéines qui seraient retenues dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi. Leurs travaux montrent une augmentation de la sécrétion de la HRP et la lipase dans le milieu de culture à partir de la souche *P. pastoris* quand celles-ci sont couplées à un facteur α tronqué (260). Par ailleurs l'élimination des sites consensus de déglycosylation du facteur α a permis également d'augmenter le rendement de sécrétion du précurseur d'insuline produit dans *S. cerevisiae* (261). Finalement il existe dans la littérature, en plus du facteur α natif, plusieurs versions mutées qui permettraient d'optimiser la sécrétion de Poldip2.

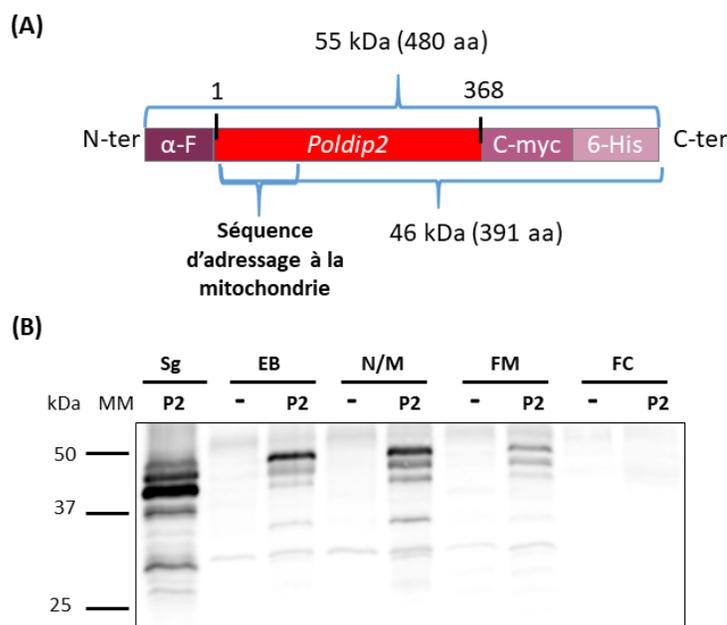


Figure III- 16 : Expression de Poldip2 (rat) dans la levure *P. pastoris* SMD1168.

(A) : Représentation schématique de la séquence de Poldip2 de rat comportant le pro-peptide α en N-terminal l'épitope c-myc et l'étiquette de 6 histidines en C-terminal de la protéine. (B) : Western Blot marqué avec l'anticorps anti-Poldip2 (Santa Cruz) réalisé sur le surnageant et les compartiments cellulaires de levure. (-) levures transformés avec le vecteur vide pPICZ α A. (P2) Levure exprimant la protéine Poldip2 de rat, (Sg) surnageant de milieu de culture, (EB) Extrait Brut, (N/M) Noyaux et mitochondries, (FM) Fraction Membranaire, (FC) Fraction Cytosolique. 20 μ g de protéines sont déposés sur le gel.

Le facteur α est un prepro-peptide signal composé d'une séquence (pre) de 19 acides aminés suivi d'une autre (pro) de 67 acides aminés contenant trois sites consensus de N-glycosylation et un site de clivage réalisé par l'endoprotéase Kex 2 (262). Le clivage du facteur se fait en 3 étapes pendant la sécrétion de la protéine recombinante. Premièrement, la séquence signal (pre) est enlevée dans le réticulum endoplasmique par des endopeptidases (263, 264). Deuxièmement la Kex 2 coupe la séquence (pro) après le motif lysine arginine (265). Et enfin, la dipeptidyl aminopeptidase A produit du gène STE13 coupe la séquence répétée Glu-Ala (266). Il n'est pas clair si cette dernière étape se produit dans le golgi ou les vésicules de sécrétion.

Donc la protéine recombinante associée au facteur α suit le même cheminement que ce dernier. Une fois clivée, elle sera libérée dans le milieu extracellulaire *via* des vésicules de sécrétion en passant par la membrane plasmique (Figure III- 17) (265).

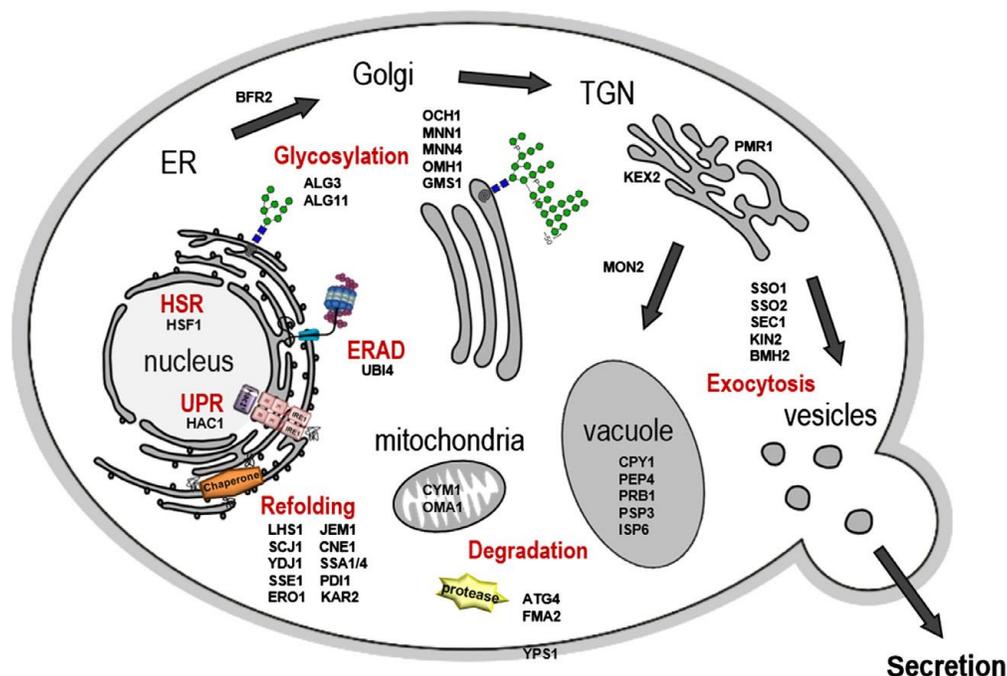


Figure III- 17 : Représentation schématique des voies de sécrétion de la levure et des gènes cibles.
 Les protéines entrent dans le **Réticulum Endoplasmique (RE)**. L'accumulation des protéines mal repliées conduit à une induction de la réponse **UPR (Unfolded Protein Response)** et du protéasome **ERAD (ER-Associated Degradation)**. La réponse **HSR (Heat Shock Response)** induit également l'augmentation d'expression de beaucoup de gènes codant pour des protéines chaperonnes cytoplasmiques et sécrétées. Les protéines correctement repliées sont transportées à l'appareil de Golgi pour subir des modifications post-traductionnelles dont les glycosylations. Les protéines qui sortent de l'appareil de Golgi peuvent être directement sécrétées dans le milieu extracellulaire ou dirigées vers les vacuoles pour y être stockées ou dégradées. Alternativement, les protéines recombinantes sont sujettes à des dégradation protéolytique par différentes protéases situées dans les compartiments cellulaires tels que l'appareil de golgi, le cytosol, la mitochondrie, et la paroi cellulaire (267).

Comme mentionné plus haut, on observe dans le surnageant de culture, beaucoup de bandes de faibles poids moléculaire en plus d'une bande qui migre vers 46 kDa. Ce résultat, suggère que la protéine est synthétisée entière dans la levure. Elle est clivée lors de son acheminement vers le milieu extérieur probablement par des enzymes de la membrane plasmique aboutissant à des formes de plus petites tailles moléculaires. Des phénomènes similaires ont été observés dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* où les protéines sécrétés ne présentaient pas la séquence attendue en N-terminale (266, 268). La souche SMD1168 sélectionnée pour produire Poldip2 est déficiente du gène *Apep4*. Ce gène code pour la protéase vacuolaire protéinase A qui est capable de s'auto-activer, en plus d'activer les protéases carboxypeptidase Y (PRC1) et protéinase B (PRB1). Néanmoins l'extinction de ce gène n'est pas suffisante pour désactiver

complètement les protéinases B dont une faible proportion reste active. De meilleurs résultats pourraient être obtenus avec la souche SMD1163 qui est déficiente des gènes $\Delta pep4$ et $\Delta prb1(269)$ où les protéinases B sont complètement désactivées. L'utilisation d'une souche de *P. pastoris* déficiente en protéase aspartyl Yapsin1 (YPS1) présente au niveau de la paroi cellulaire pourrait être également une bonne option. Cette souche a montré de bon résultat pour limiter le clivage protéolytique des protéines recombinantes secrétées (270, 271).

A.II. Purification de Poldip2 de rat

A.II.1. Mise au point du 1^{er} protocole de purification par chromatographie d'affinité au Nickel

La protéine Poldip2 de rat est purifiée à partir du surnageant de culture de levure *P. pastoris*. Après centrifugation de la culture, un litre de surnageant est chargé à un débit de 1 ml/min à l'aide d'une pompe péristaltique sur la résine de nickel préalablement équilibrée avec du tampon sans imidazole. Ensuite, la colonne est lavée à un débit de 3 ml/min avec un tampon contenant 50 mM d'imidazole pour éliminer les contaminants fixés sur la colonne. La protéine fixée est éluée à un débit de 5 ml/min avec un tampon à 500 mM d'imidazole. Le profil d'élutions obtenus (Figure III- 18 A et B) présente deux pics élués à 50 mM d'imidazole correspondant certainement à des contaminants puis un troisième lorsque l'élution se fait à 500 mM en d'imidazole. Ce dernier pic finit par un plateau correspondant à la forte concentration en imidazole.

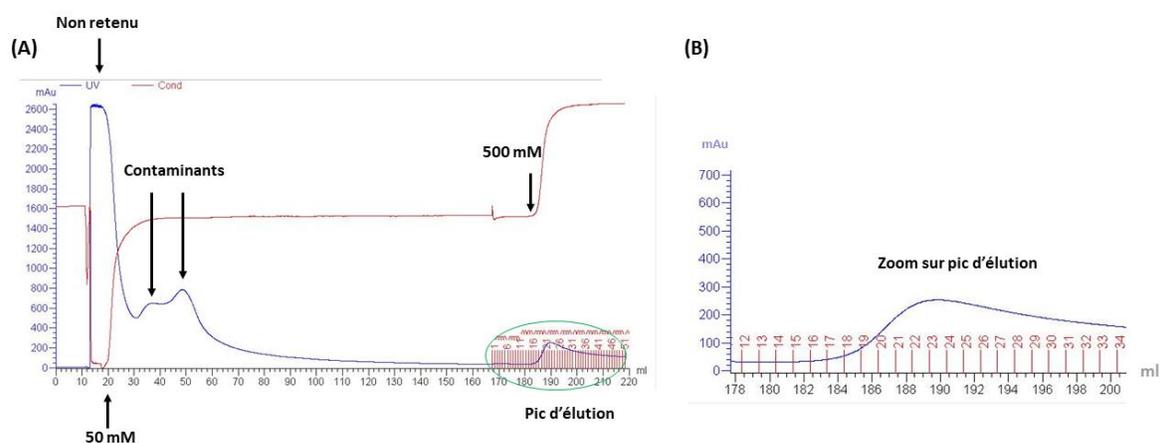


Figure III- 18 : Chromatographie d'affinité sur résine de Nickel.

(A) Profil d'élution ; (B) zoom sur le pic d'élution. Une étape de lavage est effectuée avec un tampon contenant 50 mM d'Imidazole pour éliminer les contaminants (représentés en flèches noires). L'étape d'élution de la protéine recombinante (entouré en vert) est réalisée avec un tampon à 500 mM d'Imidazole. En bleu : courbe d'absorbance en UV (mAu) en fonction du volume d'élution. En rouge : courbe de conductimétrie (mS cm⁻¹) en fonction du volume d'élution.

Les différentes étapes de la purification sont analysées par gel SDS et Western Blot marqué par un anticorps dirigé contre Poldip2 (Figure III- 19 A et B). La protéine recombinante éluée à 500 mM d'imidazole apparaît sous la forme de deux bandes : l'une au-dessus de 37 kDa et l'autre d'une taille plus faible (environ 29 kDa). Ces deux bandes sont reconnues par l'anticorps dirigé contre la protéine Poldip2 ce qui confirme que ce sont deux formes de la protéine recombinante. Néanmoins ces deux formes commencent à être éluées dès l'étape de lavage à 50 mM d'imidazole. Elles sont aussi présentes en faible quantité dans la fraction non retenue. Une autre bande vers 35 kDa (en très faible quantité dans l'éluât 500 mM imidazole) se concentre dans l'étape de lavage à 50 mM d'imidazole. Cela suggère que cette forme de Poldip2 a perdu son tag histidine et ne se fixe pas bien à la résine.

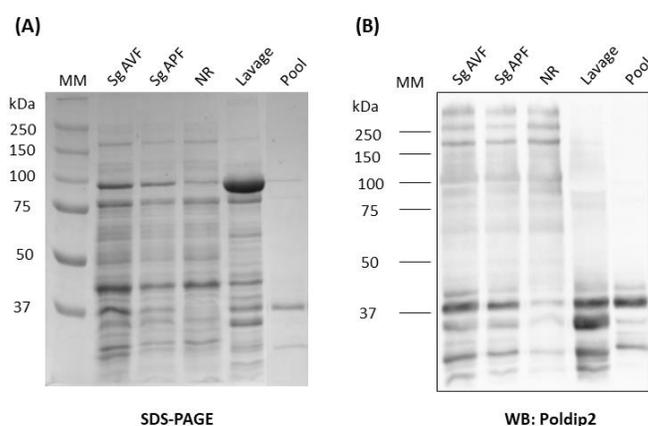


Figure III- 19 : Identification de Poldip2 recombinant à chaque étape de la purification. (A) SDS-PAGE. (B) Western Blot marqué par un anticorps dirigé contre Poldip2 (Santa Cruz). Sg AVF : surnageant de culture avant filtration sur membrane de 0,45 μ M ; Sg APF : surnageant de culture après filtration sur membrane de 0,45 μ M ; NR : non retenu. 900 μ l et 450 μ l de surnageant (SgAPF et SgAVF) sont concentrés au TCA puis déposés respectivement sur gel et Western Blot. 20 μ l et 10 d'échantillon NR, lavage (élution à 50 mM) et pool (élution à 500 mM) sont déposés respectivement sur le gel SDS-PAGE et Western Blot.

On obtient un échantillon qui semble relativement pur avec un rendement autour de 1 mg/L. Ce rendement est assez décevant pour une protéine recombinante produite en levure. Le niveau d'expression des protéines recombinantes secrétées dans le milieu de cultures est généralement de l'ordre de quelques centaines de milligrammes/L (272–275) et peut aller jusque quelques grammes/L (276). Le rendement de purification nécessite donc d'être augmenté mais avant tout il est important d'améliorer la concentration et la pureté de l'échantillon. En effet, en fin de purification, la concentration en protéines est d'environ seulement 0,25 mg/ml ce qui peut être très limitant pour les essais biochimiques. Des essais de concentration de l'échantillon en utilisant des concentrateurs de type Vivaspin (*cut-off* de 10 kDa) classiquement utilisés en laboratoire n'ont pas permis de concentrer la protéine qui semble se fixer fortement sur la membrane polyethersulfone (PES). Cela est probablement dû à des régions hydrophobes présentes à la surface de la protéine qui favorisent sa fixation sur ce type de membrane (11). De même, l'utilisation d'autres types de

concentrateurs, possédant des membranes (de type Hydrosart ®) adaptées à des protéines hydrophobes ou ayant d'autres géométries (orientation de la membrane par rapport à l'axe de centrifugation) n'a pas permis de résoudre ce problème.

A.II.2. Stratégie d'optimisation de la purification de Poldip2

Nous avons testé différentes modifications (Figure III- 20 et le Tableau III- 1) du protocole précédent afin d'améliorer le rendement et la pureté de l'échantillon mais aussi pour augmenter sa concentration en fin de purification pour que celle-ci ne soit pas limitante pour les essais biochimiques compte tenu des difficultés observées pour concentrer Poldip2.

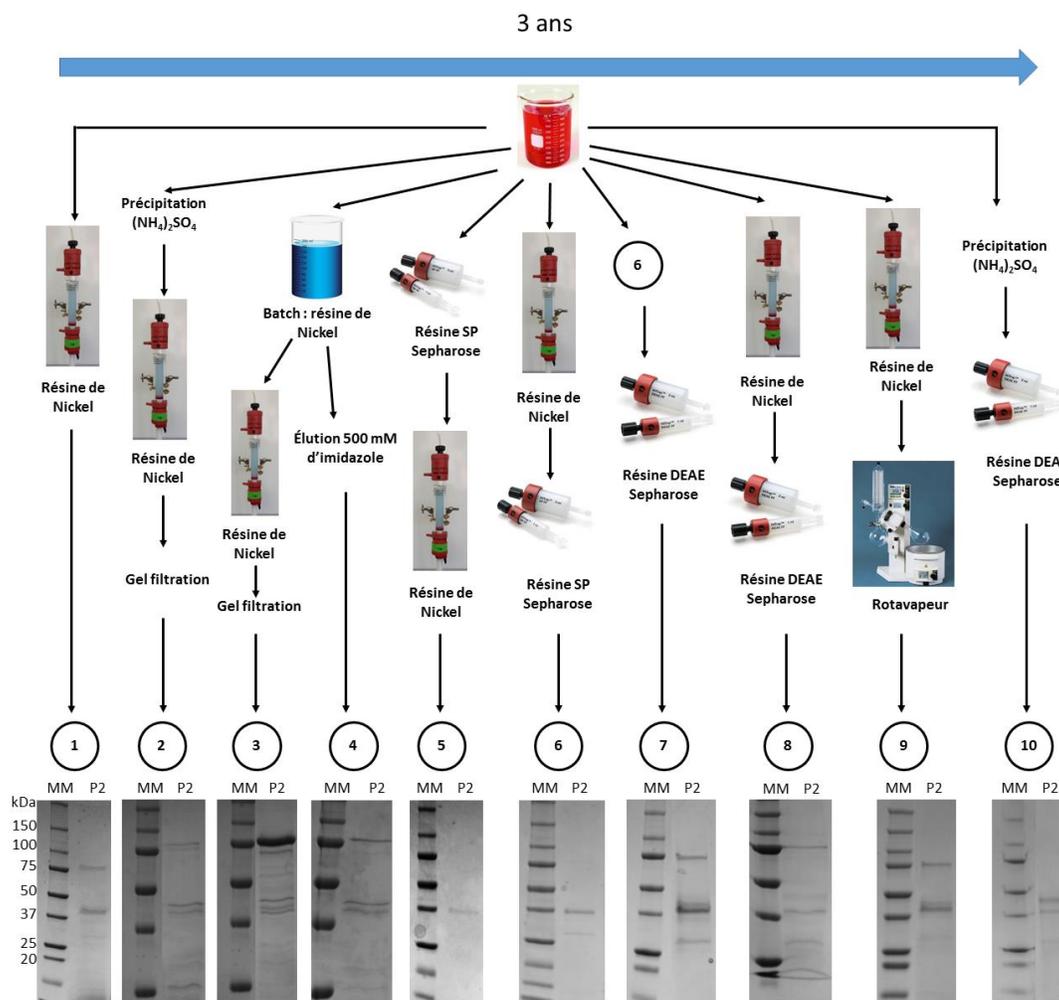


Figure III- 20 : Shéma récapitulatif des différents protocoles mis en place pour la purification de Poldip2. Ici sont représentées les différentes étapes employées, et l'analyse sur gel SDS-PAGE de l'échantillon obtenu en fin de purification.

Dans le Tableau III- 1 sont présentés les objectifs des principales modifications apportées à chaque protocole ainsi que les résultats et observations résultants de ces modifications.

Tableau III- 1 : Différentes stratégies d'optimisation du protocole de purification.

Protocole n°	Objectifs	Résultats/Observations
1	<ul style="list-style-type: none"> • 2^{ème} test du protocole décrit dans le paragraphe précédent 	<ul style="list-style-type: none"> • Purification de 2 formes de Poldip2 et d'un contaminant 75 kDa. • Echantillon très peu concentré • Pureté non satisfaisante. • Rendement faible.
2	<ul style="list-style-type: none"> • Concentration de l'échantillon par précipitation au sulfate d'ammonium (30 %) avant la colonne de Nickel pour faciliter le chargement de la colonne. • Ajout d'une étape de purification par gel filtration pour séparer chacune des bandes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bande à 75 kDa est toujours présente ; • Concentration de l'échantillon faible ; • Rendement encore plus faible ; • Poldip2 s'est dilué sur la colonne de gel filtration.
3	<ul style="list-style-type: none"> • Fixation sur la résine en mode Batch pendant 4 h dans le but d'améliorer la fixation de la protéine puis élution en colonne. • Ajout d'une étape de purification par gel filtration pour séparer chacune des bandes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Concentration de la bande à 75 kDa pendant la colonne de gel filtration ; • Echantillon encore moins pur que précédemment ; • Très peu de Poldip2 est détecté en sortie de colonne.
4	<ul style="list-style-type: none"> • Fixation de l'échantillon en batch et élution en batch. 	<ul style="list-style-type: none"> • Présence de la bande à 75 kDa ; • Échantillon dilué; • Rendement faible; • Avantage: Simplicité du protocole.
5	<ul style="list-style-type: none"> • Ajout d'une étape de purification par chromatographie échangeuse de cations (résine SP) en amont dans le but d'une purification préalable de l'échantillon. 	<ul style="list-style-type: none"> • Une protéine d'environ 37 kDa est purifiée ; • Beaucoup de perte au niveau de la SP. La protéine ne se fixe pas ; • Mauvaise estimation du point isoélectrique (PI= 8,34) ou présence de sel dans le milieu qui empêche la fixation de la protéine ; • Purification du non-retenu par Nickel.
6	<ul style="list-style-type: none"> • Même protocole mais inversion de l'ordre des colonnes dans le but de se débarrasser des sels du milieu de culture et améliorer la fixation de la protéine sur la résine SP. 	<ul style="list-style-type: none"> • Purification améliorée ; présence de deux bandes de protéines ; • La protéine est dans le non retenue. Elle n'est pas fixée sur la résine SP. Mauvaise estimation probable du PI ; • Rendement faible ; • Échantillon très peu concentré.
7	<ul style="list-style-type: none"> • Ajout d'une colonne de DEAE pour concentrer le non retenue. 	<ul style="list-style-type: none"> • La concentration via DEAE révèle la présence de la bande à 75 kDa ; • La SP ne permet pas de se débarrasser complètement de la bande à 75 kDa ; • La DEAE est un bon compromis pour concentrer la protéine.
8	<ul style="list-style-type: none"> • Simplification du protocole du protocole en éliminant la SP. 	<ul style="list-style-type: none"> • Moins de perte de l'échantillon due à l'étape de purification sur la colonne SP.

9	<ul style="list-style-type: none"> • Remplacement de la colonne de DEAE par une concentration au rotavapeur. 	<ul style="list-style-type: none"> • Beaucoup plus simple et rapide à mettre en place qu'une purification par colonne de DEAE ; • Simple concentration de l'échantillon, aucun effet sur la pureté donc moins de perte de l'échantillon.
10	<ul style="list-style-type: none"> • Précipitation par sulfate d'ammonium à 30 % pour concentrer l'échantillon suivie d'une purification par DEAE. 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation du rendement à 4 mg/L ; • Les mêmes formes de Poldip2 sont purifiées par affinité au Nickel mais différentes protéines contaminantes sont présentes.

Au cours de ce travail, nous avons testé différents protocoles pour purifier Poldip2 à partir du surnageant de culture. Mis à part ceux décrit ci-dessus, nous avons également joué sur différents paramètres tels que la concentration en imidazole pour éluer la protéine d'intérêt, la force ionique du tampon, l'ajout d'une étape de dialyse du surnageant de milieu de culture avant l'étape de chargement sur la colonne. Malgré toutes ces modifications, nous n'avons pas pu apporter d'amélioration majeure à la purification de la protéine. C'est même tout le contraire, on observe une diminution du rendement au cours du temps qui passe de 1 mg/L de protéine à 300µg/L en 3 ans d'expérimentation. Ce dernier fait nous amène à soupçonner la stabilité du clone sélectionné qui pourrait avoir perdu son tag histidine d'où la difficulté de le purifier sur colonne d'affinité au nickel. Des tests de culture réalisés sur le clone nous ont révélé que celui-ci n'est plus capable de pousser sur milieu YDP supplémenté en zéocine à une concentration de 1 mg/ml ou 500 µg/ml. Ceci suggère que la souche ne possède plus autant de copies du gène de résistance à la zéocine intégré dans son ADN génomique qu'au départ. Il est par conséquent possible qu'il en soit de même pour le gène codant pour Poldip2. Néanmoins dans cette optique d'optimisation du protocole de purification, nous avons pu mettre au point 2 méthodes pour concentrer la protéine : une méthode de concentration sur colonne DEAE en utilisant un petit volume de résine (1 ml) et une méthode de concentration par évaporation du tampon à l'aide d'un rota vapeur.

A.II.3. Protocole de purification optimisé : précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie échangeuse d'anion

Afin de déterminer la concentration optimale de sulfate d'ammonium de précipitation de Poldip2, 20, 30, 40 et 60 % de sulfate d'ammonium ont été ajoutés à 50 ml de surnageant de culture. Les culots obtenus ont été dialysés pour éliminer l'excès de sulfate d'ammonium puis analysés par Western Blot pour vérifier la présence de Poldip2. Le Western Blot (Annexe 1) montre que la protéine Poldip2 précipite dès addition de 20 % de sulfate d'ammonium. La quantité de Poldip2 présente dans le culot augmente à 30 % et reste stable au-delà de cette concentration.

Après centrifugation du milieu de culture, un litre de surnageant est concentré en ajoutant du sulfate d'ammonium à une concentration finale de 30 %. Par la suite, le surnageant est centrifugé à $10\,000 \times g$ pendant 20 min. Le culot obtenu contenant les protéines est repris dans 20 ml de Tampon contenant 25 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA, pH 7,4 supplémenté de 1 mM de PMSF puis dialysé contre ce même tampon. Après centrifugation pendant 2 min à $14\,000 \times g$ pour éliminer les agrégats de protéines, l'échantillon est chargé à un débit de 1 ml/min sur colonne de DEAE préalablement équilibrée avec le même tampon qui a servi à reprendre le culot de protéines. La protéine d'intérêt est éluée en une seule étape à 700 mM de NaCl. Le profil d'éluion obtenu montre un pic fin qui atteint 700 mAu (Figure III- 21). Ce pic est environ 4 fois supérieur à celui obtenu par chromatographie d'affinité au Nickel.

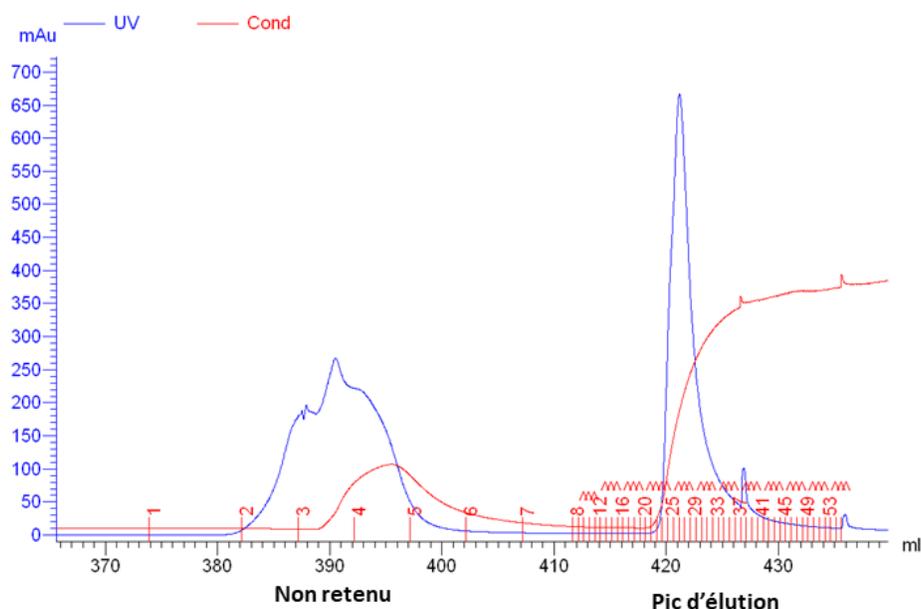


Figure III- 21 : Profil d'éluion de la chromatographie d'affinité sur résine de DEAE.
L'éluion est faite à 700 mM de NaCl. En bleu : courbe d'absorbance en UV (mAu) en fonction du volume d'éluion. En rouge : courbe de conductimétrie ($mS\ cm^{-1}$) en fonction du volume d'éluion.

L'analyse des fractions purifiées par SDS-PAGE et Western Blot (Figure III- 22) montre, comme attendu, que Poldip2 précipite à 30 % en sulfate d'ammonium. Néanmoins elle ne précipite pas totalement. Une partie reste dans le surnageant. Par la suite, l'échantillon est centrifugé avant d'être chargé sur la colonne. Cette centrifugation constitue une étape importante du protocole puisqu'elle permet d'éliminer certaines protéines contaminantes et conserve Poldip2 dans le surnageant. Enfin, suite au passage sur la colonne DEAE très peu de Poldip2 est perdu dans le non-retenu. La majorité est éluée à 700 mM de NaCl. Ce protocole nous a donc permis de purifier la protéine recombinante Poldip2 avec un rendement de 4 mg/L ; soit 4 fois plus que le protocole décrit dans le protocole précédent. Les deux formes de Poldip2 (de taille respectivement supérieur à 37 et 25 kDa) précédemment purifiées sont présentes dans cet échantillon.

Cependant on ne retrouve pas la bande à 75 kDa. C'est une protéine de taille inférieure à 50 kDa qui est co-purifiée à l'aide de ce protocole.

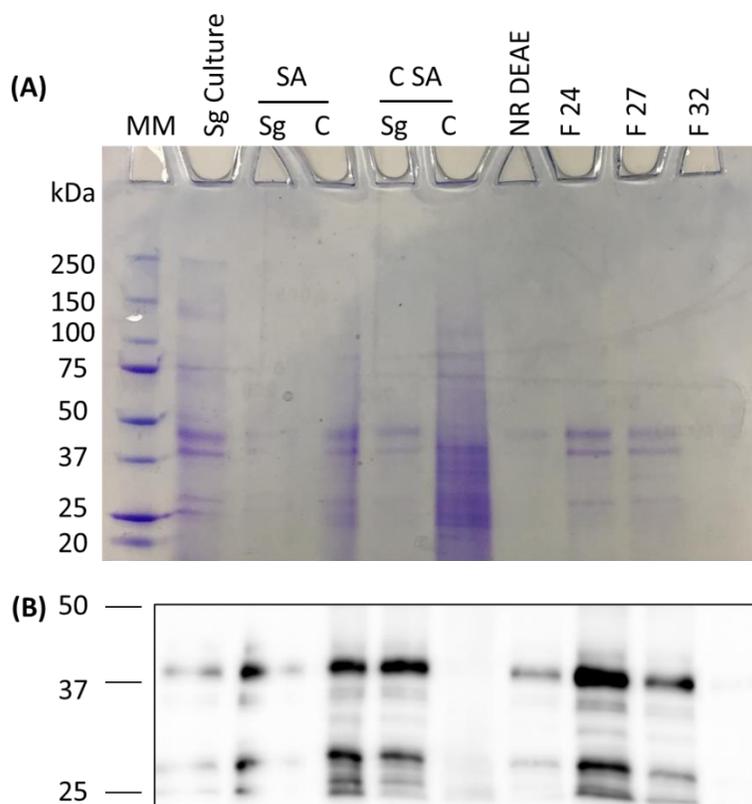


Figure III- 22 : Identification de Poldip2 recombinant à chaque étape de la purification.

(A) SDS-PAGE. (B) Western Blot marqué par un anticorps dirigé contre Poldip2 (Abcam). Sg culture : surnageant de culture après élimination du culot de levure. Sg SA : surnageant obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium ; C SA : culot obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium ; Sg C SA : surnageant obtenu suite à une centrifugation à 14 000 xg pendant 2 min du C SA ; C C SA : culot obtenu suite à une centrifugation à 14 000 xg pendant 2 min du C SA ; NR DEAE : Non retenu de la colonne de DEAE ; F 24-32 : fractions éluées. 900 µl et 450 µl d'échantillon (Sg culture et Sg SA) sont concentrés au TCA puis déposés respectivement sur gel SDS-PAGE et Western Blot. 20 µl et 10 µl d'échantillon C SA, Sg C SA, C C SA, NR DEAE, F24, F27, F32 sont déposés respectivement sur le gel SDS-PAGE et Western Blot.

A.II.4. Comparaison du Poldip2 recombinant et Poldip2 endogène

Dans le but d'approfondir la caractérisation de la protéine recombinante Poldip2, nous avons cherché des cellules ou modèles cellulaires de mammifères pouvant permettre de comparer la protéine recombinante à la protéine endogène. Nous avons pour cela analysé des lysats cellulaires de différentes cellules ou lignées cellulaires (monocytes, Cos NOX, HEK 293) disponibles au laboratoire par Western Blot, et comparé leurs profils de migration avec Poldip2 recombinant. Sur le Western Blot réalisé sur ces

échantillons (Figure III- 23), les profils de migration des Poldip2 endogènes sont cohérents avec leurs masses théoriques (36 kDa) estimées par le logiciel ProtParam (masse estimée lorsque la séquence d’adressage à mitochondrie est clivée). En revanche on observe que la forme de plus haut poids moléculaire de Poldip2 recombinant migre plus haut que les protéines endogènes exprimées en cellules de mammifères. Cela est attribué à la présence de l’étiquette de six histidines et du tag c-myc qui rajoutent à la protéine produite une masse d’environ 2700 daltons. Des résultats similaires avaient également été observés par Cheng *et al.* en (2005) où la protéine recombinante possédant une étiquette hémagglutinine HA migre plus haut que Poldip2 endogène (5).

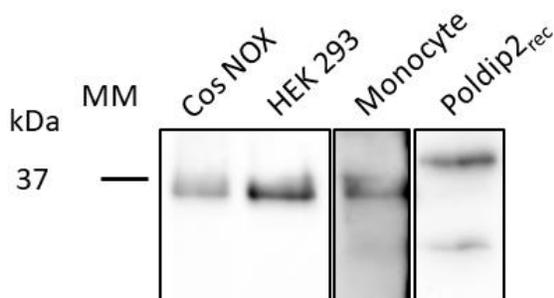


Figure III- 23 : Profils de migration de Poldip2 recombinant versus Poldip2 endogène. Western Blots marqués par un anticorps dirigé contre Poldip2 (Abcam). 20 µg de fractions membranaires de Cos NOX, de fractions mitochondriales de HEK 293, de lysat total de monocytes et 3 µg de Poldip2 recombinant sont déposés sur gel.

A.III. Caractérisation structurale de Poldip2 recombinant de rat

A.III.1. Caractérisation de la structure primaire

Des analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées en collaboration avec la plateforme SICaPS (Coll. D. Cornu et L. Sago ; Gif/Yvette) pour vérifier l’identité et l’intégrité des différentes formes de Poldip2 purifiées. Ces analyses révèlent que la protéine à 75 kDa n’est pas une forme dimère de Poldip2 (Figure III- 24). Ce résultat est cohérent avec l’analyse en Western Blot (Figure III- 19) où cette bande n’est pas visible lorsque la membrane est marquée par un anticorps anti-histidine ou anti-Poldip2.

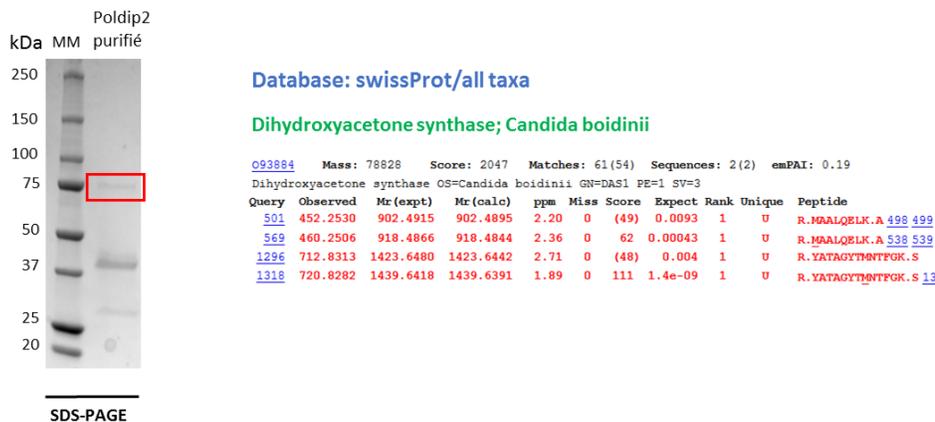


Figure III- 24 : Analyse de la bande 75 kDa par Nano-LC-MS/MS avec une détection triple TOF après digestion à la trypsine.

La protéine d'environ 46 kDa correspond bien à Poldip2 mais est tronquée en N-terminal. Une première analyse a été faite par LC-MS/MS après digestion par la trypsine. Un recouvrement de 61 % avec la séquence théorique (résultat non montré) est obtenu. La trypsine coupe la liaison peptidique après les acides aminés lysine ou arginine. Ce type de digestion peut générer des peptides trop petits pour être détectés en spectrométrie de masse ce qui implique un mauvais recouvrement sur la partie N-ter de la séquence. Par la suite, une analyse par MALDI Tof après digestion à la chymotrypsine a été réalisée pour essayer d'améliorer le recouvrement sur la partie N-terminale. Cette analyse (Figure III- 25), présente un recouvrement de séquence de 80 % par rapport à la séquence attendue de Poldip2. Elle est tronquée en N-terminal en position 54. Le produit obtenu a une taille de 39 kDa.

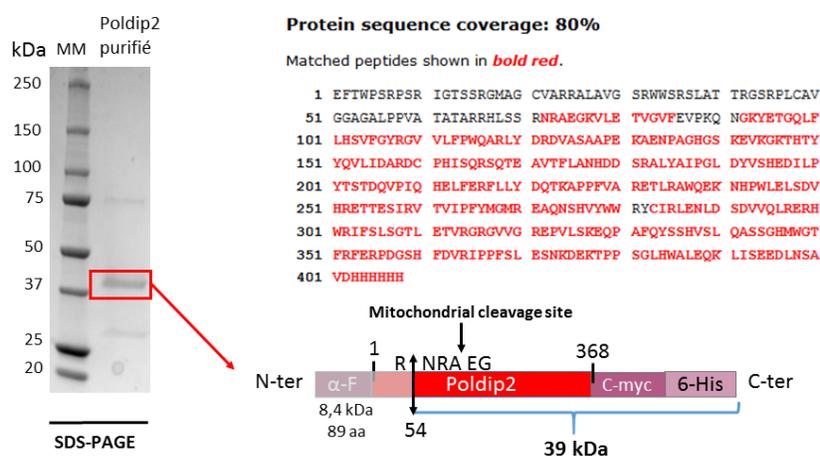


Figure III- 25 : Analyse de la séquence de Poldip2 bande à 39 kDa par Nano-LC-MS/MS avec une détection triple TOF après digestion à la chymotrypsine.

Pour confirmer l'extrémité N-terminale, des analyses plus fines de spectrométrie de masse ont été faites. Pour cela, la protéine a été marquée par un groupement chimique spécifique du N-terminal, le TMPP (N-Succinimidylloxycarbonylmethyl) tris (2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium bromide (TMPP-Ac-Osu), avant d'être digérée par l'endopeptidase Lys-N et analysée par spectrométrie de masse (Figure III- 26). Ce groupement modifie sélectivement le peptide N-terminal des protéines de manière à améliorer sa détection lors d'analyse LC-MS/MS. Cette méthode a l'avantage d'améliorer, d'une part, l'efficacité d'ionisation des peptides N-terminaux en mode electrospray grâce à la charge permanente apportée par la phosphine et de modifier, d'autre part, leur temps de rétention en chromatographie liquide pour qu'ils soient séparés de la plupart des peptides internes. Ce groupement augmente donc le signal généré par le peptide N-terminal ce qui implique une incrémentation de sa masse. Il devient donc possible de détecter le peptide N-terminal de la protéine dans le cas où il a une taille trop faible. Cette analyse révèle que le N-terminale de cette forme de Poldip2 commence bien à l'acide aminé en position 57 de la séquence

théorique de Poldip2. Cette deuxième analyse donne le même résultat que la première ce qui permet de confirmer les premières conclusions de cette expérience.

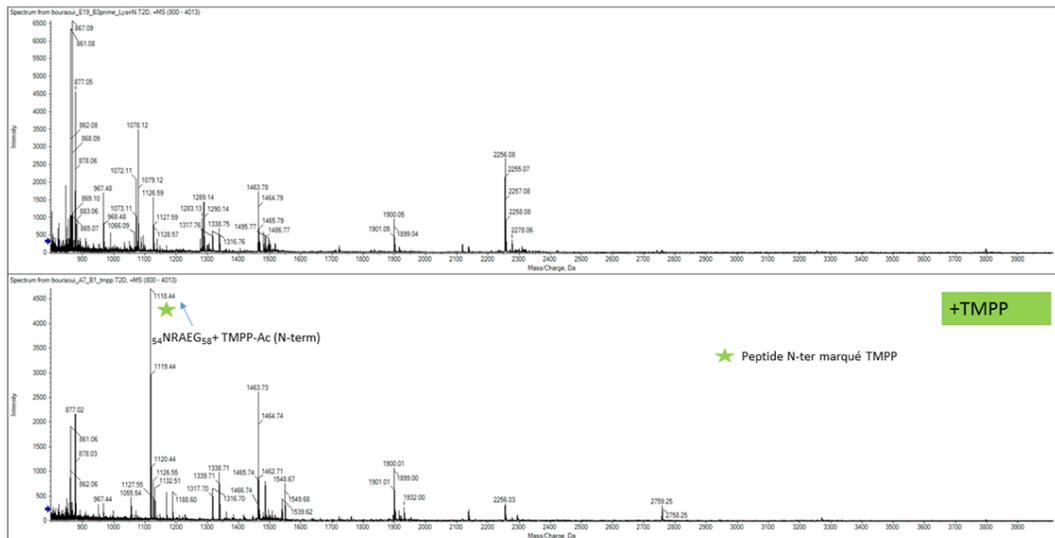


Figure III- 26 : Analyse de la séquence de Poldip2 bande à 39 kDa par Nano-LC-MS/MS avec une détection par MALDI-TOF après marquage au TMPP et digestion à la Lys-N.

Les analyses en spectrométrie de masse révèlent que la bande plus basse au niveau du gel SDS-PAGE correspond également à une forme tronquée de Poldip2 en N-terminal en position 129 et a une taille de 29 kDa (Figure III- 27). Pour cette bande la position du N-terminal a également été confirmée par MALDI TOF après marquage au TMPP et digestion par la trypsine.

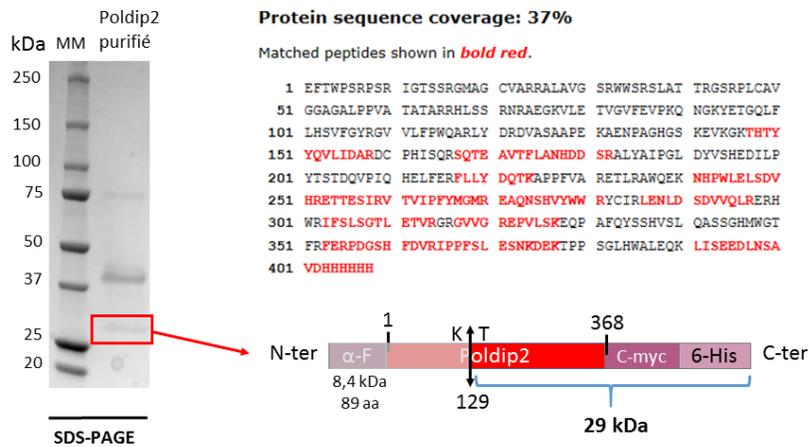


Figure III- 27 : Analyse de la bande 29 kDa avec détection MALDI TOF après digestion par la trypsine.

L'analyse par spectrométrie de masse du produit de purification révèle que seules 2 des 3 bandes co-purifiées sont la protéine Poldip2. Ces deux formes ont des tailles de 39 et 29 kDa. Elles sont tronquées en N-terminale respectivement sur les résidus 54 et 129. La forme à 39 kDa est tronquée à 3 acides aminés

en amont du site de clivage de la séquence d'adressage à la mitochondrie qui se trouve sur le résidu 57. Ce clivage n'est donc pas dû à une enzyme mitochondriale d'autant plus que, si cela avait été le cas, la protéine serait piégée à l'intérieur de la matrice mitochondriale et ne pourrait plus être adressée au milieu extracellulaire. Il semble donc que les deux formes produites soient coupées par d'autres types d'enzymes plus probablement des enzymes de la membrane plasmique de la levure (voir *supra*, A.I.5.b Vérification de l'expression de Poldip2 dans les compartiments subcellulaires de la levure). L'analyse de la séquence par le logiciel Peptide cutter (https://web.expasy.org/peptide_cutter/peptidecutter_enzymes.html#Clost) n'a pas permis de mettre en évidence une enzyme qui coupe à ces positions uniquement, mais propose les enzymes suivantes qui coupent en position 54 : la trypsine (avec 43 autres sites de coupure possibles), la Clostripaine (avec 33 autres sites de coupure possibles), l'Arg-C-protéinase (avec 33 autres sites de coupure possibles). Le logiciel propose également des enzymes qui coupent en position 129 : la protéase lys C (avec 13 autres sites de coupure possibles) et la trypsine.

L'analyse de la séquence de Poldip2 de rat recombinant par le logiciel NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/>) révèle plusieurs sites de phosphorylations possibles (14 serines, 8 thréonines et 3 tyrosines) avec un score supérieur à 0,95. L'analyse faite par spectrométrie de masse n'a pas permis de mettre en évidence le ou les sites phosphorylés. La protéine recombinante produite dans *P. pastoris* n'est donc pas phosphorylée. Par ailleurs, il est important de noter que dans la littérature aucune phosphorylation de cette protéine n'a été décrite. Néanmoins, cela n'exclut pas qu'elle le soit *in vivo* ou que des phosphorylations soient induites par certains événements impliqués dans les voies de signalisation cellulaire. En effet dans une étude faite par Huff *et al.* 2019, les auteurs montrent sur le western blot réalisé sur des extraits de cellules de muscle lisse aortique de rats deux formes endogènes de Poldip2 (environ 37 kDa) produites dans ces cellules et qui se superposent. Même si les auteurs ne commentent pas cette différence de taille ce résultat nous mène à penser à une éventuelle phosphorylation de la protéine Poldip2 chez le rat (31).

A.III.2. Caractérisation de la structure secondaire de Poldip2

Afin d'avancer vers une meilleure connaissance de la structure de Poldip2, nous avons comparé deux méthodes d'analyse des structures secondaires :

- Le dichroïsme circulaire dans les UV lointains SRCD sur la ligne de DISCO au Synchrotron de SOLEIL (Coll. Frank Wien, Gif/Yvette) ;
- L'infrarouge en film séché par ATR FTIR (*Attenuated Total Reflection ; Fourier Transform InfraRed*) (Coll. Jehan Waeytens, ULB, Bruxelles)

Dans le cas du SRCD, l'échantillon liquide est déposé dans une cuve soumis à des rayonnements UV et le spectre est enregistré entre 190 nm et 250 nm. La composition en structures secondaires est obtenue

suite à une analyse par le logiciel *BestSel* (277) des spectres enregistrés (Figure III- 28 B) qui détermine le pourcentage de structures secondaires en comparant le spectre SRCD obtenu aux spectres des protéines dont les structures 3D ont été résolues et sont présentes dans la banque de données. Dans le cas de l'analyse par infrarouge, l'échantillon est déposé sur un cristal de diamant de l'ATR FTIR puis séché par un flux d'azote. L'analyse permet d'enregistrer le spectre (Figure III- 28 E). Le même procédé a été appliqué pour 50 protéines de structure connue et à partir de ces spectres un modèle de calcul par combinaison linéaire d'absorbance à 3 nombres d'onde dans l'amide I (1700–1620 cm^{-1}) et l'amide II (1600–1510 cm^{-1}) a été construit et son exactitude vérifiée par cross-validation. Ce modèle a été utilisé pour déterminer respectivement les pourcentages en hélice α et en feuillet β de Poldip2 (Figure III- 28 D) en utilisant le logiciel *Kinetics* (250).

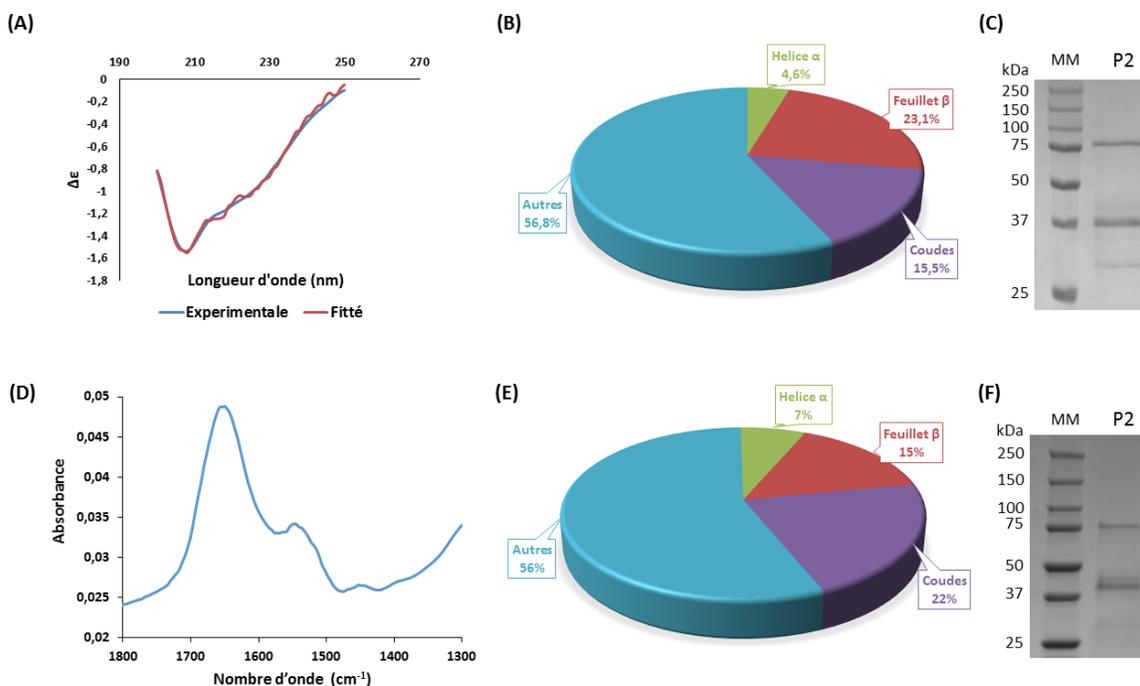


Figure III- 28 : Analyse de la structure secondaire de Poldip2.

(A) Spectre SRCD de la protéine Poldip2. (B) Composition en structure secondaire donnée par le logiciel *BestSel* à partir du spectre SRCD avec un scale factor de 1,5 et une largeur de spectre allant 200 à 250 nm. (D) Spectre infrarouge de la protéine Poldip2. (E) Composition en structure secondaire donnée par le logiciel *kinetics* à partir du spectre d'absorption en infrarouge obtenue par ATR FTIR. (C et F) SDS-PAGE de l'échantillon Poldip2 purifié et analysé.

L'analyse de la structure secondaire de Poldip2 par ces deux techniques conduit à des valeurs légèrement différentes mais cohérentes. Elle révèle que la structure secondaire de Poldip2 est partagée principalement entre une structure en feuillet β (15–23 %), des *turns* (15–22 %) et une structure majoritaire non identifiée ou désordonnée (\approx 56 %) (Figure III- 28 B et E). Par les deux approches, une très faible proportion s'organise en hélices α (4–7 %). Les différences observées, relativement faibles, entre les deux

techniques peuvent être attribuées à la différence de traitement de l'échantillon. Il semble que le séchage de l'échantillon fasse évoluer sa structure de feuillet β en hélice α . Cependant, l'analyse du spectre SRCD par *BestSel* (Figure III- 28 A) peut conduire selon les paramètres d'ajustement de départ à des proportions différentes en structure secondaire (Tableau III- 2, Annexe 2 A). En effet, en fonction de la largeur du spectre et du *scale-up* défini dans le logiciel, le pourcentage d'hélice α varie entre 3,4 % et 9,6 %. Quant au pourcentage de feuillet β , celui-ci varie entre 23,1 % et 36,9 %. De même, l'analyse ATR FTIR a une erreur sur la détermination des structures secondaires de l'ordre de 5 %, ce qui pourrait expliquer la différence entre les 2 échantillons. Compte tenu des différences observées pour un même spectre SRCD ainsi que l'erreur en FTIR, on peut considérer que les différences obtenues avec les deux techniques sont négligeables. Ainsi le SRCD et l'infrarouge donnent une estimation de la structure secondaire similaire. Ces techniques permettent donc de détecter des variations de structures d'une même protéine dans différentes conditions. En utilisant le même modèle on peut suivre l'évolution de structure d'une même protéine dans différents milieux ou conditions.

Tableau III- 2 : Variation de la structure secondaire en fonction des paramètres longueur d'onde et scale factor obtenu par le logiciel BestSel.

Largeur de spectre (nm)	Scale factor	Helice α (%)	Feuillet β (%)	Coudes (%)	Autres (%)
190–250	1	5,4	36,9	14,4	43,4
200–250	1	3,4	28,6	15,4	52,7
190–250	1,5	9,6	31,5	14,6	44,3
200–250	1,5	4,6	23,1	15,5	56,8

Justement, dans le but de vérifier si la précipitation au sulfate d'ammonium au cours de la purification de Poldip2 a un effet sur la structure de Poldip2, nous avons analysé trois préparations de Poldip2 par dichroïsme circulaire (Annexe 2). D'une manière générale, la répartition des structures secondaires est assez stable, seule le pourcentage d'hélices α varie plus significativement en fonction du traitement apporté à l'échantillon : dans le cas où l'échantillon est simplement purifié par chromatographie d'affinité (Annexe 2 B, Tableau III- 2), le pourcentage en hélice α est d'environ 9,6 %. Ce pourcentage diminue pour atteindre 0,4 % lorsque l'échantillon est concentré et chauffé à 65 °C (Annexe 2 E). Le traitement par la chaleur semble déstabiliser les hélices α et les fait évoluer vers une structure en feuillets β qui augmentent de 10 % par rapport aux autres échantillons. Par contre, la précipitation au sulfate d'ammonium ne semble pas modifier le pourcentage en hélices α (3,7 %) (Annexe 2 H).

La stabilité de Poldip2 recombinant a été analysée par SRCD en suivant la variation de $\Delta\epsilon$ en fonction de la température (5-90 °C). Cette analyse montre que Poldip2 est stable jusqu'à 65 °C, température

à laquelle une inflexion est observée (Figure III- 29). On peut donc envisager que l'expérience, dans laquelle la protéine a été concentrée par chauffage au speed vac à 65 °C, ait pu détériorer la protéine. L'agrégation de la protéine coïncide avec une structure qui évolue vers une structure en feuillets β (278).

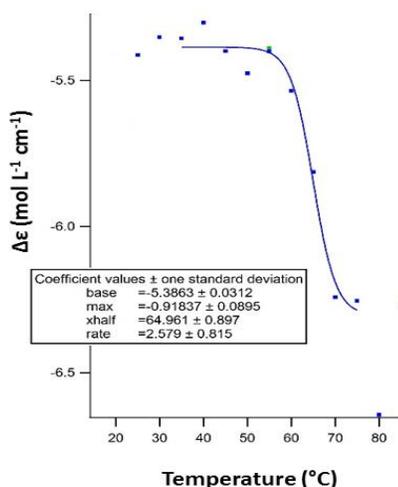


Figure III- 29 : Variation de $\Delta\epsilon$ en fonction de la température.

Scan en température des spectres SRCD de Poldip2 de 25 à 90 °C avec un pas de 5 °C.

A.III.3. Prédiction de la structure tertiaire par comparaison de séquences

La prédiction de structure secondaire de Poldip2 a été effectuée sur la base de la comparaison de séquences avec les structures disponibles dans la **ProteinDataBank** (PDB) en utilisant le logiciel SWISS-MODEL Homology Modeling. Cette analyse montre que la partie C-terminale de Poldip2 présente 30 % d'identité de séquence avec la protéine ApaG (Figure III- 30 A) (8) et conduit au modèle structural présenté dans la Figure III- 30 B (67 % de feuillets β) qui a aussi été publié dans (11). Cette région a été appelée domaine DUF525 (Figure III- 31) (11). La protéine ApaG est une petite protéine bactérienne (126 acides aminés) dont la fonction est encore inconnue et qui possède une structure en feuillets β (279–281). ApaG présente une grande similitude avec les protéines de la famille F-box (13). Il n'est donc pas surprenant de voir une homologie de séquences entre ces dernières et Poldip2. En effet, Poldip2 présente 32 % d'homologie de séquence avec les protéines F-box (8). Cette homologie se situe sur un des domaines de ces protéines (FBA) connu pour être impliqué dans les interactions protéine–protéine (12). Cela suggère que cette région de Poldip2 pourrait être également impliquée dans les interactions protéine–protéine. Une caractérisation plus poussée de ce domaine révèle la présence de deux triptophanes espacés de 22 acides aminés (Figure III- 30 B et D). Ces résidus caractérisent un domaine impliqué dans l'interaction protéine–protéine nommé « domaine WW » et donc la structure présente 3 brins β antiparallèles (Figure III- 30 C). Il a été reporté que ce domaine interagit avec les régions riches en proline présentes chez certaines protéines

(282, 283). Dans la séquence d'ApaG se trouve également une région conservée avec le motif GXGVVGXXPX(LI) et sur laquelle on retrouve une signature GXGXXG (8). Cette signature est retrouvée dans les protéines qui fixent le FAD et le NAD suggérant que Poldip2 pourrait aussi fixer des molécules de type pyrophosphate ou nucléotide phosphate (8, 279). Par ailleurs ApaG est homologue au transporteur CorD⁴⁰ responsable du transport de cations chez *Salmonella typhimurium* (13, 284). En 2016, Krzyziak *et al.* ont obtenu la structure cristallographique du domaine ApaG de la protéine humaine FBx3. Ce domaine présente 38 % d'identité de séquence avec la protéine ApaG d'*E. coli* et est impliqué dans la l'interaction et le dégradation de la protéine FBx12 lors d'une réponse inflammatoire induite par le système immunitaire. Dans cette étude, les auteurs ont vérifié si ce domaine était capable de fixer des nucléotides et les cations divalent Co²⁺ et Mg²⁺. Leurs résultats étaient négatifs pour les deux fonctions (281). Il est donc peu probable que Poldip2 puisse jouer un rôle similaire.

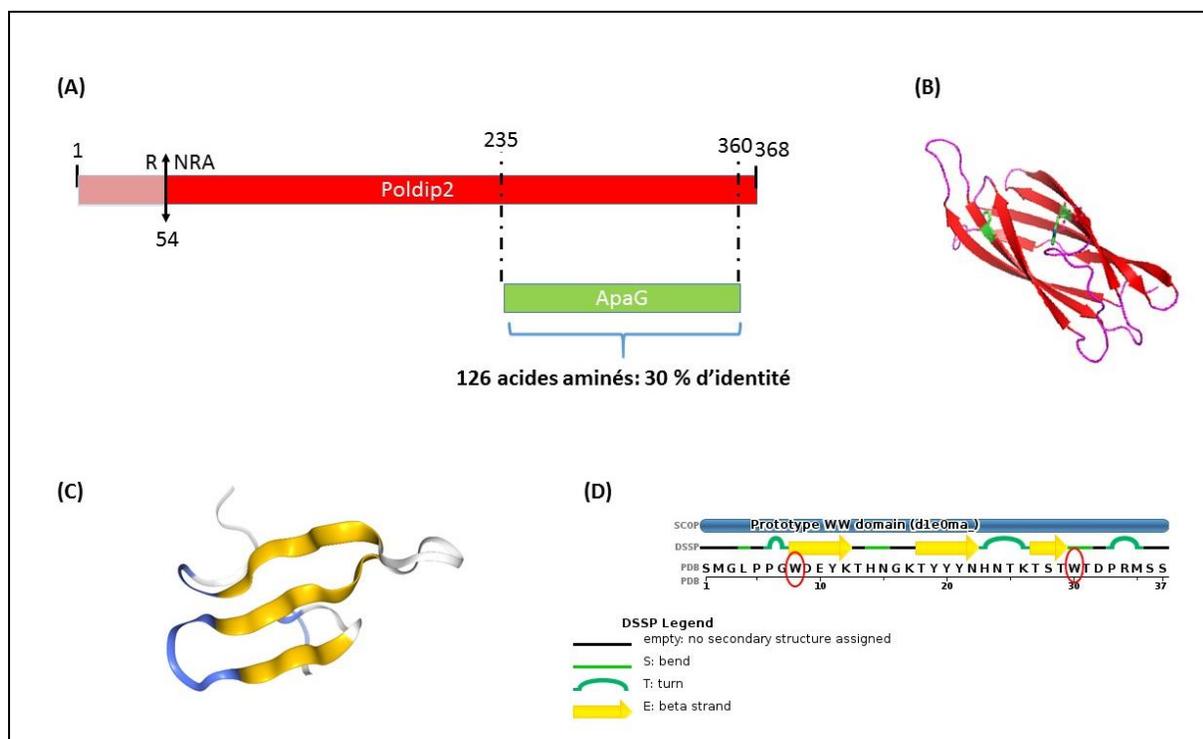


Figure III- 30 : Prédiction de structure tridimensionnelle de Poldip2 par comparaison de séquences.
 (A) : Analogie de séquence entre ApaG et Poldip2 faite par BLAST. (B) : modèle structural 3D de Poldip2 obtenue par le logiciel Swiss model homology et basée sur la structure 3 D de la protéine ApaG d'*E. coli* (souche K12). PDB code : 1tza.1.A. Figure obtenue avec PyMol. (C) : Structure modèle du domaine WW. PDB code : 1E0M. (D) Positionnement des deux résidus tryptophanes sur la structure du domaine WW.

⁴⁰ CorD : est un transporteur qui confère une résistance à des concentrations faibles de cobalt et diminue le transport de magnésium (284)

En plus du domaine DUF525, il a été identifié que Poldip2 possède sur sa partie N-terminale un autre domaine nommé YccV-like (11, 29) dont le modèle structural, que nous avons construit, est représenté dans la Figure III- 31 (soit 30 % de feuillets β et 12 % d'hélices α). Ce domaine est connu pour fixer l'ADN hémiméthylé (14). La présence de ce domaine sur la séquence de Poldip2 est donc cohérente avec sa localisation dans le noyau et la mitochondrie où elle joue un rôle dans la réplication et la réparation de l'ADN (5, 6, 16). Une protéine, produit du gène *Yccv*, nommée HspQ a été isolée chez la bactérie *E. coli* par Shimuta *et al.* (2004) (15). Cette protéine est une « *Heat Shock Protein* » dont le comportement a été associé à celui d'une protéine chaperonne. Chez *E. coli*, elle serait impliquée dans la dégradation de certaines protéines dénaturées lorsque la bactérie est soumise à des températures élevées de l'ordre de 40 °C. En solution cette protéine forme un homo-dimère, peut-être même un tétramère, stabilisé par un cofacteur. La résolution structurale de cette protéine par cristallographie aux rayons X (code PDB : 5ycq.1) a révélé que cette protéine forme un homo-trimère stable. Chaque monomère forme une protéine globulaire contenant 5 brins β (antiparallèles) de type SH3 et une hélice α en C-terminale. Les brins β de 1 à 4 sont connectés par 3 boucles. Les trois monomères sont associés grâce à des interactions hydrophobiques au niveau des feuillets β (285). Une analyse plus poussée du modèle structurale de YccV-like de Poldip2 n'a pas permis de mettre en évidence la présence de motifs consensus qui caractérisent les domaines SH3. Néanmoins au vu de sa structure très ressemblante, le domaine YccV-like de Poldip2 pourrait avoir une structure de type SH3-like. Les prédictions de structure (Figure III- 31) des deux domaines, DUF525 et YccV-like, présents sur la séquence de Poldip2, conduisent à une répartition des structures secondaires pour l'ensemble de la protéine d'environ 31 % de feuillets β et 3,5 % d'hélices α . Ces résultats sont cohérents avec l'analyse de structure secondaire faite par infrarouge et SRCD. Ces résultats nous mènent à la conclusion que Poldip2 serait une protéine globulaire avec une structure en partant du N-ter à C-ter : contenant une structure en feuillets β type SH3-like et une petite hélice α (domaine YccV-like) suivi d'une autre structure en feuillet β (domaine DUF525).

En plus de partager un domaine de type YccV-like, les deux protéines HspQ et Poldip2 sont toutes deux stables jusqu'à une température de 65 °C, fait caractéristique des protéines Hsp (285). Ceci suggère que, tout comme la protéine HspQ, Poldip2 pourrait se comporter comme une protéine chaperonne (15).

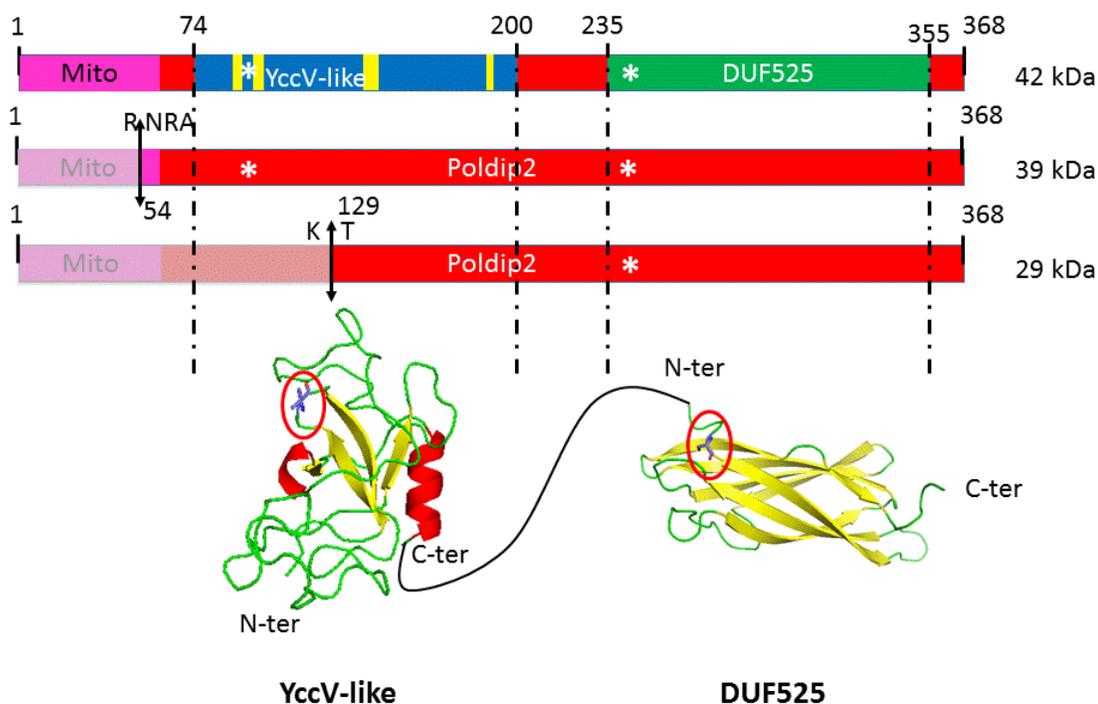


Figure III- 31 : Analyse de la structure tertiaire des formes de Poldip2 produites par la levure *P. pastoris*. Structures 3D des domaines YccV-like et DUF525 de Poldip2 obtenus par le logiciel « SWISS MODEL homology modeling » basées sur la structure 3 D de de la Protéine HspQ et la protéine ApaG d'*E. coli* (souche K12) respectivement. Les barres jaunes sur la séquence de Poldip2 correspondent aux feuillettes β du domaine YccV-like. Code PDB HspQ : 5ycq.1.A ; code PDB ApaG : 1tza.1.A. Figures obtenues avec PyMol.les étoiles blanches reperesent les rédidus différents entre la protéine humaine et la protéine de rat. Ces résidus sont entourés en rouge sur les modèlex structuraux.

Au vu de cette analyse structurale, les mutations précédemment discutées dans le paragraphe « Comparaison de la séquence de Poldip2 dans différentes espèces », représentées par une étoile blanche sur la séquence et entourées en rouge sur les deux modèles structuraux, sont positionnées sur l'extrémité de chaque domaine. Au vu de ces localisations, ces résidues ne devraient pas influencer la fonctionnalité de la protéine. Néanmoins, les formes tronquées de Poldip2 produites par la levure *P. pastoris* n'ont pas conservées tous les domaines fonctionnels de la protéine intacte. La forme à 39 kDa tronquée en position 54 a perdu la séquence d'adressage à la mitochondrie mais conserve sur sa séquence les deux domaines DUF525 et YccV-like. Par contre la forme à 29 kDa tronqué en position 129 possède le domaine DUF525 et seulement une partie du domaine YccV-like correspondante à l'hélice α et seulement 2 feuillettes β . La question de la fonctionnalité de protéine produite se pose donc ici. Les études qui associent Poldip2 et NOX4 décrivent souvent une protéine de 38 kDa (19) qui correspond à la protéine ayant perdu sa séquence d'adressage à la mitochondrie. Cette forme est équivalente à la forme 39 kDa que nous obtenons ici de manière hétérologue suggérant que cette forme est fort probablement fonctionnelle. Par ailleurs Kim *et al.* (2015) (40), dans leur étude de l'implication de Poldip2 dans l'autophagie, montrent que

l'augmentation de l'agrégation des protéines Tau dépend seulement de la partie C-terminale de la protéine qui contient le domaine DUF525. Ceci suggère que la forme à 29 kDa de Poldip2 produite par la levure pourrait également être fonctionnelle. Néanmoins, le domaine YccV-like pourrait jouer un rôle important dans la fonction de Poldip2. En effet la protéine HspQ, qui comme Poldip2 contient le domaine Yccv-like, présente dans sa structure un domaine SH3-like impliqué dans l'interaction protéine-protéine (285). La perte d'une partie du domaine YccV-like au niveau de Poldip2 pourrait donc aboutir à une perte de ce domaine SH3-like et déstabiliser les interactions possibles si ce domaine s'avère être impliqué dans ces interactions.

A.III.4. Caractérisation de l'état oligomérique de Poldip2

Le domaine YccV-like semble être impliqué dans l'oligomérisation de la protéine HspQ dont la structure forme un homo-trimère [code PDB : 5YCQ (285)]. De même le domaine DUF525 présent chez la protéine ApaG forme des monomères [code PDB : 2F1E (280) ; code PDB : 5HDW (281)], des homo-dimères [code PDB : 1XVS ; code PDB : 1TZA] ou des homo-tétramères [code PDB : 3NRF ; code PDB : 3SB3 ; code PDB : 1XQ4]. Au vu du caractère oligomérique de ces domaines, il était intéressant de vérifier l'oligomérisation de la protéine Poldip2. L'analyse par Western Blot (Figure III- 32 A) du Poldip2 recombinant en condition native révèle en plus des formes monomériques (flèche bleu), plusieurs bandes de tailles plus élevées (flèches rouges). Ces bandes peuvent correspondre à des homo-oligomères d'une des deux formes (39 kDa ou 29 kDa) ou à des hétéro-oligomères, c'est-à-dire des oligomères, qui contiennent les deux formes. L'analyse par Western Blot en condition native (Figure III- 32 B) du Poldip2 endogène révèle, en plus de la bande correspondante à la forme monomérique (flèche bleu), d'autres bandes de tailles plus élevées qui se retrouvent dans les gels en condition dénaturante (Figure III- 32 C). La seule différence est que les bandes migrent plus haut dans le gel natif que dans le gel dénaturant dû à un artefact de migration. Il semble donc que Poldip2 endogène ne tend pas naturellement à former des oligomères contrairement au Poldip2 recombinant. Ce dernier, étant pour certaines formes (dont 29 kDa) tronquée en N-terminal, pourrait former plus facilement des oligomères dû à une exposition des acides aminés à la surface de la protéine de telle sorte à favoriser des interactions intermoléculaires.

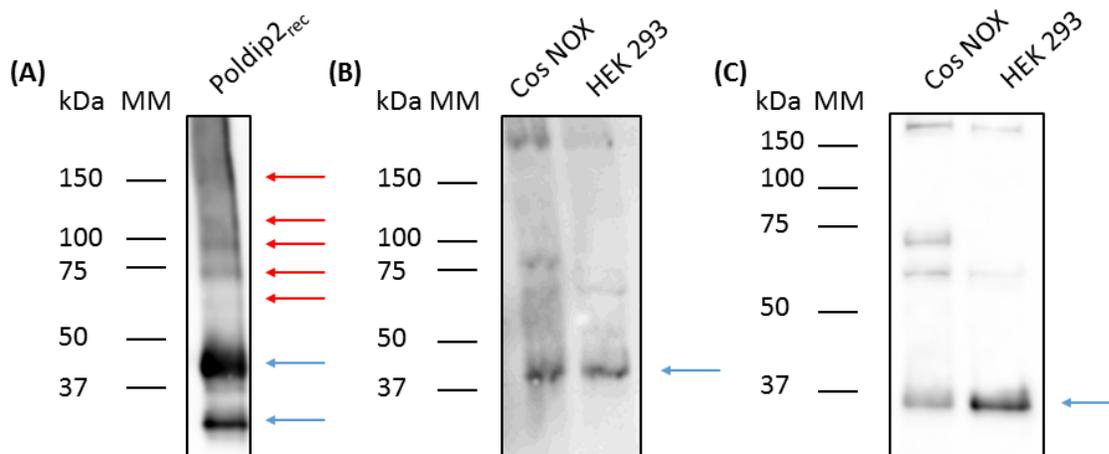


Figure III- 32 : Caractérisation de l'état oligomérique de Poldip2.

(A) Western Blot en condition native de Poldip2 recombinant. (B) Western Blot en condition native de Poldip2 endogène. (C) Western Blot en condition dénaturante de Poldip2 recombinant. Flèches bleu protéines monomériques flèches rouge protéines oligomériques. Les Western Blots sont marqués par un anticorps anti-Poldip2 (Abcam).

A.IV. Études fonctionnelle de Poldip2 recombinant de rat

Pour vérifier si Poldip2 recombinant est fonctionnel, nous avons étudié si la protéine recombinante peut augmenter l'activité de Nox4 comme cela a été suggéré dans la littérature (19). Pour cela, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Corinne Dupuy à l'Institut Gustave Roussy, nous avons pu analyser l'effet de Poldip2 sur l'activité de NOX4 dans des cellules d'une lignée cellulaire embryonnaire de rein humain, HEK293.

A.IV.1. Mesure de l'activité de NOX4 dans les cellules HEK 293/NOX4

Les cellules HEK 293, qui expriment de manière endogène NOX4, p22^{phox} et Poldip2, ont été transfectées de manière stable avec la séquence codante gène de NOX4 sous le contrôle d'un promoteur inducible à la doxycycline. Les cellules HEK293/NOX4 sont traitées avec différentes concentrations de doxycycline. L'expression des protéines NOX4, p22^{phox} et Poldip2 est observée par Western Blot. La cinétique de production de peroxyde d'hydrogène par l'enzyme NOX4 dans les cellules HEK293 ainsi que dans les différents compartiments cellulaires de ces cellules est mesurée indirectement en observant l'augmentation de la fluorescence de la resofurine, produit d'oxydation de l'Amplex red. L'effet de Poldip2 recombinant de rat sur NOX4 est également mesuré de la même manière.

La mesure de l'activité de NOX4 a d'abord été réalisée *in cellulo* (Figure III- 33 A). 10 000 cellules induites par des concentrations croissantes de doxycycline sont déposées dans les puits de la plaque. Le

mélange contenant l'Amplex red est ajouté dans chaque puits de la plaque, maintenue à froid sur la glace. La production de peroxyde d'hydrogène est détectée à 30 °C, température à laquelle le métabolisme des cellules est de nouveau actif (Figure III- 33 A et B).

Les Figure III- 33 montre l'effet dose-réponse dépendant de la doxycycline. Les maxima d'activité et d'expression de NOX4 dans les cellules sont obtenus pour une concentration de doxycycline de 10^{-1} µg/ml après un traitement de 24 h. À une concentration de 1 µg/ml de doxycycline, l'expression de NOX4 diminue ce qui coïncide avec une chute du niveau de l'activité. Ceci est dû au fait qu'à partir d'une certaine dose, la doxycycline devient toxique pour les cellules. En effet, à cette concentration, beaucoup plus de cellules mortes sont observées au microscope. La surproduction d'une protéine impacte sur le métabolisme cellulaire car en détournant la machinerie de synthèse à son profit, elle met en péril les fonctions essentielles à la survie cellulaire.

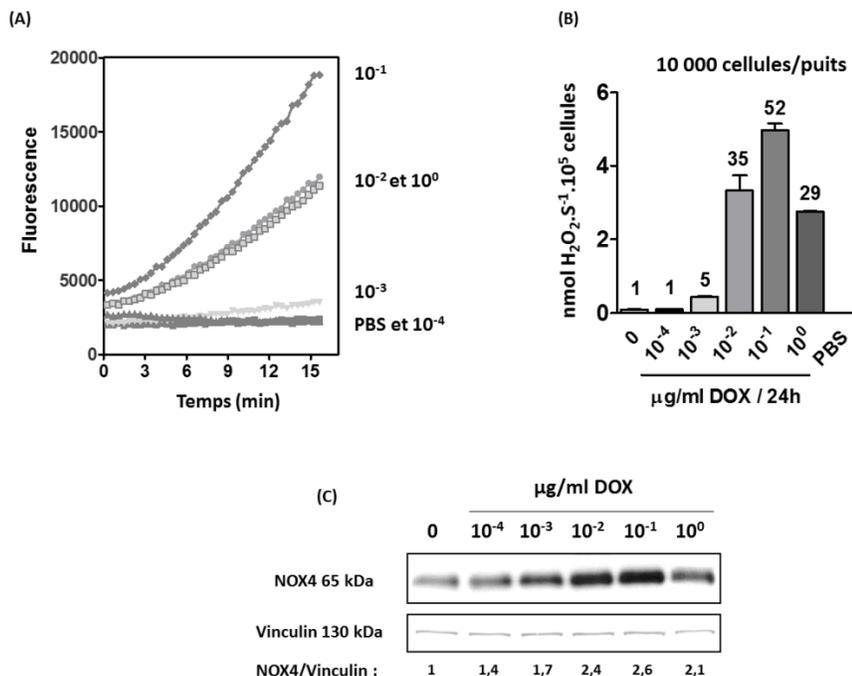


Figure III- 33 : Effet du traitement de l'induction à la doxycycline sur l'expression et l'activité de NOX4. (A) Cinétique de production du H_2O_2 en fonction du temps. (B) Mesure de l'activité NOX4 en cellules HEK293. (C) Visualisation par Western Blot de l'expression de NOX4 dans les extraits cellulaires de HEK293. 20 µg de protéines totales sont déposés sur gel.

A.IV.2. Répartition subcellulaire de NOX4, p22^{phox} et Poldip2 dans les cellules HEK 293

Les cellules HEK 293/NOX4 sont induites à 10^{-2} µg/ml de doxycycline pendant 12 h. Puis, les différents compartiments subcellulaires (mitochondrie, membrane plasmique, noyau) sont enrichis par

fractionnement cellulaire et l'effet du traitement à la doxycycline sur l'expression des protéines NOX4, p22^{phox} et Poldip2 dans ces compartiments est analysé par Western Blot.

Nous avons comparé ici deux méthodes de fractionnement cellulaire (centrifugation différentielle *versus* kit) afin de mettre en évidence avec plus de précision la localisation subcellulaire de chaque protéine. L'enrichissement de chaque fraction subcellulaire a été vérifiée avec les marqueurs suivant : la lamine A et C pour le noyau, la protéine VDAC pour la mitochondrie, GOLPH4 pour l'appareil de Golgi et enfin la calréticuline pour le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie. La (Figure III- 34) montre les résultats obtenus par ces deux méthodes. Elle révèle que, quelle que soit la méthode, les compartiments isolés dans chaque fraction (Noyau, Mitochondrie, Fraction membranaire) ne sont pas bien enrichis.

Pour la méthode de centrifugation différentielle (Figure III- 34 droite), on retrouve dans la fraction nucléaire les marqueurs du noyau (Lamine), en plus des marqueurs de mitochondries (VDAC et calréticuline) de RE (calréticuline) et de golgi (GOLPH4). Ce dernier étant très fortement exprimé. Les fractions mitochondriales semblent être bien enrichies au vu de l'absence des marqueurs de noyau et de Golgi. Néanmoins, on n'exclue pas la présence de RE puisque la calréticuline (marqueur de RE et mitochondrie) y est très fortement exprimée. Enfin la fraction membranaire est associée au RE et d'une très faible quantité de golgi. Etant donnée de que la fraction membranaire a été isolée à 100 000 x g sans étape intermédiaire celle-ci contient donc une mélange de membrane plasmique et de fraction microsomale.

Pour la méthode de fractionnement par kit (Figure III- 34 gauche), les fractions isolées ont des compositions légèrement différentes. La fraction nucléaire est très fortement contaminée par du golgi puisque le signal de GOLPH4 est très intense. La fraction mitochondriale contient du golgi et potentiellement du RE. Pour la fraction membranaire il est plus difficile de conclure. Sans traitement à la doxycycline, cette fraction contient du RE mais cela ne semble pas être le cas pour la fraction traitée avec doxycycline.

D'une manière générale les compartiments isolés ne sont pas très bien enrichis. Cependant la méthode d'isolement par kits permet d'obtenir des fractions mieux enrichies que la méthode de centrifugation différentielle. En tenant compte de ces informations, il faudra donc être prudent quant à l'interprétation sur la localisation de NOX4, p22^{phox} et Poldip2.

En ce qui concerne l'expression de NOX4 plusieurs formes sont reconnues par l'anticorps. On observe premièrement dans le noyau en plus de la forme à 35 kDa, une autre forme vers 70 kDa de même intensité. Ces dernières sont également présentes mais en moindre quantité dans les mitochondries isolées par kit. Cependant, leur niveau d'expression n'est pas influencé par la doxycycline, suggérant que ces bandes correspondent à des formes endogènes de NOX4 naturellement exprimées par les cellules HEK293

contrairement à la forme exogène à 60 kDa, retrouvée dans l'extrait total et dont l'induction est sous l'influence du promoteur à doxycycline. Même si les résultats de la Figure III- 34 droite suggèrent que la forme à 70 kDa provient essentiellement du golgi car elle co-localise toujours avec la protéine GOLPH4, il est important de noter qu'elle a déjà été observé dans la mitochondrie (108). Par ailleurs une forme vers 35 kDa a aussi été décrite dans le noyau (145). La bande à 60 kDa retrouvée dans l'extrait total est également présente en faible quantité dans le noyau isolé par centrifugation différentielle. Son expression augmente d'avantage dans la mitochondrie et encore plus dans la fraction membranaire. Ces observation suggèrent que cette forme serait plutôt localisée dans le réticulum endoplasmique, ce qui est cohérent avec la littérature (286, 287). Néanmoins, cette bande n'est plus détectée dans les fractions nucléaires, mitochondriales et membranaires lorsque celles-ci sont isolées par des kits. Dans ce cas, l'absence de détection peut être due à un manque d'enrichissement en NOX4 lorsque les compartiments subcellulaires sont isolés par des kits.

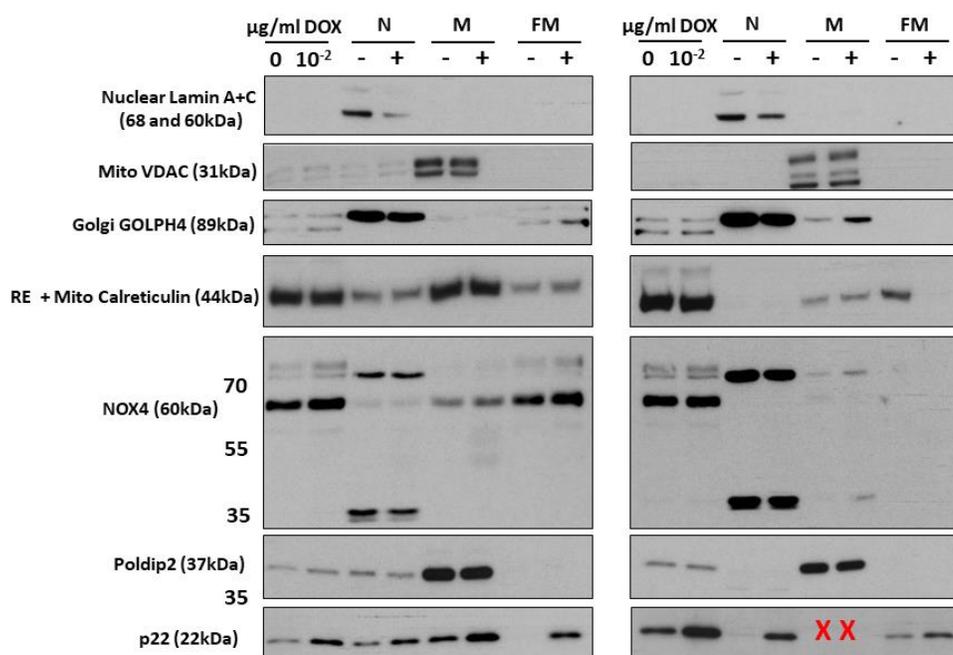


Figure III- 34 : Comparaison de la répartition subcellulaire de Poldip2 NOX4 et p22^{phox} en fonction de la méthode d'enrichissement (centrifugation à droite ou kit à gauche).

(-) Cellules non traitées à la doxycycline (+) cellules traitées avec une dose de 10⁻² µg/ml de doxycycline pendant 12 h. 20 µg de protéines totales sont déposés. N : noyaux, M : mitochondrie, FM : Fraction membranaire, C : cytoplasme. X échantillon non déposé. Les kit utilisés sont « Nuclei EZ Prep Nuclei Isolation Kit » de chez Sigma® (NUC-101), « Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells » de chez Thermo Scientific™ (89874), « Endoplasmic Reticulum Isolation Kit » de chez Sigma® (ER0100).

p22^{phox} est exprimé dans tous les compartiments subcellulaires. Son expression augmente lorsque les cellules sont traitées par la doxycycline. Ce résultat semble surprenant étant donné que p22^{phox} n'est pas

sous le contrôle du promoteur inductible à la doxycycline mais peut être expliquée par le fait que p22^{phox} est une protéine partenaire de NOX4 dont le rôle est de stabiliser cette dernière (144). Ce phénomène a déjà été observé dans les cellules PLB-985. Lorsque ces cellules sont différenciées en granulocytes, l'expression de la protéine gp91^{phox} augmente, accompagnée par une surexpression de la protéine p22^{phox} (288). Cela pourrait aussi être le cas pour NOX4, bien qu'étant faiblement détectée à la membrane. Par ailleurs dans les fractions subcellulaires isolées par kit, on observe un recrutement de p22^{phox} dans les fractions nucléaires et membranaire après traitement à la doxycycline, même en absence de détection de NOX4. Ce dernier résultat est en accord avec la présence possible de NOX4, non détecté, dans ces compartiments. L'absence de détection de cette protéine met en cause la sensibilité de l'anticorps utilisé.

Lorsque les fractions sont isolées via des kits, on remarque que Poldip2 est présent exclusivement au niveau de la mitochondrie et que sa localisation au niveau du noyau résulte d'une contamination de ce dernier par des mitochondries. Ce résultat est donc cohérent avec la littérature (5, 7, 9) d'autant plus qu'on s'attendrait à observer dans le noyau une bande à 42 kDa (taille de Poldip2 avec la séquence d'adressage à la mitochondrie) comme décrit par Moreno *et al.* (2013) dans les noyaux des cardiomyocytes (39). Or ce n'est pas le cas. Par ailleurs, Xie *et al.* (2005) montre que la localisation de Poldip2 au noyau serait la conséquence d'une rupture des membranes mitochondriales conduisant à la libération des protéines mitochondriales piégées dans la matrice (7). Cette double localisation à la fois nucléaire et mitochondriale n'est pas une particularité de Poldip2 puisque d'autres protéines telles que la hélicase MDDX28 et la topoisomerase III α ont été décrites à une localisation dans ces deux compartiments (289, 290).

La même expérience est représentée sur la Figure III- 35 avec une durée de traitement deux fois plus longue (24 h de traitement). En absence de doxycycline, la forme de NOX4 de 60 kDa attendue n'est pas détectée. En revanche, on observe une expression de plus petites tailles (25 et 40 kDa) de NOX4 dans le noyau et plus fortement dans la fraction membranaire. Dans ce dernier compartiment, l'intensité de ces bandes semble être relativement peu doxycycline-dépendante contrairement aux noyaux. Ces bandes pourraient correspondre aux autres formes de NOX4, déjà décrites dans la littérature (286). Il est également à noter que plusieurs études soulignent l'absence de spécificité des différents anticorps dirigés contre NOX4 (291). Il convient donc de rester prudent quant à la vraie nature de ces protéines. Une surexpression doxycycline-dépendante de NOX4 (bande à 60 kDa encadré en rouge) est observée dans le noyau et la mitochondrie à partir d'une concentration de 10⁻² μ g/ml en doxycycline. Cette surexpression est plus importante dans la mitochondrie que dans le noyau à une concentration à 10⁻¹ μ g/ml en doxycycline. Ces observations sont cohérentes avec la littérature. Plusieurs études décrivent une localisation de NOX4 dans le noyau (145, 286, 292) et dans la mitochondrie, également cohérente avec une estimation de cette localisation par le logiciel Mitoprot II à 98 % (108, 109, 293). Quelle que soit la concentration en

doxycycline, cette forme de NOX4 n'est pas détectée dans les fractions membranaires. En revanche, une bande peu intense est visible vers 70 kDa et dont l'intensité semble être doxycycline-dépendente. Cette bande pourrait correspondre à une forme de NOX4 localisée, soit à la membrane plasmique, soit dans le reticulum endoplasmique. En effet par centrifugation différentielle, les fractions membranaires sont enrichies en membranes plasmiques, mais également peuvent contenir des membranes du reticulum endoplasmique. En effet, la localisation subcellulaire de NOX4 a été prédite également dans le reticulum endoplasmique à 67% (145).

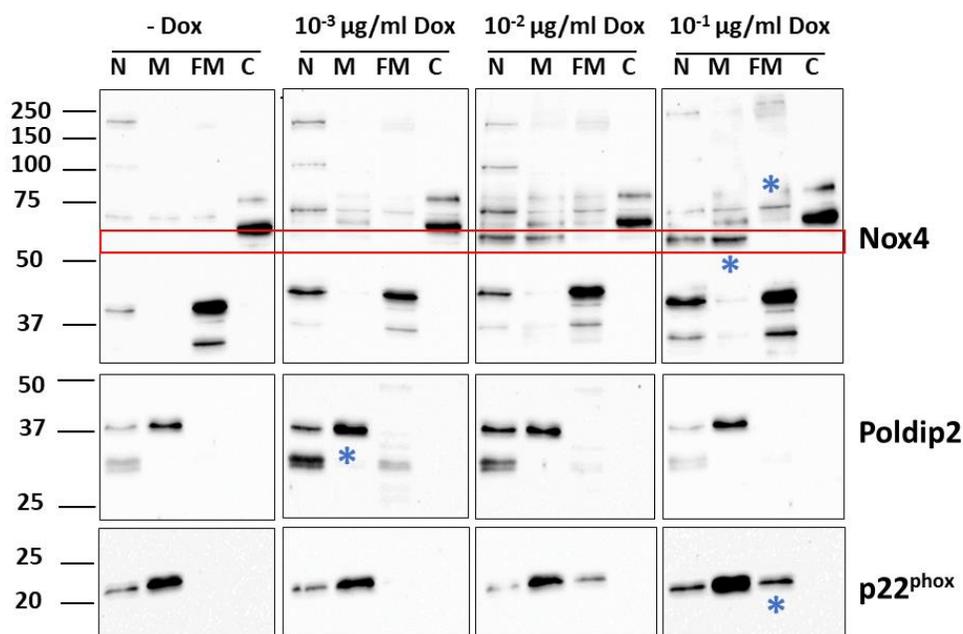


Figure III- 35 Répartition subcellulaire de l'expression de Poldip2 NOX4 et p22^{phox} après traitement ou non (-) à la doxycycline pendant 24 h.
 20 µg de protéines totales sont déposées. N : noyaux, M : mitochondrie, FM : Fraction membranaire, C : cytoplasme. * : formes surexprimées

La protéine p22^{phox} est exprimée de manière endogène dans le noyau et la mitochondrie. Suite au traitement à la doxycycline, non seulement l'expression de p22^{phox} est augmentée dans ces deux compartiments à partir de 10⁻¹ µg/ml de doxycycline, mais on observe également une bande de surexpression dans la fraction membranaire à 10⁻² µg/ml dont l'intensité augmente à 10⁻¹ µg/ml. Ce résultat renforce les observations de la Figure III- 34.

La protéine Poldip2 endogène est exprimée dans le noyau. Son expression est encore plus importante dans les mitochondries de ces cellules, avec un pic de surexpression à 10⁻³ µ/ml. À des concentrations plus élevées en doxycycline, l'expression est de nouveau légèrement plus faible. Au noyau, Poldip2 endogène est exprimé sous deux formes, 38 kDa et 30 kDa. Leur expression semble être influencée

par la doxycycline. Dans les cellules HeLa et MCF7, l'analyse par Northern blot de l'ARN totale montre deux transcrits pour Poldip2 avec une bande majoritaire à 2 kb et une autre minoritaire à 1 kb (8). De même que pour p22^{phox}, l'augmentation du niveau d'expression de Poldip2 alors qu'elle n'est pas sous contrôle du promoteur inductible à la doxycycline. Cette différence avec ce qui a été observé dans la Figure III- 34 s'explique par un temps d'induction qui est ici deux fois plus long. Il semble qu'après 12 h d'induction, la surexpression de NOX4 entraîne la surexpression de p22^{phox} pour l'aider à se stabiliser mais sans effet détectable sur l'expression de Poldip2. Après 24 h d'induction, on observe à la fois une surexpression de p22^{phox} et de Poldip2. Il semble donc que la surexpression de l'hétéromère NOX4/p22^{phox} entraîne celle de Poldip2 suggérant que Poldip2 peut participer à la stabilité de l'enzyme comme cela a été proposé par Lyle *et al.* (2009) (19).

Plusieurs formes de NOX4 sont exprimées dans les cellules HEK293 et leurs localisation est dépendante du compartiment subcellulaire. Poldip2 localise avec NOX4 seulement au niveau des mitochondries. Il serait donc intéressant de vérifier si cette co-localisation a un effet sur l'activité de NOX4 et, enfin d'étudier si l'ajout de Poldip2 recombinant dans les autres compartiments joue un rôle sur la production de ROS par NOX4.

A.IV.3. Effet de Poldip2 recombinant sur l'activité de NOX4

Les fractions subcellulaires précédemment isolées par centrifugation différentielle (Figure III- 34) ont servi à mesurer la production de peroxyde d'hydrogène *in vitro* par la méthode Amplex red et donc de comparer l'activité de NOX4 dans ces différents compartiments. Deux quantités de fractions (30 et 80 µg de protéines totales) induites et non induites par la doxycycline à 10⁻² µg/ml ont été déposées dans chaque puits. La pente de la courbe de fluorescence de la resorufin a été déterminée pour les fractions isolées respectivement par centrifugation différentielle et par kit. La Figure III- 36 A montre une activité de NOX4 plus importante dans les fractions nucléaires et mitochondriales induites par la doxycycline. Ce résultat est cohérent avec l'augmentation de l'expression NOX4 sous l'effet de la doxycycline dans ces compartiments subcellulaires. En revanche dans les fractions membranaires, aucune activité n'est détectée. Dans les fractions isolées par centrifugation différentielle, cette activité est d'autant plus importante dans les fractions mitochondriales que dans les fractions nucléaires. Cela peut être dû à la co-localisation avec Poldip2 fortement exprimé avec NOX4 dans la fraction mitochondriale (Figure III- 34). Dans les fractions isolées par kit, aucune activité n'est détectée dans aucun des compartiments subcellulaires. C'est peut-être dû à l'incompatibilité des tampons employés dans les kits avec la mesure de l'activité NOX4. Malgré que ces fractions soient plus pures que celle isolées par centrifugation différentielle, elles ne pourront pas être utilisées pour étudier l'effet de Poldip2 sur NOX4.

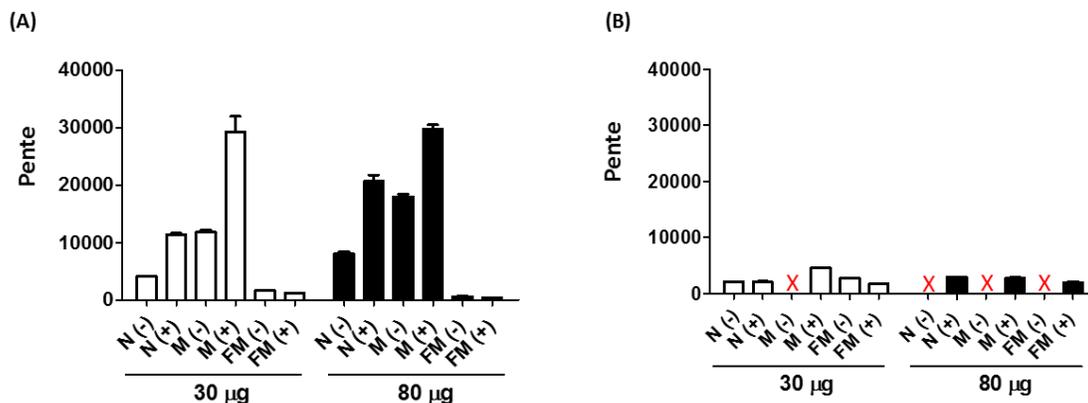


Figure III- 36 : Mesure de l'activité de NOX4 dans les fractions enrichies après 12 h de traitement à 10^{-2} µg/ml doxycycline.

(A) Mesure dans les fractions enrichies par centrifugation. (B) Mesure dans les fractions enrichies par kit. (-) Cellules non traitées à la doxycycline (+) cellules traitées avec une dose de 10^{-2} µg/ml de doxycycline pendant 12h. N : noyau ; M : mitochondrie ; FM : fraction membranaire. Les barres d'erreur sont calculées sur deux répétitions d'expérience \pm SEM. X échantillon non déposé. $n=2$.

Nous avons utilisé les fractions enrichies en particules nucléaires, en mitochondries ou en fractions membranaires pour étudier l'effet de Poldip2 sur l'activité NOX4. L'ajout de concentrations croissantes de Poldip2 recombinant augmente l'activité de NOX4 dans le noyau (Figure III- 37 B) et les mitochondries (Figure III- 37 A) d'un facteur environ 2. Les activités passent de 20 à 45 nmol $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ dans le noyau et de 50 à 100 nmol $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ dans les mitochondries. Très peu d'effet au niveau de la fraction membranaire des cellules HEK293/NOX4 est observé seulement après ajout de 550 nM de Poldip2 recombinant (Figure III- 37 C). Kuroda *et al.* (2010) (109) observe des résultats similaires. Dans leurs travaux, l'activité de NOX4 mesurée dans le noyau est supérieure d'un facteur 4 à celle mesurée dans les fractions microsomales isolées des cardiomyocytes de souris. L'équipe de K. Schroeder n'observe pas non plus d'activité de NOX4 dans les fractions membranaires (résultats montrés à la Gordon Research Conference 2018, Suisse). Ces résultats sont en opposition avec ceux de Lyle *et al.* (2009) (19) qui observe une activité de NOX4 dans les fractions membranaires de cellules du muscle lisse vasculaire (SVMC). Néanmoins en regardant plus en détail le protocole établi dans l'étude de Lyle, on se rend compte qu'il n'est peut-être pas très adapté pour l'expérience mise en place. En effet, après cassage des cellules par sonication, le lysat est directement centrifugé à $28\,000 \times g$ pendant 15 min. Ainsi dans le culot sont isolés à la fois les noyaux et les mitochondries. L'activité de NOX4 est ensuite mesurée dans les fractions isolées par chimioluminescence de la lucigenine. De ce fait, dans les travaux de Lyle *et al.* (2009) les activités mesurées ne résultent peut être pas de l'enzyme NOX4 présente dans les fractions membranaires mais plutôt de son activité dans les autres compartiments subcellulaires (noyau et mitochondries). Il n'est pas exclu non plus que dans les fractions membranaires NOX4 soient associées à une protéine inhibitrice qui empêcherait

de détecter une activité dans ce compartiment. On peut noter également que l'ajout de Poldip2 recombinant aux fractions nucléaires isolées par kit n'a pas d'effet observable sur l'activité de NOX4 (Annexe 3). Ceci confirme notre hypothèse que NOX4, dans les fractions obtenues grâce au kit, n'est plus active.

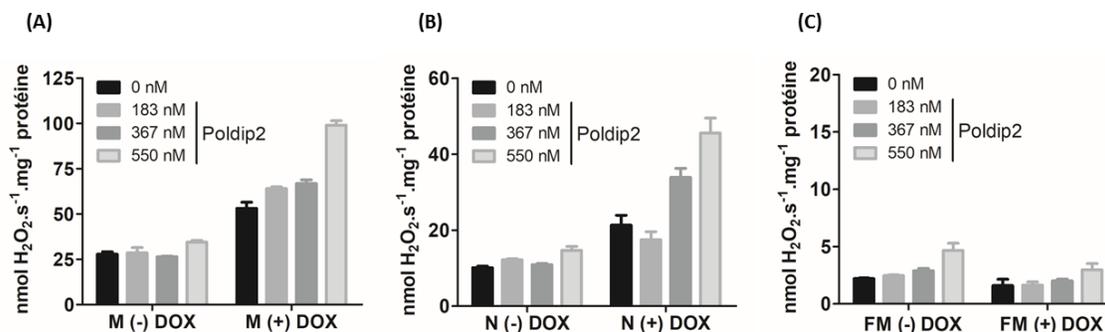


Figure III- 37 : Effet de Poldip2 recombinant de rat sur l'activité de NOX4 après 12 h de traitement à 10^{-2} µg/ml doxycycline.

(A) Mesure dans les fractions mitochondriales. (B) Mesure dans les fractions nucléaires. (C) Mesure dans les fractions membranaires. Les fractions sont enrichies par centrifugation différentielle. Les mesures sont faites sur 30 µg de fractions. (+) Cellules traitées par la doxycycline (-) cellules non traitées. Les barres d'erreur sont calculées sur deux répétitions d'expérience \pm SEM. n=2.

En conclusion, ces expériences de co-localisation et d'activité de NOX4 humain effectuées sur différents compartiments subcellulaires (mitochondrie, membrane plasmique et noyau) en présence de Poldip2 de rat montrent que Poldip2 recombinant de rat est, d'une part fonctionnelle, et d'autre part que son effet sur NOX4 n'est pas **spécifique à une espèce**.

B. Implication de Poldip2 dans l'activité de NOX2

Nous avons pu produire et purifier Poldip2 recombinant de rat dans la levure. Sa structure a été caractérisée et sa fonctionnalité vérifiée sur l'isoforme NOX4. Bien que Poldip2 soit tronqué en N-terminal de sa séquence, il est néanmoins capable d'augmenter l'activité de NOX4 d'un facteur 2 dans les mitochondries et les noyaux de cellules HEK293. Il a été décrit dans la littérature que Poldip2 augmente l'activité de NOX4 d'un facteur 3 en se fixant sur son partenaire p22^{phox} (19). Étant donné que NOX2 et NOX4 co-localisent dans certains types cellulaires (46, 74, 77–79, 294), parfois même au niveau subcellulaire (81) et que ces deux isoformes partagent le même partenaire p22^{phox}, nous avons voulu vérifier si Poldip2 est capable d'interagir avec NOX2, et si cette interaction peut moduler l'activité de NOX2. Nous avons, dans un premier temps, étudié l'effet de Poldip2 sur NOX2 *in vitro* en utilisant les fractions membranaires isolées à partir de neutrophiles et des lignées cellulaires Cos 7 qui expriment ou non NOX2. Dans un deuxième temps, ces effets ont été vérifiés *in cellulo* sur les monocytes.

B.I. Effet de Poldip2 sur NOX2 *in vitro*

B.I.1. Interaction de Poldip2 avec NOX2

Dans ce paragraphe nous avons étudié l'interaction de Poldip2 avec le Cytochrome *b558* membranaire. L'objectif est de vérifier si Poldip2 interagit de manière spécifique avec le complexe membranaire, de voir s'il y a une possible interaction avec les partenaires cytosoliques connus (p67^{phox}, p47^{phox} et Rac) de NOX2 et enfin de voir si cette protéine a un effet sur l'assemblage de la NADPH Oxydase.

B.I.1.a. Interaction de Poldip2 avec le complexe Cytochrome *b558*

B.I.1.a.i. Poldip2 endogène et co-localisation avec NOX2

Dans le but d'étudier une éventuelle interaction de Poldip2 avec le complexe cytochrome *b558*, nous avons isolé des fractions membranaires de neutrophiles humains et de cellules Cos 7, cellules rénales de singe. Contrairement aux neutrophiles, les cellules Cos 7 n'expriment pas de manière endogène les protéines du complexe NADPH oxydase. Ces cellules Cos 7 ont donc été transfectées avec les gènes codant pour NOX2 (*CYBB*) et pour p22^{phox} (*CYBA*) humains. Celles-ci sont appelées Cos NOX. Les cellules non transfectées sont notées Cos 7. Un Western Blot a donc été réalisé pour comparer les niveaux d'expression de NOX2 et p22^{phox} dans les fractions membranaire de neutrophiles et de la lignée de cellules Cos 7. La Figure III- 38 A montre que les neutrophiles expriment plus de gp91^{phox} et p22^{phox} que les cellules Cos NOX (d'un facteur de 4 basé sur le niveau d'expression de p22^{phox}). Comme attendu, aucune de ces deux protéines n'est exprimée dans la fraction membranaire de Cos 7. Afin d'étudier l'interaction de Poldip2 avec ces fraction membranaire, des quantités identiques de ces fractions ont donc été déposées sur une membrane de nitrocellulose. Par la suite la membrane est incubée dans une solution contenant la protéine Poldip2 et enfin marquée par un anticorps dirigé contre cette protéine. La Figure III- 38 B montre une interaction de Poldip2 avec toutes les fractions membranaires. De manière surprenante on observe une interaction plus importante de Poldip2 avec les fractions membranaires Cos NOX qu'avec les fractions membranaires de neutrophile même si ces dernières expriment 4 fois plus de p22^{phox}. Poldip2 est même capable d'interagir avec la fraction membranaire de Cos 7 alors que p22^{phox} est absente dans ces fractions. Compte tenu du fait que Poldip2 est présente dans les cellules rénales (19, 46, 49), nous avons soupçonné la présence de Poldip2 endogène également dans les cellules Cos 7 étant donné que les cellules Cos 7 proviennent d'une lignée cellulaire immortalisé de cellules rénales de singe. Nous avons en effet confirmé cela par Western Blot (Figure III- 38 D). Par conséquent, Poldip2 endogène participe au signal observé dans le Dot Blot des fractions membranaires de la lignée de cellule Cos 7. Par contre, dans les neutrophiles, Poldip2 n'est pas détectée dans aucune fraction subcellulaire (Figure III- 38 C). Le Dot Blot a donc permis de mettre en évidence une interaction de Poldip2 avec la fraction membranaire, sans pour autant discriminer le Poldip2

endogène du Poldip2 recombinant. Par conséquent, l'absence de Poldip2 endogène dans les fractions membranaires de neutrophiles fait que ces cellules constituent un bon modèle pour étudier l'effet de cette protéine sur l'activité de NOX2.

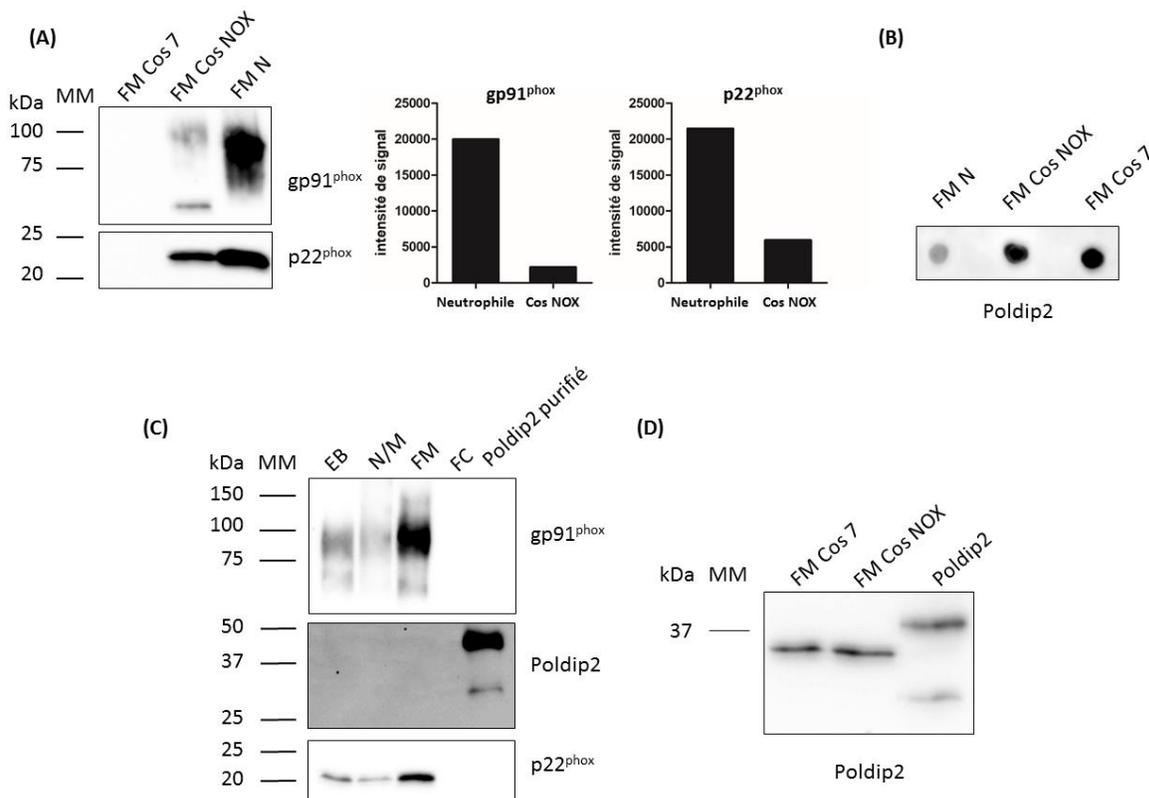


Figure III- 38 : Interaction de Poldip2 avec NOX2.

(A) Expression de gp91^{phox} et p22^{phox} dans les fractions membranaires de neutrophile et de la lignée de cellules Cos 7. (B) Interaction de Poldip2 avec les fractions membranaires de neutrophile et de la lignée de cellules Cos 7 visualisée par Dot Blot. La membrane est marquée par un anticorps dirigé contre Poldip2 (Abcam). Localisation du Poldip2 endogène dans le neutrophile (C) et la lignée de cellules Cos 7(D).

Pour mieux caractériser l'interaction entre Poldip2 et la fraction membranaire de neutrophiles, l'expérience a donc été réalisée de nouveau en employant cette fois ci la méthode de Western Blot. Cette technique nécessite au préalable une séparation des protéines selon leur taille moléculaire avant marquage par un anticorps. Elle permet donc, contrairement au Dot Blot, de mettre en évidence quelle forme de Poldip2 (39 ou 29 kDa) interagit avec la fraction membranaire en plus de discriminer la forme endogène du recombinant puisque ces deux formes n'ont pas la même taille moléculaire.

Les fractions membranaires sont incubés pendant 1 h avec le Poldip2 recombinant de rat à raison d'un ratio « cytb558 contenu dans la fraction membranaire:Poldip2 » de 1:20 (mol:mol) puis centrifugées pendant 1 h à 190 000 xg. Dans le culot sont récupérées les fractions membranaires et dans le surnageant

les protéines solubles. Poldip2 et la fraction membranaire sont également centrifugés seuls. Les différentes fractions sont analysées par Western Blot (Figure III- 39), la figure obtenue révèle que la majorité de NOX2 est présente dans le culot comme attendu, et que très peu de cette protéine reste dans le surnageant. Poldip2, qui est une protéine cytosolique, est présente majoritairement dans le surnageant. Quand Poldip2 et les fractions membranaires sont incubées ensemble, la bande correspondante à Poldip2 est retrouvée dans le culot. Dans cette figure, on peut voir clairement que la forme 29 kDa se fixe beaucoup plus que la forme 39 kDa. Il y a donc une interaction entre les deux formes de Poldip2 et la fraction membranaire de neutrophiles, avec une fixation préférentielle de la forme la plus courte. Il semble que le clivage de la partie N-terminal de cette protéine permet de libérer des sites de fixations qui favorisent cette interaction.

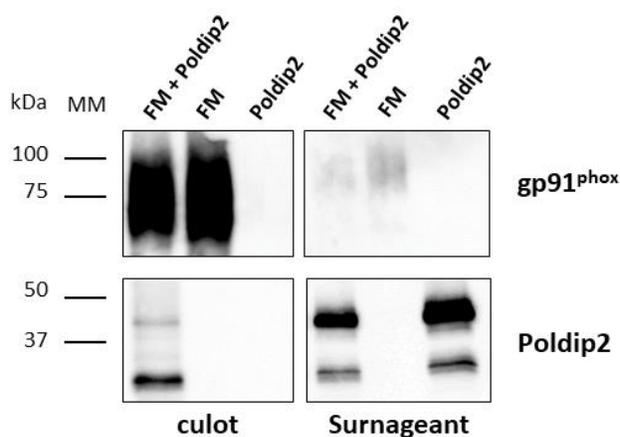


Figure III- 39 : Interaction entre Poldip2 et fraction membranaire de neutrophile en absence d'acide arachidonique.

Le culot et surnageant sont séparés par simple centrifugation. En partant du haut vers le bas : Western Blot marqué avec un anticorps anti-NOX2 (Panel 1), anti-Poldip2 (Santa Cruz) (Panel 2).

Nous avons ensuite comparé 2 ratios protéiques de manière à déterminer si la fixation de Poldip2 sur la fraction membranaire de neutrophile est dépendante de la concentration en protéines. Nous avons utilisé deux ratios « *cytb558* contenu dans la fraction membranaire:Poldip2 » différents avec les mêmes lots de protéines : 1:10 (mol:mol) et 1:5 (mol:mol). Comme précédemment les protéines sont incubées ensemble puis centrifugées et les fractions sont analysées par Western Blot (Figure III- 40 A). Sur le Western Blot marqué avec un anticorps dirigé contre Poldip2, on observe une bande plus intense vers 39 kDa pour le ratio 1:10 (*cytb558* contenu dans la fraction membranaire:Poldip2). Cela est confirmé par l'analyse de ces bandes par le logiciel IMAGE J (Figure III- 40 B). Donc, cela suggère que la fixation de Poldip2 sur la fraction membranaire des neutrophiles est dépendante de la concentration en Poldip2.

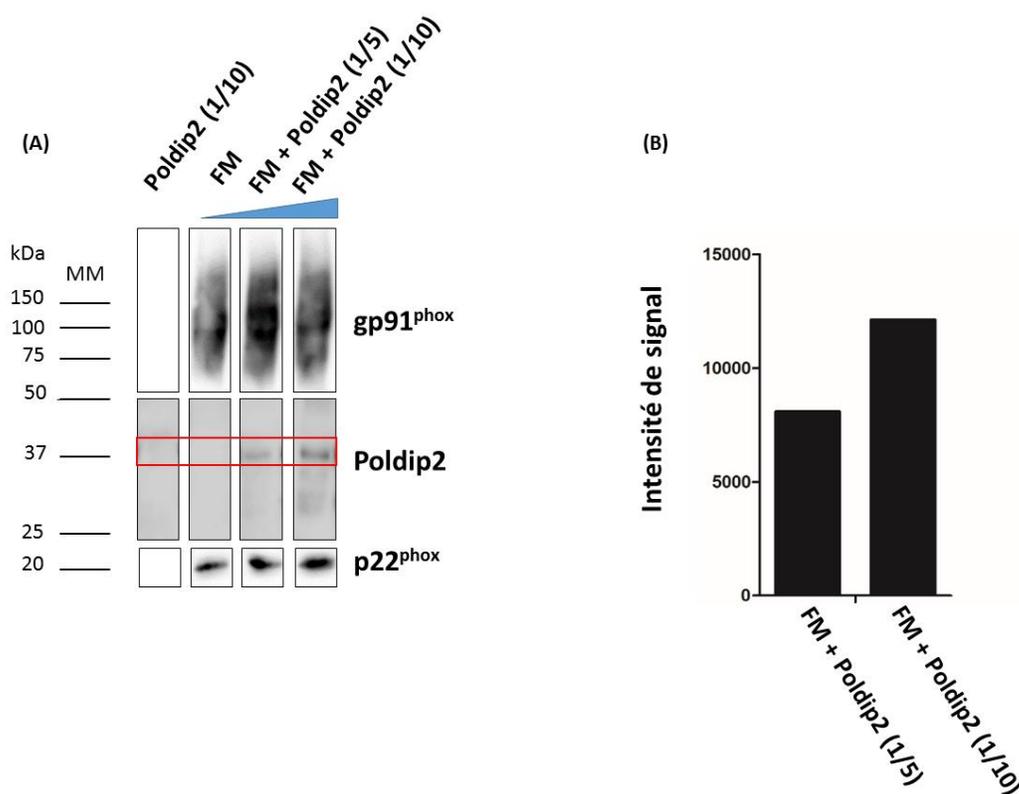


Figure III- 40 : Effet de la concentration de Poldip2 sur son interaction avec la fraction membranaire de neutrophile.

Les culot et surnageant sont séparés par simple centrifugation. (A) : En partant du haut vers le bas, Western Blot marqué avec un anticorps anti-NOX2 (Panel 1), anti-Poldip2 (Santa Cruz) (Panel 2), anti-p22^{phox} (Panel 3). (B) : Analyse par IMAGE J des intensités des bandes encadrées en rouge.

B.I.1.a.ii. Effet de l'acide arachidonique sur l'interaction de Poldip2 avec la NOX2 de neutrophile

Comme l'acide arachidonique est employé dans la plupart des expériences de *cell-free* mesurant l'activité oxydase, notre objectif est ici d'étudier son effet sur l'interaction entre la fraction membranaire et Poldip2. Cependant au cours de nos expériences d'interactions, nous avons constaté que, les résultats étaient très difficiles à interpréter. Ces expériences parfois très longues pouvaient parfois durer toute la nuit. Nous observions une diminution du signal assez conséquente alors que les dépôts en protéines étaient quantitativement équivalents. Nous avons décidé de vérifier si l'acide arachidonique avait un effet sur le signal de luminescence produit par la HRP couplée aux anticorps après ajout du substrat. L'acide arachidonique est incubé avec les protéines à différents temps allant de 0 min à 16 h avant ajout du tampon de charge. Le mélange est ensuite déposé sur le gel et analysé par Western Blot. Ce test a été fait sur deux échantillons différents de fractions membranaires de neutrophiles, marqués avec les anticorps dirigés contre NOX2 et p22^{phox}, ainsi que sur la protéine Poldip2 purifiée. La Figure III- 41 A montre que plus le temps

d'incubation des protéines avec l'acide arachidonique est important plus le signal s'affaiblit pour les trois protéines analysées ainsi que pour les deux échantillons de fractions membranaires. Une particularité est observée pour la protéine p22^{phox} : nous voyons apparaître sur le Western Blot une bande vers 30 kDa dont l'intensité augmente avec le temps d'incubation avec l'acide arachidonique. Au vu de la taille de cette protéine, il est peu probable que ce soit un dimère de p22^{phox}, d'autant plus qu'aucun dimère n'a été rapporté dans la littérature. Par ailleurs l'anticorps utilisé est un anticorps monoclonal qui reconnaît les épitopes de 29 à 33 acides aminés et de 182 à 188 acides aminés. Pour l'instant ce résultat, assez inattendu, est difficile à expliquer. Pour être sûr que les effets observés soient spécifiques à l'acide arachidonique et non à un autre facteur tel que le chauffage de l'échantillon, nous avons combiné les conditions et observé par Western Blots les effets sur le signal de chimioluminescence (Figure III- 41 B). En effet, ce traitement thermique des échantillons pourrait dégrader les épitopes reconnus par l'anticorps et rendrait donc la visualisation de la protéine plus difficile. Suite au chauffage de l'échantillon, le signal diminue légèrement, mais cela est sans comparaison avec une incubation sur la nuit avec l'acide arachidonique. Dans ce cas, la bande est très diffuse et présente un signal beaucoup plus faible qu'en absence totale d'acide arachidonique ou en présence de celui-ci durant un temps d'incubation très court. Dans ces conditions, il sera donc très difficile d'analyser les Westerns Blots quand les échantillons sont incubés avec l'acide arachidonique. Il nous faudra donc prendre en compte ce paramètre pour l'interprétation des résultats suivants.

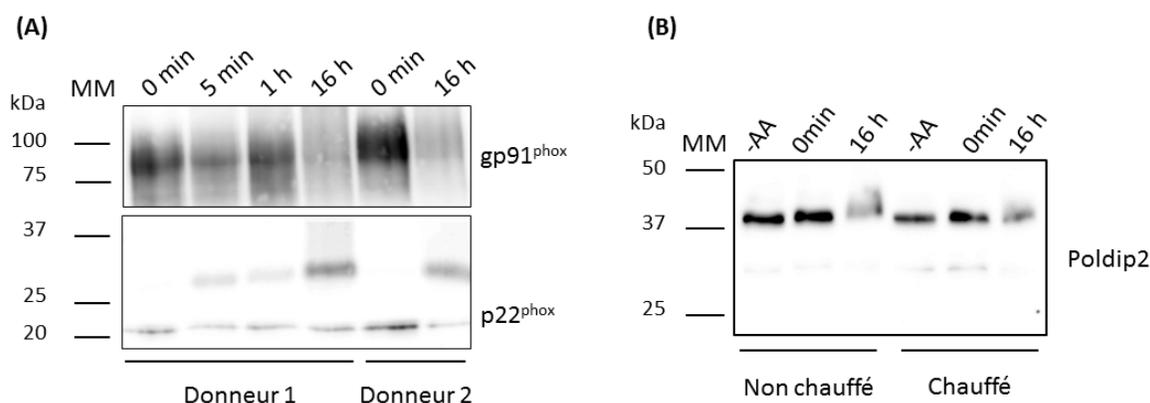


Figure III- 41 : Effet de l'incubation avec l'acide arachidonique sur le signal de Western Blot.
 (A) L'acide arachidonique est incubé à différents temps avant ajout du tampon de Laemli. (B) Suite à l'incubation avec l'acide arachidonique l'échantillon est chauffé ou non avant dépôt sur gel SDS-PAGE.

Nous avons donc suivi l'effet de l'acide arachidonique sur l'interaction de Poldip2 avec les fractions membranaires de neutrophiles par Western Blot. Les protéines sont incubées ensemble en présence ou non d'acide arachidonique pendant 1 h puis séparées sur un gradient de sucrose par centrifugation à 110 000 xg pendant 16 h. Ensuite, des fractions de 1 ml sont récupérées. 180 µl de ces fractions sont concentrées par

TCA puis déposées sur gel. Les fractions H (le haut du tube) contenant les protéines cytosoliques et B (bas du tube) contenant les protéines membranaires sont analysées par Western Blot.

Quand l'acide arachidonique est présent dans le mélange, une diminution de signal du marquage de NOX2 est observé (Figure III- 42) quel que soit l'échantillon, comme cela était déjà visible dans la Figure III- 41. En absence de fraction membranaire, la protéine Poldip2 reste dans le haut du tube (H) que l'acide arachidonique soit présent ou pas. En présence de fractions membranaires, Poldip2 co-sédimente au fond du tube (B) ce qui suggère une interaction entre ce dernier et la fraction membranaire. En absence d'acide arachidonique, contrairement à ce qui était observé dans la Figure III- 39, la forme à 39 kDa interagit de manière privilégiée avec la membrane alors qu'en présence d'acide arachidonique, c'est la forme 29 kDa qui semble avoir une interaction préférentielle avec la membrane. Il est possible que l'acide arachidonique induise des changements structuraux différents sur les deux formes de Poldip2, changements qui sont déterminants pour leur interaction avec la membrane de neutrophiles. Le point en contradiction avec celui de la Figure III- 39 peut être expliqué par l'utilisation de deux méthodes différentes de séparation qui est, dans le premier cas, une ultracentrifugation (1 h), alors que dans le deuxième cas, il s'agit d'une séparation sur gradient de sucrose pendant 16 h. Cette différence de temps et de type de centrifugation peut être à l'origine de cette différence de comportement.

D'une manière générale, nous pouvons conclure que la protéine Poldip2 ne nécessite pas l'addition d'acide arachidonique pour se fixer à membrane des neutrophiles, contrairement aux protéines régulatrices de NOX2, p47^{phox} et p67^{phox} qui doivent être phosphorylées pour se fixer et activer NOX2. Cependant, l'acide arachidonique augmente la spécificité de l'interaction de la forme 29 kDa de Poldip2 avec la fraction membranaire des neutrophiles.

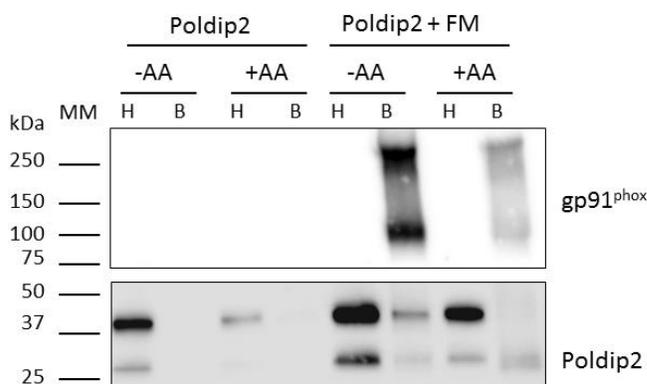


Figure III- 42 : Effet de l'acide arachidonique sur l'interaction entre Poldip2 et la fraction membranaire.
 Les échantillons sont séparés sur gradient de sucrose. FM : fraction membranaire ; AA : acide arachidonique ; H : fraction prélevée en haut du tube ; B : fraction prélevée en bas du tube.

B.I.1.a.iii. Interaction non spécifique de Poldip2 avec la fraction membranaire des lignées de cellules Cos 7

À ce stade des expérimentations, on ne sait pas encore si Poldip2 se fixe spécifiquement ou non à p22^{phox}, comme il a été décrit par Lyle *et al.* (2009) (19). L'interaction observée de Poldip2 avec la fraction membranaire de neutrophiles peut juste être due à une interaction avec les lipides de la membrane plasmique. Il n'est donc pas exclu que cette protéine, même si elle est cytosolique, puisse avoir un ancrage à la membrane. Une expérience d'interaction a donc été réalisée avec des fractions membranaires de lignées de cellules Cos 7 qui expriment le cytochrome *b588* (Cos NOX) ou pas (Cos 7).

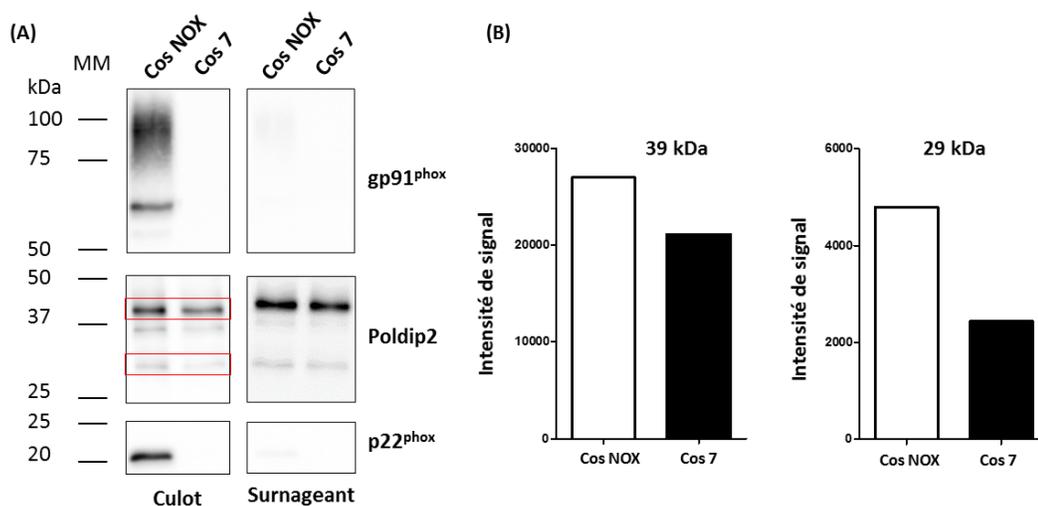


Figure III- 43 : Interaction de Poldip2 avec la fraction membranaire indépendante du cytochrome *b558*. (A) Culot et surnageant sont séparés par simple centrifugation. En partant du haut vers le bas : Western Blot marqué avec un anticorps anti-NOX2 (Panel 1), anti-Poldip2 (Abcam) (Panel 2), anti-p22^{phox} (Panel 3). (B) Analyse par IMAGE J des intensités des bandes encadrées en rouge représentative de l'interaction de Poldip2 recombinant avec les fractions membranaires des lignées de cellules Cos 7.

Les fractions membranaires sont donc incubées avec Poldip2 puis centrifugées pour séparer les protéines cytosoliques et les fractions membranaires. L'analyse par Western Blot de ces fractions (Figure III- 43 A et B) révèle que les deux formes de Poldip2 (29 et 39 kDa) co-précipitent très significativement avec les fractions membranaires Cos NOX. Le signal de Poldip2 bien que présent est cependant plus faible dans les fractions membranaires Cos 7. Il semble donc que, bien que Poldip2 interagisse fortement avec la membrane quand le *cytb558* est présent, il se fixe également de manière non spécifique avec la membrane plasmique.

B.I.1.b. Effet de Poldip2 sur l'assemblage du complexe NADPH oxydase

Dans les expériences décrites précédemment nous avons pu mettre en évidence une interaction de Poldip2 recombinant de rat avec la fraction membranaire contenant NOX2 isolée à partir de neutrophiles

humains. Il est donc important de vérifier si cette interaction affecte ou non l'assemblage du complexe NADPH oxydase. L'expérience a donc été faite comme décrit précédemment en incubant Poldip2 avec la fraction membranaire en présence ou non d'acide arachidonique (AA) et de fractions cytosoliques (FC) (p47^{phox}, p67^{phox} et Rac). Les culots et surnageants obtenus après centrifugation sont analysés par Western Blot (Figure III- 44).

Dans les culots, on retrouve les deux protéines gp91^{phox} et p22^{phox}. Aucun signal de ces protéines n'est détecté au niveau du surnageant, ce qui confirme que la totalité des fractions membranaires se retrouve dans le culot. Dans le culot, le signal de ces deux protéines est légèrement atténué en présence d'acide arachidonique comme observé dans les Figure III- 41 et Figure III- 42.

Dans les culots, la protéine Poldip2 est présente dès qu'elle est mise en présence des fractions membranaires que les protéines cytosoliques soient ou non présentes. Néanmoins, en absence de protéine cytosolique et en présence d'acide arachidonique, l'interaction est bien plus importante que dans les autres conditions. Ce résultat suggère que lorsque les protéines cytosoliques sont présentes, Poldip2 interagit moins avec la membrane, peut-être en raison d'une compétition entre Poldip2 et les protéines cytosoliques.

Dans le surnageant, en présence de Poldip2 et d'acide arachidonique, une partie de p47^{phox} reste dans le surnageant alors que le signal correspondant à p47^{phox} disparaît totalement en absence de Poldip2. Cela suggère qu'une partie des p47^{phox} n'ont pas pu être transloquées à la membrane. Cela est cohérent avec l'observation précédente indiquant qu'il y a possiblement une compétition de Poldip2 avec les protéines cytosoliques. Nous observons également que les protéines cytosoliques, en absence d'acide arachidonique, peuvent de manière inattendue co-sédimer avec la FM. Par contre, l'ajout de Poldip2 n'affecte pas cette interaction pour p47^{phox} et p67^{phox} par (à l'exception des formes tronquées de p67^{phox} qui migrent vers 40 kDa, visible dans le surnageant). Par contre, Poldip2 semble diminuer l'interaction de Rac avec la FM, en absence ou en présence d'acide arachidonique.

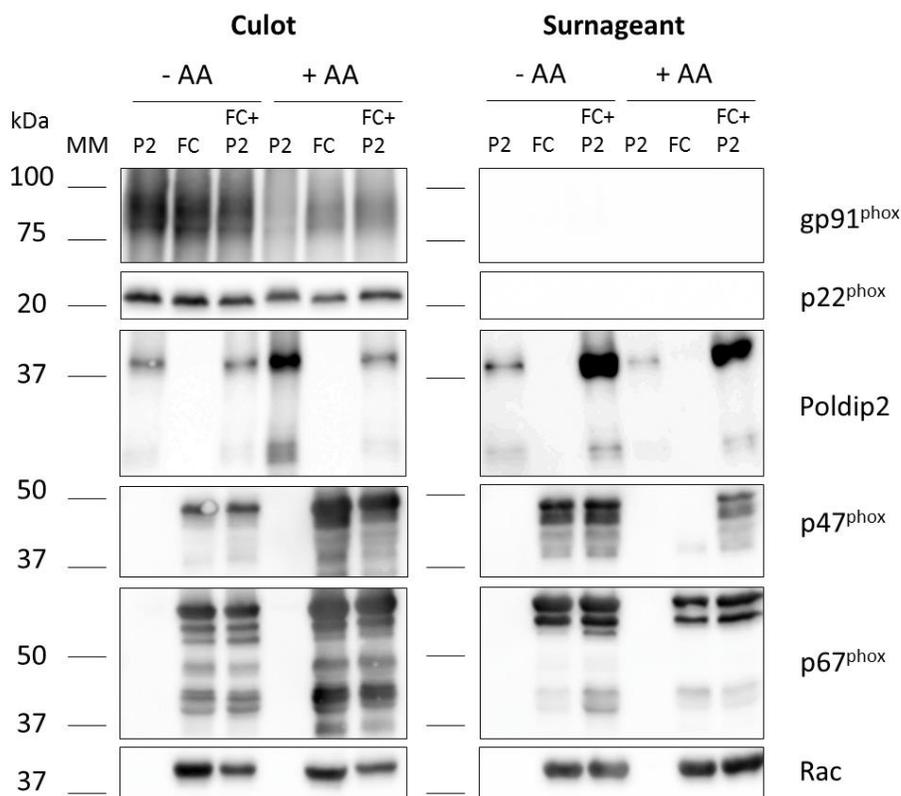


Figure III- 44 : Effet de Poldip2 sur l'assemblage du complexe NADPH oxydase en présence ou non d'acide arachidonique.

Culot et surnageant sont séparés par ultracentrifugation. En partant du haut vers le bas : Western Blot marqué avec un anticorps anti-NOX2 (Panel 1), anti-p22^{phox} (Panel 2), anti-Poldip2 (Abcam) (Panel 3), anti-p47^{phox} (panel 4), anti-p67^{phox} (panel 5), anti-Rac (panel 6). P2 : Poldip2 ; FC : fraction cytosolique ; AA : acide arachidonique.

Au vu de ce résultat il semble que lorsque le complexe NADPH est activé (+AA), la présence de Poldip2 affecte principalement l'interaction de p47^{phox} avec la membrane (mais également Rac dans une moindre mesure). Il a été montré que Poldip2 est capable de se fixer sur la partie cytosolique de p22^{phox} (121 à 193 acides aminés) (19). Dans cette région, se trouve le domaine Proline Rich Region PRR (155 à 160 acides aminés) connu pour interagir avec p47^{phox} (295). Il est donc possible qu'il y ait une compétition entre ces deux protéines cytosoliques. Ainsi, la présence de l'une limite la fixation de l'autre. De plus nous avons montré dans la Figure III- 43 que Poldip2 est capable de se fixer à la fraction membranaire indépendamment de la présence du cytochrome *b558* très probablement au niveau des phospholipides de la membrane. La protéine Rac est également connue pour se fixer sur les phospholipides anioniques *via* sa région Poly+, région polybasique riche en charge positive, en plus d'avoir un ancrage dans la bicouche lipidique grâce à la prénylation de la cystéine en C-terminal (187, 296). Si les régions de la membrane où Rac se fixe sont saturées par la présence de Poldip2, il n'est donc pas surprenant que la fixation de Rac soit diminuée. Ces

résultats montrent que la présence de Poldip2 change les interactions des protéines cytosoliques régulatrices de NOX2 conduisant à une possible modification de l'assemblage du complexe.

Il est surprenant de voir que les protéines cytosoliques co-sédimentent avec les fractions membranaires en absence d'acide arachidonique alors qu'il est décrit dans la littérature que les protéines cytosoliques ne sont adressées à la membrane que suite à une activation de ces dernières par des processus de phosphorylations décrits dans la revue El Benna *et al.* (2016) (297) ou encore des molécules amphiphiles telles que l'acide arachidonique (208, 296). Pour apporter des explications à ce résultat inattendu, la même expérience a été réalisée mais en absence de fraction membranaire. Le contenu du culot et du surnageant a été analysé par Western Blot. La figure en Annexe 4 montre que les trois protéines cytosoliques se retrouvent dans le culot en moindre quantité suite à la centrifugation. Lorsqu'elles sont incubées en présence d'acide arachidonique, les quantités retrouvées dans le culot sont encore plus importantes pour p67^{phox} et p47^{phox} alors que Rac n'est pas affecté par l'ajout d'acide arachidonique. Ce résultat suggère que lorsque les trois protéines sont présentes en solution, elles forment un complexe hétéro-oligomérique capable de sédimenter à une vitesse de centrifugation élevée. En présence d'acide arachidonique, ce phénomène est encore plus accentué. Ces résultats sont cohérents avec les observations de Bizouarn *et al.*, 2016 (298) qui mettent en évidence des changements structuraux des protéines p47^{phox} et p67^{phox} en présence du *cis*-AA suggérant un oligomérisation de ces deux protéines. La présence de ces protéines cytosoliques dans les fractions membranaires en absence d'acide arachidonique ne serait donc pas due à une interaction avec la fraction membranaire au sens propre mais à une sédimentation de ces dernières suite à la centrifugation.

B.I.1.c. Interaction de Poldip2 avec les protéines cytosoliques seules

Dans le but d'aller plus loin dans l'identification des interactions mises en jeu entre les différents partenaires protéiques, nous avons étudié par Dot Blot les interactions entre Poldip2 et les protéines cytosoliques en solution en absence des fractions membranaires. Les protéines p47^{phox} (5 à 64 pmol), p67^{phox} (4 à 49 pmol) et Rac (5 à 62 pmol) sont déposées sur une membrane de nitrocellulose (Figure III- 45 A). La membrane est ensuite incubée dans une solution de BSA à 0.5% contenant du Poldip2 à 100 nM. Enfin, la membrane est marquée par un anticorps primaire contre Poldip2 puis un anticorps secondaire couplé à la HRP. Un signal très fort pour p47^{phox} est détecté contrairement à p67^{phox} et Rac. Le signal de chimioluminescence est d'autant plus fort que la quantité de p47^{phox} déposées est importante. Ce résultat suggère qu'il y a une interaction très forte entre Poldip2 et p47^{phox} en solution. L'expérience est refaite en déposant sur la membrane 10 fois moins de protéines soit 0,2 à 5 pmol pour p47^{phox} et Rac et 0,16 à 4 pmol pour p67^{phox} et Rac pour mieux révéler les signaux plus faibles (Figure III- 45 B). En effet, étant donné que la camera qui analyse les signaux de chimioluminescence fait une moyenne entre les signaux élevés et faibles pour optimiser le résultat, il est possible de ne pas détecter de faibles signaux. Avec des dépôts 10

fois moins importants en protéines, le signal pour p67^{phox} est finalement détecté. Il est beaucoup plus faible que pour p47^{phox}. L'interaction entre Poldip2 et p67^{phox} est donc beaucoup plus faible. En revanche aucun signal n'est visible pour Rac.

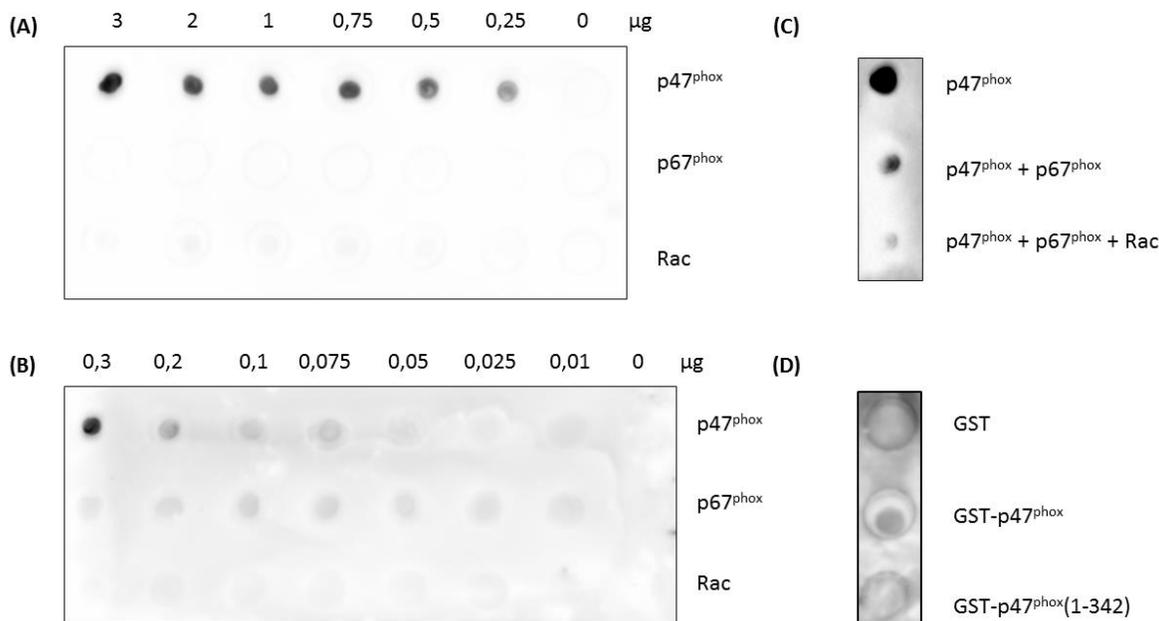


Figure III- 45 : Interaction de Poldip2 les protéines cytosolique p47^{phox}, p67^{phox} et Rac.

Les protéines cytosoliques sont déposées sur la membrane de nitrocellulose. La membrane est ensuite incubée dans une solution de BSA à 0,5 % contenant du Poldip2 à 100 nM. La membrane est marquée par un anticorps dirigé contre Poldip2 (Abcam). (A) p47^{phox} (5 à 64 pmol), p67^{phox} (4 à 49 pmol) et Rac (5 à 62 pmol). (B) p47^{phox} et Rac (0,2 à 5 pmol) p67^{phox} (0,16 et 4 pmol). (C) p47^{phox} 20 pmol, Rac 21 pmol et p67^{phox} 16 pmol. (D) GST, GST-p47^{phox} et GSTp47^{phox}(1-342) 20 pmol.

Ces premiers résultats étant très intéressants, nous avons cherché à savoir quel serait l'interaction de Poldip2 avec le mélange de deux ou trois des protéines cytosoliques. Celles-ci sont donc déposées sur la membrane de nitrocellulose et l'interaction de Poldip2 est mise en évidence comme décrit plus haut dans ce paragraphe. Le signal détecté lorsque p47^{phox} et p67^{phox} sont déposés ensemble sur la membrane est beaucoup moins intense que pour p47^{phox} seul. Lorsque Rac est ajouté au mélange des deux, le signal diminue d'avantage. Il semble que les interactions entre p47^{phox} et Poldip2 sont moins fortes lorsque p67^{phox} et Rac sont présents, suggérant également que lorsque l'hétérodimère p47^{phox}-p67^{phox} est (pré)formé en solution, les régions d'interaction avec Poldip2 sont moins accessibles.

En effet, en solution lorsque le complexe n'est pas activé, p47^{phox} et p67^{phox} forment un dimère. La région PRR en C-terminal de p47^{phox} se fixe sur le domaine SH3 de p67^{phox} (299). De plus, p47^{phox} présente une conformation fermée. La protéine est repliée de telle sorte que les domaines PX, SH3 sont masqués et ne peuvent pas interagir ni avec les phospholipides de la membrane ni avec la région PRR en C-ter de p22^{phox}.

(183). Par homologie avec la protéine HspQ, un domaine SH3 pourrait être présent dans la région N-terminal de Poldip2 (domaine YccV-like)(285). En tenant compte de ces informations en plus des résultats des expériences de Dot Blot, il est possible que Poldip2, tout comme p67^{phox}, se fixe sur p47^{phox} sur sa région PRR *via* son domaine SH3. La région PRR est également présente sur la séquence de p67^{phox}. Une interaction de Poldip2 avec cette dernière est également possible. Cette interaction est confirmée par les expériences de Dot Blot. Cependant, contrairement à p47^{phox}, elle est beaucoup plus faible. Cela suggère une affinité différente de Poldip2 vis à vis de la région PRR de p67^{phox} ou une accessibilité différente de cette région lorsque p67^{phox} est à l'état inactif. En effet, lorsque le système enzymatique est au repos, p67^{phox} est replié de telle sorte que le domaine SH3 et le motif TPR sont très proches masquant ainsi la région PRR, ce qui limiterait l'accès à Poldip2 (223). Si on prend en considération que Poldip2 et p67^{phox} peuvent interagir avec p47^{phox} sur la même région, celles-ci seraient donc en compétitions. Il ne serait donc pas surprenant que l'ajout de p67^{phox} ayant plus d'affinité pour la région PRR de p47^{phox} limite l'interaction de Poldip2 sur ce dernier. L'ajout de Rac diminue d'avantage l'interaction de Poldip2. Dans la littérature, il est décrit que Rac se fixe sur p67^{phox} sur son domaine TPR après activation pour l'amener vers la membrane où il se fixe sur son site d'interaction. Cette interaction se produit lorsque Rac est sous sa forme GTP. Dans cette expérience nous avons utilisé une forme de cette protéine mutée, Rac1Q61L. La structure de cette protéine est très similaire au Rac couplé à la GTP. Par ailleurs, il a été montré dans la littérature que la forme Rac1Q61L-GTP est capable de se fixer à la protéine p67^{phox}. La structure cristallographique montre une interaction entre le domaine SWITCH I de Rac et le domaine TRP de p67^{phox} (239). On peut donc imaginer que le Rac1Q61L utilisé dans nos expériences soit capable de se fixer à la protéine p67^{phox} sous sa forme complète. Ainsi la formation d'un trimère pourrait induire un réarrangement des domaines d'interaction différent de celui retrouvé pour chaque protéine seule, masquant ainsi les sites d'interactions avec la protéine Poldip2.

Finalement, pour vérifier si l'interaction entre Poldip2 et p47^{phox} se fait au niveau de la région PRR de p47^{phox}, nous avons étudié par Dot Blot l'interaction entre Poldip2 et p47^{phox} (protéine complète) et p47^{phox} tronqué en C-terminal. Ce dernier ne possède pas la région PRR. La Figure III- 45 montre que l'interaction se fait uniquement sur la forme complète de p47^{phox} et, lorsque la région PRR est absente, l'interaction ne se fait plus. Ce résultat est donc en accord avec notre hypothèse.

B.I.2. Effet de Poldip2 sur l'activité de NOX2

Il est montré dans la littérature que l'interaction de Poldip2 avec NOX4 *via* son partenaire p22^{phox} induit une augmentation de son activité d'un facteur 3 (19). Nous avons obtenu des résultats similaires avec Poldip2 (rat) produit dans la levure et NOX4 exprimé dans les cellules HEK293 où nous avons montré que Poldip2 (rat) est fonctionnel et qu'il interagit avec NOX4/p22^{phox} (humain). Nous avons pu également mettre en évidence dans le paragraphe précédent que Poldip2 interagit avec NOX2. Cette interaction qui semble

modifier l'assemblage des sous-unités cytosoliques sur leurs partenaires membranaires pourrait, sans doute, avoir des conséquences sur le fonctionnement de l'enzyme.

L'effet de Poldip2 sur le fonctionnement de la NADPH oxydase (NOX2) des neutrophiles est observé *in vitro* à l'aide du test d'activité dit « *acellulaire* » ou « *cell-free* ». Ce test *in vitro* est réalisé en mettant en présence les fractions membranaires des neutrophiles humains contenant NOX2/p22^{phox} et les 3 protéines p47^{phox}, p67^{phox} et Rac (recombinantes et purifiées), régulatrices de l'activité du cytb558. L'activation de l'enzyme se fait par l'ajout d'acide arachidonique qui va permettre l'assemblage des protéines cytosoliques à la membrane. Il s'ensuit alors une production d'anions superoxyde. En absence d'acide arachidonique et/ou des protéines cytosoliques, NOX2 est inactive et ne produit donc pas d'anions superoxyde.

B.I.2.a. Poldip2 : rôle d'activateur de NOX2 ?

Dans une première série d'expérience, nous avons cherché à savoir si Poldip2, seul, peut activer l'enzyme NOX2. Des concentrations croissantes de Poldip2 recombinant de rat (0 à 765 nM) ont été ajoutées à la fraction membranaire de neutrophiles en absence de protéines cytosoliques p47^{phox}, p67^{phox} et Rac. L'activité de l'enzyme est déterminée en suivant la vitesse de réduction du cytochrome *c* à 550 nm. Nous avons observé une augmentation de l'activité de NOX2 d'un facteur 2 qui est dose-dépendante de Poldip2 (Figure III- 46). Cette légère augmentation, observée en présence ou en absence d'acide arachidonique, est proche de l'augmentation d'activité observée de NOX4 (facteur 2–3) suggérant que Poldip2 pourrait être également un activateur de NOX2.

Cependant, lorsque l'effet de Poldip2 (336 nM) sur l'activité de NOX2 est suivi en mesurant la consommation de NADPH, substrat de la réaction, à 340 nm, l'activité spécifique de l'enzyme est environ 0,04 équivalent $\mu\text{Mol O}_2^{\cdot-} \cdot \text{s}^{-1}$, du même ordre de grandeur que l'activité de l'enzyme NOX2 non activée (Figure III- 47 et Figure III- 47 zoom). Toutefois, une activité spécifique d'environ 0,6 équivalent $\mu\text{Mol O}_2^{\cdot-} \cdot \text{s}^{-1}$ de l'enzyme après activation par les protéines cytosoliques et l'acide arachidonique confirme que l'enzyme est fonctionnelle (contrôle positif). Les résultats de ces expériences n'étant pas cohérents, il est difficile de dire si Poldip2 est capable ou non d'activer significativement NOX2. Nous avons donc tenté de comprendre l'augmentation observée de la réduction du cytochrome *c* en présence de concentration de Poldip2, un effet direct de Poldip2 sur cytochrome *c* qui induit une réduction de celui-ci n'étant pas à exclure.

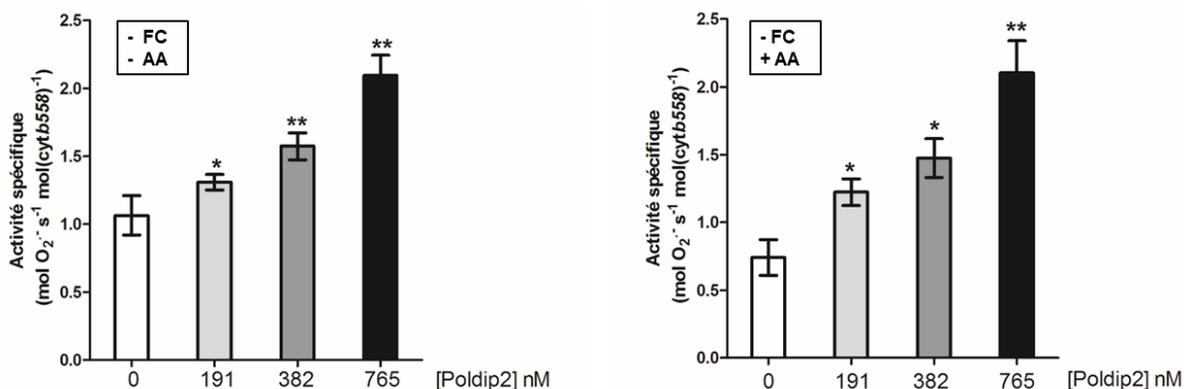


Figure III- 46 : Effet de Poldip2 sur NOX2 en absence des fractions cytosolique (FC).
 (-) AA : sans acide arachidonique. (+) AA : avec acide arachidonique (32 μ M). L'activité de NOX2 a été mesurée en suivant la réduction du cytochrome c à 550 nm. 4 nM cytb558, 269 nM p67^{phox}, 175,5 nM p47^{phox}, 136,6 nM RacQ61L, 200 μ M NADPH, 50 μ M cytc. Les valeurs sont une moyenne de 3 répétitions de mesure \pm SEM (* : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$).

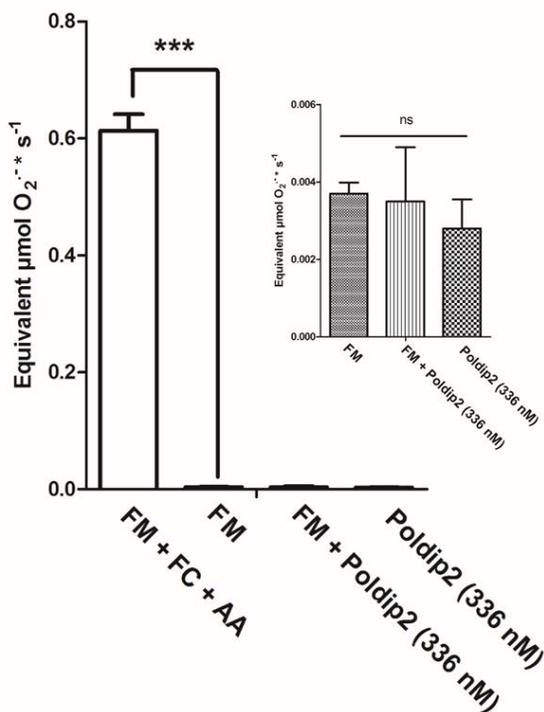


Figure III- 47 : Effet de Poldip2 sur NOX2 non activé. L'activité de NOX2 a été mesurée en suivant la consommation du NADPH à 340 nm. Le panel de droite est un zoom du panel de gauche. FM : Fraction Membranaire. FC : Fraction cytosolique, AA : Acide arachidonique. 4 nM cytb558, 269 nM p67^{phox}, 303 nM p47^{phox}, 786 nM Rac1Q61L, 200 μ M NADPH, 54 μ M acide arachidonique. Les valeurs sont une moyenne de 3 répétitions de mesure \pm SEM (***) : $P < 0,001$; ns : non significatif).

Pour apporter des éléments de réponse à l'augmentation de la vitesse de réduction de cytc constatée dans la Figure III- 46, nous avons réalisé des expériences dans lesquelles nous avons fait varier la composition du mélange réactionnel. Chaque expérience a été analysée en présence ou non de superoxyde dismutase (SOD) afin d'identifier s'il y a production de superoxyde. En effet, comme la SOD dismute l'anion superoxyde avant que celui-ci ne puisse réduire le cytochrome c, cela nous permet de vérifier si la

réduction du cytochrome *c* observée résulte d'une production d'anion superoxyde et donc d'une activité NADPH oxydase. Dans le cas de la fraction membranaire seule, on observe une diminution de l'activité en présence de SOD (Figure III- 48). Cette diminution correspond à une production de superoxyde qui émane de l'activité de NOX2. Lorsque la fraction membranaire et Poldip2 sont mélangés, la vitesse de réduction du cytc est 2 fois plus grande que lorsque Poldip2 est absent. Pourtant aucune variation significative de la vitesse de réduction du cytc n'est observée en présence de SOD. Par ailleurs, on observe dans cette figure une légère augmentation de la réduction du cytc suite à chaque ajout de SOD suggérant qu'une proportion du cytc pourrait être déjà réduit.

Nous en concluons que l'augmentation de la vitesse de réduction du cytc observé, corrélée à une concentration croissante de Poldip2, est un artefact et ne résulte pas d'une augmentation directement de la production d'anion superoxyde mais plutôt d'espèces réductrices résiduelles (potentiellement Poldip2) capable de réduire le cytc comme l'indique l'expérience contrôle mettant en présence Poldip2 seul avec le cytc. Ces dernières conclusions remettent donc en cause les résultats observés sur la Figure III- 46. Sur la base des résultats obtenus en suivant la consommation de NADPH par l'enzyme, nous en concluons que Poldip2 ne semble donc pas être un activateur direct de NOX2.

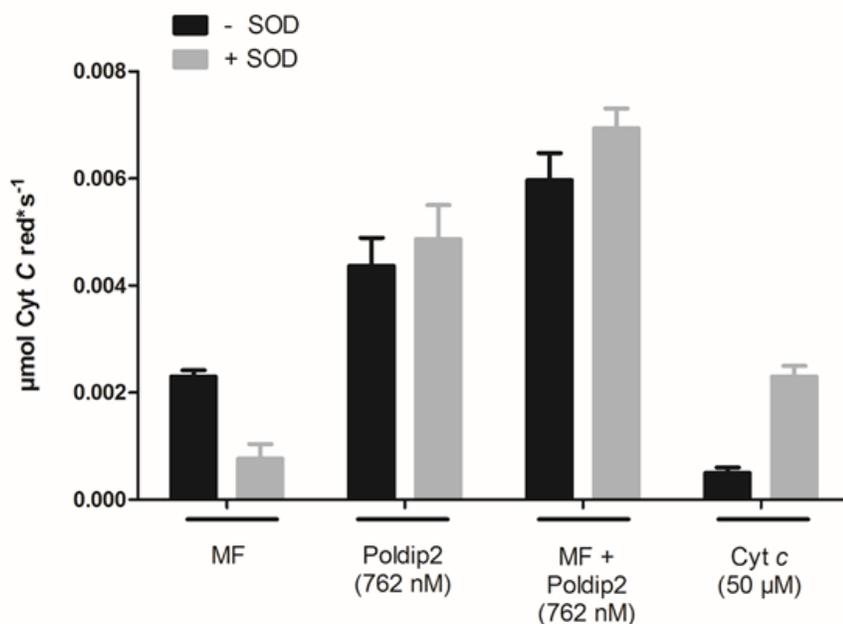


Figure III- 48 : Effet de Poldip2 sur NOX2 non activé en présence de superoxyde dismutase (SOD). L'activité de NOX2 a été mesurée en suivant la réduction du cytochrome à 550 nm. 4 nM cytb558, 1,5 µM SOD, 200 µM NADPH, 50 µM cytc. Les valeurs sont une moyenne de 3 répétitions de mesure ± SEM.

B.I.2.b. Effet de Poldip2 sur l'activité de NOX2

Nous avons ensuite étudié l'effet de Poldip2 sur l'activité de NOX2 en présence d'acide arachidonique et des protéines cytosoliques, conditions dans lesquelles le complexe NADPH oxydase est actif et fonctionnel. L'effet de l'addition de Poldip2 sur l'activité de NOX2 a été suivi à la fois en mesurant la vitesse de réduction du cytc (Figure III- 49 A) et celle de consommation du NADPH (Figure III- 49 B).

L'ajout de Poldip2 conduit à une diminution l'activité de NOX2. Environ 20 % de diminution de l'activité de NOX2 est mesuré en présence de 382 nM de Poldip2 en suivant la vitesse de réduction du cytc. De la même façon, on observe une diminution de l'activité de NOX2 en fonction d'une concentration croissante en Poldip2 en suivant la consommation de NADPH. Cette diminution atteint 50 % de l'activité initiale pour une concentration de 1.3 μ M de Poldip2. Les deux approches pour suivre l'activité de NOX2 conduisent à la même conclusion : Poldip2 aurait un rôle inhibiteur sur le fonctionnement de NOX2.

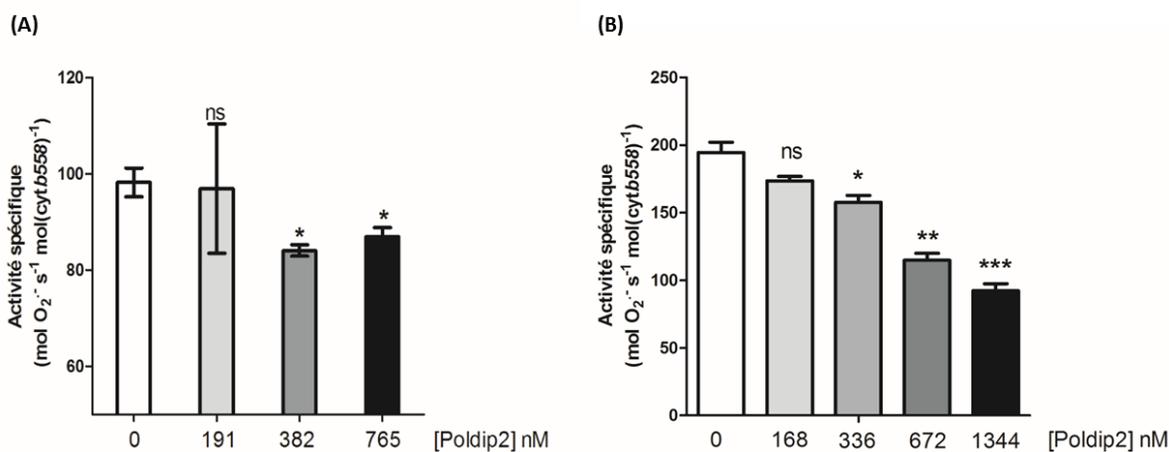


Figure III- 49 : Effet de Poldip2 sur NOX2 en présence des fractions cytosoliques et d'acide arachidonique.

(A) L'activité de NOX2 a été mesurée en suivant la réduction du cytochrome c à 550 nm. 4 nM cytb558, 269 nM p67^{phox}, 177,5 nM p47^{phox}, 136,6 nM Rac Q61L, 200 μ M NADPH, 50 μ M cyt c, 32 μ M acide arachidonique. (B) L'activité de NOX2 a été mesurée en suivant la consommation de NADPH à 340 nm. 4 nM cytb558, 269 nM p67^{phox}, 303 nM p47^{phox}, 786 nM Rac Q61L, 200 μ M NADPH, 50 μ M cyt c, 32 μ M acide arachidonique. Les valeurs sont une moyenne de 3 répétitions de mesure \pm SEM (*** : $P < 0,001$; ** : $P < 0,01$; * : $P < 0,05$; ns : non significatif).

B.I.2.c. Identification des partenaires et mode d'action de Poldip2

Dans le but de mettre en évidence le mode d'action de Poldip2 sur le complexe NADPH oxydase et d'identifier le mécanisme par lequel Poldip2 inhibe l'activité de NOX2, nous avons suivi l'activité de NOX2 en la mettant en présence de Poldip2 avec chacune des protéines cytosoliques prise séparément, et en présence ou non d'acide arachidonique (Figure III- 50).

Nous avons observé que Poldip2 n'a pas d'effet sur l'activité de NOX2 en présence d'une seule des protéines cytosoliques en présence ou d'acide arachidonique (Figure III- 50). Cela est peu étonnant dans la mesure où il est connu que p47^{phox} et Rac sont incapables d'activer seuls NOX2. Seul le couple Poldip2/p67^{phox} en présence d'acide arachidonique, augmente légèrement d'un facteur 2 l'activité (basale) de NOX2. Il est possible que Poldip2 puisse aider à l'interaction de p67^{phox} avec la fraction membranaire des neutrophiles conduisant à un système un peu plus actif.

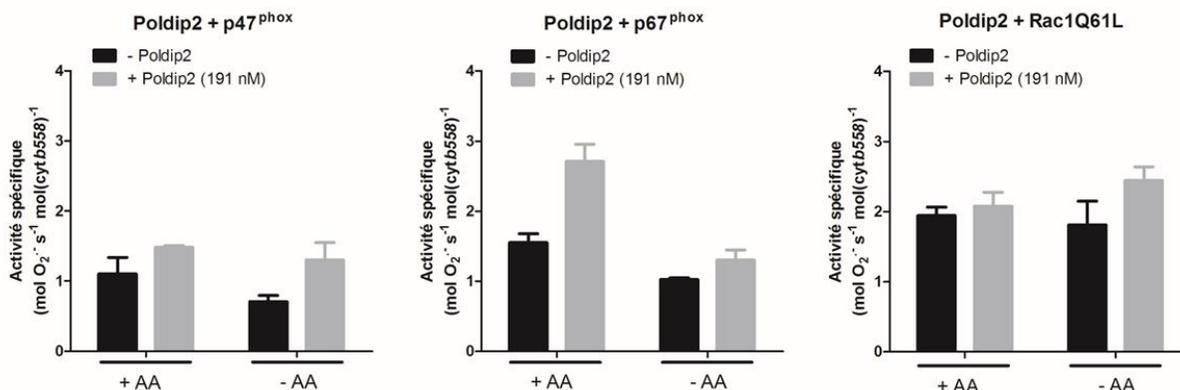


Figure III- 50 : Effet de Poldip2 combiné à une protéine cytosolique sur l'activité de NOX2 avec ou sans acide arachidonique.

L'activité de NOX2 a été mesurée en suivant la réduction du cytochrome c à 550 nm. 4nM cytb558, 269 nM p67^{phox}, 177,5 nM p47^{phox}, 136,6 nM Rac1Q61L, 200 μM NADPH, 50 μM cytc, 32 μM acide arachidonique. Les valeurs sont une moyenne de 3 répétitions de mesure ± SEM.

Dans l'expérience suivante (Figure III- 51), nous avons remplacé dans le système *cell-free* l'une des 3 protéines régulatrices du cytb558 par Poldip2 en présence et absence d'acide arachidonique. On observe, d'une manière générale, que les activités restent faibles. Les substitutions de Rac1Q61L ou p67^{phox} par Poldip2 en présence ou non d'acide arachidonique n'ont pas d'effet significatif. Ceci est cohérent avec la littérature qui montre que Rac et p67^{phox} sont essentiels à l'activité *in vitro* de l'oxydase (208, 296). Lorsque p47^{phox} est absent du système *cell-free* en présence d'acide arachidonique, p67^{phox} et Rac1Q61L, à elles seules, peuvent partiellement activer NOX2 comme cela avait déjà été observé dans la littérature (208, 296). Nous constatons alors que l'activité spécifique de NOX2 diminue de 90 mol O₂⁻·s⁻¹·mol (cytb558)⁻¹ à 70 mol O₂⁻·s⁻¹·mol (cytb558)⁻¹.

Lorsque Poldip2 est ajouté à ce système *cell-free* incomplet ne contenant que p67^{phox} et Rac, l'activité de NOX2 diminue encore plus, jusqu'à 40 mol O₂⁻·s⁻¹.mol (cytb558)⁻¹. Nous pouvons en conclure que Poldip2 ne peut pas remplacer p47^{phox}. Au contraire, il inhibe encore plus l'enzyme. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la Figure III- 44 suggérant que Poldip2 et p47^{phox} pourraient interagir avec p22^{phox} au niveau du même site d'interaction, dans la région C-terminale de p22^{phox}. La compétition entre ces deux protéines aboutirait à un complexe assemblé de manière moins fonctionnelle.

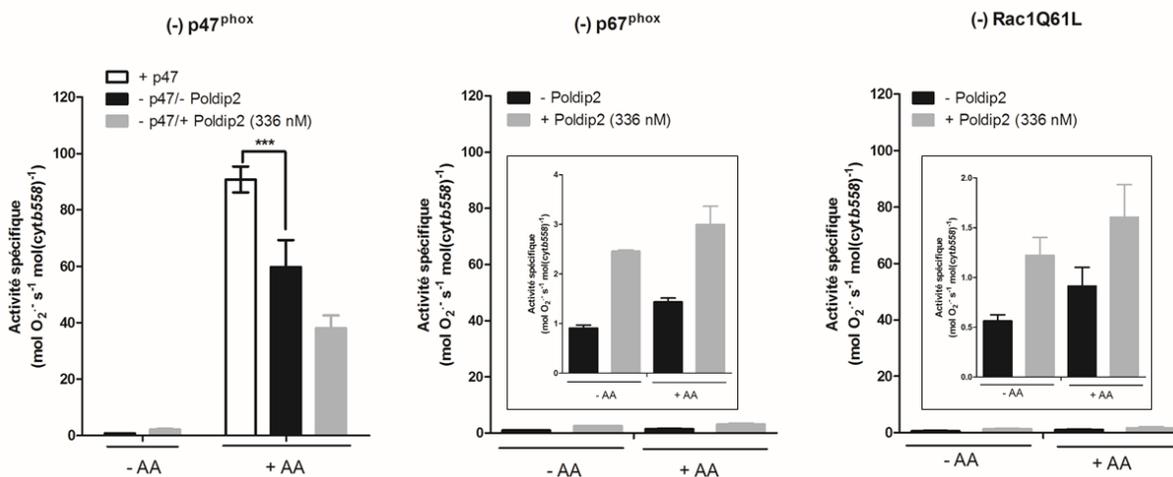


Figure III- 51 : Substitution d'une des trois protéines cytosoliques dans le système cell-free par Poldip2 avec ou sans acide arachidonique.

L'activité de NOX2 a été mesurée en suivant la consommation de NADPH à 340 nm. 4 nM cytb558, 269 nM p67^{phox}, 303 nM p47^{phox}, 786 nM Rac1Q61L, 200 μM NADPH, 54 μM acide arachidonique. Les valeurs sont une moyenne de 3 répétitions de mesure ± SEM (*** : P<0,001 ; ns : non significatif).

L'expérience précédente a été reproduite en ajoutant des concentrations croissantes de Poldip2 au complexe partiellement activé, toujours en absence de p47^{phox} (Figure III- 52). L'activité de NOX2 diminue en fonction de l'augmentation de la concentration de Poldip2. L'activité chute d'environ 40 % pour une concentration de 366 nM en Poldip2. Ce résultat est cohérent avec une interaction croissante de Poldip2 lorsque le ratio Poldip2/FM augmente que nous avons vu en Western Blot (Figure III- 40).

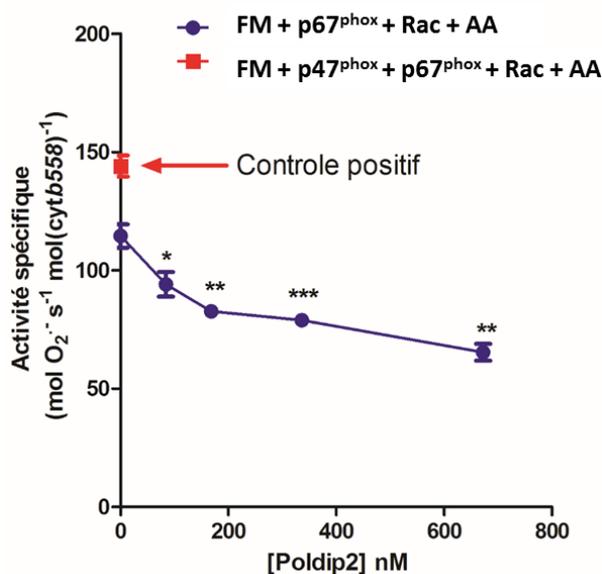


Figure III- 52 : Effet de la concentration de Poldip2 sur l'activité de NOX2 en absence de p47^{phox}.

L'activité de NOX2 a été mesurée en suivant la consommation de NADPH à 340 nm. 4 nM cytb558, 269 nM p67^{phox}, 303 nM p47^{phox}, 786 nM Rac Q61, 200 μM NADPH, 54 μM acide arachidonique (AA). Les valeurs sont une moyenne de 3 répétitions de mesure ± SEM (*** : P<0,001 ; ** : P<0,01 ; * : P<0,05 ; ns : non significatif).

Afin de vérifier que les effets observés sont bien spécifiques à Poldip2 et non dus à des artefacts, nous avons mesuré les activités de NOX2 en présence du Poldip2 avant et après dénaturation de ce dernier. La Figure III- 53 montre que Poldip2 dénaturé a perdu ses propriétés inhibitrices de l'activité de NOX2 puisque les activités en absence de Poldip2 et en présence de Poldip2 dénaturé sont les mêmes. Nous pouvons donc en conclure que la diminution d'activité de NOX2 observé en présence de Poldip2 est bien due à une interaction spécifique entre Poldip2 et le complexe oxydase.

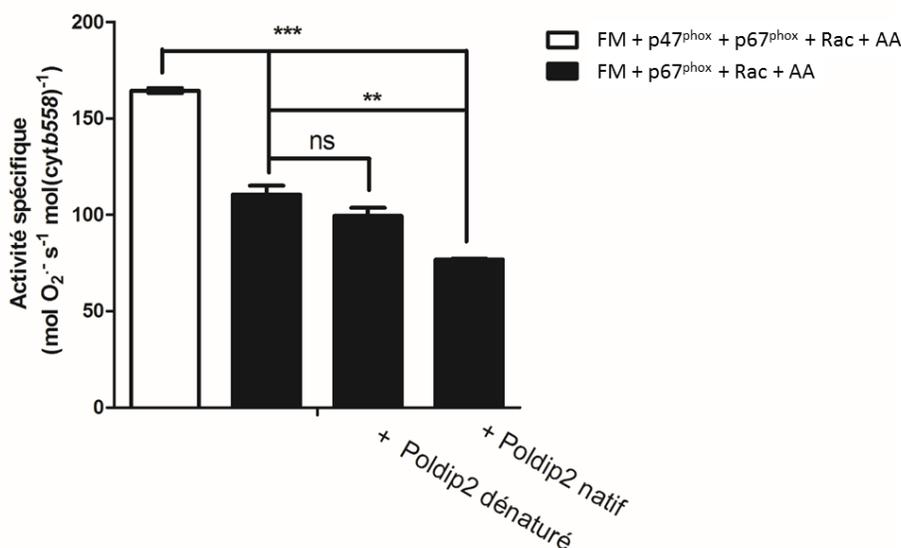


Figure III- 53 : Effet de Poldip2 dénaturé et non dénaturé sur l'activité de NOX2 en absence de p47^{phox}. 4 nM cytb558, 183 nM Poldip2, 269 nM p67^{phox}, 303 nM p47^{phox}, 786 nM Rac Q61L, 200μM NADPH, 54 μM acide arachidonique (AA). Poldip2 est dénaturé par chauffage à 100 °C pendant 15 min. Les valeurs sont une moyenne de 3 répétitions de mesure ± SEM (*** : P<0,001 ; ** : P<0,01).

B.I.2.d. Effet d'une pré-incubation avec Poldip2 sur l'activité de NOX2

La question se posait de savoir si l'ordre de mise en présence des différentes protéines pouvait agir sur l'activité de la NADPH oxydase. Nous avons donc joué sur la séquence d'ajout de Poldip2 et des protéines cytosoliques dans le mélange réactionnel et comparé les effets observés au mélange ne contenant pas de Poldip2 (contrôle). Dans la mesure contrôle (première barre dans l'histogramme), les fractions membranaires sont préalablement incubées seules dans le tampon à 25 °C pendant une minute (Figure III- 54). Les fractions cytosoliques et l'acide arachidonique sont ensuite ajoutés au mélange qui est de nouveau incubé pendant 5 min pour permettre l'assemblage du complexe NADPH oxydase. La mesure de la cinétique est faite en suivant la consommation du NADPH au cours du temps à 340 nm. La mesure faite dans ces conditions donne une bonne valeur d'activité. Lorsque Poldip2 est ajouté au mélange réactionnel en même temps que les fractions cytosoliques (deuxième barre de l'histogramme), l'activité de NOX2 chute de 160 à 120 mol O₂⁻ S⁻¹ mol (cytb558)⁻¹. Mais lorsque Poldip2 est ajouté aux fractions membranaires avant la première incubation d'une minute (troisième barre de l'histogramme), l'activité de l'enzyme revient à des valeurs semblables au contrôle. Il semble que, dans ce dernier cas, le complexe enzymatique est assemblé correctement et fonctionne normalement alors que dans l'autre cas l'assemblage n'est pas correcte ce qui mène à une diminution de l'activité de l'enzyme. Nous avons montré en Dot Blot (Figure III- 45) que Poldip2 pouvait interagir avec p47^{phox} en se fixant sur sa partie C-terminale probablement *via* son domaine YccV-like. En se fixant sur p47^{phox}, Poldip2 empêche p47^{phox} de se fixer sur son site d'interaction au niveau de la région PRR de p22^{phox}. Par ailleurs, Poldip2 peut se fixer sur la partie C-terminale de p22^{phox} *via* son domaine DUF525 et amener avec elle p47^{phox} fixée sur son domaine YccV-like. Dans cette configuration le complexe enzymatique n'est pas assemblé correctement. Cependant, lorsque Poldip2 est ajouté au mélange réactionnel avant l'ajout des protéines cytosoliques, l'interaction entre Poldip2 et p47^{phox} en solution ne se fait plus. Poldip2 se fixe sur la partie cytosolique de p22^{phox} ensuite vient p47^{phox} et se fixe dans cette même région au niveau des sites encore accessibles. De cette manière Poldip2 ne perturbe pas l'assemblage du complexe.

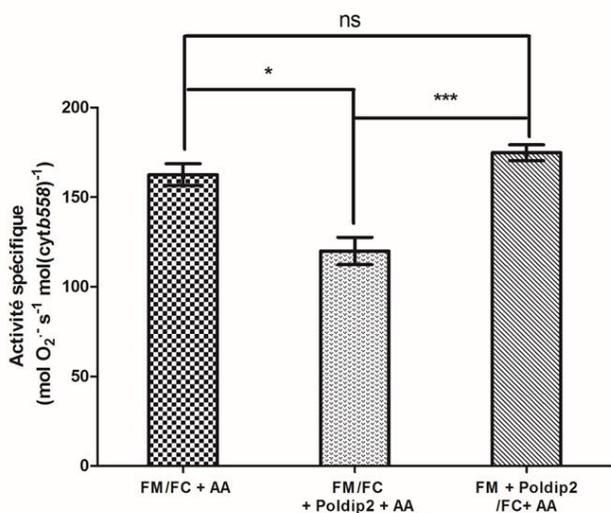


Figure III- 54 : Effet de Poldip2 sur NOX2 en fonction de la séquence d'ajout dans le mélange réactionnel.

4 nM cytb558, 336 nM Poldip2, 269 nM p67^{phox}, 303 nM p47^{phox}, 786 nM Rac Q61L, 200 μM NADPH, 32 μM acide arachidonique (AA). Les valeurs sont une moyenne de 3 répétitions de mesure ± SEM (***: P<0,001 ; *: P<0,05 ; ns : non significatif).

B.II. Discussion : Hypothèse sur une nouvelle régulation de NOX2

Le mécanisme d'activation de NOX2 a largement été décrit dans la littérature (187, 189, 208). Nous ne présentons ici qu'une version simplifiée de ce mécanisme pour faciliter d'une part l'interprétation des phénomènes observés en présence de Poldip2. D'autre part, n'ayant pas utilisé la protéine p40^{phox} dans les expériences, nous ne prenons donc pas en compte les phénomènes qui peuvent potentiellement se produire en sa présence.

Les protéines cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox} forment un dimère à l'état repos (Figure III- 57 A). Le deuxième domaine SH3(B) de p67^{phox} interagit avec le domaine PRR de p47^{phox}. Les protéines p47^{phox} et p67^{phox} sont repliées de manière à ce que leurs sites d'interaction avec NOX2 soient cachés. L'ajout d'acide arachidonique permet de mimer les phosphorylations présentes sur p47^{phox} et p67^{phox} exposant ainsi leur site d'interaction à NOX2. Par conséquent, Le dimère peut migrer vers la membrane et se fixer sur les différents sites d'interaction et activer l'enzyme NOX2 (Figure III- 58 A). La région SWITCH1 de Rac1Q61L (bloqué sous sa forme GTP) interagit alors avec le domaine TPR de p67^{phox}. Lorsque Poldip2 est introduit dans le mélange, le complexe se comporte différemment. Les interactions décrites précédemment sont modifiées pour permettre l'interaction de Poldip2 avec le complexe enzymatique. Ces dernières sont décrites dans les paragraphes suivants.

B.II.1. Au repos (absence d'acide arachidonique)

B.II.1.a. Avec les membranes

Les expériences d'interaction protéine-protéine ont montré que les deux formes de Poldip2 (29 et 39 kDa) co-précipitent avec les membranes de neutrophiles. Ce résultat est en accord avec la littérature qui

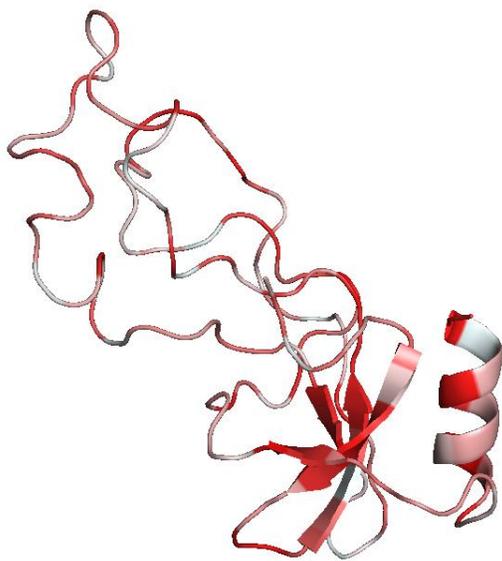


Figure III- 56 : distribution des résidus hydrophobes sur le modèle structural de la protéine Poldip2 basé sur la structure de HspQ. Code PDB : 5YCQ. En rouge : résidus hydrophobes ; en blanc : résidus non hydrophobes ; en jaune ; méthionine en position 56. Figure obtenue avec PyMol.

B.II.1.b. Avec les protéines cytosoliques

Les expériences de Dot Blot ont révélé que Poldip2 interagit fortement avec p47^{phox}. La protéine p47^{phox} (tout comme p22^{phox}) possède dans sa région C-terminal le domaine PRR connu pour interagir avec p67^{phox} au repos. Nos résultats montrent que l'interaction avec Poldip2 a probablement lieu au niveau de cette région de p47^{phox}. Cette hypothèse est confirmée par l'absence d'interaction entre Poldip2 et la forme tronquée de p47^{phox} où le domaine PRR est absent (Figure III- 45 D). Puisque p47^{phox} peut être libre en cellules et en solution, c'est-à-dire non engagé dans l'interaction avec p67^{phox} (300, 301), il est donc envisageable que le domaine YccV-like de Poldip2, présentant une structure SH3, puisse se fixer sur le PRR de p47^{phox} libre. En tenant compte de tous nos résultats, il apparaît que Poldip2 interagit avec p47^{phox} pour former l'hétérodimère p47^{phox}/Poldip2 (Figure III- 57 B). Cette interaction a une conséquence importante sur l'assemblage et l'activité de l'enzyme puisque p47^{phox} engagé dans une interaction avec Poldip2 ne peut plus amener p67^{phox} à la membrane. Par ailleurs, les expériences de Dot Blot ont montré une interaction de Poldip2 avec p67^{phox}. Cette interaction est beaucoup plus faible que celle observée avec p47^{phox}, probablement dû au fait que, sous sa forme inactive, p67^{phox} présente des interactions intramoléculaires impliquant ses domaines PRR et SH3(A).

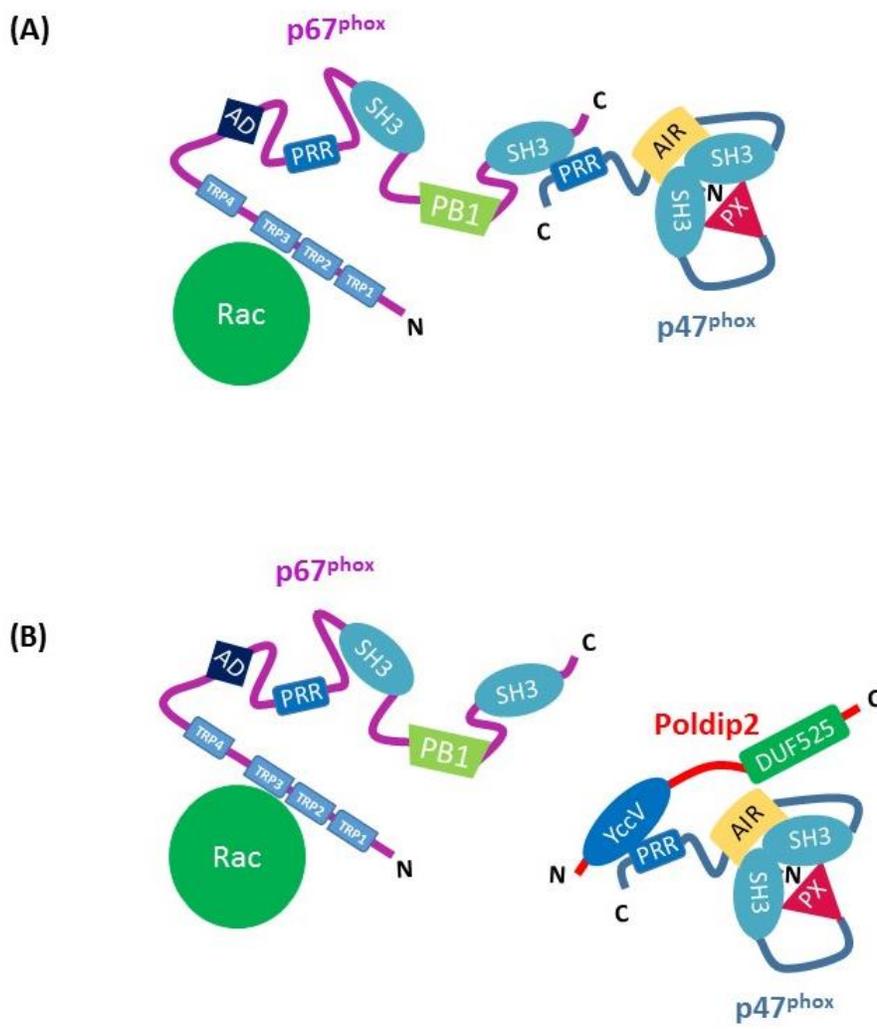


Figure III- 57 : Représentation schématique des interactions entre protéines cytosoliques au repos (sans AA).

(A) en absence de Poldip2. (B) en présence de Poldip2.

B.II.2. Activé (en présence d’acide arachidonique)

B.II.2.a. Avec les membranes seules

L’interaction de Poldip2 (les deux formes) avec la fraction membranaire des neutrophiles est plus importante en présence qu’en absence d’acide arachidonique (Figure III- 44). Poldip2 est donc sensible à l’acide gras qui modifie probablement la structure pour lui permettre d’interagir plus facilement avec la membrane de neutrophiles. Cette observation est en accord avec l’idée que Poldip2 est une phosphoprotéine, même si l’analyse de spectrométrie de masse n’a pas identifié de site de phosphorylation de la protéine recombinante. Cela suggère que la phosphorylation de Poldip2 doit être initiée par des phénomènes de signalisation cellulaire qui n’ont pas lieu lors de la surexpression de la protéine. L’interaction de Poldip2

avec la fraction membranaire de neutrophiles se fait probablement comme cela a été proposé pour NOX4/p22^{phox} sur le domaine PRR de p22^{phox}. Nos résultats montrent que cette interaction avec le complexe membranaire aide à la fixation de p67^{phox} puisque nous constatons une légère activation de NOX2 en l'absence de p47^{phox} et Rac (Figure III- 50).

B.II.2.b. En présence des protéines cytosoliques

Lors de l'activation par l'acide arachidonique, les protéines cytosoliques changent de conformation permettant leur assemblage avec leur partenaire membranaire NOX2/p22^{phox} (Figure III- 58 A). Bien que ces interactions soient encore à l'étude, cet édifice est déjà largement décrit dans la littérature.

En présence des protéines cytosoliques, nous avons montré que Poldip2 co-précipite également avec la fraction membranaire mais en plus faible quantité (Figure III- 44). Nous constatons aussi que p47^{phox}, dans sa forme activée, s'accroche moins à la membrane quand Poldip2 est présent (puisque son signal dans le surnageant est plus important en présence de Poldip2). C'est cohérent avec l'inhibition observée lorsque Poldip2 est ajouté en même temps que les autres protéines cytosoliques. Cela suggère qu'un des mécanismes d'inhibition de Poldip2 sur l'activité de NOX2 est dû à l'interaction de p47^{phox} avec Poldip2, l'empêchant ainsi d'amener p67^{phox} à la membrane. Alternativement, il est possible que l'heterodimère Poldip2/p47^{phox} migre vers la membrane, interagisse avec la membrane via les domaines DUF525 et PX de Poldip2 et p47^{phox}, respectivement.

Par ailleurs, nous avons aussi observé que, dans les expériences réalisées en Western Blot, p67^{phox} se fixe de manière équivalente à la fraction membranaire de neutrophiles que ce soit en présence ou en absence de Poldip2 (Figure III- 44). Il semble donc que l'ajout de Poldip2 ne gêne pas l'interaction de p67^{phox} avec NOX2. Néanmoins, en absence de p47^{phox}, une concentration croissante de Poldip2 augmente l'inhibition du complexe oxydase activé (Figure III- 52). Même si Poldip2 jouerait ainsi le rôle de p47^{phox} en amenant p67^{phox} à la membrane, on peut supposer que dans ce cas l'organisation du complexe est moins optimale. Poldip2 pourrait interagir avec p67^{phox} sur son domaine PRR devenu accessible par l'effet de l'acide arachidonique. Le nouveau complexe enzymatique ainsi formé peut subir des torsions au niveau des régions cytosoliques flexibles de NOX2 conduisant ainsi un à réarrangement des domaines NADPH et FAD moins favorable aux transferts d'électrons et par conséquent à une inhibition de l'enzyme. En ce qui concerne Rac, les westerns blot ont montré une légère diminution de son interaction avec les fractions membranaires de neutrophiles en présence de Poldip2 (Figure III- 44). Étant donné que Poldip2 est capable de se fixer de manière non spécifique à la membrane plasmique, on ne peut donc pas exclure qu'elle puisse saturer les sites d'interaction de Rac, limitant ainsi sa fixation à la membrane.

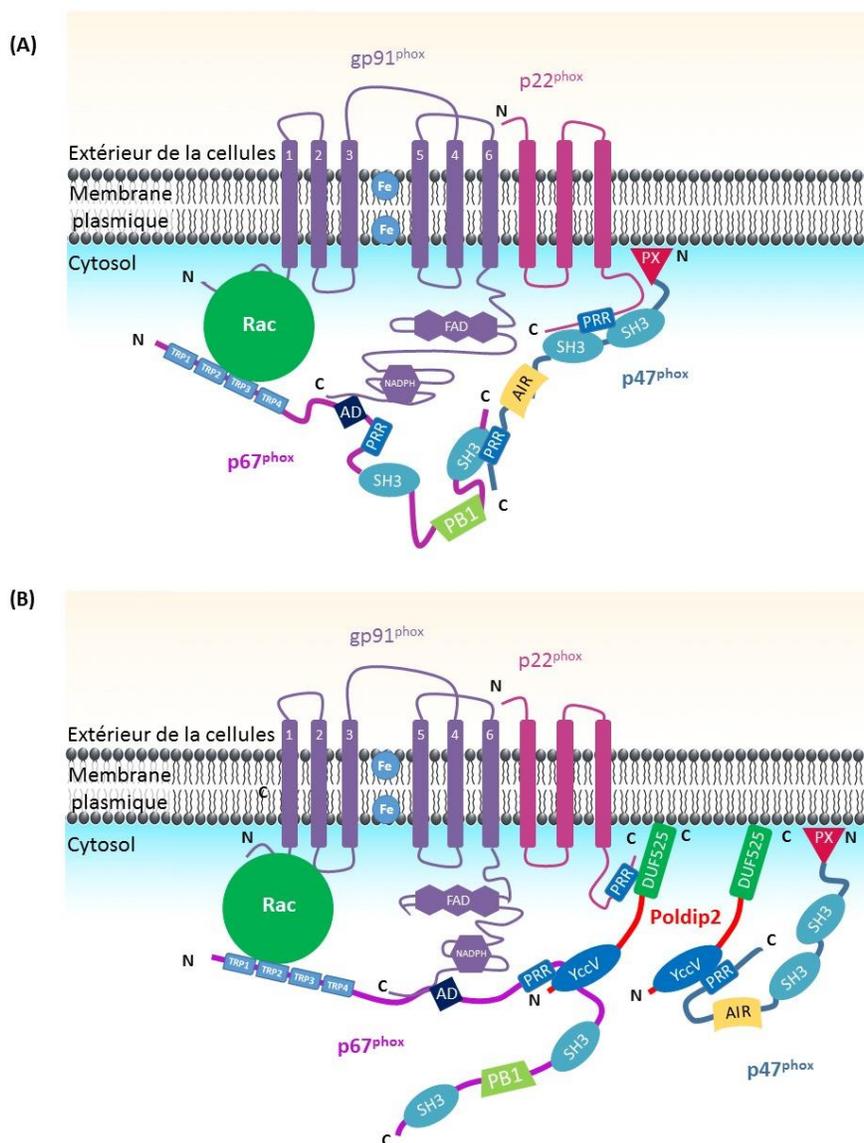


Figure III- 58 : Représentation schématique des interactions des protéines cytosoliques avec le cytochrome b558 activé (avec AA).
 (A) En absence de Poldip2. (B) En présence de Poldip2.

B.III. Effet de Poldip2 sur NOX2 *in cellulo*

Les expériences précédemment réalisées ont montré que Poldip2 inhibe l'activité de NOX2. Cette inhibition, dans des conditions physiologiques, pourrait avoir des conséquences biologiques importantes. Par ailleurs, il est connu dans la littérature que les neutrophiles produisent beaucoup plus de ROS que les autres cellules du système immunitaire telles que monocytes et macrophages (228, 302–304). En croisant cette information avec les résultats précédemment montrés, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette différence d'activité de NOX2 entre les différents types cellulaires pourrait être liée à la présence de Poldip2

dans ces cellules. Par conséquent, nous avons tout d'abord cherché à vérifier si Poldip2 est exprimé dans les monocytes et macrophages. Ces travaux ont été menés en collaboration avec l'équipe de My-Chan Pham Dang au Centre de Recherche sur l'Inflammation (CRI, Bichat). Les monocytes et neutrophiles ont été isolés à partir de sang humain **d'un même donneur**. Une partie des monocytes ont été mis en culture dans du milieu RPMI supplémenté de sérum bovin et d'antibiotiques et différenciés en macrophages de type M1 et M2 en ajoutant respectivement les facteurs de différenciation GM-CSF et MCSF. Les cellules isolées sont lysées et les extraits sont analysés par Western Blot. La Figure III- 59 confirme la présence de NOX2 dans tous ces types cellulaires. Les monocytes expriment beaucoup moins de gp91^{phox} et p22^{phox} que les autres types cellulaires. Cela pourrait être une des raisons pour laquelle la production de ROS est moindre. Les macrophages, quant à eux, semblent exprimer plus de protéines gp91^{phox} que les neutrophiles. Cependant il est assez difficile d'estimer la quantité de gp91^{phox} du fait du signal en smire dû aux glycosylations de la protéine. Nous nous basons donc sur l'expression de p22^{phox}. Celle-ci est similaire dans les deux types cellulaires. En tenant compte du fait que p22^{phox} et gp91^{phox} sont présents en des proportions stœchiométriques dans la cellule (167), il est plus probable que l'expression de NOX2 soit similaire dans les neutrophiles et les macrophages. Néanmoins, il est décrit dans la littérature que les macrophages produisent moins de ROS que les neutrophiles et les monocytes (304), et avec une cinétique différente (303). Étant donné le niveau élevé d'expression de NOX2 dans les macrophages, le faible niveau de production de ROS ne peut donc pas simplement lui être corrélé. D'autre part le Western Blot révèle la présence Poldip2 dans les monocytes et surtout dans les macrophages. En tenant compte de ce dernier résultat en plus de ce qui est décrit la littérature, il est possible que Poldip2 inhibe NOX2 dans les monocytes et macrophages. Néanmoins à ce stade des expérimentations, les données ne sont pas suffisantes pour confirmer cette hypothèse avec certitude.

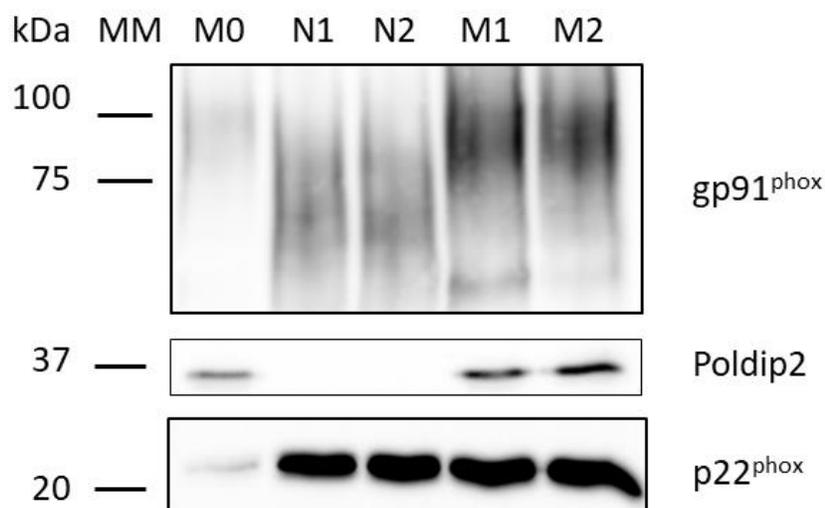


Figure III- 59 : comparaison de l'expression de gp91^{phox}, Poldip2 et p22^{phox} dans les monocytes, neutrophiles et macrophages.

M0 : monocyte ; N1 et N2 : neutrophile ; M1 et M2 macrophage type M1 et M2. 12 µg de protéines totales (lysats cellulaires) sont déposés. Tous les échantillons sont issus du même donneur.

Fort de ces premières observations, nous avons entamé des expériences pour éteindre l'expression de Poldip2 dans les monocytes par transfection avec des SiRNA dirigés contre l'ARNm de cette protéine dans le but de comparer le niveau de production de ROS avant et après transfection. Après purification, les cellules de monocytes humains ont été traitées pendant 60 h avec des concentrations croissantes (10, 25, 50, 75, 100, 200 nM) de SiRNA dirigé contre l'ARNm de Poldip2 (SiP2) et des SiRNA contrôle non spécifique de l'ARNm de Poldip2, communément appelés SiScramble (SCR). Le Western Blot (Figure III- 60 B) montre une diminution de l'expression de Poldip2 pour deux concentrations de SiRNA (25 et 50 nM). Le contrôle des dépôts sur gel fait par coloration au rouge ponceau de la membrane après transfert (Figure III- 60 A) confirme que la diminution d'expression de Poldip2 dans les monocytes est bien spécifique au traitement par les SiRNA.

Ces résultats, assez encourageant, nous ont permis de définir la concentration en SiRNA permettant de réduire l'expression de Poldip2. Nous pouvons maintenant envisager de traiter les monocytes par 50 nM de SiRNA et de comparer la production de ROS dans ces cellules avec celles traitées par les SiRNA contrôle (SCR). Étant donnée les délais de la thèse, les mesures de ROS après transfection des monocytes n'ont pas pu être faites. Néanmoins, si après transfection, le niveau de ROS produit augmente parallèlement à la diminution d'expression de Poldip2, les effets sur NOX2 observés *in vivo* seront donc cohérents avec ceux obtenus *in vitro*, ce qui permettra de confirmer le nouveau mécanisme de régulation de NOX2 par Poldip2.

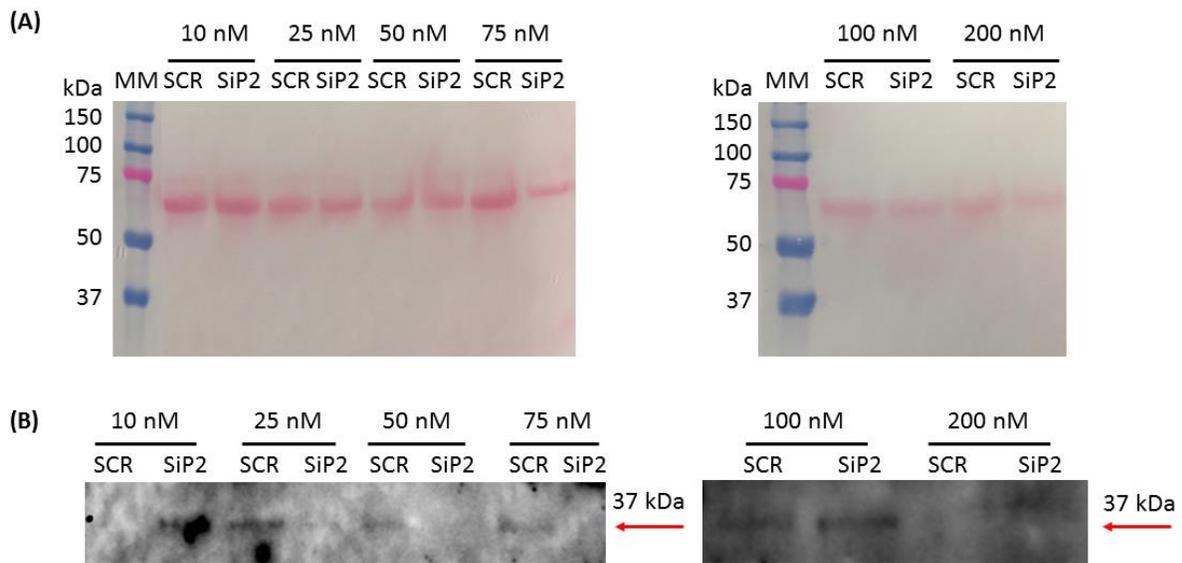


Figure III- 60 : Expression de Poldip2 dans les monocytes isolés de sang humain après traitement par les SiRNA pendant 60 h.

(A) Coloration au rouge ponceau de la membrane après l'étape de transfert. (B) Western Blot marqué par un anticorps anti-Poldip2 (Abcam). SCR : monocytes traités par des SiRNA contrôle (SiScramble) ; SiP2 : monocytes traités par des SiRNA dirigés contre l'ARNm de Poldip2. 10 μ g de lysat total sont déposés sur le gel.

CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I. Conclusion

Au cours de cette thèse, nous avons réussi à exprimer Poldip2 (rat) recombinant dans un système d'expression de levures pour le produire dans le milieu de culture. D'autres systèmes d'expression ont été réalisés (expression dans *E. coli* et *in vitro*) sur la protéine humaine avec succès.

Étant donnée la présence de sites de phosphorylation sur la séquence de Poldip2, nous avons choisi de poursuivre les expériences avec la protéine produite en levure puisque seul ce système d'expression est capable de faire ce type de modifications post-traductionnelles. La protéine Poldip2 a donc été produite à grande échelle après optimisation des conditions de culture et purifiée à partir du surnageant de culture. Plusieurs protocoles de purification par des méthodes de chromatographie ont été mis au point pour aboutir à celui qui permet d'obtenir le meilleur rendement et pureté de la protéine. Finalement deux formes de Poldip2 ont pu être co-purifiées.

Les analyses de spectrométrie de masse des formes purifiées ont permis de vérifier que les deux formes obtenues à 39 et 29 kDa correspondent bien à la protéine Poldip2 (rat), tronquée en N-terminal. Ces deux formes ne possèdent pas de modifications post-traductionnelles de type phosphorylation sur leur séquence. Les analyses de dichroïsme circulaire et d'infrarouge ainsi que les prédictions de structures faites par le logiciel SWISS MODEL Homology modeling basé sur les structures des protéines ApaG et HspQ ont montré que Poldip2 est une protéine globulaire contenant deux domaines YccV-Like et DUF525. Sa structure contient en partant de N-ter à C-ter des feuillets β de type SH3 et une hélice α (domaine YccV-like) suivi d'une autre structure en feuillets β . Les analyses de comparaison de séquence entre les espèces nous mènent à penser que ces formes tronquées de Poldip2 pourrait cependant être fonctionnelles.

Les expériences réalisées avec les cellules HEK293 exprimant NOX4 et p22^{phox} ont montré que l'activité de NOX4 détectée au niveau du noyau et des mitochondries, est augmentée d'un facteur 2 après ajout de Poldip2 recombinant, en accord avec son effet sur NOX4 décrit dans la littérature. La protéine (rat) recombinante produite est donc fonctionnelle. Les expériences réalisées sur la lignée de cellules HEK293 ont permis de révéler une colocalisation de NOX4 et Poldip2 endogène dans le noyau et les mitochondries.

Une fois la fonctionnalité de la protéine Poldip2 vérifiée, nous avons utilisé la protéine recombinante pour étudier son effet sur NOX2. Nous avons étudié dans un premier temps son interaction avec le complexe enzymatique et son effet sur l'assemblage du complexe NADPH oxydase, puis, dans un deuxième temps, son effet sur l'activité enzymatique.

Des tests de co-précipitation ont été réalisés pour étudier l'interaction de Poldip2 avec la fraction membranaire de neutrophiles. Ces tests ont révélé que les deux formes tronquées de Poldip2 interagissent avec la fraction membranaire de neutrophiles, avec une interaction préférentielle pour la forme la plus

courte. L'interaction de Poldip2 avec la fraction membranaire de neutrophile augmente de façon concentration-dépendante. Les interactions avec les fractions membranaires des cellules Cos 7 qui expriment ou non NOX2 ont été étudiées pour déterminer si les interactions observées avec la fraction membranaire de neutrophile est bien spécifique de NOX2. Les résultats montrent que Poldip2 interagit avec NOX2 mais aussi avec les membranes en de moindres proportions. Nous avons attribué cette propriété au domaine DUF525 de Poldip2 puisque ce domaine est présent dans les deux formes de Poldip2. On suppose aussi que l'hélice α , présente sur le domaine YccV-like, conservée dans les deux formes, pourrait participer à l'interaction avec la membrane. Par ailleurs, l'interaction de Poldip2 avec les fractions membranaires de neutrophiles est augmentée en présence d'acide arachidonique, suggérant des modifications de structure de cette protéine favorisant son interaction avec NOX2. L'étude de l'interaction de Poldip2 avec NOX2 en présence des partenaires cytosoliques révèle que la présence de Poldip2 déstabilise l'interaction de p47^{phox} avec NOX2 lorsque le complexe enzymatique est activé mais aussi Rac, de manière indépendante de l'état actif ou non de l'enzyme. Finalement, nos résultats montrent une interaction directe de Poldip2 avec p47^{phox} en absence de fractions membranaires, très probablement sur la région PRR de cette protéine. L'interaction de Poldip2 avec p67^{phox} est aussi présente mais beaucoup plus faible que p47^{phox}. La protéine p67^{phox} dans son état fermé, ses domaines d'interaction avec Poldip2 seraient moins accessibles d'où la faible intensité de signal.

Les tests d'activités réalisés sur NOX2 indiquent que Poldip2, seule, ne semble pas être un activateur de NOX2. L'ajout de Poldip2 à une seule des protéines cytosoliques n'a pas d'effet sur l'activité de NOX2, sauf pour le cas où Poldip2 est ajouté à p67^{phox} en présence d'acide arachidonique suggérant que Poldip2 aide à amener p67^{phox} à la membrane. Les tests de remplacement d'une protéine cytosolique par Poldip2 montrent, au contraire, une inhibition de l'activité de NOX2, notamment quand p47^{phox} est absente. Cette inhibition est dépendante de la concentration de Poldip2 et cohérente avec l'interaction croissante de Poldip2 avec NOX2. Au vu de ces résultats, il nous semblait intéressant de voir si l'effet de Poldip2 était influencé par l'ordre d'ajout des protéines cytosoliques. L'expérience réalisée montre que Poldip2 inhibe NOX2 lorsqu'il est ajouté dans le mélange réactionnel en même temps que les autres protéines cytosoliques. Dans le cas où Poldip2 est pré-incubé avec NOX2, son effet inhibiteur est aboli. Ce dernier résultat, en association avec l'étude d'interaction de Poldip2 avec les protéines cytosoliques, suggère que l'inhibition de NOX2 par Poldip2 est due à son interaction avec p47^{phox}, l'empêchant ainsi d'amener p67^{phox} à la membrane. Il n'est pas exclu non plus que l'hétérodimère Poldip2/p47^{phox} interagisse avec la membrane respectivement *via* les domaines DUF525 et PX de Poldip2 et p47^{phox}.

L'ensemble des résultats d'interactions et d'activités montrent que Poldip2 interagit avec le complexe enzymatique et inhibe son activité. L'interaction de Poldip2 a pour conséquence la formation d'un

complexe ou les protéines sont réarrangées de telle manière que les domaines FAD et NADPH ne permettent pas un transfert optimal des électrons.

II. Perspectives

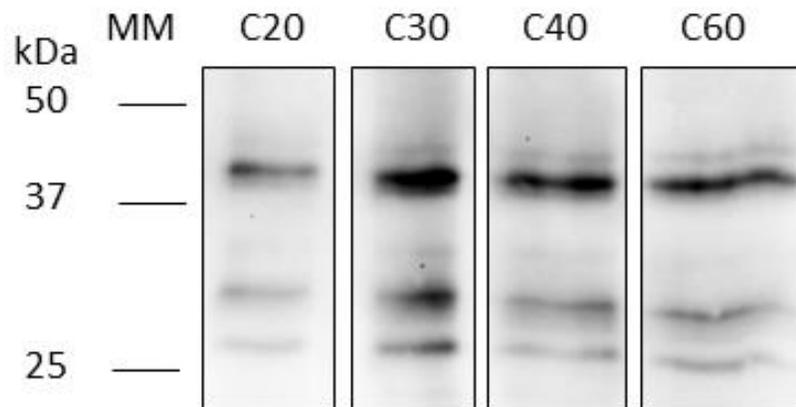
Les expériences réalisées dans ce travail de thèse ont permis de mettre en évidence *in vitro* un nouveau mécanisme d'inhibition de NOX2. Ces résultats sont assez prometteurs et méritent d'être approfondis. Il serait donc intéressant de produire séparément chaque domaine (DUF525 et YccV-like) de la protéine Poldip2 afin de vérifier lequel de ces deux domaines est impliqué dans l'activation de NOX2 ainsi que dans les interactions protéine-protéine avec cette enzyme. On peut également envisager que la séparation des deux domaines faciliterait leur production de manière hétérologue. Ainsi en espérant augmenter les rendements de purification de ces domaines on pourra mener plus facilement les études par cristallographie aux rayons X ou par RMN de ces domaines aboutissant à leur structure tridimensionnelle.

Les résultats obtenus *in vitro* devront être confirmés en cellules. Cette étude a déjà été initiée à la fin de ce projet. En effet la présence de Poldip2 endogène dans les monocytes et les macrophages est cohérente avec l'activité plus faible de NOX2 dans ces cellules par rapport à la forte activité en neutrophiles qui n'expriment pas Poldip2. Ces résultats préliminaires semblent aller dans le sens de notre hypothèse. Pour confirmer cette hypothèse, il faudra moduler l'expression de Poldip2 dans ces cellules et observer les effets sur l'activité de NOX2. Les expériences ont déjà été entamées dans ce projet. Les résultats préliminaires ont permis de déterminer la concentration idéale en SiRNA pour éteindre l'expression de Poldip2 dans les monocytes. Il faudra maintenant mesurer les ROS produit par NOX2 dans les monocytes après transfection. Cette dernière partie du projet présente quelques contraintes techniques dont il faudra s'affranchir. Premièrement les monocytes comme les macrophages expriment NOX4 en plus de NOX2. Si on mesure la production de ROS dans ces cellules après extinction du gène de Poldip2, il sera difficile de distinguer l'effet sur l'un ou l'autre isoforme. En effet, en l'absence d'un inhibiteur spécifique de NOX4, on risque de mesurer un effet combiné sur les deux enzymes : une diminution de l'activité de NOX4 associée à une augmentation de l'activité de NOX2. Dans ce cas une option peut être envisagée. Il faudra faire phagocyter les cellules pour recruter NOX2 dans le phagosome. Après cassage des cellules et isolement des phagosomes, on pourra mesurer dans ce compartiment les ROS qui émanent de NOX2. Cette méthode a déjà été décrite (305, 306) mais ne semble pas facile à mettre en place. Nous ne pouvons pas non plus garantir de pouvoir mesurer les ROS avec succès après isolement des phagosomes. On peut également envisager de transfecter des neutrophiles, qui semblent être un meilleur modèle étant donné l'absence d'expression de Poldip2 et NOX4, avec des ARNm de Poldip2 pour induire son expression. Néanmoins, le maintien en culture de ces cellules, connues pour avoir une durée de vie assez courte, représente encore un

défi technique. Plus récemment, une étude publiée par Monceaux *et al.* (2018) décrit un protocole qui permet de maintenir les neutrophiles en culture pendant 24 h dans du milieu RPMI supplémenté de glucose. Ce protocole a été testé dans notre laboratoire et a permis de maintenir les neutrophiles viables jusqu'à 48 h avec une conservation de leur activité (production de ROS et phagocytose). L'équipe de Monceaux a également réussi à transférer par électrolocation des neutrophiles par des plasmides ou des SiRNA (307). Ces avancées techniques sont très importantes et prometteuses pour le projet à venir.

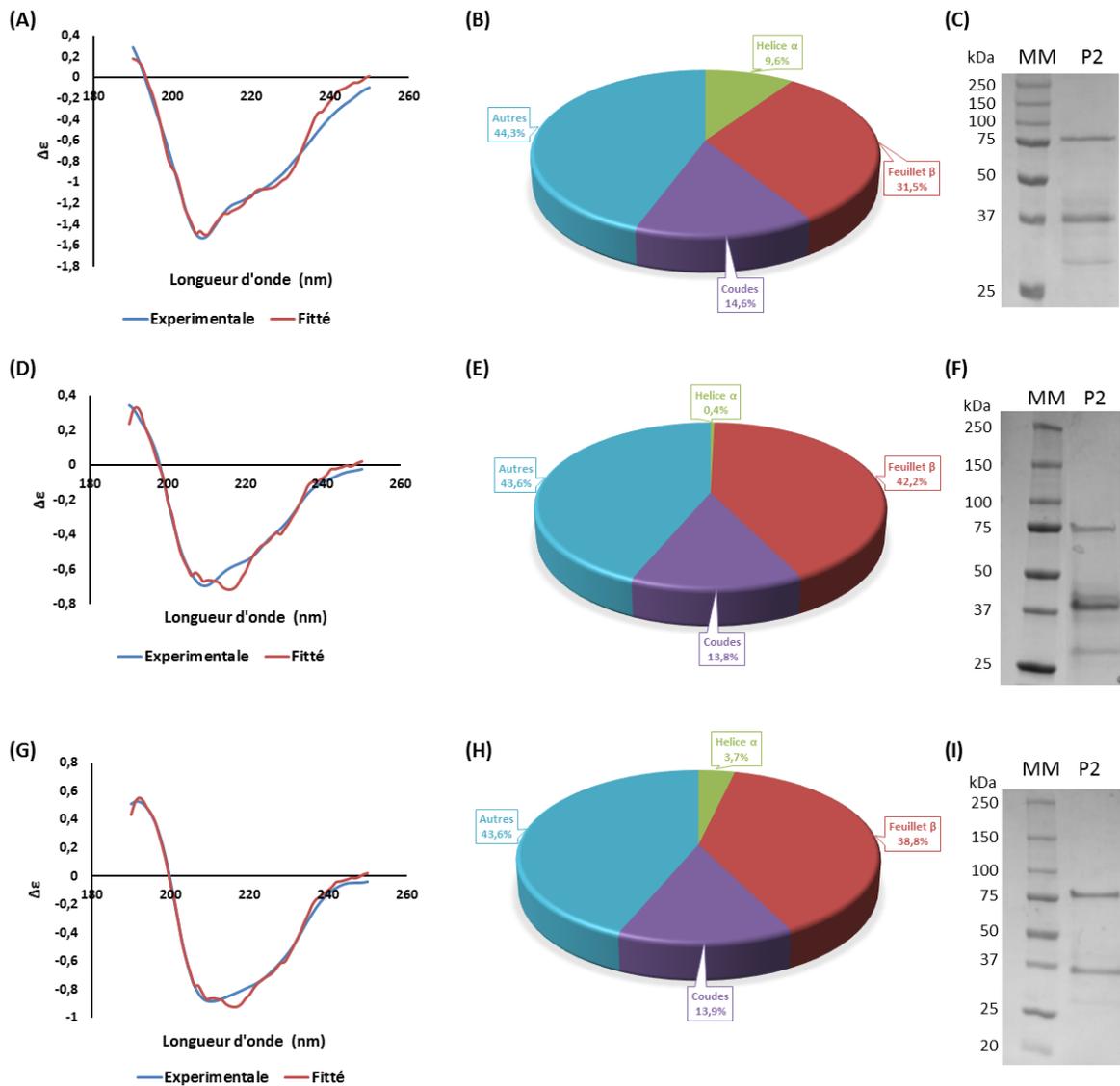
En plus de ces deux approches, dont l'avantage principal est de travailler avec des cellules humaines, on peut envisager deux autres possibilités qui permettraient également de vérifier *in cellulo* l'inhibition de NOX2 par Poldip2. Premièrement on pourrait isoler des macrophages de souris *knockout* NOX4. Ce système, en plus de s'affranchir de l'effet croisé sur les deux enzymes, nous permettrait également de vérifier si l'expression de Poldip2 peut être indépendante de NOX4. Deuxièmement on pourrait envisager de transférer la lignée de cellules PLB avec le cDNA de Poldip2. Cette lignée cellulaire qui peut être différenciée en neutrophiles est plus facile à manipuler.

CHAPITRE V : ANNEXES



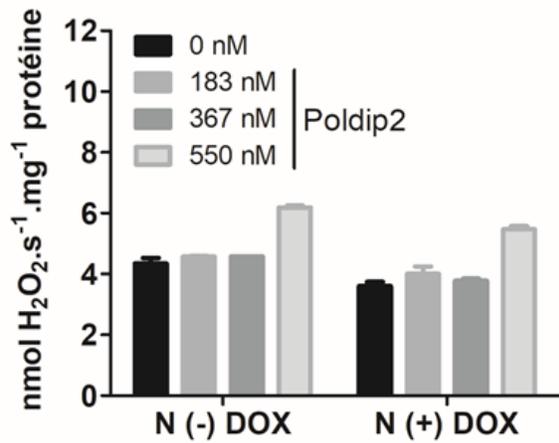
Annexe 1 : Précipitation au sulfate d'ammonium des protéines.

25 μ l d'échantillons sont déposés sur gel. La révélation du Western Blot a été effectuée avec une sonde anti-histidine (Thermo Scientifique). C20 : culot précipité à 20 % ; C30 : culot précipité à 30 % ; C40 : culot précipité à 40 % ; C60 : culot précipité à 60 %.



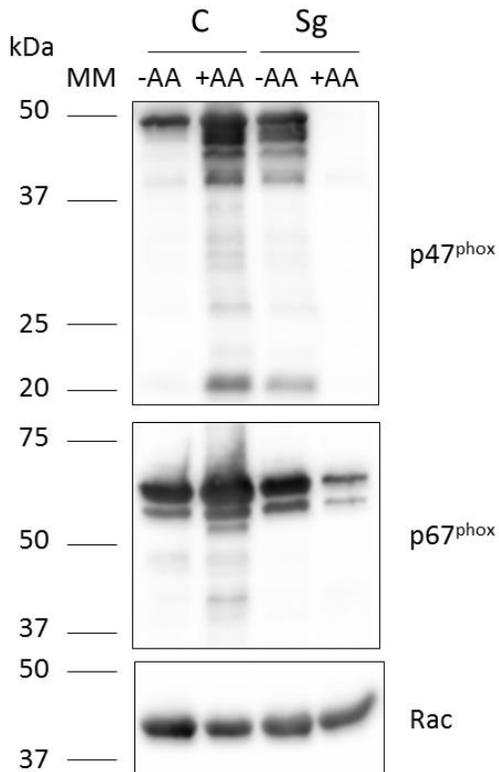
Annexe 2 : Analyse de la structure secondaire de Poldip2 par SRCD.

(A, D, G) Spectre SRCD de la protéine Poldip2 purifiée. (B, E, H) Composition en structure secondaire donnée par le logiciel bestsel à partir du spectre SRCD avec un scale factor de 1,5 et une largeur de spectre allant 190 à 250 nm. (C) Poldip2 purifié par chromatographie d'affinité au Nickel. (F) Poldip2 purifié par chromatographie d'affinité au Nickel et concentré au speed vac à 65 °C. (I) Poldip2 purifié par précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie d'affinité au Nickel.



Annexe 3 : Effet de Poldip2 recombinant de rat sur l'activité de NOX4 dans les fractions nucléaires après 12 h de traitement à 10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ doxycycline.

Les fractions sont enrichies avec un kit. Les mesures sont faites sur 30 μg de fractions. Les barres d'erreur sont calculées sur deux répétitions d'expérience.



Annexe 4 : Effet de l'Acide Arachidonique sur la sédimentation par centrifugation des protéines cytosolique.

En partant du haut vers le bas : Western Blot marqué avec un anticorps anti-p47^{phox} (panel 1), anti-p67^{phox} (panel 2), anti-Rac (panel 3). C : culot ; Sg : surnageant ; AA : acide arachidonique.

REFERENCES

1. Lehninger, A. L. (1982) *Principle of Biochemistry*, First Edition, Sally Anderson, June Fox, USA
2. Lesk, A. M. (2016) *Introduction to Protein Science Architecture, Function, and Genomics*, Third Edition, Oxford University Press, United Kingdom
3. Pawson, T., and Gish, G. D. (2005) Protein-Protein Interaction: A Common Theme in Cell Biology. in *Protein-Protein Interaction : A molecular Clonning Manual*, Second Edition, p. 938, Erica A. Golemis et Peter D. Adams, USA
4. Voet, D., and Voet, J. G. (1995) *Biochemistry*, Second Edition, John Wiley and Sons, INC, Canada
5. Cheng, X., Kanki, T., Fukuoh, A., Ohgaki, K., Takeya, R., Aoki, Y., Hamasaki, N., and Kang, D. (2005) PDIP38 Associates with Proteins Constituting the Mitochondrial DNA Nucleoid. *J. Biochem. (Tokyo)*. **138**, 673–678
6. Klaile, E., Müller, M. M., Kannicht, C., Otto, W., Singer, B. B., Reutter, W., Öbrink, B., and Lucka, L. (2007) The Cell Adhesion Receptor Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 Regulates Nucleocytoplasmic Trafficking of DNA Polymerase δ -Interacting Protein 38. *J. Biol. Chem.* **282**, 26629–26640
7. Xie, B., Li, H., Wang, Q., Xie, S., Rahmeh, A., Dai, W., and Lee, M. Y. W. T. (2005) Further Characterization of Human DNA Polymerase δ Interacting Protein 38. *J. Biol. Chem.* **280**, 22375–22384
8. Liu, L., Rodriguez-Belmonte, E. M., Mazloun, N., Xie, B., and Lee, M. Y. W. T. (2003) Identification of a Novel Protein, PDIP38, That Interacts with the p50 Subunit of DNA Polymerase δ and Proliferating Cell Nuclear Antigen. *J. Biol. Chem.* **278**, 10041–10047
9. Arakaki, N., Nishihama, T., Kohda, A., Owaki, H., Kuramoto, Y., Abe, R., Kita, T., Suenaga, M., Himeda, T., Kuwajima, M., Shibata, H., and Higuti, T. (2006) Regulation of mitochondrial morphology and cell survival by Mitogenin I and mitochondrial single-stranded DNA binding protein. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1760**, 1364–1372
10. Chen, C.-P., Chiang, S., Wang, K.-L., Cho, F.-N., Chen, M., Chern, S.-R., Wu, P.-S., Chen, Y.-N., Chen, S.-W., Chang, S.-P., Chen, W.-L., and Wang, W. (2016) Prenatal diagnosis of mosaic small supernumerary marker chromosome 17 associated with ventricular septal defect, developmental delay, and speech delay. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* **55**, 419–422
11. Hernandez, M. S., Lassègue, B., and Griendling, K. K. (2017) Polymerase δ -interacting Protein 2: A Multifunctional Protein. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **69**, 335–342
12. Winston, J. T., Koepf, D. M., Zhu, C., Elledge, S. J., and Harper, J. W. (1999) A family of mammalian F-box proteins. *Curr. Biol.* **9**, 1180-S3
13. Ilyin, G. P., Rialland, M., Pigeon, C., and Guguen-Guillouzo, C. (2000) cDNA Cloning and Expression Analysis of New Members of the Mammalian F-Box Protein Family. *Genomics.* **67**, 40–47
14. d'Alençon, E., Taghbalout, A., Bristow, C., Kern, R., Aflalo, R., and Kohiyama, M. (2003) Isolation of a New Hemimethylated DNA Binding Protein Which Regulates dnaA Gene Expression. *J. Bacteriol.* **185**, 2967–2971
15. Shimuta, T., Nakano, K., Yamaguchi, Y., Ozaki, S., Fujimitsu, K., Matsunaga, C., Noguchi, K., Emoto, A., and Katayama, T. (2004) Novel heat shock protein HspQ stimulates the degradation of

- mutant DnaA protein in Escherichia coli: Novel heat shock protein HspQ. *Genes Cells*. **9**, 1151–1166
16. Guillian, T. A., Bailey, L. J., Brissett, N. C., and Doherty, A. J. (2016) PolDIP2 interacts with human PrimPol and enhances its DNA polymerase activities. *Nucleic Acids Res.* **44**, 3317–3329
 17. Maga, G., Crespan, E., Markkanen, E., Imhof, R., Furrer, A., Villani, G., Hubscher, U., and van Loon, B. (2013) DNA polymerase -interacting protein 2 is a processivity factor for DNA polymerase during 8-oxo-7,8-dihydroguanine bypass. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 18850–18855
 18. Chen, Y.-C., Kuo, C.-C., Chian, C.-F., Tzao, C., Chang, S.-Y., Shih, Y.-L., Lin, Y.-W., Yu, M.-H., and Su, H.-Y. (2018) Knockdown of POLDIP2 suppresses tumor growth and invasion capacity and is linked to unfavorable transformation ability and metastatic feature in non-small cell lung cancer. *Exp. Cell Res.* **368**, 42–49
 19. Lyle, A. N., Deshpande, N. N., Taniyama, Y., Seidel-Rogol, B., Pounkova, L., Du, P., Papaharalambus, C., Lassègue, B., and Griendling, K. K. (2009) Poldip2, a Novel Regulator of Nox4 and Cytoskeletal Integrity in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* **105**, 249–259
 20. Katsumura, S., Izu, Y., Yamada, T., Griendling, K., Harada, K., Noda, M., and Ezura, Y. (2017) FGF Suppresses Poldip2 Expression in Osteoblasts: FGF SUPPRESSES POLDIP2 EXPRESSION. *J. Cell. Biochem.* **118**, 1670–1677
 21. Fortunato, R. S., Braga, W. M. O., Ortenzi, V. H., Rodrigues, D. C., Andrade, B. M., Miranda-Alves, L., Rondinelli, E., Dupuy, C., Ferreira, A. C. F., and Carvalho, D. P. (2013) Sexual Dimorphism of Thyroid Reactive Oxygen Species Production Due to Higher NADPH Oxidase 4 Expression in Female Thyroid Glands. *Thyroid*. **23**, 111–119
 22. Paredes, F., Sheldon, K., Lassègue, B., Williams, H. C., Faidley, E. A., Benavides, G. A., Torres, G., Sanhueza-Olivares, F., Yeligar, S. M., Griendling, K. K., Darley-Usmar, V., and San Martin, A. (2018) Poldip2 is an oxygen-sensitive protein that controls PDH and α KGDH lipoylation and activation to support metabolic adaptation in hypoxia and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 1789–1794
 23. Lange, S. S., Takata, K., and Wood, R. D. (2011) DNA polymerases and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **11**, 96–110
 24. Tissier, A., Janel-Bintz, R., Coulon, S., Klaile, E., Kannouche, P., Fuchs, R. P., and Cordonnier, A. M. (2010) Crosstalk between replicative and translesional DNA polymerases: PDIP38 interacts directly with Pol η . *DNA Repair*. **9**, 922–928
 25. Tsuda, M., Ogawa, S., Ooka, M., Kobayashi, K., Hirota, K., Wakasugi, M., Matsunaga, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., Chikuma, S., Sasanuma, H., Debatisse, M., Doherty, A. J., Fuchs, R. P., and Takeda, S. (2019) PDIP38/PolDIP2 controls the DNA damage tolerance pathways by increasing the relative usage of translesion DNA synthesis over template switching. *PLOS ONE*. **14**, e0213383
 26. Wong, A., Zhang, S., Mordue, D., Wu, J. M., Zhang, Z., Darzynkiewicz, Z., Lee, E. Y., and Lee, M. Y. (2013) PDIP38 is translocated to the spliceosomes/nuclear speckles in response to UV-induced DNA damage and is required for UV-induced alternative splicing of MDM2. *Cell Cycle*. **12**, 3373–3382
 27. Forrester, S. J., Xu, Q., Kikuchi, D. S., Okwan-Duodu, D., Campos, A. C., Faidley, E. A., Zhang, G., Lassègue, B., Sadikot, R. T., Griendling, K. K., and Hernandez, M. S. (2019) Poldip2 deficiency protects against lung edema and vascular inflammation in a model of acute respiratory distress syndrome. *Clin. Sci.* **133**, 321–334

28. Sutliff, R. L., Hilenski, L. L., Amanso, A. M., Parastatidis, I., Dikalova, A. E., Hansen, L., Datla, S. R., Long, J. S., El-Ali, A. M., Joseph, G., Gleason, R. L., Taylor, W. R., Hart, C. M., Griendling, K. K., and Lassègue, B. (2013) Polymerase Delta Interacting Protein 2 Sustains Vascular Structure and Function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2154–2161
29. Brown, D. I., Lassègue, B., Lee, M., Zafari, R., Long, J. S., Saavedra, H. I., and Griendling, K. K. (2014) Poldip2 Knockout Results in Perinatal Lethality, Reduced Cellular Growth and Increased Autophagy of Mouse Embryonic Fibroblasts. *PLoS ONE*. **9**, e96657
30. Datla, S. R., L. Hilenski, L., Seidel-Rogol, B., Dikalova, A. E., Harousseau, M., Punkova, L., Joseph, G., Taylor, W. R., Lassègue, B., and Griendling, K. K. (2018) Poldip2 knockdown inhibits vascular smooth muscle proliferation and neointima formation by regulating the expression of PCNA and p21. *Lab. Invest.* 10.1038/s41374-018-0103-y
31. Huff, L. P., Kikuchi, D. S., Faidley, E., Forrester, S. J., Tsai, M. Z., Lassègue, B., and Griendling, K. K. (2019) Polymerase- δ -interacting protein 2 activates the RhoGEF epithelial cell transforming sequence 2 in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **316**, C621–C631
32. Klaile, E., Kukalev, A., Öbrink, B., and Müller, M. M. (2008) PDIP38 is a novel mitotic spindle-associated protein that affects spindle organization and chromosome segregation. *Cell Cycle*. **7**, 3180–3186
33. Miller, F. J. (2009) NADPH Oxidase 4: Walking the Walk With Poldip2. *Circ. Res.* **105**, 209–210
34. Mattila, P. K., and Lappalainen, P. (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 446–454
35. Datla, S. R., McGrail, D. J., Vukelic, S., Huff, L. P., Lyle, A. N., Pounkova, L., Lee, M., Seidel-Rogol, B., Khalil, M. K., Hilenski, L. L., Terada, L. S., Dawson, M. R., Lassègue, B., and Griendling, K. K. (2014) Poldip2 controls vascular smooth muscle cell migration by regulating focal adhesion turnover and force polarization. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **307**, H945–H957
36. Vukelic, S., Xu, Q., Seidel-Rogol, B., Faidley, E. A., Dikalova, A. E., Hilenski, L. L., Jorde, U., Poole, L. B., Lassègue, B., Zhang, G., and Griendling, K. K. (2018) NOX4 (NADPH Oxidase 4) and Poldip2 (Polymerase δ -Interacting Protein 2) Induce Filamentous Actin Oxidation and Promote Its Interaction With Vinculin During Integrin-Mediated Cell Adhesion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 2423–2434
37. Fujii, M., Amanso, A., Abrahão, T. B., Lassègue, B., and Griendling, K. K. (2016) Polymerase delta-interacting protein 2 regulates collagen accumulation via activation of the Akt/mTOR pathway in vascular smooth muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **92**, 21–29
38. Amanso, A. M., Lassegue, B., Joseph, G., Landazuri, N., Long, J. S., Weiss, D., Taylor, W. R., and Griendling, K. K. (2014) Polymerase -Interacting Protein 2 Promotes Postischemic Neovascularization of the Mouse Hindlimb. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1548–1555
39. Moreno, M. U., Gallego, I., López, B., González, A., Fortuño, A., José, G. S., Valencia, F., Gómez-Doblas, J. J., de Teresa, E., Shah, A. M., Díez, J., and Zalba, G. (2013) Decreased Nox4 levels in the myocardium of patients with aortic valve stenosis. *Clin. Sci.* **125**, 291–300
40. Kim, Y., Park, H., Nah, J., Moon, S., Lee, W., Hong, S., Kam, T.-I., and Jung, Y.-K. (2015) Essential role of POLDIP2 in Tau aggregation and neurotoxicity via autophagy/proteasome inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **462**, 112–118
41. Hernandez, M. S., Lassègue, B., Hilenski, L. L., Adams, J., Gao, N., Kuan, C.-Y., Sun, Y.-Y., Cheng, L., Kikuchi, D. S., Yepes, M., and Griendling, K. K. (2018) Polymerase delta-interacting protein 2

- deficiency protects against blood-brain barrier permeability in the ischemic brain. *J. Neuroinflammation*. 10.1186/s12974-017-1032-1
42. Grinchuk, O. V., Motakis, E., and Kuznetsov, V. A. (2010) Complex sense-antisense architecture of TNFAIP1/POLDIP2 on 17q11.2 represents a novel transcriptional structural-functional gene module involved in breast cancer progression. *BMC Genomics*. **11**, S9
 43. Chian, C.-F., Hwang, Y.-T., Terng, H.-J., Lee, S.-C., Chao, T.-Y., Chang, H., Ho, C.-L., Wu, Y.-Y., and Perng, W.-C. (2016) Panels of tumor-derived RNA markers in peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer: their dependence on age, gender and clinical stages. *Oncotarget*. 10.18632/oncotarget.10558
 44. Chan, J. Y. K., Poon, P. H. Y., Zhang, Y., Ng, C. W. K., Piao, W. Y., Ma, M., Yip, K. Y., Chan, A. B. W., and Lui, V. W. Y. (2018) Case Report: Exome sequencing reveals recurrent RETSAT mutations and a loss-of-function POLDIP2 mutation in a rare undifferentiated tongue sarcoma. *F1000Research*. **7**, 499
 45. Horbach, L., Sinigaglia, M., da Silva, C., Olguins, D., Gregianin, L., Brunetto, A., Brunetto, A., Roesler, R., and de Farias, C. (2018) Gene expression changes associated with chemotherapy resistance in Ewing sarcoma cells. *Mol. Clin. Oncol*. 10.3892/mco.2018.1608
 46. Lin, C.-S., Lee, S.-H., Huang, H.-S., Chen, Y.-S., and Ma, M.-C. (2015) H₂O₂ generated by NADPH oxidase 4 contributes to transient receptor potential vanilloid 1 channel-mediated mechanosensation in the rat kidney. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol*. **309**, F369–F376
 47. Manickam, N., Patel, M., Griendling, K. K., Gorin, Y., and Barnes, J. L. (2014) RhoA/Rho kinase mediates TGF- β ₁-induced kidney myofibroblast activation through Poldip2/Nox4-derived reactive oxygen species. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol*. **307**, F159–F171
 48. Dosoki, H., Stegemann, A., Taha, M., Schnittler, H., Luger, T. A., Schröder, K., Distler, J. H. W., Kerkhoff, C., and Böhm, M. (2017) Targeting of NADPH oxidase in vitro and in vivo suppresses fibroblast activation and experimental skin fibrosis. *Exp. Dermatol*. **26**, 73–81
 49. Saez, F., Hong, N. J., and Garvin, J. L. (2016) Luminal flow induces NADPH oxidase 4 translocation to the nuclei of thick ascending limbs. *Physiol. Rep*. **4**, e12724
 50. Nakamura, M., Eguchi, A., Inohana, M., Nagahara, R., Murayama, H., Kawashima, M., Mizukami, S., Koyanagi, M., Hayashi, S., Maronpot, R. R., Shibutani, M., and Yoshida, T. (2018) Differential impacts of mineralocorticoid receptor antagonist potassium canrenoate on liver and renal changes in high fat diet-mediated early hepatocarcinogenesis model rats. *J. Toxicol. Sci*. **43**, 611–621
 51. Li, L., Lai, E. Y., Luo, Z., Solis, G., Griendling, K. K., Taylor, W. R., Jose, P. A., Wellsten, A., Welch, W. J., and Wilcox, C. S. (2017) Superoxide and hydrogen peroxide counterregulate myogenic contractions in renal afferent arterioles from a mouse model of chronic kidney disease. *Kidney Int*. **92**, 625–633
 52. Li, L., Lai, E. Y., Luo, Z., Solis, G., Mendonca, M., Griendling, K. K., Wellstein, A., Welch, W. J., and Wilcox, C. S. (2018) High Salt Enhances Reactive Oxygen Species and Angiotensin II Contractions of Glomerular Afferent Arterioles From Mice With Reduced Renal Mass. *Hypertension*. **72**, 1208–1216
 53. 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*. 10.1128/mBio.01487-17
 54. Juillan-Binard, C., Picciocchi, A., Andrieu, J.-P., Dupuy, J., Petit-Hartlein, I., Caux-Thang, C., Vivès, C., Nivière, V., and Fieschi, F. (2017) A Two-component NADPH Oxidase (NOX)-like

- System in Bacteria Is Involved in the Electron Transfer Chain to the Methionine Sulfoxide Reductase MsrP. *J. Biol. Chem.* **292**, 2485–2494
55. Bedard, K., Lardy, B., and Krause, K. (2007) NOX family NADPH oxidases: Not just in mammals. *Biochimie.* **89**, 1107–1112
 56. Kawahara, B., Quinn, M. T., and Lambeth, J. D. (2007) Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evol. Biol.* **7**, 109
 57. 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.* 10.1073/pnas.1702293114
 58. Finegold, A. A., Shatwell, K. P., Segal, A. W., Klausner, R. D., and Dancis, A. (1996) Intramembrane Bis-Heme Motif for Transmembrane Electron Transport Conserved in a Yeast Iron Reductase and the Human NADPH Oxidase. *J. Biol. Chem.* **271**, 31021–31024
 59. Chuong Nguyen, M. V., Lardy, B., Paclet, M.-H., Rousset, F., Berthier, S., Baillet, A., Grange, L., Gaudin, P., and Morel, F. (2015) Les NADPH oxydases, Nox: Une nouvelle famille d'isoenzymes. *médecine/sciences.* **31**, 43–52
 60. Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007) The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313
 61. Kawahara, T., Jackson, H. M., Smith, S. M. E., Simpson, P. D., and Lambeth, J. D. (2011) Nox5 Forms a Functional Oligomer Mediated by Self-Association of Its Dehydrogenase Domain. *Biochemistry.* **50**, 2013–2025
 62. De Deken, X., Corvilain, B., Dumont, J. E., and Miot, F. (2014) Roles of DUOX-Mediated Hydrogen Peroxide in Metabolism, Host Defense, and Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 2776–2793
 63. Grasberger, H., and Refetoff, S. (2006) Identification of the Maturation Factor for Dual Oxidase: *EVOLUTION OF AN EUKARYOTIC OPERON EQUIVALENT.* *J. Biol. Chem.* **281**, 18269–18272
 64. Bánfi, B., Tirone, F., Durussel, I., Knisz, J., Moskwa, P., Molnár, G. Z., Krause, K.-H., and Cox, J. A. (2004) Mechanism of Ca²⁺ Activation of the NADPH Oxidase 5 (NOX5). *J. Biol. Chem.* **279**, 18583–18591
 65. Björkman, U., and Ekholm, R. (1984) Generation of H₂O₂ in Isolated Porcine Thyroid Follicles*. *Endocrinology.* **115**, 392–398
 66. Brandes, R. P., Weissmann, N., and Schröder, K. (2014) Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic. Biol. Med.* **76**, 208–226
 67. Clark, R. A., Leidal, K. G., Pearson, D. W., and Nauseef, W. M. (1987) NADPH oxidase of human neutrophils. Subcellular localization and characterization of an arachidonate-activatable superoxide-generating system. *J. Biol. Chem.* **262**, 4065–4074
 68. 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
 69. 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
 70. Lambeth, J. D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 181–189
 71. Li, J.-M. (2003) ROS Generation by Nonphagocytic NADPH Oxidase: Potential Relevance in Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 221S – 226

72. Guo, S., and Chen, X. (2015) The human Nox4: gene, structure, physiological function and pathological significance. *J. Drug Target.* **23**, 888–896
73. George, A., Pushkaran, S., Konstantinidis, D. G., Koochaki, S., Malik, P., Mohandas, N., Zheng, Y., Joiner, C. H., and Kalfa, T. A. (2013) Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. *Blood.* **121**, 2099–2107
74. Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G., and Lambeth, J. D. (2001) Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene.* **269**, 131–140
75. Dupuy, C., Pomerance, M., Ohayon, R., Noël-Hudson, M.-S., Dème, D., Chaaaraoui, M., Francon, J., and Virion, A. (2000) Thyroid Oxidase (THOX2) Gene Expression in the Rat Thyroid Cell Line FRTL-5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 287–292
76. Xu, Q., Choksi, S., Qu, J., Jang, J., Choe, M., Banfi, B., Engelhardt, J. F., and Liu, Z. (2016) NADPH Oxidases Are Essential for Macrophage Differentiation. *J. Biol. Chem.* **291**, 20030–20041
77. Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 1752–1761
78. Tam, N. N. C., Gao, Y., Leung, Y.-K., and Ho, S.-M. (2003) Androgenic Regulation of Oxidative Stress in the Rat Prostate. *Am. J. Pathol.* **163**, 2513–2522
79. Bendall, J. K., Rinze, R., Adlam, D., Tatham, A. L., de Bono, J., and Channon, K. M. (2007) Endothelial Nox2 Overexpression Potentiates Vascular Oxidative Stress and Hemodynamic Response to Angiotensin II: Studies in Endothelial-Targeted Nox2 Transgenic Mice. *Circ. Res.* **100**, 1016–1025
80. Griendling, K. K. (2004) Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart.* **90**, 491–493
81. Van Buul, J. D., Fernandez-Borja, M., Anthony, E. C., and Hordijk, P. L. (2005) Expression and Localization of NOX2 and NOX4 in Primary Human Endothelial Cells. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 308–317
82. Petry, A., Djordjevic, T., Weitnauer, M., Kietzmann, T., Hess, J., and Görlach, A. (2006) NOX2 and NOX4 Mediate Proliferative Response in Endothelial Cells. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1473–1484
83. Gavazzi, G., Banfi, B., Deffert, C., Fiette, L., Schappi, M., Herrmann, F., and Krause, K.-H. (2006) Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett.* **580**, 497–504
84. Ghouleh, I. A., Sahoo, S., Meijles, D. N., Amaral, J. H., de Jesus, D. S., Sembrat, J., Rojas, M., Goncharov, D. A., Goncharova, E. A., and Pagano, P. J. (2017) Endothelial Nox1 oxidase assembly in human pulmonary arterial hypertension; driver of Gremlin1-mediated proliferation. *Clin. Sci.* **131**, 2019–2035
85. Sobey, C. G., Judkins, C. P., Rivera, J., Lewis, C. V., Diep, H., Lee, H. W., Kemp-Harper, B. K., Broughton, B. R. S., Selemidis, S., Gaspari, T. A., Samuel, C. S., and Drummond, G. R. (2015) NOX1 deficiency in apolipoprotein E-knockout mice is associated with elevated plasma lipids and enhanced atherosclerosis. *Free Radic. Res.* **49**, 186–198
86. Geiszt, M., Lekstrom, K., Brenner, S., Hewitt, S. M., Dana, R., Malech, H. L., and Leto, T. L. (2003) NAD(P)H Oxidase 1, a Product of Differentiated Colon Epithelial Cells, Can Partially Replace Glycoprotein 91phox in the Regulated Production of Superoxide by Phagocytes. *J. Immunol.* **171**, 299–306

87. Archer, S. L., Reeve, H. L., Michelakis, E., Puttagunta, L., Waite, R., Nelson, D. P., Dinauer, M. C., and Weir, E. K. (1999) O₂ sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 7944–7949
88. Kazemian, P., Stephenson, R., Yeager, H., and Cutz, E. (2001) Respiratory control in neonatal mice with NADPH oxidase deficiency. *Respir. Physiol.* **126**, 89–101
89. Manoury, B., Nenan, S., Leclerc, O., Guenon, I., Boichot, E., Planquois, J.-M., Bertrand, C. P., and Lagente, V. (2005) The absence of reactive oxygen species production protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* 10.1186/1465-9921-6-11
90. Duilio, C., Ambrosio, G., Kuppusamy, P., DiPaula, A., Becker, L. C., and Zweier, J. L. (2001) Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **280**, H2649–H2657
91. Krijnen, P. A. J. (2003) Increased Nox2 expression in human cardiomyocytes after acute myocardial infarction. *J. Clin. Pathol.* **56**, 194–199
92. Kim, Y. M., Guzik, T. J., Zhang, Y. H., Zhang, M. H., Kattach, H., Ratnatunga, C., Pillai, R., Channon, K. M., and Casadei, B. (2005) A Myocardial Nox2 Containing NAD(P)H Oxidase Contributes to Oxidative Stress in Human Atrial Fibrillation. *Circ. Res.* **97**, 629–636
93. Oudot, A., Vergely, C., Ecarnot-Laubriet, A., and Rochette, L. (2003) Angiotensin II activates NADPH oxidase in isolated rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. *Eur. J. Pharmacol.* **462**, 145–154
94. Chen, J.-X., Zeng, H., Lawrence, M. L., Blackwell, T. S., and Meyrick, B. (2006) Angiotensin-1-induced angiogenesis is modulated by endothelial NADPH oxidase. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **291**, H1563–H1572
95. Wenzel, S., Taimor, G., Piper, H. M., and Schlüter, K.-D. (2001) Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF- β expression in adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB J.* **15**, 2291–2293
96. Johar, S., Cave, A. C., Narayanapanicker, A., Grieve, D. J., and Shah, A. M. (2006) Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB J.* **20**, 1546–1548
97. Zekry, D., Epperson, T. K., and Krause, K.-H. (2003) A Role for NOX NADPH Oxidases in Alzheimer's Disease and Other Types of Dementia? *IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life.* **55**, 307–313
98. Zhang, W., Wang, T., Qin, L., Gao, H.-M., Wilson, B., Ali, S. F., Zhang, W., Hong, J.-S., and Liu, B. (2004) Neuroprotective effect of dextromethorphan in the MPTP Parkinson's disease model: role of NADPH oxidase. *FASEB J.* **18**, 589–591
99. Kishida, K. T., Hoeffler, C. A., Hu, D., Pao, M., Holland, S. M., and Klann, E. (2006) Synaptic Plasticity Deficits and Mild Memory Impairments in Mouse Models of Chronic Granulomatous Disease. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5908–5920
100. Shibuya, H. (1997) Kupffer cells generate superoxide anions and modulate reperfusion injury in rat livers after cold preservation. *Hepatology.* **25**, 356–360
101. Yang, S., Madyastha, P., Bingel, S., Ries, W., and Key, L. (2001) A New Superoxide-generating Oxidase in Murine Osteoclasts. *J. Biol. Chem.* **276**, 5452–5458
102. Paffenholz, R. (2004) Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev.* **18**, 486–491

103. Geiszt, M., Kopp, J. B., Varnai, P., and Leto, T. L. (2000) Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 8010–8014
104. Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., and Sumimoto, H. (2001) A Novel Superoxide-producing NAD(P)H Oxidase in Kidney. *J. Biol. Chem.* **276**, 1417–1423
105. Menshikov, M., Plekhanova, O., Cai, H., Chalupsky, K., Parfyonova, Y., Bashtrikov, P., Tkachuk, V., and Berk, B. C. (2006) Urokinase Plasminogen Activator Stimulates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Via Redox-Dependent Pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 801–807
106. Etoh, T., Inoguchi, T., Kakimoto, M., Sonoda, N., Kobayashi, K., Kuroda, J., Sumimoto, H., and Nawata, H. (2003) Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment. *Diabetologia.* **46**, 1428–1437
107. Shanmugasundaram, K., Nayak, B. K., Friedrichs, W. E., Kaushik, D., Rodriguez, R., and Block, K. (2017) NOX4 functions as a mitochondrial energetic sensor coupling cancer metabolic reprogramming to drug resistance. *Nat. Commun.* 10.1038/s41467-017-01106-1
108. Block, K., Gorin, Y., and Abboud, H. E. (2009) Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 14385–14390
109. Kuroda, J., Ago, T., Matsushima, S., Zhai, P., Schneider, M. D., and Sadoshima, J. (2010) NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 15565–15570
110. Xu, Y., Ruan, S., Wu, X., Chen, H., Zheng, K., and Fu, B. (2013) Autophagy and apoptosis in tubular cells following unilateral ureteral obstruction are associated with mitochondrial oxidative stress. *Int. J. Mol. Med.* **31**, 628–636
111. Wang, J., and Yi, J. (2008) Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 1875–1884
112. O’Flaherty, C., Breininger, E., Beorlegui, N., and Beconi, M. T. (2005) Acrosome reaction in bovine spermatozoa: Role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1726**, 96–101
113. O’Flaherty, C., Beorlegui, N., and Beconi, M. T. (2003) Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *Int. J. Androl.* **26**, 109–114
114. Moreno, J. C., Bikker, H., Kempers, M. J. E., van Trotsenburg, A. S. P., Baas, F., de Vijlder, J. J. M., Vulsma, T., and Ris-Stalpers, C. (2002) Inactivating Mutations in the Gene for Thyroid Oxidase 2 (*THOX2*) and Congenital Hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* **347**, 95–102
115. Vigone, M. C., Fugazzola, L., Zamproni, I., Passoni, A., Di Candia, S., Chiumello, G., Persani, L., and Weber, G. (2005) Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the *DUOX2* gene in two siblings. *Hum. Mutat.* **26**, 395–395
116. Singel, K. L., and Segal, B. H. (2016) NOX2-dependent regulation of inflammation. *Clin. Sci.* **130**, 479–490
117. Harrison, J. E., and Schultz, J. (1976) Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **251**, 1371–1374
118. Albrich, J. M., McCarthy, C. A., and Hurst, J. K. (1981) Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 210–214

119. Weiss, S. J., Klein, R., Slivka, A., and Wei, M. (1982) Chlorination of Taurine by Human Neutrophils. *J. Clin. Invest.* **70**, 598–607
120. Reeves, E. P., Lu, H., Jacobs, H. L., Messina, C. G. M., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E. O., Warley, A., Roes, J., and Segal, A. W. (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature*. **416**, 291–297
121. Brinkmann, V. (2004) Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. **303**, 1532–1535
122. Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N. V., Zbytnuik, L. D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H. C., Malawista, S. E., de Boisleury Chevance, A., Zhang, K., Conly, J., and Kubes, P. (2012) Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* **18**, 1386–1393
123. Caudrillier, A., Kessenbrock, K., Gilliss, B. M., Nguyen, J. X., Marques, M. B., Monestier, M., Toy, P., Werb, Z., and Looney, M. R. (2012) Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J. Clin. Invest.* **122**, 2661–2671
124. Coxon, A., Rieu, P., Barkalow, F. J., Askari, S., Sharpe, A. H., von Andrian, U. H., Arnaout, M. A., and Mayadas, T. N. (1996) A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity*. **5**, 653–666
125. Gordon, S., and Taylor, P. R. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953–964
126. Sareila, O., Kelkka, T., Pizzolla, A., Hultqvist, M., and Holmdahl, R. (2011) NOX2 Complex-Derived ROS as Immune Regulators. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 2197–2208
127. van de Veerdonk, F. L., Smeekens, S. P., Joosten, L. A. B., Kullberg, B. J., Dinarello, C. A., van der Meer, J. W. M., and Netea, M. G. (2010) Reactive oxygen species-independent activation of the IL-1 inflammasome in cells from patients with chronic granulomatous disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 3030–3033
128. Bustamante, J., Arias, A. A., Vogt, G., Picard, C., Galicia, L. B., Prando, C., Grant, A. V., Marchal, C. C., Hubeau, M., Chagnier, A., de Beaucoudrey, L., Puel, A., Feinberg, J., Valinetz, E., Janni re, L., Besse, C., Boland, A., Brisseau, J.-M., Blanche, S., Lortholary, O., Fieschi, C., Emile, J.-F., Boisson-Dupuis, S., Al-Muhsen, S., Woda, B., Newburger, P. E., Condino-Neto, A., Dinauer, M. C., Abel, L., and Casanova, J.-L. (2011) Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease. *Nat. Immunol.* **12**, 213–221
129. Grimm, M. J., Vethanayagam, R. R., Almyroudis, N. G., Dennis, C. G., Khan, A. N. H., D’Auria, A. C., Singel, K. L., Davidson, B. A., Knight, P. R., Blackwell, T. S., Hohl, T. M., Mansour, M. K., Vyas, J. M., R hm, M., Urban, C. F., Kelkka, T., Holmdahl, R., and Segal, B. H. (2013) Monocyte- and Macrophage-Targeted NADPH Oxidase Mediates Antifungal Host Defense and Regulation of Acute Inflammation in Mice. *J. Immunol.* **190**, 4175–4184
130. Pizzolla, A., Hultqvist, M., Nilson, B., Grimm, M. J., Eneljung, T., Jonsson, I.-M., Verdrengh, M., Kelkka, T., Gjer sson, I., Segal, B. H., and Holmdahl, R. (2012) Reactive Oxygen Species Produced by the NADPH Oxidase 2 Complex in Monocytes Protect Mice from Bacterial Infections. *J. Immunol.* **188**, 5003–5011
131. Lapouge, K., Smith, S. J. M., Groemping, Y., and Rittinger, K. (2002) Architecture of the p40-p47-p67^{phox} Complex in the Resting State of the NADPH Oxidase: A CENTRAL ROLE FOR p67^{phox}. *J. Biol. Chem.* **277**, 10121–10128

132. Kim, T. K., Billard, M. J., Wieder, E. D., McIntyre, B. W., and Komanduri, K. V. (2010) Co-engagement of $\alpha 4\beta 1$ integrin (VLA-4) and CD4 or CD8 is necessary to induce maximal Erk1/2 phosphorylation and cytokine production in human T cells. *Hum. Immunol.* **71**, 23–28
133. Frasch, S. C., Berry, K. Z., Fernandez-Boyanapalli, R., Jin, H.-S., Leslie, C., Henson, P. M., Murphy, R. C., and Bratton, D. L. (2008) NADPH Oxidase-dependent Generation of Lysophosphatidylserine Enhances Clearance of Activated and Dying Neutrophils via G2A. *J. Biol. Chem.* **283**, 33736–33749
134. Frasch, S. C., Fernandez-Boyanapalli, R. F., Berry, K. Z., Leslie, C. C., Bonventre, J. V., Murphy, R. C., Henson, P. M., and Bratton, D. L. (2011) Signaling via Macrophage G2A Enhances Efferocytosis of Dying Neutrophils by Augmentation of Rac Activity. *J. Biol. Chem.* **286**, 12108–12122
135. Fernandez-Boyanapalli, R. F., Frasch, S. C., McPhillips, K., Vandivier, R. W., Harry, B. L., Riches, D. W. H., Henson, P. M., and Bratton, D. L. (2009) Impaired apoptotic cell clearance in CGD due to altered macrophage programming is reversed by phosphatidylserine-dependent production of IL-4. *Blood.* **113**, 2047–2055
136. Sanmun, D., Witasp, E., Jitkaew, S., Tyurina, Y. Y., Kagan, V. E., Åhlin, A., Palmblad, J., and Fadeel, B. (2009) Involvement of a functional NADPH oxidase in neutrophils and macrophages during programmed cell clearance: implications for chronic granulomatous disease. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **297**, C621–C631
137. Soehnlein, O., Weber, C., and Lindbom, L. (2009) Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol.* **30**, 538–546
138. Soehnlein, O., Zerneck, A., and Weber, C. (2009) Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. *Thromb. Haemost.* **102**, 198–205
139. Soehnlein, O., Kai-Larsen, Y., Frithiof, R., Sorensen, O. E., Kenne, E., Scharffetter-Kochanek, K., Eriksson, E. E., Herwald, H., Agerberth, B., and Lindbom, L. (2008) Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1–3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. *J. Clin. Invest.* **118**, 3491–3502
140. Savill, J. S., Wyllie, A. H., Henson, J. E., Walport, M. J., Henson, P. M., and Haslett, C. (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* **83**, 865–875
141. Petry, A., Weitnauer, M., and Görlach, A. (2010) Receptor Activation of NADPH Oxidases. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 467–487
142. Rada, B., and Leto, T. L. (2008) Oxidative Innate Immune Defenses by Nox/Duox Family NADPH Oxidases. in *Contributions to Microbiology* (Egesten, A., Schmidt, A., and Herwald, H. eds), pp. 164–187, KARGER, Basel, 10.1159/000136357
143. Porcheray, F., Viaud, S., Rimaniol, A.-C., Leone, C., Samah, B., Dereuddre-Bosquet, N., Dormont, D., and Gras, G. (2005) Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **0**, 051006055454001
144. Martyn, K. D., Frederick, L. M., von Loehneysen, K., Dinauer, M. C., and Knaus, U. G. (2006) Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell. Signal.* **18**, 69–82
145. Goyal, P., Weissmann, N., Rose, F., Grimminger, F., Schäfers, H. J., Seeger, W., and Hänze, J. (2005) Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 32–39

146. Takac, I., Schröder, K., Zhang, L., Lardy, B., Anilkumar, N., Lambeth, J. D., Shah, A. M., Morel, F., and Brandes, R. P. (2011) The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J. Biol. Chem.* **286**, 13304–13313
147. Nguyen, M. V. C., Lardy, B., Rousset, F., Hazane-Puch, F., Zhang, L., Trocmé, C., Serrander, L., Krause, K.-H., and Morel, F. (2013) Quinone compounds regulate the level of ROS production by the NADPH oxidase Nox4. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 1644–1654
148. Nisimoto, Y., Diebold, B. A., Cosentino-Gomes, D., and Lambeth, J. D. (2014) Nox4: A Hydrogen Peroxide-Generating Oxygen Sensor. *Biochemistry.* **53**, 5111–5120
149. Jackson, H. M., Kawahara, T., Nisimoto, Y., Smith, S. M. E., and Lambeth, J. D. (2010) Nox4 B-loop Creates an Interface between the Transmembrane and Dehydrogenase Domains. *J. Biol. Chem.* **285**, 10281–10290
150. Nisimoto, Y., Jackson, H. M., Ogawa, H., Kawahara, T., and Lambeth, J. D. (2010) Constitutive NADPH-Dependent Electron Transferase Activity of the Nox4 Dehydrogenase Domain. *Biochemistry.* **49**, 2433–2442
151. von Löhneysen, K., Noack, D., Hayes, P., Friedman, J. S., and Knaus, U. G. (2012) Constitutive NADPH Oxidase 4 Activity Resides in the Composition of the B-loop and the Penultimate C Terminus. *J. Biol. Chem.* **287**, 8737–8745
152. Diaz, B., Shani, G., Pass, I., Anderson, D., Quintavalle, M., and Courtneidge, S. A. (2009) Tks5-Dependent, Nox-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species Is Necessary for Invadopodia Formation. *Sci. Signal.* **2**, ra53–ra53
153. 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
154. Gil Lorenzo, A. F., Bocanegra, V., Benardon, M. E., Cacciamani, V., and Vallés, P. G. (2014) Hsp70 regulation on Nox4/p22phox and cytoskeletal integrity as an effect of losartan in vascular smooth muscle cells. *Cell Stress Chaperones.* **19**, 115–134
155. Sbarra, A. J., and Karnovsky, M. L. (1959) The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **234**, 1355–1362
156. IYER, G. Y. N., ISLAM, M. F., and QUASTEL, J. H. (1961) Biochemical Aspects of Phagocytosis. *Nature.* **192**, 535–541
157. Rossi, F., and Zatti, M. (1964) Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia.* **20**, 21–23
158. Baehner, R. L., and Nathan, D. G. (1967) Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. *Science.* **155**, 835–836
159. Holmes, B., Page, A. R., and Good, R. A. (1967) Studies of the Metabolic Activity of Leukocytes from Patients with a Genetic Abnormality of Phagocytic Function*. *J. Clin. Invest.* **46**, 1422–1432
160. Quie, P. G., White, J. G., Holmes, B., and Good, R. A. (1967) In Vitro Bactericidal Capacity of Human Polymorphonuclear Leukocytes: Diminished Activity in Chronic Granulomatous Disease of Childhood *. *J. Clin. Invest.* **46**, 668–679
161. Segal, A., Jones, OwenT. G., Webster, D., and Allison, A. (1978) ABSENCE OF A NEWLY DESCRIBED CYTOCHROME b FROM NEUTROPHILS OF PATIENTS WITH CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE. *The Lancet.* **312**, 446–449

162. Segal, A. W., and Jones, O. T. (1978) Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature*. **276**, 515–517
163. Royer-Pokora, B., Kunkel, L. M., Monaco, A. P., Goff, S. C., Newburger, P. E., Baehner, R. L., Cole, F. S., Curnutte, J. T., and Orkin, S. H. (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder—chronic granulomatous disease—on the basis of its chromosomal location. *Nature*. **322**, 32–38
164. Teahan, C., Rowe, P., Parker, P., Totty, N., and Segal, A. W. (1987) The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the β -chain of cytochrome b-245. *Nature*. **327**, 720–721
165. 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
166. Yu, L., Zhen, L., and Dinauer, M. C. (1997) Biosynthesis of the Phagocyte NADPH Oxidase Cytochrome *b*₅₅₈: ROLE OF HEME INCORPORATION AND HETERODIMER FORMATION IN MATURATION AND STABILITY OF gp91^{phox} and p22^{phox} SUBUNITS. *J. Biol. Chem.* **272**, 27288–27294
167. Wallach, T. M., and Segal, A. W. (1996) Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b₅₅₈ of the NADPH oxidase of phagocytes. *Biochem. J.* **320** (Pt 1), 33–38
168. 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
169. Laurindo, F. R. M., Araujo, T. L. S., and Abrahão, T. B. (2014) Nox NADPH Oxidases and the Endoplasmic Reticulum. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 2755–2775
170. Wallach, T. M., and Segal, A. W. (1997) Analysis of glycosylation sites on gp91^{phox}, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem. J.* **321**, 583–585
171. Paclet, M.-H., Coleman, A. W., Vergnaud, S., and Morel, F. (2000) P67-phox-Mediated NADPH Oxidase Assembly: Imaging of Cytochrome *b*₅₅₈ Liposomes by Atomic Force Microscopy †. *Biochemistry*. **39**, 9302–9310
172. Raad, H., Paclet, M.-H., Boussetta, T., Krowiarski, Y., Morel, F., Quinn, M. T., Gougerot-Pocidallo, 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
173. Paclet, M.-H., Henderson, L. M., Campion, Y., Morel, F., and Dagher, M.-C. (2004) Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. *Biochem. J.* **382**, 981–986
174. Rotrosen, D., Kleinberg, M. E., Nuno, H., Leto, T., Gallin, J. I., and Malech, H. L. (1990) Evidence for a functional cytoplasmic domain of phagocyte oxidase cytochrome b₅₅₈. *J. Biol. Chem.* **265**, 8745–8750
175. Imajoh-Ohmi, S., Tokita, K., Ochiai, H., Nakamura, M., and Kanegasaki, S. (1992) Topology of cytochrome b₅₅₈ in neutrophil membrane analyzed by anti-peptide antibodies and proteolysis. *J. Biol. Chem.* **267**, 180–184
176. Burrett, J. B., Foubert, T. R., Baniulis, D., Lord, C. I., Taylor, R. M., Mills, J. S., Baughan, T. D., Roos, D., Parkos, C. A., and Jesaitis, A. J. (2003) Functional Epitope on Human Neutrophil Flavocytochrome b₅₅₈. *J. Immunol.* **170**, 6082–6089

177. Parkos, C. A., Dinauer, M. C., Walker, L. E., Allen, R. A., Jesaitis, A. J., and Orkin, S. H. (1988) Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 3319–3323
178. DeLeo, F. R., Burritt, J. B., Yu, L., Jesaitis, A. J., Dinauer, M. C., and Nauseef, W. M. (2000) Processing and Maturation of Flavocytochrome *b*₅₅₈ Include Incorporation of Heme as a Prerequisite for Heterodimer Assembly. *J. Biol. Chem.* **275**, 13986–13993
179. Campion, Y., Jesaitis, A. J., Nguyen, M. V. C., Grichine, A., Herenger, Y., Baillet, A., Berthier, S., Morel, F., and Paclet, M.-H. (2009) New p22-Phox Monoclonal Antibodies: Identification of a Conformational Probe for Cytochrome *b*₅₅₈. *J. Innate Immun.* **1**, 556–569
180. Dahan, I., Issaeva, I., Gorzalczyk, Y., Sigal, N., Hirshberg, M., and Pick, E. (2002) Mapping of Functional Domains in the p22^{phox} Subunit of Flavocytochrome *b*₅₅₉ Participating in the Assembly of the NADPH Oxidase Complex by “Peptide Walking.” *J. Biol. Chem.* **277**, 8421–8432
181. 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
182. 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
183. 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
184. 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
185. Lomax, K. J., Leto, T. L., Nunoi, H., Gallin, J. I., and Malech, H. L. (1989) Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science.* **245**, 409–412
186. Volpp, B. D., Nauseef, W. M., Donelson, J. E., Moser, D. R., and Clark, R. A. (1989) Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 7195–7199
187. Groemping, Y., and Rittinger, K. (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J.* **386**, 401–416
188. El-Benna, J., Dang, P. M.-C., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Marie, J.-C., and Braut-Boucher, F. (2009) p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp. Mol. Med.* **41**, 217
189. El-Benna, J., My-Chan Dang, P., and Yaffe, M. B. (2016) The Phagocyte NADPH Oxidase: Structure and Assembly of the Key Multicomponent Enzyme of Innate Immunity. in *Encyclopedia of Cell Biology*, pp. 702–709, Elsevier, 10.1016/B978-0-12-394447-4.30106-7
190. el Benna, J., Faust, L. P., and Babior, B. M. (1994) The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J. Biol. Chem.* **269**, 23431–23436
191. Inanami, O., Johnson, J. L., McAdara, J. K., Benna, J. E., Faust, L. R., Newburger, P. E., and Babior, B. M. (1998) Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47PHOX on serine 303 or 304. *J. Biol. Chem.* **273**, 9539–9543
192. Dang, P. M., Fontayne, A., Hakim, J., El Benna, J., and Périanin, A. (2001) Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and

- participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* **166**, 1206–1213
193. Chen, Q., Powell, D. W., Rane, M. J., Singh, S., Butt, W., Klein, J. B., and McLeish, K. R. (2003) Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* **170**, 5302–5308
 194. Faust, L. R., el Benna, J., Babior, B. M., and Chanock, S. J. (1995) The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J. Clin. Invest.* **96**, 1499–1505
 195. Johnson, J. L., Park, J.-W., Benna, J. E., Faust, L. P., Inanami, O., and Babior, B. M. (1998) Activation of p47^{PHOX}, a Cytosolic Subunit of the Leukocyte NADPH Oxidase: PHOSPHORYLATION OF Ser-359 OR Ser-370 PRECEDES PHOSPHORYLATION AT OTHER SITES AND IS REQUIRED FOR ACTIVITY. *J. Biol. Chem.* **273**, 35147–35152
 196. Leto, T. L., Lomax, K. J., Volpp, B. D., Nunoi, H., Sechler, J. M., Nauseef, W. M., Clark, R. A., Gallin, J. I., and Malech, H. L. (1990) Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src. *Science.* **248**, 727–730
 197. Han, C.-H., Freeman, J. L. R., Lee, T., Motalebi, S. A., and Lambeth, J. D. (1998) Regulation of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase: IDENTIFICATION OF AN ACTIVATION DOMAIN IN p67^{phox}. *J. Biol. Chem.* **273**, 16663–16668
 198. 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
 199. Forbes, L. V., Truong, O., Wientjes, F. B., Moss, S. J., and Segal, A. W. (1999) The major phosphorylation site of the NADPH oxidase component p67phox is Thr233. *Biochem. J.* **338 (Pt 1)**, 99–105
 200. Wientjes, F. B., Hsuan, J. J., Totty, N. F., and Segal, A. W. (1993) p40^{phox}, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem. J.* **296**, 557–561
 201. Tsunawaki, S., Mizunari, H., Nagata, M., Tatsuzawa, O., and Kuratsuji, T. (1994) A Novel Cytosolic Component, p40phox, of Respiratory Burst Oxidase Associates with p67phox and Is Absent in Patients with Chronic Granulomatous Disease Who Lack p67phox. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1378–1387
 202. Matute, J. D., Arias, A. A., Dinauer, M. C., and Patiño, P. J. (2005) p40phox: The last NADPH oxidase subunit. *Blood Cells. Mol. Dis.* **35**, 291–302
 203. Bouin, A.-P., Grandvaux, N., Vignais, P. V., and Fuchs, A. (1998) p40^{phox} Is Phosphorylated on Threonine 154 and Serine 315 during Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase: IMPLICATION OF A PROTEIN KINASE C-TYPE KINASE IN THE PHOSPHORYLATION PROCESS. *J. Biol. Chem.* **273**, 30097–30103
 204. Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C. G., and Segal, A. W. (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature.* **353**, 668–670
 205. Abo, A., Webb, M. R., Grogan, A., and Segal, A. W. (1994) Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem. J.* **298 Pt 3**, 585–591
 206. Knaus, U. G., Heyworth, P. G., Evans, T., Curnutte, J. T., and Bokoch, G. M. (1991) Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science.* **254**, 1512–1515

207. 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
208. Dagher, M., and Pick, E. (2007) Opening the black box: Lessons from cell-free systems on the phagocyte NADPH-oxidase. *Biochimie.* **89**, 1123–1132
209. Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O. N., Illenberger, D., and Gierschik, P. (2000) The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 122–126
210. Regazzi, R., Kikuchi, A., Takai, Y., and Wollheim, C. B. (1992) The small GTP-binding proteins in the cytosol of insulin-secreting cells are complexed to GDP dissociation inhibitor proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 17512–17519
211. Hoffman, G. R., Nassar, N., and Cerione, R. A. (2000) Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell.* **100**, 345–356
212. Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* **349**, 117–127
213. Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature.* **348**, 125–132
214. Iyer, S. S., Pearson, D. W., Nauseef, W. M., and Clark, R. A. (1994) Evidence for a readily dissociable complex of p47phox and p67phox in cytosol of unstimulated human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **269**, 22405–22411
215. Park, J. W., Benna, J. E., Scott, K. E., Christensen, B. L., Chanock, S. J., and Babior, B. M. (1994) Isolation of a Complex of Respiratory Burst Oxidase Components from Resting Neutrophil Cytosol. *Biochemistry.* **33**, 2907–2911
216. Kanai, F., Liu, H., Field, S. J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G. E., Cantley, L. C., and Yaffe, M. B. (2001) The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat. Cell Biol.* **3**, 675–678
217. Brown, G. E., Stewart, M. Q., Liu, H., Ha, V.-L., and Yaffe, M. B. (2003) A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase. *Mol. Cell.* **11**, 35–47
218. Ellson, C. D., Gobert-Gosse, S., Anderson, K. E., Davidson, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Thuring, J. W., Cooper, M. A., Lim, Z.-Y., Holmes, A. B., Gaffney, P. R. J., Coadwell, J., Chilvers, E. R., Hawkins, P. T., and Stephens, L. R. (2001) PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40phox. *Nat. Cell Biol.* **3**, 679–682
219. Sumimoto, H., Kage, Y., Nuno, 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
220. Marcoux, J., Man, P., Petit-Haertlein, I., Vivès, C., Forest, E., and Fieschi, F. (2010) p47^{phox} Molecular Activation for Assembly of the Neutrophil NADPH Oxidase Complex. *J. Biol. Chem.* **285**, 28980–28990
221. Kami, K. (2002) Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67phox, Grb2 and Pex13p. *EMBO J.* **21**, 4268–4276
222. Dang, P. M.-C., Morel, F., Gougerot-Pocidalo, 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
223. Durand, D., Vivès, C., Cannella, D., Pérez, J., Pebay-Peyroula, E., Vachette, P., and Fieschi, F. (2010) NADPH oxidase activator p67phox behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers. *J. Struct. Biol.* **169**, 45–53
 224. Ziegler, C. S., Bouchab, L., Tramier, M., Durand, D., Fieschi, F., Dupré-Crochet, S., Mérola, F., Nüße, O., and Erard, M. (2019) Quantitative live-cell imaging and 3D modeling reveal critical functional features in the cytosolic complex of phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **294**, 3824–3836
 225. Wilson, M. I., Gill, D. J., Perisic, O., Quinn, M. T., and Williams, R. L. (2003) PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Mol. Cell.* **12**, 39–50
 226. Fuchs, A., Dagher, M.-C., and Vignais, P. V. (1995) Mapping the Domains of Interaction of p40<sup> with Both p47<sup> and p67<sup> of the Neutrophil Oxidase Complex Using the Two-hybrid System. *J. Biol. Chem.* **270**, 5695–5697
 227. Dusi, S., Donini, M., and Rossi, F. (1996) Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40_{phox}, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47_{phox} or p67_{phox}. *Biochem. J.* **314**, 409–412
 228. Cathcart, M. K. (2004) Regulation of Superoxide Anion Production by NADPH Oxidase in Monocytes/Macrophages: Contributions to Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 23–28
 229. 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
 230. 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
 231. Swain, S. D., Helgerson, S. L., Davis, A. R., Nelson, L. K., and Quinn, M. T. (1997) Analysis of activation-induced conformational changes in p47phox using tryptophan fluorescence spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **272**, 29502–29510
 232. Fontayne, A., Dang, P. M.-C., Gougerot-Pocidalò, M.-A., and El-Benna, J. (2002) Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry*. **41**, 7743–7750
 233. Han, C. H., and Lee, M. H. (2000) Activation domain in P67phox regulates the steady state reduction of FAD in gp91phox. *J. Vet. Sci.* **1**, 27–31
 234. 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 p67PHOX and cytochrome b558 II. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 4262–4265
 235. DeLeo, F. R., Yu, L., Burritt, J. B., Loetterle, L. R., Bond, C. W., Jesaitis, A. J., and Quinn, M. T. (1995) Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 7110–7114
 236. DeLeo, F. R., Nauseef, W. M., Jesaitis, A. J., Burritt, J. B., Clark, R. A., and Quinn, M. T. (1995) A Domain of p47^{phox} That Interacts with Human Neutrophil Flavocytochrome b₅₅₈. *J. Biol. Chem.* **270**, 26246–26251

237. Leusen, J. H., de Boer, M., Bolscher, B. G., Hilarius, P. M., Weening, R. S., Ochs, H. D., Roos, D., and Verhoeven, A. J. (1994) A point mutation in gp91-phox of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase leading to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. *J. Clin. Invest.* **93**, 2120–2126
238. 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
239. Lapouge, K., Smith, S. J., Walker, P. A., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., and Rittinger, K. (2000) Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP. *Mol. Cell.* **6**, 899–907
240. Diebold, B. A., and Bokoch, G. M. (2001) Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat. Immunol.* **2**, 211–215
241. Sarfstein, R., Gorzalczyk, Y., Mizrahi, A., Berdichevsky, Y., Molshanski-Mor, S., Weinbaum, C., Hirshberg, M., Dagher, M.-C., and Pick, E. (2004) Dual Role of Rac in the Assembly of NADPH Oxidase, Tethering to the Membrane and Activation of p67^{phox}: A STUDY BASED ON MUTAGENESIS OF p67^{phox}-Rac1 CHIMERAS. *J. Biol. Chem.* **279**, 16007–16016
242. Ellson, C. D., Andrews, S., Stephens, L. R., and Hawkins, P. T. (2002) The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. *J. Cell Sci.* **115**, 1099–1105
243. Xu, Y., Seet, L.-F., Hanson, B., and Hong, W. (2001) The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling. *Biochem. J.* **360**, 513
244. Bravo, J., Karathanassis, D., Pacold, C. M., Pacold, M. E., Ellson, C. D., Anderson, K. E., Butler, P. J., Lavenir, I., Perisic, O., Hawkins, P. T., Stephens, L., and Williams, R. L. (2001) The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Mol. Cell.* **8**, 829–839
245. 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 p47phox to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO J.* **21**, 5057–5068
246. Hiroaki, H., Ago, T., Ito, T., Sumimoto, H., and Kohda, D. (2001) Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 526–530
247. Larrieu, I., Tolchard, J., Sanchez, C., Kone, E. Y., Barras, A., Stines-Chaumeil, C., Odaert, B., and Giraud, M.-F. (2017) Cell-Free Expression for the Study of Hydrophobic Proteins: The Example of Yeast ATP-Synthase Subunits. in *Membrane Protein Structure and Function Characterization* (Lacapere, J.-J. ed), pp. 57–90, Springer New York, New York, NY, **1635**, 57–90
248. Szabó, Á., Papin, C., Cornu, D., Chélot, E., Lipinszki, Z., Udvardy, A., Redeker, V., Mayor, U., and Rouyer, F. (2018) Ubiquitylation Dynamics of the Clock Cell Proteome and TIMELESS during a Circadian Cycle. *Cell Rep.* **23**, 2273–2282
249. Bou-Nader, C., Pecqueur, L., Cornu, D., Lombard, M., Dezi, M., Nicaise, M., Velours, C., Fontecave, M., and Hamdane, D. (2017) Power of protein/tRNA functional assembly against aberrant aggregation. *Phys Chem Chem Phys.* **19**, 28014–28027
250. Goormaghtigh, E., Gasper, R., Bénard, A., Goldsztein, A., and Raussens, V. (2009) Protein secondary structure content in solution, films and tissues: Redundancy and complementarity of the information content in circular dichroism, transmission and ATR FTIR spectra. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics.* **1794**, 1332–1343

251. Serrander, L., Cartier, L., Bedard, K., Banfi, B., Lardy, B., Plastre, O., Sienkiewicz, A., Fórró, L., Schlegel, W., and Krause, K.-H. (2007) NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem. J.* **406**, 105–114
252. Bizouarn, T., Souabni, H., Serfaty, X., Bouraoui, A., Masoud, R., Karimi, G., Houée-Levin, C., and Baciou, L. (2019) A Close-Up View of the Impact of Arachidonic Acid on the Phagocyte NADPH Oxidase. in *NADPH Oxidases* (Knaus, U. G., and Leto, T. L. eds), pp. 75–101, Springer New York, New York, NY, **1982**, 75–101
253. Horecker, B. L., and Kornberg, A. (1948) The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **175**, 385–390
254. Ziegenhorn, J., Senn, M., and Bücher, T. (1976) Molar absorptivities of beta-NADH and beta-NADPH. *Clin. Chem.* **22**, 151–160
255. Massey, V. (1959) The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta.* **34**, 255–256
256. Van Gelder, B. F., and Slater, E. C. (1962) The extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta.* **58**, 593–595
257. Gakh, O., Cavadini, P., and Isaya, G. (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1592**, 63–77
258. Denver, N. (2014) *Study of Poldip2 as a regulator of Nox2*, Université Paris Sud, Laboratoire de Chimie Physique
259. Noël, M. (2015) *Modulation du fonctionnement des protéines d stress oxydant*, Université Paris Sud, Laboratoire de Chimie Physique
260. Lin-Cereghino, G. P., Stark, C. M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, H., Agari, K., Moua, P., Low, L. K., Tran, N., Huang, A. D., Nattestad, M., Oshiro, K. T., Chang, J. W., Chavan, A., Tsai, J. W., and Lin-Cereghino, J. (2013) The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene.* **519**, 311–317
261. Kjeldsen, T., Hach, M., Balschmidt, P., Havelund, S., Pettersson, A. F., and Markussen, J. (1998) Prepro-leaders lacking N-linked glycosylation for secretory expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr. Purif.* **14**, 309–316
262. Kurjan, J., and Herskowitz, I. (1982) Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. *Cell.* **30**, 933–943
263. Waters, M. G., Evans, E. A., and Blobel, G. (1988) Prepro-alpha-factor has a cleavable signal sequence. *J. Biol. Chem.* **263**, 6209–6214
264. Bader, O., Krauke, Y., and Hube, B. (2008) Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *BMC Microbiol.* **8**, 116
265. Julius, D., Schekman, R., and Thorner, J. (1984) Glycosylation and processing of prepro- α -factor through the yeast secretory pathway. *Cell.* **36**, 309–318
266. Brake, A. J., Merryweather, J. P., Coit, D. G., Heberlein, U. A., Masiarz, F. R., Mullenbach, G. T., Urdea, M. S., Valenzuela, P., and Barr, P. J. (1984) Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 4642–4646
267. Kim, H., Yoo, S. J., and Kang, H. A. (2014) Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Res.* 10.1111/1567-1364.12195

268. Bitter, G. A., Chen, K. K., Banks, A. R., and Lai, P. H. (1984) Secretion of foreign proteins from *Saccharomyces cerevisiae* directed by alpha-factor gene fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 5330–5334
269. Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., and Schwab, H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 5301–5317
270. Wu, M., Shen, Q., Yang, Y., Zhang, S., Qu, W., Chen, J., Sun, H., and Chen, S. (2013) Disruption of YPS1 and PEP4 genes reduces proteolytic degradation of secreted HSA/PTH in *Pichia pastoris* GS115. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 589–599
271. Sohn, S. B., Graf, A. B., Kim, T. Y., Gasser, B., Maurer, M., Ferrer, P., Mattanovich, D., and Lee, S. Y. (2010) Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its use for *in silico* analysis of heterologous protein production. *Biotechnol. J.* **5**, 705–715
272. Digan, M. E., Lair, S. V., Brierley, R. A., Siegel, R. S., Williams, M. E., Ellis, S. B., Kellaris, P. A., Provow, S. A., Craig, W. S., Veliçelebi, G., Harpold, M. M., and Thill, G. P. (1989) Continuous Production of a Novel Lysozyme via Secretion from the Yeast, *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.* **7**, 160–164
273. Vedvick, T., Buckholz, R. G., Engel, M., Urcan, M., Kinney, J., Provow, S., Siegel, R. S., and Thill, G. P. (1991) High-level secretion of biologically active aprotinin from the yeast *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol.* **7**, 197–201
274. Gram, H., Schmitz, R., and Ridder, R. (1998) Secretion of scFv antibody Fragments. in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, pp. 179–192, David R. Higgins and James M. Cregg, **Vol.103: Pichia Protocols**, 179–192
275. Brierley, R. A. (1998) Secretion of recombinant human insulin-like growth factor (IGF-I). in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, pp. 149–177, David R. Higgins and James M. Cregg, **Vol.103: Pichia Protocols**, 149–177
276. Tschopp, J. F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W., and Grinna, L. (1987) High-Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylotrophic Yeast, *Pichia Pastoris*. *Nat. Biotechnol.* **5**, 1305–1308
277. Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y.-H., Goto, Y., Réfrégiers, M., and Kardos, J. (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E3095–E3103
278. Fink, A. L. (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.* **3**, R9–R23
279. Katsuyama, ^Angela M., Cicero, D. O., Spisni, A., Paci, M., Farah, C. S., and Pertinhez, T. A. (2004) Letter to the Editor: ¹H, ¹⁵N and ¹³C Resonance Assignments of the ApaG Protein of the Phytopathogen *Xanthomonas Axonopodis* pv. *citri*. *J. Biomol. NMR.* **29**, 423–424
280. Cicero, D. O., Contessa, G. M., Pertinhez, T. A., Gallo, M., Katsuyama, A. M., Paci, M., Farah, C. S., and Spisni, A. (2007) Solution structure of ApaG from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals a fibronectin-3 fold. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **67**, 490–500
281. Krzysiak, T. C., Chen, B. B., Lear, T., Mallampalli, R. K., and Gronenborn, A. M. (2016) Crystal structure and interaction studies of the human FBxo3 ApaG domain. *FEBS J.* **283**, 2091–2101
282. Broutin, I., and Ducruix, A. (2000) Domaines structuraux et signalisation. *médecine/sciences.* **16**, 611
283. Sudol, M. (1998) From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. *Oncogene.* **17**, 1469–1474

284. Gibson, M. M., Bagga, D. A., Miller, C. G., and Maguire, M. E. (1991) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: the influence of new mutations conferring Co²⁺ resistance on the CorA Mg²⁺ transport system. *Mol. Microbiol.* **5**, 2753–2762
285. Abe, Y., Shioi, S., Kita, S., Nakata, H., Maenaka, K., Kohda, D., Katayama, T., and Ueda, T. (2017) X-ray crystal structure of *Escherichia coli* HspQ, a protein involved in the retardation of replication initiation. *FEBS Lett.* **591**, 3805–3816
286. Anilkumar, N., Jose, G. S., Sawyer, I., Santos, C. X. C., Sand, C., Brewer, A. C., Warren, D., and Shah, A. M. (2013) A 28-kDa Splice Variant of NADPH Oxidase-4 Is Nuclear-Localized and Involved in Redox Signaling in Vascular Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 10.1161/ATVBAHA.112.300956
287. Zhang, L., Nguyen, M. V. C., Lardy, B., Jesaitis, A. J., Grichine, A., Rousset, F., Talbot, M., Paclet, M.-H., Qian, G., and Morel, F. (2011) New insight into the Nox4 subcellular localization in HEK293 cells: First monoclonal antibodies against Nox4. *Biochimie.* **93**, 457–468
288. Zhen, L., King, A. A., Xiao, Y., Chanock, S. J., Orkin, S. H., and Dinauer, M. C. (1993) Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9832–9836
289. Valgardsdottir, R., Brede, G., Eide, L. G., Frengen, E., and Prydz, H. (2001) Cloning and Characterization of MDDX28, a Putative DEAD-box Helicase with Mitochondrial and Nuclear Localization. *J. Biol. Chem.* **276**, 32056–32063
290. Wang, Y., Lyu, Y. L., and Wang, J. C. (2002) Dual localization of human DNA topoisomerase III to mitochondria and nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12114–12119
291. Diebold, B. A., Wilder, S. G., De Deken, X., Meitzler, J. L., Doroshov, J. H., McCoy, J. W., Zhu, Y., and Lambeth, J. D. (2019) Guidelines for the Detection of NADPH Oxidases by Immunoblot and RT-qPCR. in *NADPH Oxidases* (Knaus, U. G., and Leto, T. L. eds), pp. 191–229, Springer New York, New York, NY, **1982**, 191–229
292. Kuroda, J., Nakagawa, K., Yamasaki, T., Nakamura, K., Takeya, R., Kuribayashi, F., Imajoh-Ohmi, S., Igarashi, K., Shibata, Y., Sueishi, K., and Sumimoto, H. (2005) The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells: Nox4 as a nuclear NAD(P)H oxidase. *Genes Cells.* **10**, 1139–1151
293. Graham, K. A., Kulawiec, M., Owens, K. M., Li, X., Desouki, M. M., Chandra, D., and Singh, K. K. (2010) NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria. *Cancer Biol. Ther.* **10**, 223–231
294. Griendling, K. K. (2004) Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart Br. Card. Soc.* **90**, 491–493
295. de Mendez, I., Homayounpour, N., and Leto, T. L. (1997) Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2177–2185
296. Pick, E. (2014) Cell-Free NADPH Oxidase Activation Assays: “In Vitro Veritas.” in *Neutrophil Methods and Protocols* (Quinn, M. T., and DeLeo, F. R. eds), pp. 339–403, Humana Press, Totowa, NJ, **1124**, 339–403
297. El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J.-C., Gougerot-Pocidallo, M.-A., and Dang, P. M.-C. (2016) Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol. Rev.* **273**, 180–193

298. 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
299. Kami, K., Takeya, R., Sumimoto, H., and Kohda, D. (2002) Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p. *EMBO J.* **21**, 4268–4276
300. 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
301. Karimi, G., Houée Levin, C., Dagher, M. C., Baciou, L., and Bizouarn, T. (2014) Assembly of phagocyte NADPH oxidase: A concerted binding process? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1840**, 3277–3283
302. Gomes, N. E., Brunialti, M. K. C., Mendes, M. E., Freudenberg, M., Galanos, C., and Salomão, R. (2010) Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **43**, 853–858
303. Ponath, V., and Kaina, B. (2017) Death of Monocytes through Oxidative Burst of Macrophages and Neutrophils: Killing in Trans. *PLOS ONE.* **12**, e0170347
304. Devalon, M. L., Elliott, G. R., and Regelman, W. E. (1987) Oxidative response of human neutrophils, monocytes, and alveolar macrophages induced by unopsonized surface-adherent *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **55**, 2398–2403
305. Dayam, R. M., and Botelho, R. J. (2017) Quantitative Immunofluorescence to Study Phagosome Maturation. in *Phagocytosis and Phagosomes* (Botelho, R. ed), pp. 113–123, Springer New York, New York, NY, **1519**, 113–123
306. Härtlova, A., Peltier, J., Bilkei-Gorzo, O., and Trost, M. (2017) Isolation and Western Blotting of Latex-Bead Phagosomes to Track Phagosome Maturation. in *Phagocytosis and Phagosomes* (Botelho, R. ed), pp. 241–248, Springer New York, New York, NY, **1519**, 241–248
307. Monceaux, V., Chiche-Lapierre, C., Chaput, C., Witko-Sarsat, V., Prevost, M.-C., Taylor, C. T., Ungeheuer, M.-N., Sansonetti, P. J., and Marteyn, B. S. (2016) Anoxia and glucose supplementation preserve neutrophil viability and function. *Blood.* **128**, 993–1002

Titre : Poldip2 : caractérisation et implication dans l'activité des NADPH Oxydases.

Mots clés : Poldip2, NADPH Oxydases, Stress Oxydant, *Pichia pastoris*, protéines membranaires

Résumé : Poldip2 est une protéine ubiquitaire initialement identifiée comme étant un partenaire de la sous unité p50 de la polymérase δ en intervenant dans la réplication et la réparation de l'ADN. Depuis sa découverte en 2003, beaucoup d'autres partenaires et fonctions lui ont été attribués. Elle joue, entre autre, un rôle régulateur de l'isoforme NADPH oxydase NOX4. A ce jour, le mode d'action de cette régulation n'a pas encore été identifié. Seul fait connu est que Poldip2 augmente l'activité de NOX4 en s'associant à son partenaire, la protéine p22phox. L'association de p22phox à d'autres isoformes de NADPH Oxydase (NOX1, NOX2 ou NOX3) nous mène à soupçonner une interaction possible entre ces derniers et Poldip2. Par ailleurs la co-localisation de NOX4 et NOX2 dans plusieurs types cellulaires, tels que les cellules du muscle lisse et l'endothélium mais également la coexpression de Poldip2 et NOX2 dans les artérioles rénale font de NOX2 un bon candidat pour l'étude de l'effet régulateur possible de Poldip2 sur cet isoforme.

Dans cette perspective, la protéine recombinante Poldip2 (rat) a été produite de manière hétérologue dans un système d'expression de levure *P. pastoris*. Grâce à un vecteur d'expression spécifique de cette levure, Poldip2 est sécrété dans le milieu extracellulaire. La protéine a été purifiée à partir du milieu de culture. L'analyse de la séquence par spectrométrie de masse a permis de confirmer l'identité du Poldip2 recombinant produit par la levure. Après avoir caractérisé structurellement Poldip2 et confirmé sa capacité à augmenter l'activité de NOX4, nous avons étudié son effet sur NOX2 des phagocytes. De manière surprenante, nos études en système cell-free ont montré des propriétés inhibitrices de Poldip2 vis-à-vis de NOX2 avec des interactions privilégiées avec certaines des composantes du complexe oxydase. Nos résultats suggèrent que l'interaction de Poldip2 avec le complexe pourrait constituer une nouvelle voie de régulation de NOX2 en perturbant l'assemblage du complexe NADPH oxydase.

Title : Poldip2 : characterization and involvement in the NADPH Oxidases activity

Keywords : Poldip2, NADPH Oxidase, Oxidative Stress, *Pichia pastoris*, membrane proteins

Abstract: Poldip2 is an ubiquitous protein initially identified as a partner for polymerase δ p50 subunit and is involved in DNA replication and repairing. Since its discovery in 2003, many partners and functions has been assigned to it. Poldip2 is also involved in NADPH Oxidase NOX4 isoform regulation. The enhancement of NOX4 activity was attributed to Poldip2 interaction with the membrane partner p22phox. However the mechanism by which it regulates NOX4 has not been identified yet. The association of p22phox with other Nox isoform (NOX1, NOX2 or NOX3) question the possible interaction of Poldip2 with Nox2. Furthermore the colocalization of NOX4 and NOX2 in several cell type as the smooth muscle cells and endothelium cells besides Poldip2 and NOX2 coexpression in renal arterioles makes NOX2 a good candidate for studying the possible

On this purpose the recombinant protein Poldip2 (rat) was produced in the yeast *P. pastoris*. Using a specific expression vector Poldip2 was secreted in the extracellular media. The protein was purified from culture media. Sequence analysis by mass spectrometry allowed to confirm the recombinant protein identity produced in the yeast. After the structural characterization of poldip2 and the confirmation of its functionality on NOX4, the protein was used to study its effect on NOX2 phagocyte. Surprisingly our study on cell free assay shows that Poldip2 has inhibiting properties regarding NOX2 and interacts in a privileged manner with certain component of the NADPH Oxidase complex. Our result suggest that the interaction of Poldip2 and the complex might constitute a new regulation for NOX2 by disturbing the NADPH Oxidase assembly.

