



**HAL**  
open science

# Dynamique de la protéine Nox2 lors de la phagocytose

Jérémy Joly

► **To cite this version:**

Jérémy Joly. Dynamique de la protéine Nox2 lors de la phagocytose. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS446 . tel-03862198

**HAL Id: tel-03862198**

**<https://theses.hal.science/tel-03862198>**

Submitted on 21 Nov 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.

# Dynamique de la protéine Nox2 lors de la phagocytose

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

École doctorale n°568 Signalisation et réseaux intégratifs en biologie  
(BIOSIGNE)  
Spécialité de doctorat : aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 20 novembre 2019, par

**Jérémy Joly**

## Composition du Jury :

Karim Benihoud Professeur, Université Paris-Sud (IGR, UMR 8203)	Président
Marie-Hélène Pacllet MCU-PH, Université Grenoble Alpes (EA 7408)	Rapporteur
Emma Colucci-Guyon Chargée de recherche, Institut Pasteur Paris (UMR 3738)	Rapporteur
Jean-Marc Verbavatz Professeur, Université Paris Diderot (IJM, UMR 7592)	Examineur
Oliver Nüße Professeur, Université Paris-Sud (LCP, UMR 8000)	Directeur de thèse
Sophie Dupré-Crochet Maitre de conférences, Université Paris-Sud (LCP, UMR 8000)	Co-Directeur de thèse



## Remerciements

Rétrospectivement la thèse ce fut pour moi comme une visite d'un panthéon. On est entouré de dieux et déesses antiques dont l'immortalité dans le monde de la recherche est bien supérieure à la nôtre. Nous, simples mortels, devrions à la manière des héros faire nos preuves, accomplir des exploits évalués dans le monde entier grâce à l'impact factor. Si nos triomphes sont suffisamment importants nous serons l' élu, celui qui aura le droit à l'ambrosie, un poste de chercheur ou de maître de conférences.

Tout d'abord je tiens à remercier le pouvoir bicéphale qui guida ce travail. Oliver (Saturne) mes sincères remerciements pour la grande liberté que tu m'as accordée, pour m'avoir laissé faire mes propres erreurs qui m'ont permis d'apprendre et d'avancer. Sophie (Minerve) qu'aurais-je pu faire sans ton abnégation, ton sens du mot juste qui réchauffe les âmes les plus éprouvées, sans ta foi inexpugnable en notre capacité à dépasser les écueils ? Ces mentors ont été brillamment secondés par Elodie (Uzume), l'ambianceuse officieuse du groupe biophysique et tellement plus que ça, un soutien et une aide inaltérable au quotidien.

Je souhaiterais souligner toute la tendresse que j'éprouve pour Michel (Esus), Joël (Ganesha), Essyllt (Téthys), Laura (Hestia) les fanatiques du traditionnel repas de midi prêts à braver les tortueux escaliers exposés au céleste courroux par manque d'entretien ; tout comme je voudrais faire part de ma dévotion à l'égard de Sophie (Aphélie) et d'Emilie (Euthymie) pour la chaleur qu'elles m'ont toujours témoignée. J'adresse aussi mes plus profonds témoignages de piété à Tania (Chloris), Céline (Angerona), Yasmina (Belisama) et aux Hélène (Mokosh et Lady Saso) pour leur gentillesse, leur aide pour les rudiments de l'horticulture ou pour la reconnaissance du vrai miel et des méthodes naturelles pour lutter contre les moustiques. Permettez que je continue en présentant mes hommages au reste du groupe biophysique et aux membres du groupe RISMAS du premier étage du bâtiment 350 pour les agréables moments que nous avons partagés. Oserais-je terminer cette pléiade de témoignages de reconnaissances par mes compagnons stagiaires, doctorants et post-doctorants passés par le groupe biophysique et RISMAS ? Une telle dilection nous unit, que de rencontres enrichissantes et uniques, les plus grands d'entre vous hantant encore tendrement mon souvenir car « Si je diffère de toi, loin de te léser, je t'augmente » (Antoine de Saint-Exupéry. Lettre à un otage, Chapitre VI, page 40, 1943).



Je fais part de mon extrême dévotion envers tous nos collaborateurs que ce soit Romain (Ptah), Laetitia ou Sandrine à la plateforme Imagerie-Gif ou M. Roos (Amsterdam) et Mme Reichenbach (Zurich) qui nous ont fourni des cellules sans lesquelles mon projet n'aurait pas existé.

Je remercie M. Verbabatz et M. Benihoud d'avoir accepté d'examiner mon travail et j'avoue une certaine hâte à me confronter aux jugements de l'ensemble du jury. Je tiens particulièrement à évoquer toute ma gratitude pour Mme Colucci et Mme Palet qui ont accepté d'être mes rapporteuses.



## Table des matières

Abréviations	ix
Première partie - Le contexte	1
1. Biographie d'un neutrophile	2
Vie et mort d'un neutrophile humain	2
L'hématopoïèse	2
La granulopoïèse	3
Mobilisation des neutrophiles	5
Recrutement des neutrophiles humain	6
Priming	6
Franchissement de l'endothélium vasculaire	7
Diversité de l'action des neutrophiles	8
Arrêt de la réponse inflammatoire et réparation tissulaire	10
2. Le choix des armes	12
La NETose chez l'Homme	12
La phagocytose	14
Considérations biochimiques	15
Considérations biophysiques	16
Considérations biologiques	18
Inhibition de la phagocytose	22
La NADPH oxydase	23
Les sous-unités membranaires	24
Adressage des sous-unités membranaires et protéines impliquées dans leur recrutement au phagosome	25
Les sous-unités cytosoliques	26
Activation et dynamique du complexe	27
Les pathologies liées à une absence/diminution de la production de FRO	29
3. Objectifs de l'étude	31
Quel modèle pour étudier la protéine Nox2 dans les neutrophiles ?	31
Les PLB-985, la référence	31
Création des PLB-985 X-CGD GFP-Nox2	32
Objectifs de l'étude	33
Deuxième partie - Résultats	35





1. Caractérisation des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2	36
Expression de la protéine GFP-Nox2	36
Détection des protéines GFP-Nox2	36
Homogénéité de l'expression de la protéine GFP-Nox2 au sein d'une population	37
Localisation subcellulaire de la protéine	37
Fonctionnalité des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2	38
Etude de la phagocytose des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2	38
Etude de la production de FRO avec les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2	39
2. Les compartiments cytoplasmiques contenant Nox2 : nature et implication dans la phagocytose	41
Colocalisation des endosomes EEA1 et Rab11 positifs avec la protéine Nox2	45
Etude dans les cellules non stimulées	45
Endosomes Nox2 positifs et phagocytose	50
Fusion des endosomes avec le phagosome	51
3. Cinétique de Nox2 au phagosome : de l'internalisation à la destruction	52
Cinétique de la protéine GFP-Nox2 au phagosome pendant les temps courts	52
Cinétique de la protéine GFP-Nox2 au phagosome pendant les temps longs	53
4. Modulation du recrutement de Nox2 : rôle de IQGAP1	55
Expression de la protéine IQGAP1 dans les cellules PLB-985	55
Expression d'IQGAP1 dans les cellules non stimulées	55
Présence de la protéine IQGAP1 lors de la phagocytose dans notre modèle	59
Colocalisation des protéines IQGAP1 et Nox2 lors de la phagocytose dans notre modèle	59
Rôle de la protéine IQGAP1 dans notre modèle	59
Impact de l'inhibition de la protéine IQGAP1 sur la phagocytose	61
Impact de l'inhibition de la protéine IQGAP1 sur la production de FRO	61
5. Organisation spatiale de Nox2 à la synapse phagocytaire	63
Analyse de la répartition et de la taille des clusters	63
Répartition des clusters	65
Taille des clusters	65
Analyse de l'étalement des cellules et du nombre de clusters à la membrane	66
Mesure de l'étalement des cellules	66
Nombre de clusters à la membrane	67
Troisième partie - Discussion	69
Pertinence du modèle cellulaire PLB-985 X-CGD GFP-Nox2	71
Rôle de la séquence de liaison dans la production de FRO	71



Phagocytose des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2	72
Utilisation de l'interféron gamma	72
Compartiments subcellulaire contenant la protéine Nox2	73
Endosomes et protéine Nox2	73
Evaluation de la colocalisation	74
Trafic de la protéine Nox2 dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2	75
Accumulation de la protéine Nox2 au phagosome	75
Recyclage des composés du phagosome	76
Rôle de chacune des voies dans l'apport de Nox2	76
Influence de la protéine IQGAP1 sur le recrutement de la protéine Nox2	77
La synapse phagocytaire	78
Comparaison avec les autres synapses immunologiques	78
Taille et rôle des clusters de la protéine Nox2	79
Importance des FRO dans l'étalement des cellules	80
Importance des FRO dans le recrutement de la protéine Nox2 à la membrane plasmique	80
Développement et limites du <i>d</i> STORM	81
Conclusions	83
Quatrième partie - Matériels et Méthodes	86
1. Lignées cellulaires : cultures et différenciation	87
Culture cellulaire	87
Différenciation	87
Transfection	88
Transfection des <i>small interference</i> ARN	88
Transfection du plasmide GFP-GFP-IQGAP1	88
2. Biochimie : Extraction protéique et marquage de zymosane	89
Western-Blot et immunoblot	89
Préparation des membranes et extraction protéique	89
Electrophorèse et Immunoblot	90
Préparation des particules de zymosane et des levures DCFH <sub>2</sub>	90
3. Biologie cellulaire : Etude à l'échelle d'une population	92
Mesure des FRO en luminométrie	92
Cytométrie en flux	92
Phagocytose des particules de zymosane et des levures DCFH <sub>2</sub>	92
Phénotypage des récepteurs	93



4. Biologie cellulaire : Etude d'une cellule en microscopie	94
Cinétique de la protéine GFP-Nox2 au phagosome	94
Dynamique de la protéine GFP-GFP-IQGAP1 lors de la phagocytose	95
Dynamique des endosomes chargés avec le dextran TMR lors de la phagocytose	95
Immunofluorescence	96
Le TIRF- <i>d</i> STORM	97
Intérêt de la technique	97
Principe	98
Préparation des lamelles	99
Expérience	100
Acquisition	101
5. Statistiques et analyses d'images	103
Statistiques	103
Analyse d'images	103
Etude de la colocalisation	103
Accumulation de Nox2 au phagosome	105
Expression de la protéine IQGAP1 dans les PLB-985 WT après transfection des siARN	105
Super-résolution	105
Cinquième partie - Bibliographie	108



## Abréviations

AML	<i>Acute Myeloid Leukemia</i>
ARF	<i>ADP-Ribosylation Factor</i>
ARP	<i>Actin Related Protein</i>
BPI	<i>Bactericidal/Permeability Increasing protein</i>
BT	Bleu de trypan
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
C-myb	<i>Cellular Myeloblastosis</i>
C-myc	<i>Cellular Myelocytomatosis</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand</i>
CCP	Coefficient de corrélation de Pearson
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinases</i>
CDP	<i>CCAAT displacement protein</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CLIP	<i>CAP-GLY domain containing linker protein</i>
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
CR	<i>Complement Receptor</i>
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) Ligand
CXCR	CXC chemokine receptors
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>
DBSCAN	<i>Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise</i>
DCF	<i>Dichlorofluorescein</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dSTORM	<i>direct Stochastic Optical Resolution Microscopy</i>
DUSP	<i>Dual Specificity protein Phosphatase</i>
EEA	<i>Early Endosome Antigen</i>
Elf	<i>E74-Like Factor</i>
ELMO	<i>Engulfment and cell motility protein</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FBP17	<i>Formin-Binding Protein</i>
FcγR	Récepteur du fragment cristallisable γ
FPR	<i>Formyl Peptide Receptor</i>
FRO	Forme Réactive de l'Oxygène
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i> (largeur à mi-hauteur)
Fyb/SLAP	<i>Fyn-binding/SLP-76-Associated Protein</i>
G-MDSC	<i>granulocytic myeloid-derived suppressor cells</i>
Gab2	<i>Grb2-associated Binder</i>
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
Gfi	<i>Growth Factor Independent protein</i>
GFP-Nox2	GFP est lié au N-terminal de la protéine Nox2





GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GMP	<i>Granulocyte Monocyte Progenitor</i>
GPI	<i>Glycophosphatidylinositol</i>
GRO- $\alpha$	<i>Growth-regulated alpha protein</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HILO	<i>Highly Inclined and Laminated Optical sheet microscopy</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
ICAM	<i>Intracellular Cell Adhesion Molecule</i>
IL	<i>Interleukine</i>
IP3	<i>Inositol triphosphate</i>
IQGAP	<i>IQ-motif-containing GTPase-Activating Protein</i>
ISC (K <sub>ISC</sub> )	<i>Intersystem Crossing</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
Jak	<i>Janus kinase</i>
LAMP	<i>Lysosome-associated membrane glycoprotein</i>
LAT	<i>Linker Activated T cells</i>
LDH	<i>Lactate Déshydrogénase</i>
LDN	<i>Low Density Neutrophils</i>
LEF	<i>Lymphoid Enhancer-binding Factor</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen 1</i>
LMP	<i>Lymphoid-primed Multipotent Progenitors cells</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAC-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MAP Kinase	<i>Mitogen-Activated Protein kinase</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
miR	<i>MicroARN</i>
mKO2	<i>mKusabira-Orange2</i>
MMP	<i>Matrix Metallopeptidase</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response protein MyD88</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate</i>
NET	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NFI-A	<i>Nuclear Factor 1 A-type</i>
NR (K <sub>NR</sub> )	<i>Non radiative</i>
PAF	<i>Platelet Activation Factor</i>
PALM	<i>Photo-activated localization microscopy</i>
PB1	<i>Phox and Bem1</i>
PD-1	<i>Programmed cell Death protein 1</i>
PH	<i>Pleckstrin Homology Domain</i>
PtdIns / PI	<i>Phosphatidylinositol</i>
PKC	<i>Protéine Kinase C</i>
PMA	<i>Phorbol Myristate Acétate</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor ou Proline Rich Region</i>
PSF	<i>Point Spread Function</i>
PSGL1	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand 1</i>

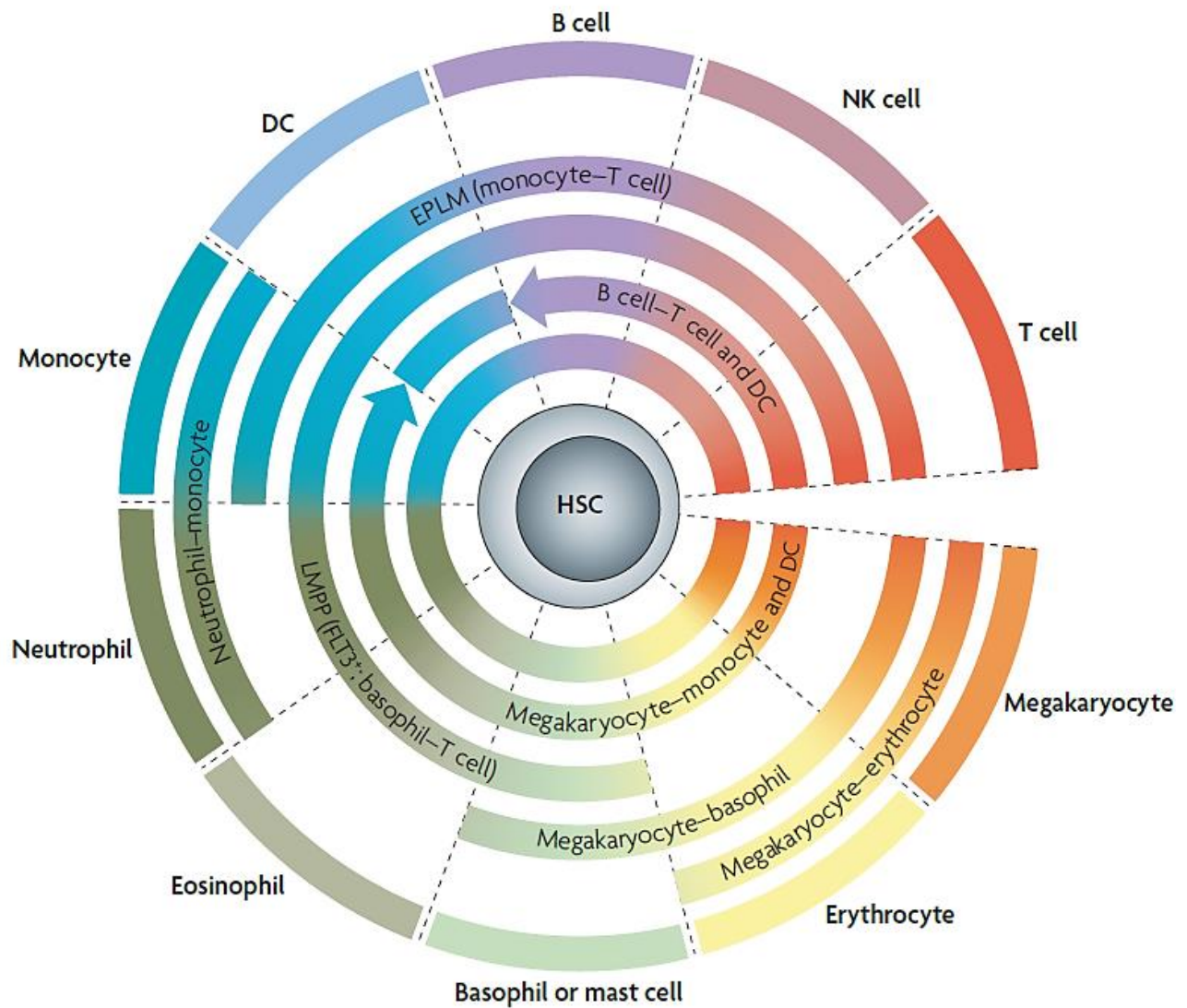


PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
PTP1B	<i>Protein-tyrosine phosphatase 1B</i>
PU.1	<i>Purine Box (Transcription factor linked to)</i>
PX	<i>Phagocyte Oxidase</i>
R (K <sub>R</sub> )	<i>Radiative</i>
Rab	<i>Ras-related in brain</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RAF	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
Sar1	<i>Secretion-associated RAS-related protein 1</i>
SH3	<i>SRC Homology 3 Domain</i>
siARN	<i>Small interference ARN</i>
SLP-76	<i>SH2-domain containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
SMAC	<i>Supramolecular Adhesion Complex</i>
SNAP-23	<i>Synaptosomal-Associated Protein 23</i>
SNARE	<i>SNAP Receptor</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STED	<i>Stimulated-Emission-Depletion</i>
STIM	<i>Stromal Interaction Molecule 1</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine Kinase</i>
Tat	<i>Trans-Activator of Transcription</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TIRF	<i>Total Internal Reflexion Fluorescence</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TMR	<i>Tetramethylrhodamine</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TPR	<i>Tetratricopeptide Repeat motif</i>
VAMP	<i>Vesicle Associated Membrane Protein</i>
VASP	<i>Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VLA	<i>Very Late Antigen</i>
Vps34	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 34</i>
WASP	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome Protein</i>
WIP	<i>WASP Interacting Protein</i>
X-CGD	<i>X linked Chronic Granulomatous Disease</i>
YOP	<i>Yersinia outer protein</i>
ZO	<i>Zymosane recouvert d'opsonines</i>



**Première partie**

**Le contexte**



**Figure 1. Représentation de l'hématopoïèse.** D'après Ceredig *et al.*<sup>1</sup> Parfois une cellule souche hématopoïétique (HSC) se divise de manière asymétrique entraînant l'apparition d'un progéniteur multipotent. Cette cellule va ensuite se différencier en cellule *lymphoid-primed multipotent progenitors cells* (LMPP/LMP) capable de donner toutes les cellules mis à part les précurseurs des érythrocytes et des mégacaryocytes. Cette cellule se différenciera en *granulocyte-monocyte progenitor* capable de ne donner que des neutrophiles ou des monocytes. Elle entrera ensuite dans la granulopoïèse.

## 1.

### Biographie d'un neutrophile

La survie des organismes a toujours été une condition *sine qua non* pour la survie des espèces et plus généralement de la vie. Aussi sont apparus dès les premiers êtres unicellulaires des mécanismes permettant de lutter contre les parasites. L'évolution conduisit à l'émergence des premiers organismes pluricellulaires il y a 2.1 milliards d'années<sup>2</sup> et progressivement des cellules capables d'éliminer les pathogènes firent leur apparition. Il y a 940 millions d'années apparurent au sein des métazoaires, chez les éponges, des cellules capables de phagocytose : les amibocytes (les « aïeux » des phagocytes humains)<sup>3</sup>. Au cours du temps le système immunitaire inné se complexifia et lorsque le genre *Homo* émergea il y a 2,8 millions d'années<sup>4</sup>, ces phagocytes (cellules dendritiques, macrophages et neutrophiles) étaient devenus des cellules spécialisées dans la défense de l'organisme avec des fonctions propres à chacune.

#### Vie et mort d'un neutrophile humain

##### L'hématopoïèse

Chez l'Homme adulte la genèse des neutrophiles et de toutes les cellules de la lignée hématopoïétique se déroule dans la moelle osseuse, c'est l'hématopoïèse (Figure 1). Il s'agit d'un processus continu ponctué par divers phénotypes caractéristiques de la progression et de la différenciation des cellules<sup>5</sup>. Chaque neutrophile a pour parent une cellule souche hématopoïétique ( $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD90}^+ \text{CD49f}^+ \text{CD45RA}^-$ )<sup>6</sup> <sup>a</sup>. Ces cellules résidentes de la moelle osseuse, capable d'auto-renouvellement, ne se divisent que tous les cent soixante-quinze à trois cents cinquante jours<sup>7</sup>. Parfois leur division est asymétrique entraînant l'apparition d'un progéniteur multipotent ( $\text{CD133}^+ \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low}} \text{CD90}^- \text{CD49f}^- \text{CD45RA}^-$ )<sup>8</sup> ayant une capacité d'auto-renouvellement plus limitée et dont la destinée dépend de son activité transcriptionnelle<sup>5</sup>. Pour devenir un neutrophile, il va subséquemment se différencier en cellule *lymphoid-primed multipotent progenitors cells*<sup>9</sup> (LMP -  $\text{CD133}^+ \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low}} \text{CD45RA}^+ \text{CD10}^-$ )<sup>8</sup>, capable de se différencier en *multilymphoid progenitor* ou en

---

<sup>a</sup> Les *clusters of differentiation* (CD) sont des molécules de surface utilisées pour la distinction et l'identification des cellules lors d'un immunophénotypage.



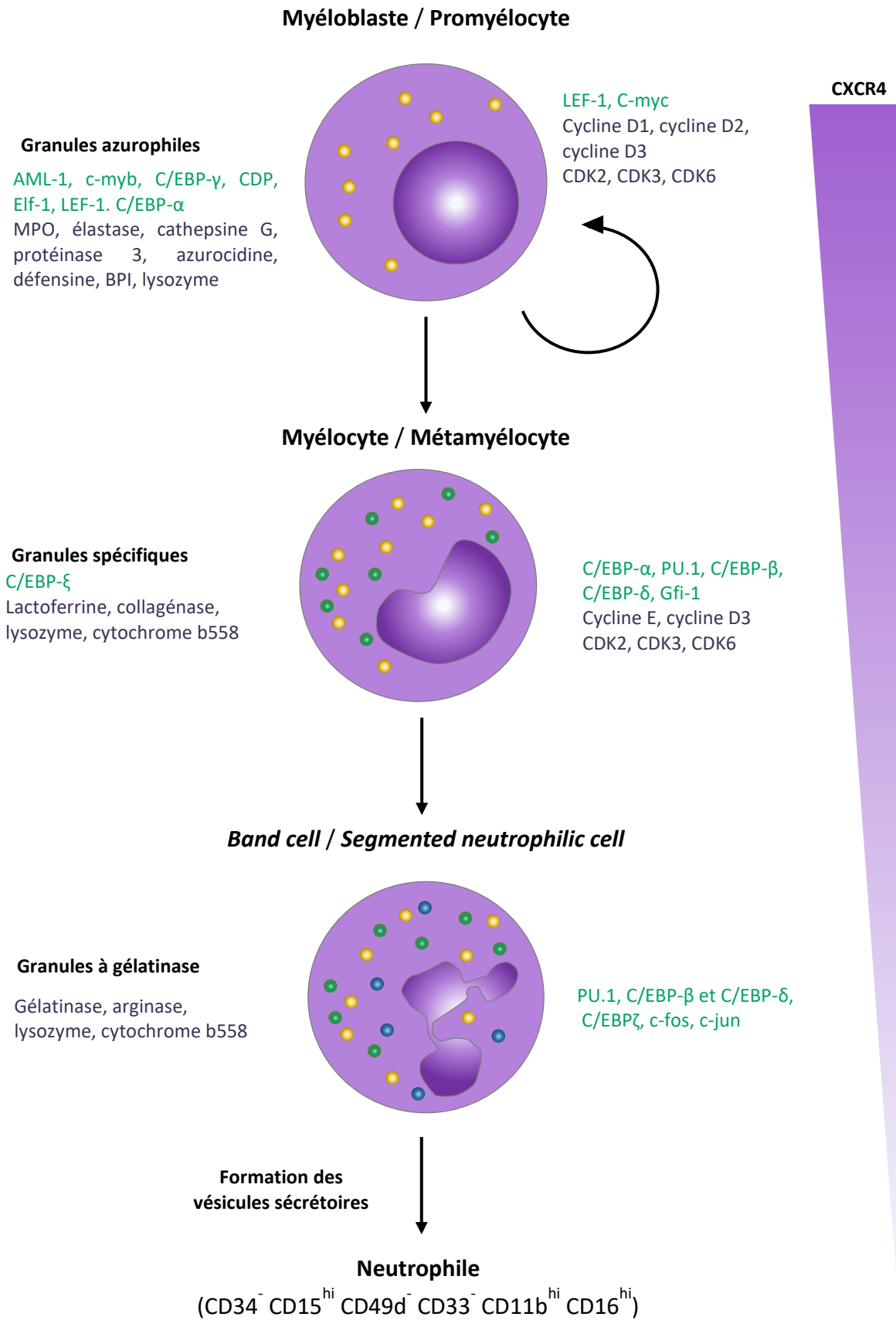


*Granulocyte Monocyte Progenitor* (GMP - CD133<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD10<sup>-</sup> CD7<sup>-</sup>)<sup>8</sup>. Après le stade GMP le futur neutrophile entre dans la phase terminale de sa différenciation (la granulopoïèse) qui débute au stade myéloblaste.

### La granulopoïèse

Les deux premiers stades de la granulopoïèse (myéloblaste et promyélocyte) sont les derniers stades où les cellules possèdent une activité mitotique ; la protéine *lymphoid enhancer-binding factor 1* (LEF-1), dont la transcription est maximale durant la phase promyélocyte, augmentant la transcription des protéines c-myc et de la cycline D1 qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire<sup>10</sup>. De surcroît on retrouve encore à ce moment de la différenciation les trois protéines CDK (CDK2, CDK3, CDK6) impliquées dans le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire et leurs cyclines associées (cycline D1, cycline D2, cycline D3) à l'exception de la cycline E<sup>11</sup>. Les stades myéloblastes et promyélocytes sont aussi marqués par l'apparition des granules azurophiles qui contiennent notamment : la myéloperoxydase, l'élastase, la cathepsine G, la protéinase 3, l'azurocidine, la défensine, le BPI, le lysozyme<sup>12,13</sup>. La synthèse de ces protéines est finement contrôlée par des facteurs de transcription, pour la plupart spécifique de ces deux phases ; parmi eux on retrouve les protéines AML-1, c-myb, C/EBP- $\gamma$ , CDP, Elf-1<sup>14</sup> et LEF-1. Le facteur de transcription LEF-1 va induire, tout comme la fixation du G-CSF sur son récepteur, la transcription d'un autre facteur de transcription C/EBP- $\alpha$ <sup>15</sup> et ensemble ils vont permettre la synthèse de la protéine élastase<sup>16</sup>.

Les stades myélocyte (CD34<sup>-</sup> CD15<sup>hi</sup> CD49d<sup>hi</sup> CD33<sup>hi</sup> CD11b<sup>hi</sup> CD16<sup>-</sup>)<sup>17</sup> et métamyélocyte (CD34<sup>-</sup> CD15<sup>hi</sup> CD49d<sup>-</sup> CD33<sup>-</sup> CD11b<sup>hi</sup> CD16<sup>-</sup>)<sup>17</sup> se caractérisent par le début de la segmentation du noyau et le début de la phase post-mitotique de la granulopoïèse, qui durera 6 à 7 jours. La perte de la capacité mitotique est due à la protéine C/EBP- $\alpha$  qui va former un complexe avec E2F, empêchant la cellule d'entrer en phase S et induisant une répression de l'expression du facteur de transcription c-myc qui maintenait la cellule à un stade prolifératif mais indifférencié<sup>18</sup>. De plus la protéine C/EBP- $\alpha$  va favoriser la transcription du miR-223 en se fixant sur son promoteur à la place de la protéine NFI-A. La transcription du miR-223 entraîne la répression de la traduction de la protéine NFI-A qui favorisait la prolifération cellulaire<sup>19</sup>. En sus de l'action de la protéine C/EBP- $\alpha$ , il y a une diminution de l'expression des



**Figure 2. Schématisation de la granulopoïèse.** Sont représentés les facteurs de transcription (vert) et les protéines (noir) caractéristiques de chaque stade. Les granules azurophiles sont représentés en jaune, les granules spécifiques en vert et les granules à gélatinase en bleu. L'expression de CXCR4, nécessaire à la domiciliation dans la moelle osseuse diminue au cours de la différenciation.

protéines CDK2, CDK4 et CDK6 associées à la phase G1 du cycle cellulaire<sup>11</sup> ; les cellules entrent alors en quiescence. C'est dans ces stades myélocyte et métamyélocyte que se forment les granules spécifiques<sup>20</sup> dans lesquels on retrouve entre autres : la lactoferrine, la collagénase, le lysozyme ou le cytochrome b558<sup>12,13</sup>. Ils sont dus à l'expression du facteur de transcription C/EBP- $\xi$ , dont l'activité nécessite au préalable l'acétylation de ses lysines 121 et 198<sup>21</sup>, et à la fin de l'expression des facteurs de transcription AML-1, C-myb et C/EBP- $\gamma$  spécifiques des protéines des granules azurophiles. L'expression des protéines CDP et C/EBP- $\alpha$  reste similaire comme lors de toutes les étapes de la granulopoïèse et l'expression des protéines PU.1, C/EBP- $\beta$  et C/EBP- $\delta$  continue de croître<sup>14</sup>. Enfin le facteur de transcription Gfi-1 va être exprimé et il va inhiber les gènes codant pour les microARN miR-21 et miR-196b qui sont respectivement : un activateur de la monopoïèse et un répresseur de la granulopoïèse<sup>22</sup>.

C'est lors de la transition vers les deux dernières étapes que sont les *band cell* (CD34<sup>-</sup> CD15<sup>hi</sup> CD49d<sup>-</sup> CD33<sup>-</sup> CD11b<sup>hi</sup> CD16<sup>int</sup>)<sup>17</sup> et les *segmented neutrophilic cell* que les granules à gélatinase font leurs apparitions. Bien que tirant leur nom de la gélatinase qu'ils contiennent ils intègrent aussi en leur sein : de l'arginase, du lysozyme, ou le cytochrome b558<sup>12,13</sup>. L'expression des facteurs de transcription PU.1, C/EBP- $\beta$ , C/EBP- $\delta$  augmente et se maintient dans les neutrophiles matures. Celle des protéines C/EBP- $\zeta$ , c-fos, c-jun augmente aussi et cette augmentation se poursuivra dans le neutrophile mature<sup>14</sup>. C'est à ce moment que se forment les vésicules sécrétoires qui présentent de nombreux récepteurs et protéines membranaires à leur surface. Enfin, après toutes ces étapes, le neutrophile est pleinement mature (CD34<sup>-</sup> CD15<sup>hi</sup> CD49d<sup>-</sup> CD33<sup>-</sup> CD11b<sup>hi</sup> CD16<sup>hi</sup>)<sup>17</sup> (Figure 2).

Cette représentation de la genèse des neutrophiles ne fait pas consensus et de nombreuses versions de l'hématopoïèse chez l'Homme cohabitent, certaines présentant rapidement une absence de lignée multipotente. Bien que des différences dues aux modèles utilisés existent (lignées cellulaire, sang de cordon ombilical, foie fœtal, moelle osseuse), ces différentes versions de l'hématopoïèse ne sont pas irréconciliables. En effet les cellules sont rapidement prédestinées par l'expression de facteurs de transcription. En conséquence, dans une population de cellules LMP qui est isolée à partir de marqueur phénotypique, se trouve une multitude de cellules qui par leurs activités transcriptionnelles sont en réalité déjà unipotentes<sup>23</sup>. Ce destin peut être altéré par le microenvironnement comme l'illustre



l'exemple des cellules pré-B, qui *in vitro* sont capables de se différencier en progéniteur myéloïde<sup>24</sup>.

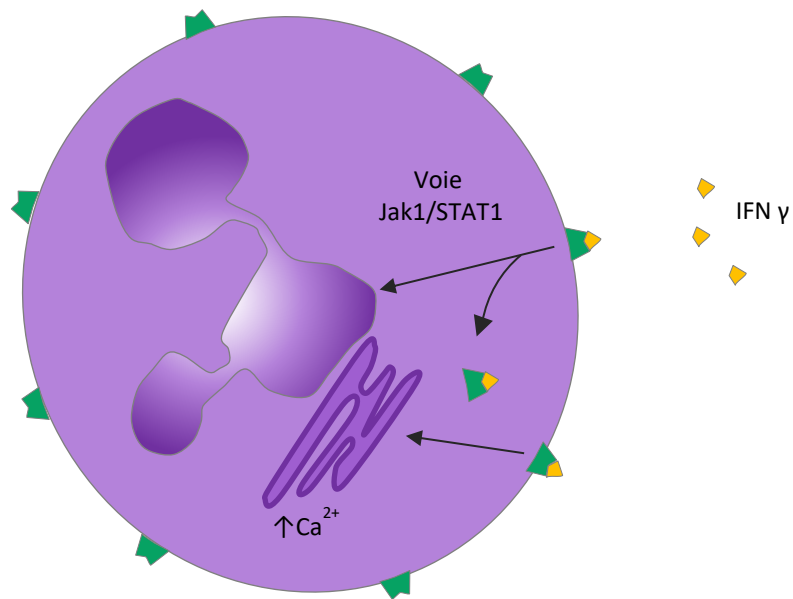
### Mobilisation des neutrophiles

Durant tout le processus de différenciation les neutrophiles restent dans la moelle osseuse grâce à l'interaction du chimioattractant CXCL12<sup>b</sup> avec son récepteur CXCR4<sup>25</sup> dont l'expression diminue au cours de la maturation ; permettant aux neutrophiles gagnant la circulation de ne plus être sensibles à la protéine CXCL12. Les neutrophiles sont alors très réceptifs à la protéine CXCL1, le ligand de la protéine CXCR2<sup>26</sup>, qui est sécrétée par les macrophages résidents des tissus, les cellules épithéliales et les neutrophiles lors d'une inflammation. Cependant l'augmentation de l'expression de la protéine CXCR4 au cours de leur vie de cellule mature (humaine)<sup>27</sup> laisse penser que les neutrophiles sénescents retournent dans la moelle osseuse où ils sont éliminés, comme c'est le cas pour les neutrophiles murins<sup>26</sup>. Pour la grande majorité des neutrophiles, après une durée de vie relativement courte allant de quelques heures à quelques jours selon les auteurs<sup>28,29</sup>, ils sont éliminés de l'organisme. Durant cette brève existence, une part importante des neutrophiles matures reste dans la moelle osseuse tandis qu'environ  $4 \times 10^6$  neutrophiles par litre de sang<sup>30,31</sup> arpentent la circulation sanguine représentant 60% des leucocytes sanguin. Enfin des réserves de neutrophiles de tailles variables se trouvent dans divers tissus<sup>28</sup> et peuvent être mobilisées notamment lors d'infection ou de processus inflammatoire.

Lors d'une infection systémique un processus va même permettre une mobilisation encore plus importante des neutrophiles, c'est la granulopoïèse d'urgence. Favorisé par les protéines IL-6 ou GM-CSF, une modification de l'expression de certains gènes va s'opérer conduisant par exemple à une augmentation de la protéine C/EBP- $\beta$  qui est nécessaire uniquement lors de ce processus. Cela va se traduire par un relargage dans la circulation sanguine de neutrophiles matures et immatures (métamyélocyte, *band cells* ou *segmented neutrophilic cells*) qui possèdent cependant déjà la capacité de phagocyter, produire des formes réactives de l'oxygène (FRO), de suivre un gradient de chimioattractant et de tuer des bactéries<sup>32</sup>.

---

<sup>b</sup> Cytokines : petites protéines jouant un rôle important dans la signalisation cellulaire et notamment auprès des cellules du système immunitaire. Cette grande famille regroupe les chimiokines, les interférons, les interleukines et le *Tumor Necrosis Factor*.



- ↑ Chimiotactisme
- ↑ Adhésion cellulaire
- ↑ Phagocytose (Récepteur du complément, Récepteur du LPS, FcγRI, FcγRIII)
- ↑ Réponse adaptative
- ↑ Expression de Nox2

- ↓ CXCR4
- ↓ Expression des chimiokines impliquées dans le recrutement des neutrophiles
- ↓ Expression de p47<sup>phox</sup>

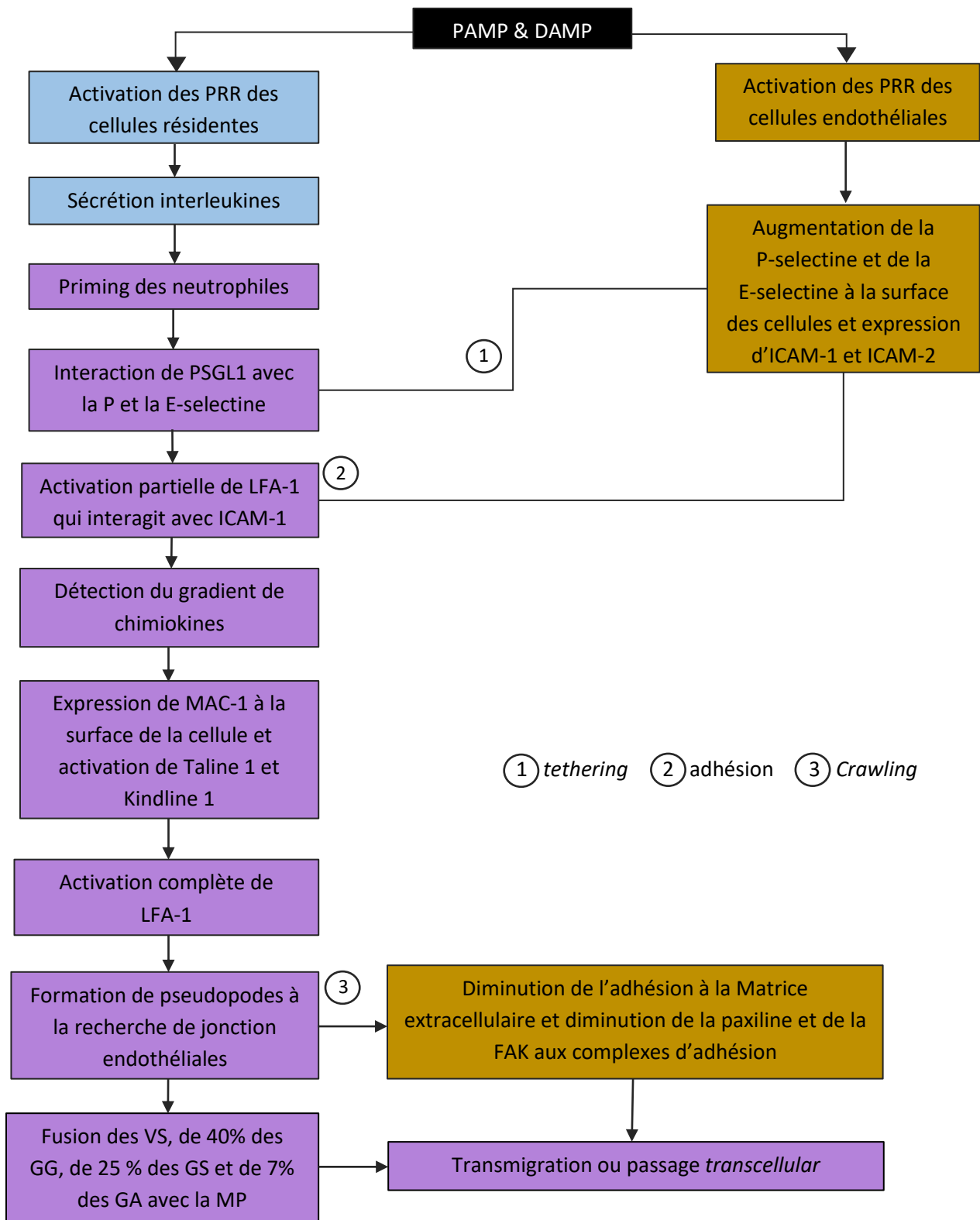
**Figure 3. Effet du priming par l'interféron gamma sur les neutrophiles humains.** La fixation de l'interféron sur son récepteur entraîne une activation de la voie Jak/STAT provoquant une profonde modification de l'expression génique. Concomitamment il y a d'une part une internalisation du complexe ligand/récepteur et d'autre part un stockage dans les compartiments intracellulaires du calcium afin d'augmenter la sensibilité de la cellule à un second stimulus.

## Recrutement des neutrophiles humain

### Priming

Lors d'une infection localisée ou d'un processus inflammatoire stérile, les premières cellules du système immunitaire à agir vont être les macrophages et les mastocytes résidents du tissu concerné qui vont détecter des signaux propres aux pathogènes ou à la mort anormale des cellules (les *Pathogen Associated Molecular Patterns* et les *Damage Associated Molecular Patterns*) grâce à leur *Pattern Recognition Receptor* (PRR). En réponse, diverses molécules vont être produites par les cellules résidentes du tissu parmi lesquels certaines (chimioattractants, interleukines) vont gagner la circulation sanguine et pré-activer les neutrophiles au même titre que certaines molécules spécifiques des pathogènes (*priming*)<sup>33</sup>. On distingue trois types de molécules induisant le *priming* : les molécules chimioattractantes (fMLF, C5a, LTB4, PAF), les cytokines (TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-18, adiponectine) et les agonistes des TLR (LPS, Lipopeptide, flagelline, CL097, CL075, zymosane)<sup>33</sup>. Les modifications produites sont nombreuses et variables en fonction du stimulus, mais elles sont généralement résumées par une augmentation de la production de FRO, de l'exocytose, de la formation de NET et du chimiotactisme en réponse à un second stimulus ainsi que par une modulation de la durée de vie des neutrophiles<sup>28</sup>. Si l'on prend l'exemple de l'interféron gamma (interféron de type II) qui est produit entre autre par les *innate lymphoid cells* du groupe 1<sup>34</sup>, les lymphocytes T, les macrophages et dans certains cas les neutrophiles<sup>35</sup>, sa fixation sur son récepteur va modifier l'activité transcriptionnelle de la cellule via la voie Jak1/STAT1 puis le complexe ligand/récepteur va être internalisé<sup>36</sup> (Figure 3). Concomitamment l'ion calcium va être capturé depuis le milieu extracellulaire et séquestré dans les compartiments intracellulaires afin d'augmenter la sensibilité de la cellule à un nouveau stimulus<sup>37</sup>. Parmi les gènes dont l'expression est augmentée par cette régulation, on retrouve des gènes codant pour des protéines impliquées dans le chimiotactisme, l'adhésion cellulaire, la phagocytose (le récepteur du complément, le récepteur du LPS, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII), la production de FRO (Nox2), la mise en place de la réponse adaptative ou un marqueur d'activation<sup>38</sup>. A l'inverse l'expression de certains gènes diminue. C'est notamment le cas du gène codant pour la protéine CXCR4 ou de gènes codant pour des chimiokines impliquées dans le recrutement des neutrophiles (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , GRO- $\alpha$ , IL-8). L'expression du gène codant pour la protéine





**Figure 4.** Schéma des mécanismes permettant au neutrophile de franchir la barrière endothéliale des vaisseaux. En bleu sont représentées les actions concernant les cellules résidentes du tissu ; en violet se sont celles des neutrophiles ; en jaune celles des cellules endothéliales. VS : vésicules sécrétoires, GG : granules à gélatinase, GS : granules spécifiques, GA : granules azurophiles, MP : membrane plasmique

p47<sup>phox</sup> est aussi réduite<sup>39</sup> mais la protéine étant en excès, cela n'empêche pas l'augmentation de la production de FRO<sup>38</sup>.

### Franchissement de l'endothélium vasculaire

Parallèlement, au *priming*, l'activation des PRR à la surface des cellules endothéliales va augmenter l'expression de protéines impliquées dans le recrutement des neutrophiles à leur surface. Si l'exocytose de la P-selectine contenue dans les corps de Weibel-Palade ne prend que quelques minutes, la E-selectine doit être transcrite puis traduite ce qui prend environ quatre-vingt-dix minutes<sup>40,41</sup>. Ces deux protéines vont notamment être reconnues par la protéine *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1* (PSGL1) du neutrophile ce qui va induire sa capture dans cette zone (*tethering*). Il va alors continuer d'avancer le long du vaisseau en suivant le flux de la circulation sanguine (*rolling*)<sup>42</sup>. La fixation de la protéine PSGL1 à son ligand entraîne une activation partielle de la protéine *Lymphocyte function-associated Antigen 1* (LFA-1) qui va se fixer aux protéines *Intracellular Cell Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) et ainsi ralentir le neutrophile<sup>43</sup>. Il va alors détecter le gradient de chimiokines<sup>44</sup> produits par les cellules résidentes du tissu<sup>45</sup>. La détection du gradient de chimiokine va entraîner une mobilisation des stocks des récepteurs MAC-1 (CD11b/CD18) et l'activation des protéines taline 1 et kindline 3 ce qui va augmenter l'affinité des récepteurs LFA-1 (CD11a/CD18) pour leurs ligands (ICAM-1 et ICAM-2)<sup>46</sup> et conduire à une immobilisation du neutrophile (*adhesion*). Une fois arrêté le neutrophile explore son environnement à l'aide de pseudopodes tout en restant attaché à l'endothélium jusqu'à trouver une jonction endothéliale (*crawling*) pour pénétrer dans le tissu. Le passage à travers la barrière de l'endothélium (*transmigration*) au niveau des jonctions endothéliales prend entre sept et vingt minutes. Des expériences *in vitro* ont montré qu'afin de faciliter le passage de la matrice extra-cellulaire de l'endothélium, toutes les vésicules sécrétoires du neutrophile humain vont fusionner avec la membrane ainsi que 40% des granules à gélatinases, 25% des granules spécifiques et 7% des granules azurophiles<sup>47</sup>. Dans le même temps l'adhésion des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire diminue localement, avec une perte des protéines paxiline et *focal adhesion kinase* au niveau des complexes d'adhésion, à proximité de la zone de migration du neutrophile humain (comme montré par des expériences *in vitro*)<sup>48</sup>. De plus afin de permettre le passage du neutrophile, il y a une rupture des liaisons entre les protéines VE-cadhérine (donc les jonctions adhérentes)<sup>40</sup> (Figure 4). L'autre possibilité pour le neutrophile de franchir la barrière endothéliale, est le



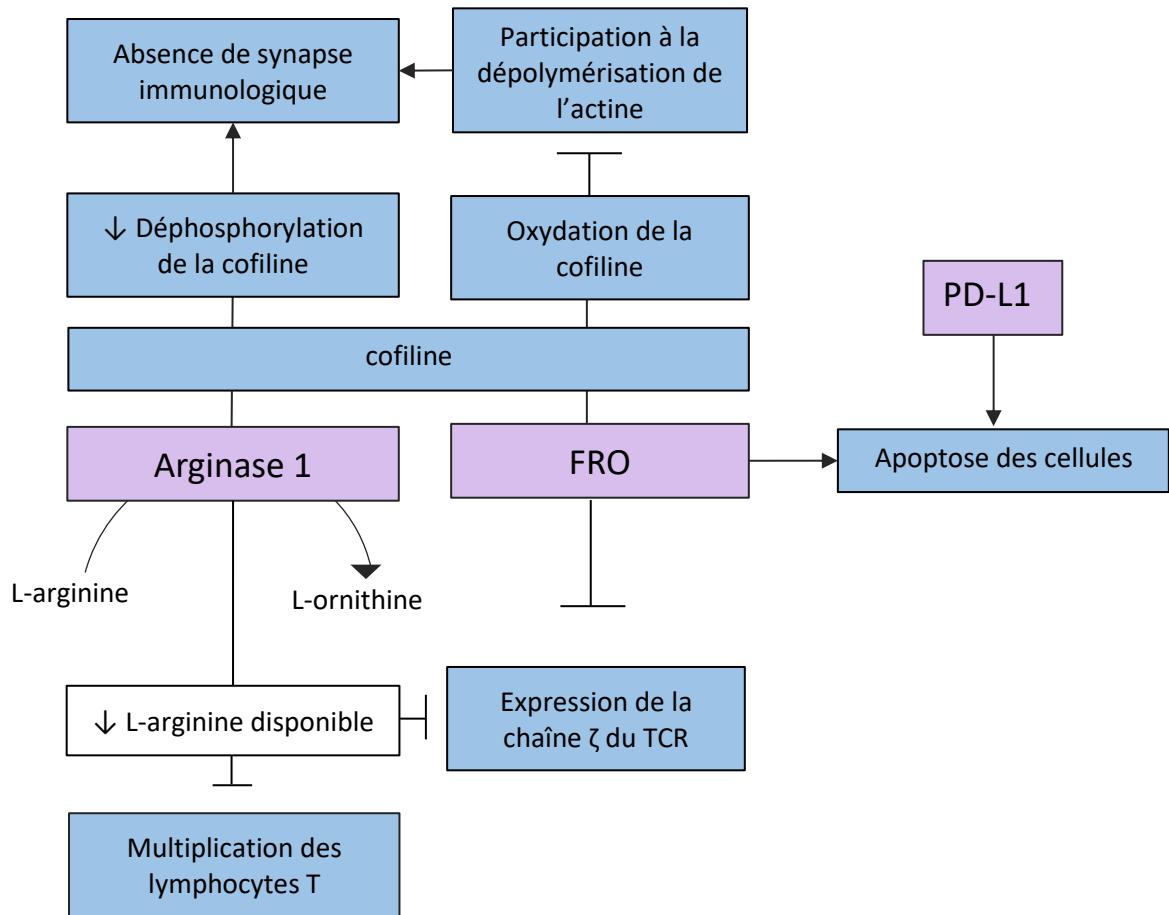
passage *transcellular*. La cellule endothéliale subit une réorganisation de son cytosquelette d'actine ce qui va lui permettre d'englober le neutrophile humain grâce à des prolongements riches en protéines ICAM-1 et VCAM-1 qui vont se lier aux protéines VLA-1 et LFA-1 et former « le dôme », comme démontré par des études *in vitro*<sup>49</sup>. Ce mode de passage de la barrière endothéliale est plus long puisqu'il faut entre vingt et trente minutes pour que le neutrophile puisse passer.

Une fois la barrière franchie, le neutrophile se retrouve exposé à un nouveau gradient de chimiokine (chémioattractant final) qui a une double fonction : guider le neutrophile vers le site exact où il est demandé et éviter qu'il ne reste subjugué par le gradient présent sur l'épithélium (chémioattractant intermédiaire)<sup>50</sup>. Cette hiérarchisation des gradients est le résultat de la primauté de certaines voies de signalisation sur d'autres ; la voie PI3 Kinase est responsable de la migration lorsqu'il s'agit du chémioattractant intermédiaire tandis que la voie impliquant la p38 MAP Kinase contrôle la migration lorsqu'il s'agit du chémioattractant final<sup>51</sup>.

### Diversité de l'action des neutrophiles

Dans un cadre infectieux, une fois sur site, les neutrophiles se chargent de l'élimination des pathogènes grâce à deux principaux mécanismes : la phagocytose (production de FRO, dégranulation) et la NETose qui seront détaillés dans le chapitre suivant. Cependant l'action des neutrophiles est bien plus complexe, il existe de nombreuses sous-populations qui exercent en réalité une kyrielle de fonctions différentes.

Longtemps cantonné à un rôle dans la résolution de l'infection et dans la mise en place de l'inflammation, les neutrophiles se voient aujourd'hui parés de propriétés immunosuppressives. Les *granulocytic myeloid-derived suppressor cells* (G-MDSC), que l'on retrouve parmi les *low density neutrophils* (LDN), sont l'oriflamme de ce nouveau concept. Les G-MDSC se composent de neutrophiles activés<sup>52,53</sup> cependant il est difficile de définir un phénotype qui fasse consensus. Chez l'Homme les phénotypes établis varient d'une situation à l'autre (cancer, grossesse, sepsis, infection) et même d'un patient à l'autre pour un contexte donné<sup>54</sup>. Leur fonction immunosuppressive est principalement due à l'action de la protéine arginase 1 et à la production de FRO<sup>53</sup> qu'ils sécrètent dans le milieu ainsi qu'à la plus grande sensibilité des lymphocytes T conventionnel au stress oxydant par rapport aux lymphocytes T



**Figure 5. Mécanismes de l'action immunosuppressives des MDSC.** En bleu sont représentées les actions concernant les lymphocytes T ; en violet se sont les mécanismes provenant des neutrophiles. L'arginase et les FRO sont produits dans le milieu extracellulaire par les neutrophiles.

régulateur<sup>55</sup>. L'arginase 1 dégrade la L-arginine présente dans l'environnement en L-ornithine puis en urée. Or la L-arginine est nécessaire à la multiplication des lymphocytes T<sup>56</sup> ainsi qu'à l'expression de la chaîne  $\zeta$  du *T cell Receptor* (TCR)<sup>57</sup> qui est la chaîne limitante dans le processus de synthèse du TCR. Celle-ci stabilise le complexe CD3/TCR à la surface de la cellule. De plus en absence d'arginine, la déphosphorylation de la cofiline diminue<sup>58</sup> entraînant une diminution voir une absence de synapse immunologique (zone d'interaction entre cellules lorsque l'un des acteurs est une cellule du système immunitaire) qui est pourtant nécessaire à la prolifération des cellules T. Cette action sur la cofiline est renforcée par la production du peroxyde d'hydrogène par les neutrophiles, qui l'oxyde l'empêchant de participer à la dépolymérisation de l'actine<sup>59</sup>. Le stress oxydatif induit aussi l'apoptose des lymphocytes T et cette action pro-apoptotique des G-MDSC est renforcée par l'expression à leur surface de la protéine PD-L1 qui en se liant à la protéine PD-1 provoque l'apoptose des lymphocytes<sup>60</sup> (Figure 5). Parmi les LDN se trouvent aussi des cellules pro-inflammatoires dont la composition et la nature sont sujettes à débat<sup>61</sup> et qui se retrouvent dans les maladies auto-immunes ou dans les maladies rhumatoïdes. Elles se caractérisent par une importante faculté à produire des cytokines<sup>62</sup> ainsi que des NETs qui dans ce cas, sont dépendant des FRO produit par les mitochondries<sup>63</sup>. Les *Normal density neutrophil* ne sont pas pour autant oublier dans cette révolution et certains possèdent eux aussi une activité immunosuppressive sur les lymphocytes T grâce à la production de FRO, par une libération de protéine CCL2 qui inhibe la fonction des lymphocytes T<sup>64</sup> ou via Mac-1<sup>65</sup>. Ces nouvelles populations proviennent-elles d'une lignée spécifique durant l'hématopoïèse ou sont-elles le résultat de la plasticité des neutrophiles qui s'adaptent à leur micro-environnement ? La question reste ouverte.

Autre fonction longtemps dépréciée des neutrophiles, la production de protéines et particulièrement de cytokines. Certes la quantité d'ARN messager total est dix à vingt fois moins importante dans les neutrophiles que dans les autres leukocytes<sup>66,67</sup> mais leur nombre au site inflammatoire est tel qu'il est déraisonnable de négliger leur synthèse protéique ; d'autant plus que dans les neutrophiles des modifications épigénétiques (méthylation, acétylation des histones)<sup>68</sup> œuvrent pour adapter la synthèse protéique au micro-environnement<sup>69</sup>. Cette adaptabilité se reflète dans l'importante diversité des cytokines qu'ils produisent (chimiokines, cytokines immuno-régulatrices, pro-inflammatoire ou



anti-inflammatoire, des facteurs angiogénique et fibrogénique, des membres de la superfamille des TNF...)70, témoignage de l'intrication existante entre l'immunité innée et adaptative puisqu'elles contribuent au recrutement ou à la maturation des monocytes/macrophages, cellules dendritiques, *Natural Killer*, ou lymphocytes B/T71. Cette intrication entre immunité innée et adaptative est renforcée par la capacité des neutrophiles à être des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) atypiques72. En effet bien qu'incapable d'activer des lymphocytes T naïf, ils sont capables de présenter un antigène exogène73 et d'exprimer des molécules nécessaires à la présentation antigénique et à l'activation des lymphocytes T mémoires (HLA-DP, DQ, DR ; molécule de costimulation)74. De plus chez les primates non humains, les neutrophiles sont capables de transporter un antigène dans les organes lymphoïdes secondaires et d'induire la prolifération des lymphocytes T72 (ce qui n'a pas été étudié chez l'Homme). Bien que cette fonction de présentation d'antigène ne concerne pas tous les neutrophiles (seul une fraction exprime les molécules HLA-DP, DQ, DR et les molécules de costimulation) et qu'elle soit moins efficace qu'avec les CPA professionnelles, leur nombre pourrait pallier cette efficacité moindre. En outre en produisant des NET, les neutrophiles sont capables d'abaisser le seuil d'activation des lymphocytes CD4 *helper*, grâce à l'activation de la voie de signalisation associé au TCR75 par les NET.

#### Arrêt de la réponse inflammatoire et réparation tissulaire

L'arrêt de la réponse inflammatoire et la réparation tissulaire impliquent aussi les neutrophiles. La fin de leur recrutement au site inflammatoire est le résultat de la production tissulaire de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10 ; de la diminution de l'activité de la protéine NF- $\kappa$ B ; de la synthèse d'antagonistes des récepteurs aux cytokines ou d'une forme soluble de ces récepteurs, ce qui limite la diffusion de leur ligand et donc le recrutement des neutrophiles40. L'action anti-inflammatoire est aussi due à la production de glucocorticoïde qui vont provoquer une relocalisation de l'annexine 1 à la surface des cellules de l'endothélium, ce qui inhibe l'adhésion et la transmigration des neutrophiles grâce à la fixation de l'annexine 1 sur le *Formyl Peptide Receptor*76. De même, la production de la *lipoxin A4* inhibe le chimiotactisme lié au FPR77 et elle induit le recrutement de macrophages non-inflammatoires qui vont phagocyter les neutrophiles apoptotiques. Les neutrophiles, eux, vont sécréter des protéines tels que la résolvine et la protectine D1 qui arrêtent la migration des neutrophiles. La protectine D1 va de surcroît augmenter l'expression de la protéine CCR5 sur





les neutrophiles apoptotiques tardifs ce qui agit comme un piège pour les chimiokines CCL3 et CCL5, deux chimioattractants des neutrophiles, en les empêchant de gagner la circulation<sup>78</sup>. Concernant la reconstruction tissulaire, elle est facilitée par la capacité des neutrophiles à éliminer les cellules mortes, les pathogènes, à activer la protéine VEGF qui favorise la revascularisation de la zone lésée et à exprimer certaines métallopeptidases comme MMP9. Celles-ci permettent la dégradation des composants du cytosquelette des cellules nécrosées (actine, tubuline, l'annexine 1) qui font partie des DAMP<sup>79</sup>. Autre mécanisme pouvant contribuer au retour à l'homéostasie tissulaire, la capacité de certains neutrophiles à regagner la circulation. Le pourcentage de cellules concernées reste incertain<sup>80,81</sup> tout comme leur destin mais il est vraisemblable qu'elles soient capables de se rendre dans des organes lymphoïdes pour y activer la réponse adaptative<sup>72</sup>.



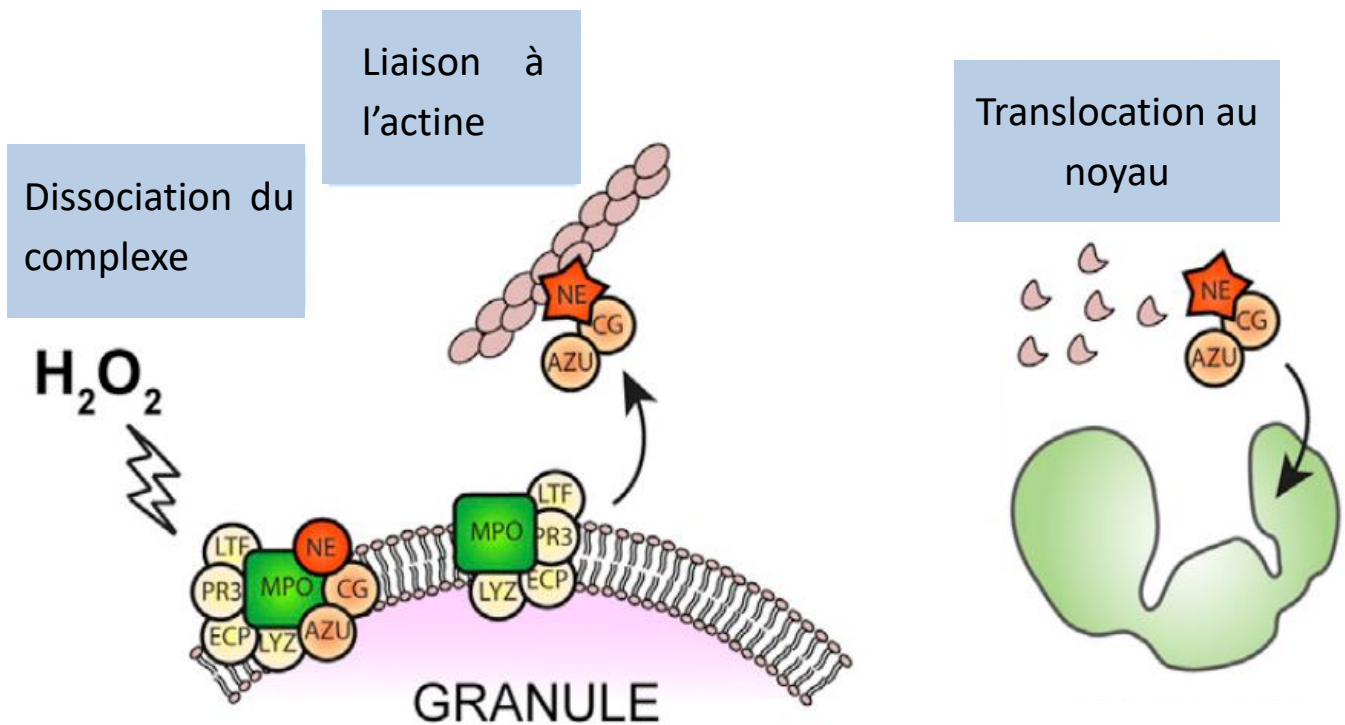
## 2.

### Le choix des armes

Les neutrophiles disposent de deux principaux procédés pour l'élimination des pathogènes, la phagocytose et la production de *Neutrophil extracellular Traps* (NET). Si Max Schultze dès le milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle observe le processus de phagocytose dans des neutrophiles<sup>82</sup>, il faudra attendre 2004 pour que la production de NET soit mise en évidence<sup>83</sup>.

#### La NETose chez l'Homme

Le processus de formation des NET est un mécanisme que l'on retrouve dans tous les granulocytes<sup>84</sup> et qui est conservé au cours de l'évolution puisqu'il est présent chez de nombreuses espèces animales et chez les végétaux<sup>84</sup>. Ce sont des filaments de chromatine recouvert de protéines des granules et expulsés dans le milieu extracellulaire. Leur formation est le résultat d'une signalisation complexe qui mobilise différentes voies de signalisation en fonction du stimulus et qui va aussi dépendre d'autres processus cellulaires ; notamment de la phagocytose qui, en provoquant la fusion des granules azurophiles avec le phagosome, entraîne la séquestration de la *neutrophil elastase* dans celui-ci ; ce qui empêche sa présence au noyau et l'initiation de la formation des NET<sup>85</sup>. La production de NET la plus courante correspond à un processus de mort cellulaire particulier marqué notamment par une inhibition de l'apoptose. Phénotypiquement, elle se caractérise tout d'abord par une perte de la morphologie du noyau, puis par une perte de la membrane nucléaire et une décondensation de la chromatine avant une disparition de la membrane des granules<sup>86</sup>. Moléculairement, Hakkim *et al.* ont montré qu'un analogue du diacylglycérol provoque l'activation de la Protéine Kinase C puis de la voie c-Raf-MEK-ERK<sup>85</sup> ; la protéine ERK phosphoryle ensuite la protéine p47<sup>phox</sup> conduisant à l'activation de la NADPH oxydase et à la formation de FRO<sup>88</sup>. Parmi ces FRO le peroxyde d'hydrogène va permettre, par un mécanisme encore non connu, la séparation d'un complexe *neutrophil elastase*, cathepsine G, azurocidine de la myéloperoxydase lorsque ces protéines sont présentes à la membrane des granules azurophiles mais sans en détruire la membrane. Une fois dans le cytoplasme le complexe se fixe aux filaments d'actine qu'il dégrade avant de pénétrer dans le noyau<sup>89</sup> où la



**Figure 6. Libération de la neutrophil elastase des granules.** Sous l'action du peroxyde d'hydrogène un complexe formé par la neutrophil elastase, la cathepsine G et l'azurocidine se détache de la membrane des granules azurophiles (lorsqu'il est complexé à la membrane avec la myéloperoxydase). Ce complexe se lie à l'actine qu'il dégrade avant de transloquer au noyau où l'élastase va dégrader l'histone H4. Modifié à partir de Metzler *et al.*<sup>89</sup>

*neutrophil elastase* dégrade l'histone H4 (Figure 6). Parallèlement, un processus de citrullination des histones H3, dépendant de la NADPH oxydase, de l'autophagie<sup>90</sup> et de la PKC<sup>91</sup> permet la décondensation de la chromatine<sup>92</sup>. La disparition des membranes des granules et de la membrane nucléaire permet ensuite la formation de filaments d'ADN recouverts d'histones et de protéases issues des granules<sup>93</sup> avant leur dispersion dans le milieu extra-cellulaire. Le processus conduisant à la disparition de la membrane nucléaire est encore mal compris mais sa composition (faible en cholestérol contrairement à la membrane plasmique qui dans un premier temps reste intact) laisse penser que des peptides antimicrobiens de la famille des cathelicidines comme LL-37 (qui sont présents dans les granules et qui dégradent spécifiquement les membranes pauvres en cholestérol) sont impliqués dans le processus comme montré dans les neutrophiles murins<sup>94</sup>. Les complexes immuns immobilisés sont aussi capables d'induire la production de NET lors de leur fixation sur les récepteurs FcγRIIIB et MAC-1 ; ce qui initie une cascade de signalisation passant par Syk, PI3 Kinase/Akt, la protéine p38 MAP Kinase et les protéines ERK1/2<sup>95</sup>.

Il existe un autre moyen de produire des NET et cette voie en plus d'être non létale et plus rapide est indépendante de la production de FRO. Elle dépend notamment de facteurs sécrétés par certains pathogènes comme *Staphylococcus aureus* qui vont stimuler la formation de NET en quelques minutes. Les filaments d'ADN parés d'histones et de protéases sont transportés dans le milieu extracellulaire au sein de granules et c'est dans le milieu extracellulaire qu'ils formeront des NET<sup>96</sup>, ce processus d'encapsulation et d'expulsion de l'ADN peut être rapproché de celui qui se déroule dans les érythrocytes murins lors de leur maturation<sup>97</sup> et, d'après Pilszczek *et al.*<sup>96</sup>, on peut imaginer une similitude dans les mécanismes. Lorsque les NET sont produits du fait de stimulus produits par des pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, la morphologie du noyau avant encapsulation de l'ADN, rappelle celle des patients atteint d'un déficit en *emerin* (une protéine de la membrane nucléaire) tandis que la disparition de l'enveloppe nucléaire correspond à ce qui peut être observé lors de la prométaphase ; ce qui pourrait indiquer une implication de cette protéine et des protéines impliquées dans la mitose lors de la formation des NET<sup>96</sup>. Même énuclée, le neutrophile conserve sa capacité à suivre un gradient de chimiokine ou à phagocyter une proie. Il existe aussi certains cas où le neutrophile produit des NET, survie et conserve son



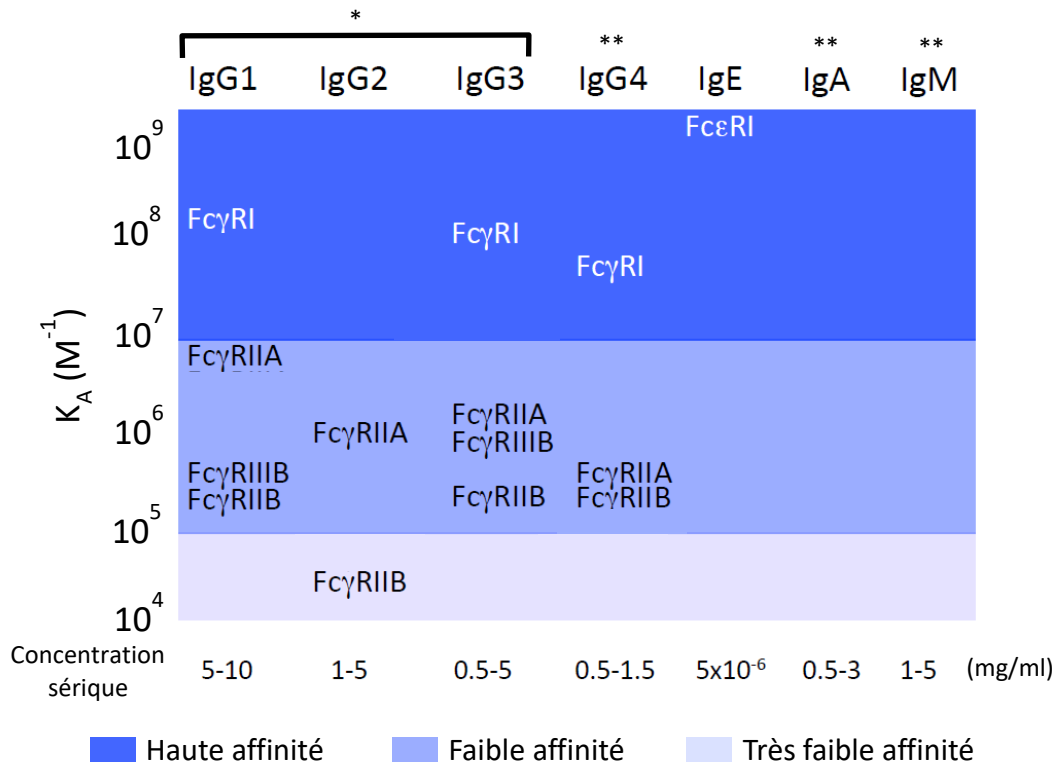
ADN nucléaire. Dans ces situations spécifique les NET sont formés par l'ADN mitochondrial<sup>98</sup> et leur composition diffère de celle des NET nucléaires mais ce mécanisme est à relativiser car la quantité d'ADN alors présente, du fait de la faible quantité de mitochondries dans les neutrophiles, est 100 000 fois moins importante qu'avec des NET classique<sup>99</sup>.

Une fois dans le milieu extracellulaire le rôle des NET va dépendre du contexte. Lors d'une infection ils piègent les pathogènes mais leur action précise (biocide ou bactériostatique) reste débattue<sup>100</sup>. C'est cependant un mécanisme suffisamment efficace pour qu'au cours de l'évolution soit apparu chez certains pathogènes une sécrétion dans le milieu extracellulaire de nucléases. Dans un contexte inflammatoire, les nombreuses protéases présentes sur les NET participent aussi à la dégradation des cytokines du micro-environnement contribuant à limiter les molécules pro-inflammatoires<sup>101</sup>. Dans un contexte d'auto-immunité, les NET contribueraient à la libération du contenu intracellulaire des neutrophiles ce qui provoquerait la dispersion d'auto-antigène puis la formation d'anticorps spécifique (*anti-neutrophil cytoplasmic antibodies* (ANCA), anti-histones, ADN, ribonucléoprotéine, anti-citrulline)<sup>102</sup>.

### La phagocytose

La phagocytose est un mécanisme permettant d'ingérer des proies de nature variable (corps apoptotique, pathogène) et dont la taille excède  $0.5 \mu\text{m}$ <sup>103</sup>. Malgré de nombreuses similarités dans le processus de phagocytose réalisé par les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques, des spécificités sont attachées aux différents phagocytes professionnels. Par exemple dans la larve de poisson zébrée les neutrophiles sont peu efficaces lorsqu'il s'agit de capturer une bactérie en milieu liquide contrairement aux macrophages, en revanche ils excellent lorsque les bactéries sont adhérentes à une surface<sup>104</sup>. Autre différence, la finalité de la phagocytose dépend du type cellulaire. Si dans les neutrophiles elle a principalement pour vocation l'élimination de la proie, dans les cellules dendritiques elle sert à apprêter les antigènes pour leur présentation, alors que dans les macrophages les deux desseins cohabitent. Les phases qui composent l'initiation de cette phagocytose, sont en revanche communes. L'internalisation de la proie, peut être découpé en trois phases : la *pedestal phase* qui correspond au premier contact entre la proie et la cellule, la formation de la coupe phagocytaire puis la phase de fermeture du phagosome.





**Figure 7. Affinité des récepteurs Fcγ présent à la surface des neutrophiles humains.** Dans les neutrophiles humains il y a une forte expression constitutive des FcγRIIA et FcγRIIIB et une faible expression des FcγRIIB. Dans un contexte allergique ils expriment FcεRI tandis que l'expression des FcγRI est induite par l'interféron gamma. D'après le Janeway neuvième édition : \* principales sous-classes impliquées dans l'opsonisation tandis que les sous-classes \*\* n'y ont qu'un rôle mineur. Modifié à partir de Jönsson *et al.*<sup>105</sup>

## Considérations biochimiques

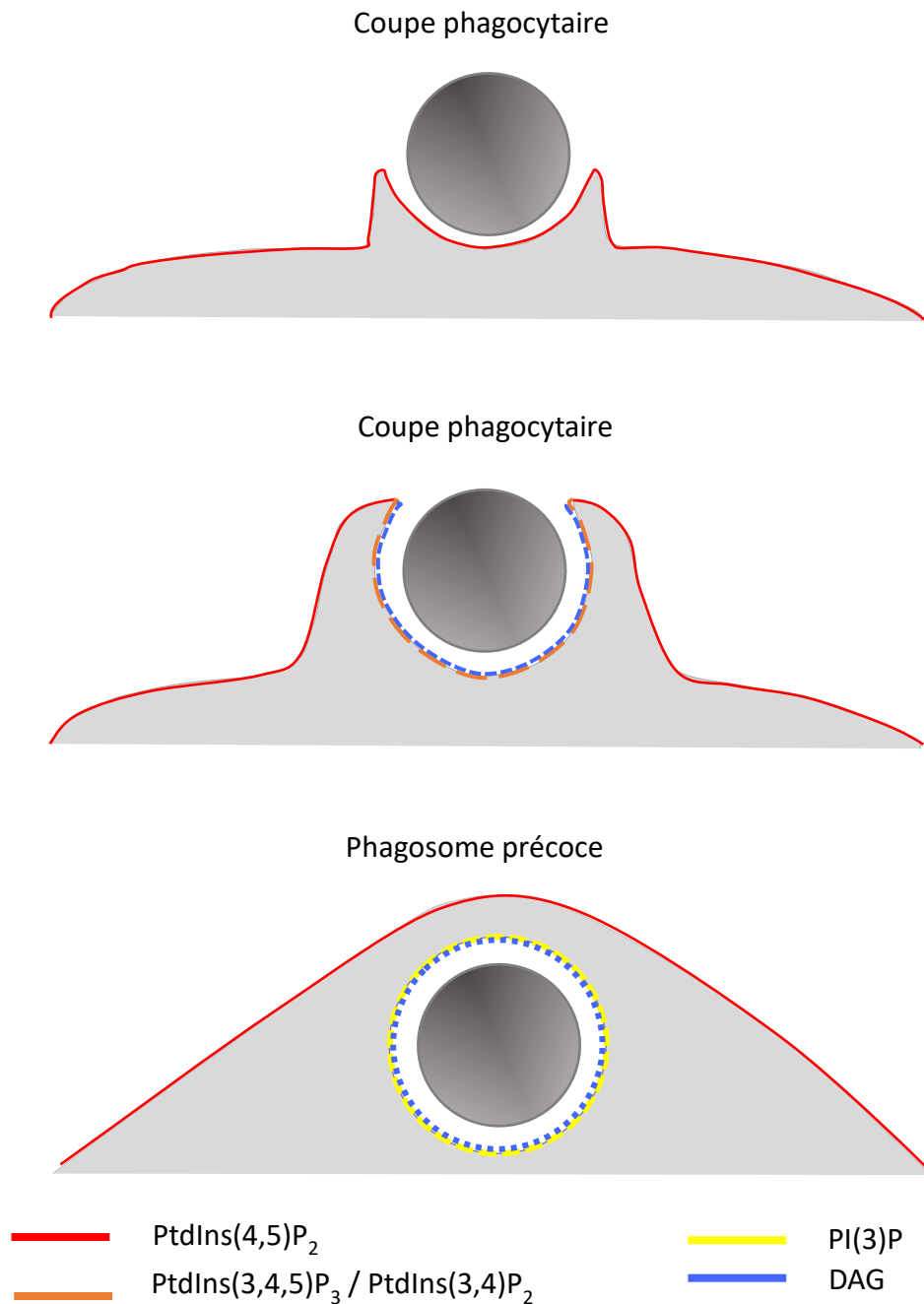
### Reconnaissance de la proie et affinité des récepteurs

La *pedestal phase* dépend au préalable de la reconnaissance de la proie par les récepteurs à la surface de la cellule. On distingue trois grandes classes de récepteurs impliqués dans la phagocytose : les TLR qui reconnaissent des molécules étrangères à l'organisme ; les récepteurs aux opsonines qui fixent les anticorps et les molécules C4b, iC3b/C3b du complément ; les récepteurs reconnaissant les corps apoptotiques (absent chez les neutrophiles)<sup>103</sup>. Individuellement seuls les récepteurs du  $\beta$ -glucane (Dectine-1) et le récepteur des immunoglobulines de classe G (Fc $\gamma$ R) sont suffisants pour induire la phagocytose<sup>106,107</sup>, chacun mobilisant des voies de signalisation particulière. Toutefois la reconnaissance et la formation du complexe ligand/récepteur ne sont pas suffisants pour induire la phagocytose puisque la fixation au neutrophile nécessite de tenir compte de l'avidité qui dépend : de l'affinité du récepteur pour la sous-classe d'immunoglobuline présente, de la densité de ligands sur la proie et de la densité de récepteurs.

Parmi les récepteurs suffisant pour induire la phagocytose, on s'intéresse uniquement au récepteurs Fc $\gamma$  car leur fonctionnement a été le plus étudié. Parmi eux, les Fc $\gamma$ RIIA et les Fc $\gamma$ RIIIB sont les plus présents à la surface des neutrophiles humains. Les Fc $\gamma$ RIIIB sont dix fois plus nombreux que les Fc $\gamma$ RIIA<sup>108</sup>, les Fc $\gamma$ RIIB sont faiblement exprimés et les Fc $\gamma$ RI ne sont exprimés qu'après stimulation par l'interféron gamma<sup>109</sup>. Seuls les Fc $\gamma$ RI ont une forte affinité pour les IgG1 ( $K_A=10^8 \text{ M}^{-1}$ ) qui représentent un tiers des immunoglobulines dans le sérum (5-10 mg/ml), les Fc $\gamma$ RIIA et Fc $\gamma$ RIIIB, Fc $\gamma$ RIIB ayant une affinité faible affinité pour ces immunoglobulines ( $10^7 > K_A > 10^5$ )<sup>110</sup> (Figure 7). Les récepteurs vont donc devoir être concentrés au niveau de la proie pour assurer son attachement et cette concentration est aussi nécessaire pour que la signalisation intracellulaire se mette en place.

### Dynamique des phospholipides

Durant la formation du phagosome dans les neutrophiles humains, lors de l'apparition des pseudopodes, le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) initialement réparti dans toute la membrane plasmique est d'une part hydrolysé par la PLC- $\gamma$ 2 au niveau



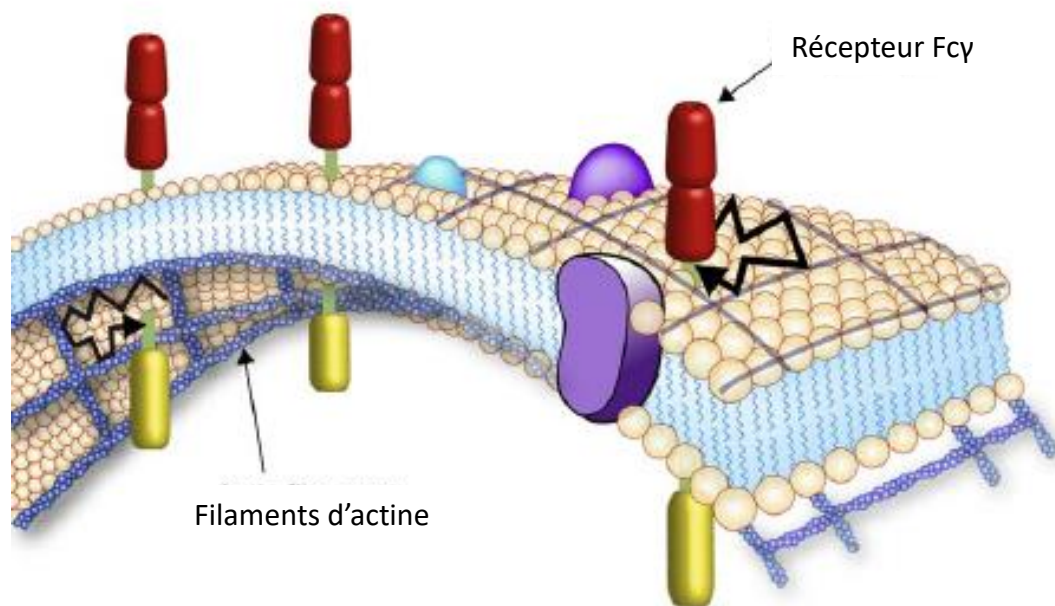
**Figure 8. Dynamique des phosphoinositides à la membrane du phagosome.** Lors du contact entre la proie et le phagosome les PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> sont présent à la zone de contact. Très vite ils disparaissent à la membrane du phagosome remplacés par le DAG et les PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> / PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>. Lors de la maturation du phagosome, après sa fermeture le DAG reste et les PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> / PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> laissent place aux PI(3)P.

de la zone de contact entre la proie et le phagosome et d'autre part phosphorylé par une PI3 kinase de classe I ce qui entraîne respectivement la formation de diacylglycérol (DAG) (et d' $IP_3$ ) et de  $PtdIns(3,4,5)P_3$ <sup>111</sup>. Une fois le phagosome fermé le  $PtdIns(3,4,5)P_3$  disparaît, cela coïncide avec l'apparition du  $PtdIns(3)P$ <sup>111</sup> qui est impliqué dans le fonctionnement de la NADPH oxydase. Cette modification de la composition lipidique contrôle donc les étapes clés de la maturation du phagosome et de la production de FRO par la NADPH oxydase (Figure 8). Cette succession de phosphoinositides participe aussi au recrutement des différents acteurs de la phagocytose (voir plus bas – Considérations biologiques).

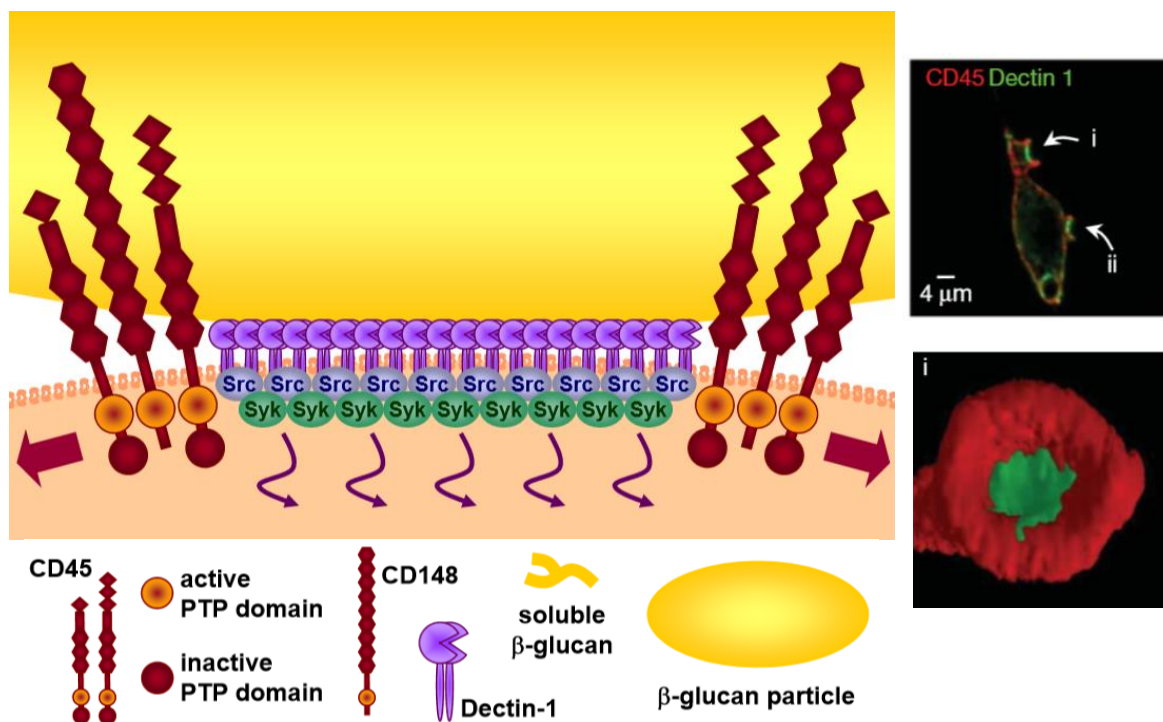
Les travaux menés dans les macrophages murins *in vitro* et résumés dans la revue de Bohdanowicz *et al.*<sup>112</sup> permettent d'approfondir les mécanismes sous-jacents. Le  $PtdIns(4,5)P_2$  stabilise la présence à la membrane du phagosome de protéines PtdInsP5 Kinase qui semblent impliquées dans la réorganisation de l'actine durant la clusterisation des récepteurs et durant l'extension des pseudopodes. De plus le  $PtdIns(4,5)P_2$  favorise la nucléation de l'actine. Sa disparition est donc nécessaire pour que l'actine se désassemble à la coupe ce qui permet l'internalisation complète de la particule. Le  $PtdIns(3,4,5)P_3$  qui apparaît va favoriser le recrutement de la myosine X qui, selon certaines hypothèses, servirait à la fermeture du phagosome et il va participer à la stabilisation de la protéine Gab2 à la membrane. Le  $PtdIns(3)P$  qui apparaît après est principalement dû à l'activité de la PtdIns3 Kinase de classe III, Vps34. Comme dans le neutrophile, il va permettre l'activité de la NADPH oxydase en recrutant la sous-unité  $p40^{phox}$  au phagosome.

### Considérations biophysiques

Les études sur la mobilité des protéines dans la membrane indiquent que contrairement au modèle passé, les protéines et même les lipides ne se déplacent pas librement dans la membrane<sup>113</sup>. Tout d'abord de nombreux éléments entretiennent l'inhomogénéité des membranes que ce soit l'activation localisé d'enzymes influant sur la composition membranaire (tel les kinases et les phosphatases), les interactions protéines-protéines, les radeaux lipidiques, la taille des lipides ou les contraintes physiques (filopodes, cils...). Viennent ensuite les obstacles physiques à la diffusion comme le cytosquelette, la matrice



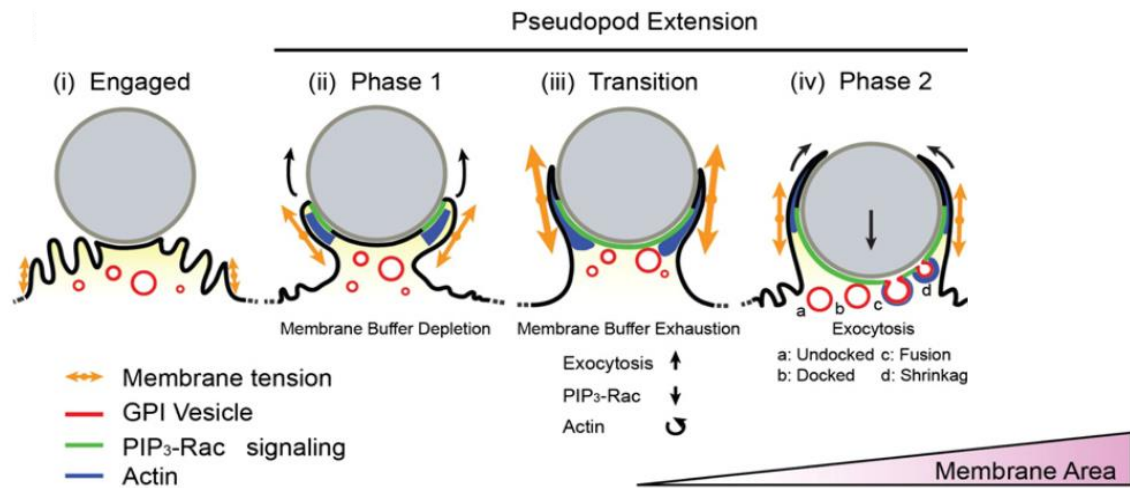
**Figure 9.** Schéma de la mobilité protéique dans la membrane selon le modèle *picket-fence*. Des éléments de la membrane plasmique (phospholipides, protéines) servent d'ancrage (*picket*) au cytosquelette d'actine dont le réseau sous membranaire limite la mobilité du récepteur Fcγ (*fence*). D'après Jaumouillé *et al.*<sup>114</sup>



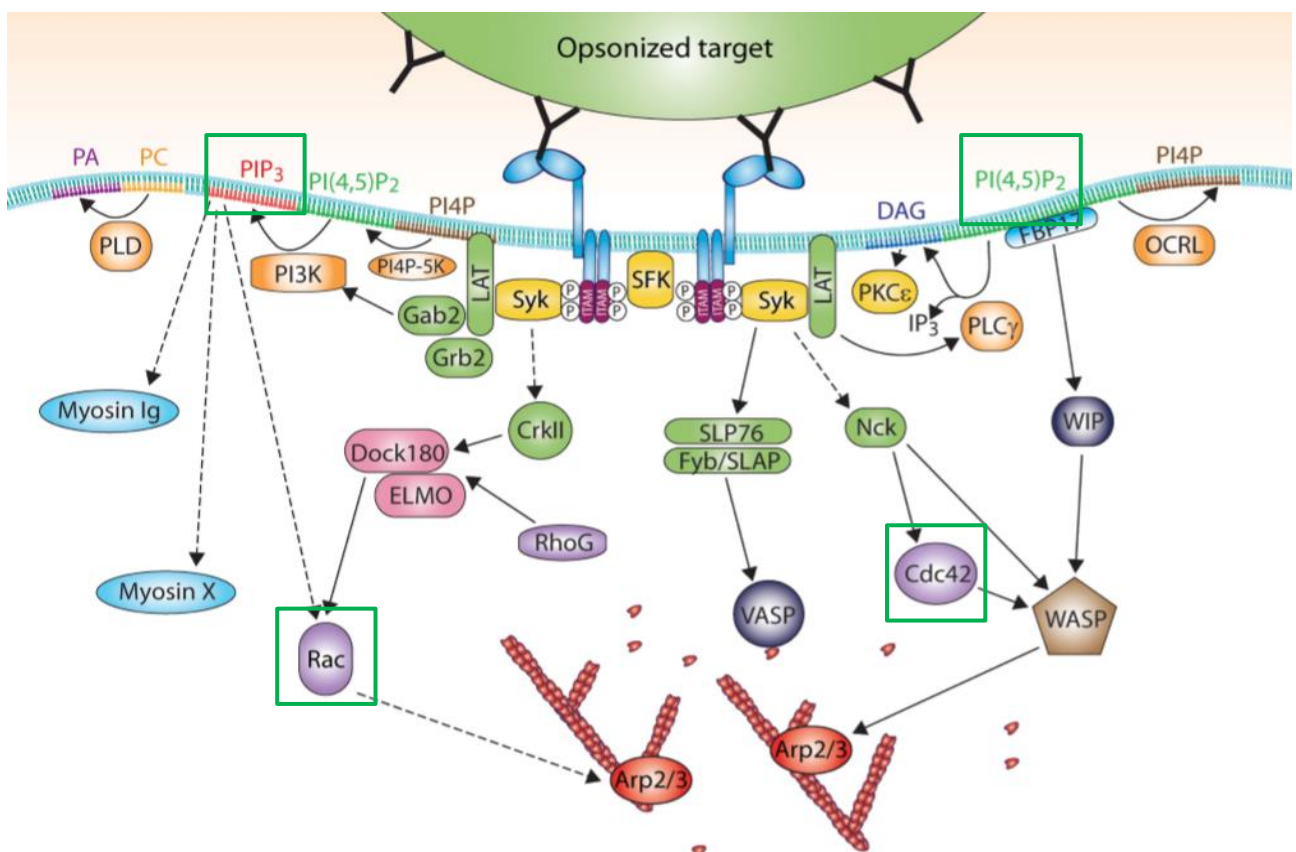
**Figure 10.** Organisation des récepteurs dectine-1 lors de la phagocytose dans les macrophages murins. (A gauche) Schéma montrant la clusterisation des récepteurs dectine-1 (c-SMAC) et l'exclusion des phosphatases CD45 du fait de la taille de leur ectodomaine (p-SMAC). (A droite) Marquage *in cellulo* des protéines dectine-1 et CD45 lors de la phagocytose de particules marquées par du B-glucane. Les récepteurs dectine-1 se retrouvent au centre de la zone d'interaction avec la proie et les protéines CD45 sont en périphérie. D'après Goodridge *et al.*<sup>115</sup>

extracellulaire ou les clusters de protéines transmembranaires. Enfin les interactions électrostatiques ou d'hydrophobicité peuvent localement modifier la composition de la membrane<sup>116</sup>. Ces considérations entraînent l'apparition du *picket-fence* modèle où le cytosquelette d'actine par sa liaison aux protéines ou aux lipides limite localement la diffusion des protéines dans la membrane plasmique les confinant à une zone restreinte <sup>114</sup> (Figure 9).

Ces travaux sur la mobilité des protéines membranaires et des lipides ont trouvé un profond écho dans l'étude de la phagocytose où, dans les macrophages, les PIP<sub>2</sub> sont restreint à certaines portions du phagosome (supposément par les filaments de septines) suivant le modèle de *fence*<sup>117</sup>. L'étude de la diffusion des protéines au phagosome et plus particulièrement à la synapse phagocytaire, c'est-à-dire à l'interface entre la proie et la cellule durant la *pedestal phase* et la formation de la coupe, a montré dans les macrophages un important niveau d'organisation des protéines qui ont alors une mobilité limitée. Cette organisation est souvent présentée comme étant similaire à l'organisation modèle de la synapse immunologique à savoir : un *central supramolecular adhesion complex* (c-SMAC) composé par les protéines TCR entouré par un *peripheral SMAC* puis par le *distal SMAC*<sup>118</sup> où l'on retrouve les phosphatases comme CD45. Par exemple lors de la reconnaissance de  $\beta$ -glucane par les récepteurs dectine-1 dans les macrophages murins, les récepteurs se regroupent au centre de l'aire de contact (c-SMAC) et l'on retrouve en périphérie les phosphatases CD45 (p-SMAC)<sup>115</sup> (Figure 10). Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que les intégrines forment une barrière entre les différentes zones de la synapse excluant les protéines ayant un ectodomaine trop long comme les phosphatases<sup>119</sup>. Dans la synapse immunologique les moésines sont responsables de cette exclusion des phosphatases<sup>120</sup>, on peut spéculer sur le fait qu'elles jouent un rôle similaire lors de la phagocytose. Dans les macrophages lors d'une phagocytose dépendante des récepteurs Fc $\gamma$ , la réorganisation du cytosquelette d'actine permet la clusterisation des récepteurs Fc $\gamma$  soulignant l'importance du cytosquelette dans la mise en place du c-SMAC<sup>121</sup>.



**Figure 11. Rôle de la tension surfacique dans la phagocytose des proies de grandes tailles par les macrophages.** Après le contact avec la proie les invaginations présentes à la membrane se déplient pour permettre le début de la phagocytose (phase I et II). Du fait de l'accumulation des tensions dans ces pseudopodes il y a une réorganisation du cytosquelette d'actine et une fusion de vésicules pour permettre une augmentation de la surface, une diminution des tensions et une extension des pseudopodes (phase III et IV). Figure provenant de Masters *et al.*<sup>122</sup>



**Figure 12. Cascade de signalisation des FcγRIIA dans les macrophages lors de la phagocytose dépendante des récepteurs Fcγ.** Les encadrés verts représentent le lien entre la phagocytose et la production de FRO. Figure provenant de Jaumouillé *et al.*<sup>123</sup>



Après la *pedestal phase* vient la formation de la coupe phagocytaire. La tension surfacique à la synapse semble y jouer un rôle de coordinateur dans la mise en place de la réponse du macrophage<sup>122</sup> (Figure 11). En effet dans un premier temps les pseudopodes se créent à la coupe et commence à englober la proie. Cependant rapidement la tension surfacique augmente et cela coïncide avec la disparition de l'actine à la coupe et à sa polymérisation au niveau des pseudopodes. Dans le même temps les rugosités qui se trouvent à la membrane du neutrophile et qui sont autant de réservoirs lipidiques, sont mobilisées afin d'augmenter la surface de la cellule tout en diminuant localement les tensions<sup>124</sup>. En plus du rôle de la tension surfacique, l'internalisation de la proie dépendrait de la répulsion mécanique entre le cytosquelette et la membrane plasmique libre et de l'attraction du cytosquelette par la membrane qui adhère à la proie. Le cytosquelette ferait pression sur la membrane libre jusqu'à ce qu'elle adhère à la proie faisant progresser la phagocytose. Une fois que la membrane adhère elle tire le cytosquelette vers la proie conduisant à un amincissement local de la cellule qui permettrait aussi l'avancée des pseudopodes. Ces interactions impliqueraient certaines myosines non conventionnelles qui doivent encore être identifiées<sup>125</sup>.

### Considérations biologiques

Chaque type de FcγR favorise un processus biologique donné et est donc associé à une voie de signalisation particulière, le FcγRIIA favorise la phagocytose tandis que le FcγRIIIB favorise la formation de NET, l'activation des intégrines et dans une moindre mesure la phagocytose<sup>126,127</sup>.

#### Cascade de signalisation dans les macrophages

La phagocytose dépendante des récepteurs Fcγ est la plus étudiée et donc la mieux comprise. Dans les macrophages, la cascade de signalisation conduisant à l'internalisation de la proie est connue et on la retrouve en détail dans la revue de Jaumouillé *et al.*<sup>123</sup> (Figure 12). Le FcγRIIA contient dans sa partie cytoplasmique un motif ITAM dont deux tyrosines sont phosphorylées lors de son activation par une tyrosine kinase de la famille Src. Cela permet la fixation de la protéine Syk au motif ITAM par son domaine SH2. Celle-ci s'autophosphoryle et recrute la protéine adaptatrice LAT qui va permettre le recrutement du duo de protéines Grb2 et Gab2. Cette dernière protéine et Syk collaborent pour recruter une PI3 Kinase de classe I (particulièrement importante dans la phagocytose des particules de grandes tailles) tandis que

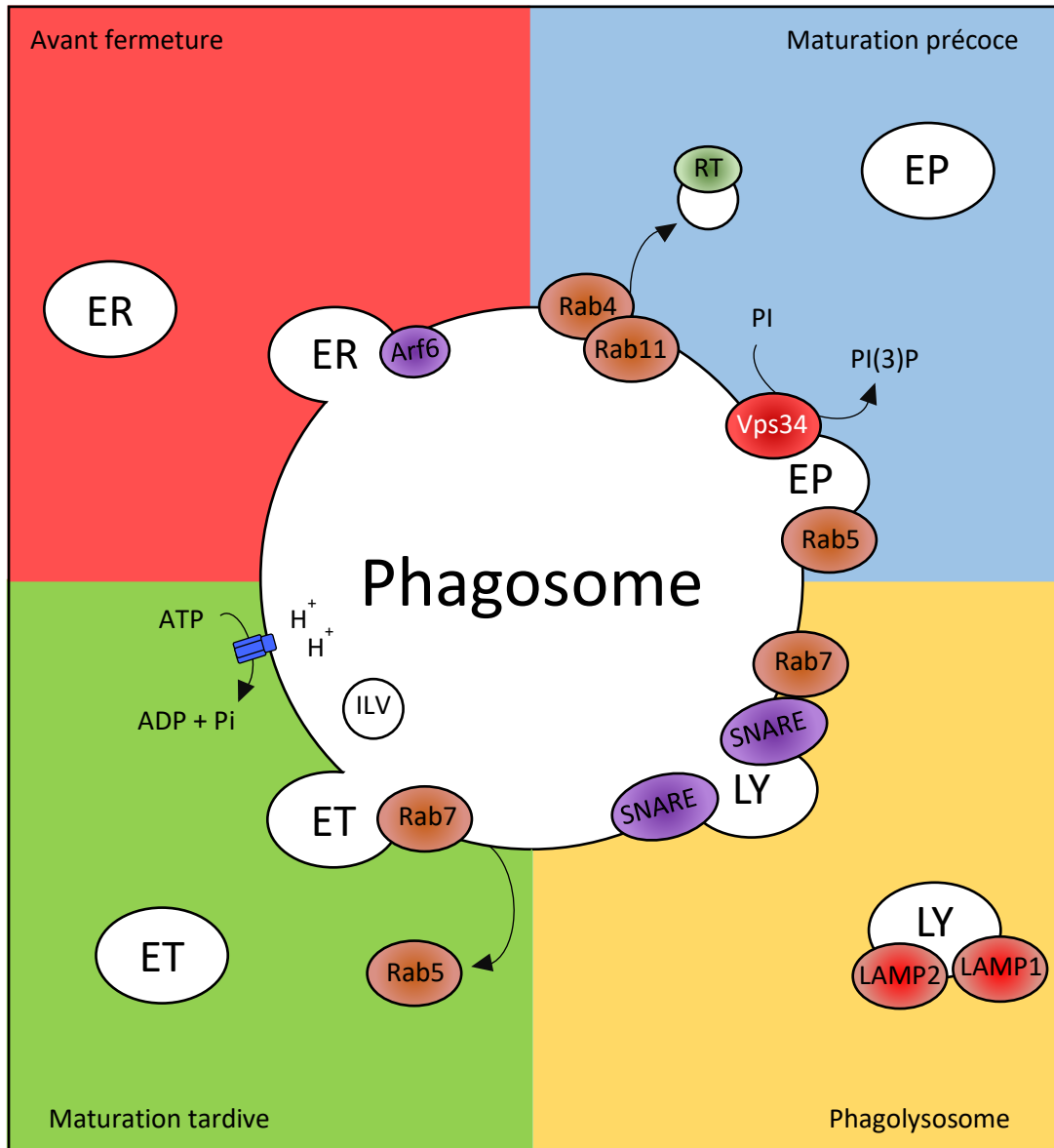




**Figure 13.** Cascade de signalisation conduisant à la polymérisation de l'actine à la base de la coupe phagocytaire lors de la phagocytose dépendante des récepteurs Fc $\gamma$ . L'activation des récepteurs Fc $\gamma$  conduit à l'activation des voies Syk et PI(4,5)P $_2$  qui permettent la nucléation de l'actine à la base de la coupe phagocytaire (encadrés verts). Les acteurs intervenant dans la dépolymérisation de l'actine à la coupe phagocytaire et lors de sa polymérisation dans les pseudopodes sont représentés dans les encadrés en rouge. Etant donné que dans un neutrophile on considère que la phase d'internalisation est un processus de l'ordre de la minute, c'est un phénomène extrêmement dynamique.

la collaboration entre les protéines Syk et LAT provoque le recrutement de la PLC- $\gamma$  qui va former du DAG nécessaire au recrutement de la PKC- $\epsilon$ .

L'actine est un acteur central de la phagocytose dépendante des récepteurs Fc $\gamma$ . Le recrutement de la protéine SLP-76 par son domaine SH2 et de la protéine Fyb/SLAP conduit à l'accumulation de VASP une protéine régulatrice de l'actine. Plus important, la protéine adaptatrice Nck est recrutée et elle permet, de concert avec la protéine FBP17, le recrutement des protéines WASP et WIP et de la protéine Cdc42 à la coupe phagocytaire. L'activation de WASP dépendra de la présence de PI(4,5)P<sub>2</sub> au phagosome ainsi que la présence de Cdc42 sous sa forme active, forme active qui dépend elle aussi de la présence de PI(4,5)P<sub>2</sub> au phagosome. L'activation de WASP conduit à celle d'Arp2/3 qui permet la nucléation de l'actine. Cependant de nouveaux résultats remettent en cause l'implication d'Arp2/3 lors de la phagocytose dépendante des immunoglobulines puisque chez des souris *Arpc2*<sup>-/-</sup> (codant pour une des sous-unités de Arp2/3) les macrophages présentent uniquement un défaut de phagocytose CR3 dépendante<sup>128</sup>. Cela laisse envisager l'implication d'autres mécanismes dans la nucléation de l'actine lors de la phagocytose dépendante des immunoglobulines, comme les formines dont l'implication a été montré lors de l'activation des récepteurs CR3<sup>129</sup>. Afin de permettre une polymérisation continue de l'actine il est nécessaire de pouvoir récupérer les monomères disponibles et de favoriser la création de nouveaux filaments dans les pseudopodes pour permettre l'internalisation des proies de grande taille. La dépolymérisation de l'actine à la base de la coupe phagocytaire permet cette récupération. Il y a d'abord un arrêt de la polymérisation de l'actine suite à la disparition du PI(4,5)P<sub>2</sub> et à l'inactivation des petites protéines G Cdc42 et Rac. Cette dernière est due à l'activation de protéines GAP dépendante du PIP<sub>3</sub>. De plus la dépolymérisation de l'actine est favorisée par l'action de l'IP<sub>3</sub> qui permet le relargage du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique. Ce calcium active la gelsoline, une protéine capable de dépolymériser l'actine. Une polymérisation de l'actine s'effectue alors dans les pseudopodes. L'interaction de la protéine VASP avec la profiline, favorise le recyclage des monomères d'actine libre tandis que la protéine CapG empêche l'incorporation de monomère d'actine sur l'extrémité plus des filaments déplaçant l'équilibre vers l'actine monomérique ce qui favorise la formation de nouveaux filaments. La cofiline contribue elle aussi à dépolymériser les filaments d'actine et favorise son recyclage<sup>130</sup> (Figure 13). Une autre famille de protéine importante dans la régulation de l'actine lors de la

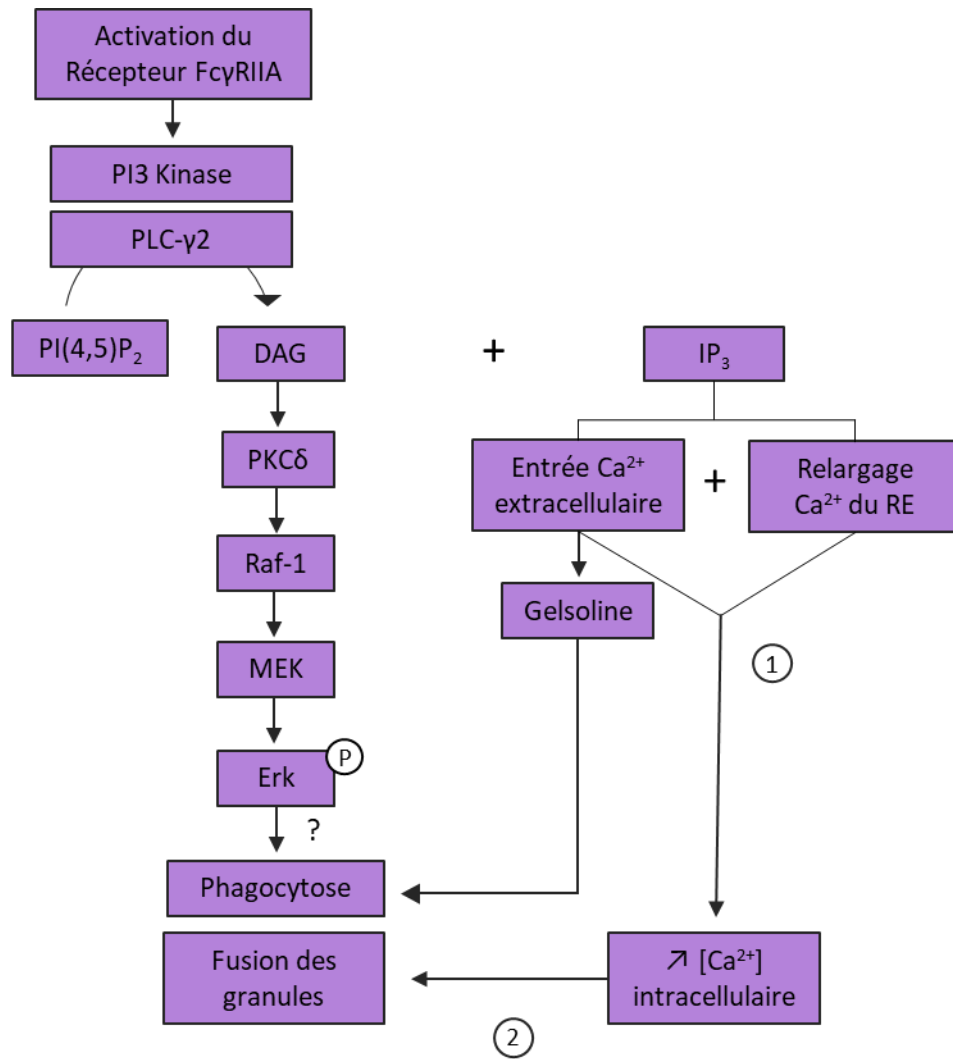


**Figure 14. Schéma de la maturation du phagosome dans les macrophages** Avant sa fermeture les endosomes de recyclage (ER) fusionnent avec le phagosome grâce à Arf6. Les endosomes précoces (EP) fusionnent avec le phagosome précoce apportant Vps34 qui est responsable de l'apparition du PI(3)P et Rab5. Grâce à Rab4 et Rab11 un trafic au départ du phagosome se met en place. Il permet le recyclage de certains composants comme le récepteur à la transferrine (RT). Lors de sa maturation tardive il y a un apport important en V-ATPase ce qui acidifie encore plus le phagosome. La protéine Rab7 remplace Rab5 à la surface du phagosome. Sa présence permet la fusion des endosomes tardifs (ET). Dans le même temps se forment les *intraluminal vesicles*. Grâce au complexe SNARE syntaxine 7/ VAMP7, le lysosome fusionne donnant le phagolysosome. Il enrichit ainsi le phagosome en molécules aux propriétés biocides.

phagocytose est celle des myosines. Un défaut de myosine II est associé à une absence d'exclusion de la phosphatase CD45 de la synapse phagocytaire, la myosine Ig et X régulent l'action de la PI3 Kinase tandis que la myosine Ic pourrait être associée à la fermeture du phagosome<sup>123</sup>. Autre protéine qu'il est important de mentionner, la dynamine-2 est recrutée dès la formation de la coupe phagocytaire où elle est associée à l'actine et où elle contribue à son organisation. Son inhibition empêche la fermeture du phagosome<sup>131</sup>.

De nombreuses petites protéines G comme Cdc42 sont impliquées dans la phagocytose. Pour être dans leur conformation active elles doivent être liées au GTP ce qui nécessite l'action de protéine de type GEF (*Guanine Exchange Factor*) peu identifiée dans le cadre de la phagocytose. La protéine RhoG active le complexe protéique Dock180-ELMO qui se comporte comme une protéine GEF pour les protéines Rac et plus particulièrement pour Rac2 qui contrairement à Rac1 est importante lors de la phagocytose dépendante des récepteurs Fcγ.

Une revue de Flannagan *et al.* permet de documenter le processus de maturation du phagosome<sup>103</sup>. Grâce à la protéine Arf6 les endosomes de recyclage fusionnent avant la fermeture du phagosome, avec la coupe phagocytaire<sup>132</sup>. Dès sa fermeture, un trafic à destination et au départ du phagosome commence modifiant son contenu et sa composition. Après fermeture se sont les endosomes précoces qui fusionnent avec le phagosome grâce à la protéine Rab5. Ils apportent notamment la protéine Vps34 responsable de la formation du PI(3)P. Certains composants présents à la membrane du phagosome sont recyclés à la membrane plasmique (comme le récepteur de la transferrine) notamment grâce aux protéines Rab4 et Rab11. Lorsque le phagosome continue sa maturation mais qu'il n'est pas encore un phagolysosome, des vésicules dont le contenu ubiquitinylé est destiné à être dégradé, se forment dans le phagosome se sont les *intraluminal vesicles* (ILV) qui formeront les corps multivésiculaires. Dans sa phase de maturation tardive, le phagosome s'acidifie du fait de la présence de la V-ATPase. Il perd aussi la protéine Rab5 à sa surface et il devient positif pour la protéine Rab7 qui permet la fusion des endosomes tardifs puis celle du lysosome qui apportent les protéines LAMP1 et 2 nécessaires à l'acquisition de l'activité microbicide du phagosome. Le phagolysosome représente le phagosome mature (Figure 14). La fusion du phagosome et des lysosomes dépend du complexe SNARE syntaxine 7/VAMP7. Ce compartiment au pH acide (environ cinq) contient de nombreuses molécules aux propriétés biocides tels que les cathépsines, des hydrolases ou les FRO produits par la NADPH oxydase.



**Figure 15.** Spécificité de la cascade de signalisation dans les neutrophiles lors de la phagocytose dépendante des récepteurs Fcγ. La différence majeure avec la signalisation dans les macrophages concerne la fusion des granules après relargage du calcium. Autre mécanisme moins documenté l'implication de la voie Raf-MEK-Erk bien que l'on ne sache pas l'action exacte de Erk car celui-ci reste dans le cytoplasme.

La phagocytose reste cependant un processus complexe et de nombreuses protéines retrouvées au phagosome et impliquées dans la phagocytose dépendante des récepteurs Fcγ dans les macrophages, ne sont pas citées ici<sup>133</sup>. Leurs rôles dans la phagocytose et la compréhension pleine et entière du mécanisme restent à établir. Pour complexifier la situation, des différences existent en fonction du récepteur impliqué (différentes voies de signalisation)<sup>129</sup>, de la taille de la proie (qui fait varier le taux de phagocytose)<sup>134</sup> et évidemment du phagocyte (présentation des antigènes dans les cellules dendritiques).

#### Cascade de signalisation dans les neutrophiles

La cascade de signalisation suivant l'activation du FcγRIIA n'est pas aussi bien définie dans les neutrophiles que dans les macrophages. Mais les éléments qui ont été identifiés sont similaires à la signalisation présente dans les macrophages. Aussi ne sont ici présentées que les spécificités propres aux neutrophiles. Dans les neutrophiles lorsque la PLC-γ2<sup>135</sup> et la PI3 kinase de classe I sont activées, le diacylglycérol produit lors de l'hydrolyse du PI(4,5)P<sub>2</sub> par la PLC-γ2 permet l'activation de la PKCδ qui va activer Raf-1<sup>136</sup> puis MEK avant une phosphorylation de la protéine Erk dans le cytoplasme, qui ne gagne pas le noyau mais qui va activer la phagocytose<sup>137</sup> selon un mécanisme inconnu.

L'IP<sub>3</sub> produit lors de la phagocytose va induire un premier signal calcique. Il se caractérise par le relargage dans le cytoplasme des ions calcium stockés dans le réticulum endoplasmique et par l'entrée de calcium extracellulaire. Dans les neutrophiles murins cette entrée de calcium va permettre l'activation de la gelsoline une protéine de *capping* de l'actine dépendante du calcium. Elle est importante pour l'adhésion et ingestion de la proie lors d'une phagocytose dépendante des récepteurs Fcγ mais elle n'affecte pas la fusion des granules où l'activité de la NADPH oxydase<sup>138</sup>. La brusque augmentation de la concentration calcique intracellulaire est nécessaire pour la fusion des granules avec le phagosome, chaque granule ayant un seuil minimal que doit atteindre la concentration calcique intracellulaire pour fusionner avec le phagosome<sup>139</sup> (Figure 15). Plus les granules sont apparus tôt au cours de la différenciation de



la cellule et plus le seuil à atteindre pour la dégranulation sera élevé. Ainsi les vésicules sécrétoires fusionnent en premier alors que la concentration seuil de calcium la plus élevée est nécessaire pour la fusion des granules azurophiles. La fusion de ces granules nécessite même un second signal calcique dont l'origine reste à élucidé.

La fusion des granules avec le phagosome débute avant sa fermeture, à sa coupe phagocytaire. Elle nécessite la dépolymérisation de l'actine à la coupe du phagosome et cette dépolymérisation est dépendante du calcium<sup>140</sup>. La fusion des granules implique des complexes SNARE<sup>141</sup>, la protéine SNAP-23 est particulièrement impliquée puisqu'elle intervient dans la fusion des granules spécifiques, à gélatinase et des vésicules sécrétoires<sup>142</sup>. La fusion des granules azurophiles est très polarisée grâce à la relocalisation du centre organisateur des microtubules près du phagosome<sup>143</sup>. Les microtubules participent aussi à l'exocytose des granules spécifiques mais leur exocytose est plus dispersée à la membrane conduisant à une recapture spécifique des protéines des granules qui se trouvent dans la membrane plasmique<sup>144</sup>. Cette fusion des granules apporte une grande quantité de protéines, d'une grande diversité ; seulement 14% sont directement des molécules impliquées dans la défense contre les pathogènes, les autres étant pour 10% d'entre elles des protéines mitochondriales, 14% sont des protéines impliquées dans la transduction du signal, autant sont attachées à la mobilité cellulaire et au cytosquelette et, pour ne citer que les fonctions les plus représentées, 11% sont des protéines du réticulum endoplasmique ou impliqué dans la maturation de ses vésicules<sup>145</sup>. Les granules spécifiques apportent une importante quantité de cytochrome b<sub>558</sub>, les constituants membranaires portant l'activité catalytique de la NADPH oxydase.

Les mécanismes régissant la fermeture du phagosome des neutrophiles lors d'une phagocytose dépendante des récepteurs Fcγ demeurent obscurs. Cependant il est possible d'extrapoler ce mécanisme à partir des données obtenues lors d'une phagocytose dépendante de iC3b dans les neutrophiles. Dans ce contexte, le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> sont nécessaires à la fermeture du phagosome. Ils pourraient jouer un rôle d'ancrage pour certaines protéines du cytosquelette comme la myosine X qui est capable grâce à son domaine PH de lier le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub><sup>146</sup> et qui contribuerait à la fermeture du phagosome.





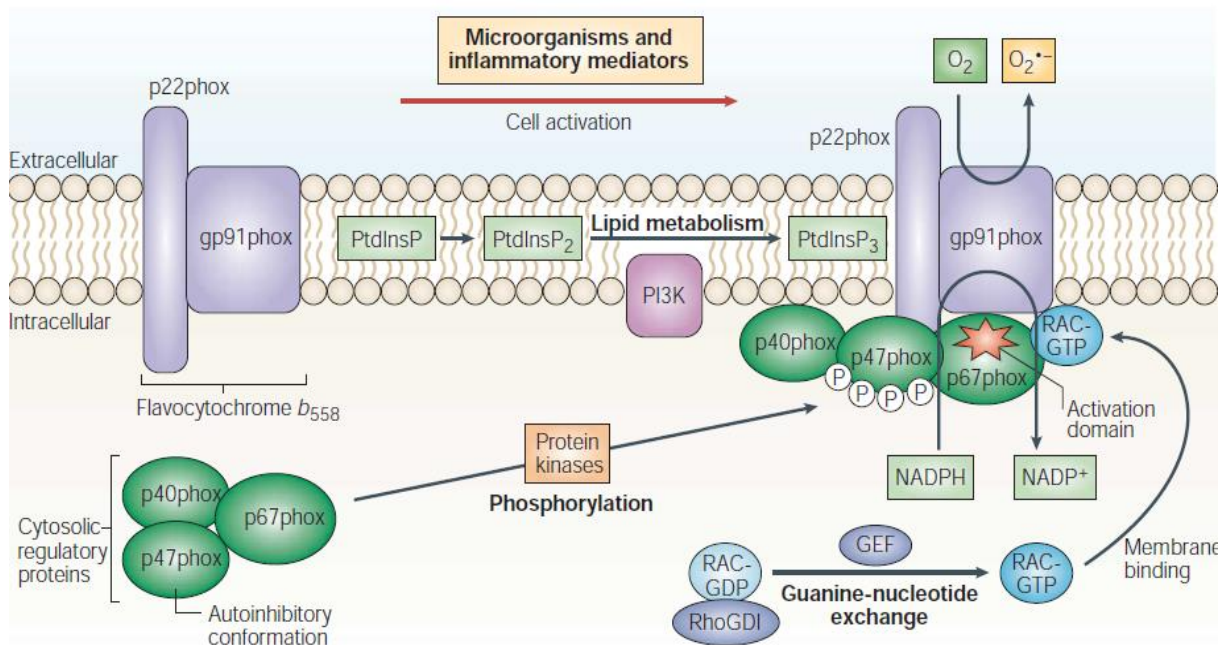
### Inhibition de la phagocytose

Devant l'universalité du mécanisme et son efficacité il n'est pas étonnant d'observer qu'au cours de l'évolution, soit apparu chez certains pathogènes des facteurs de virulence leur permettant d'éviter la phagocytose. Par exemple, la fixation de la bactérie *Yersinia enterocolitica* au neutrophile provoque une diminution de la concentration en calcium intracellulaire permettant l'activation du système de sécrétion de la bactérie et l'introduction des protéines Yop dans le cytoplasme de la cellule. YopH évite toute augmentation du calcium tandis que YopE en inhibant la voie Rac entraîne la dépolymérisation de l'actine<sup>147</sup>. D'autres bactéries, les *Group A Streptococci* sont capable de retarder le recrutement des neutrophiles grâce à une C5a peptidase et de se prémunir de la phagocytose en sécrétant la protéine GAS Mac qui séquestre le complexe CR3-FcγRIIIB à la surface des neutrophiles diminuant le taux de phagocytose en présence d'opsonines<sup>147</sup>.

Les stratégies d'évitement de la phagocytose développées par ces pathogènes leur permettent d'éviter la mise en place des deux principaux mécanismes biocide du neutrophile, la fusion des granules et de leur contenu avec le phagosome et l'activation de la NADPH oxydase. Cette enzyme productrice de FRO est intimement liée au processus de phagocytose puisque les petites protéines G précédemment citées (Cdc42 et Rac2) participent à son activation<sup>148</sup>.

### **La NADPH oxydase**

La NADPH oxydase est une famille d'enzyme dont les premières formes seraient apparues il y a 3,5 à 4,1 milliards d'années<sup>149</sup> soit bien avant la grande oxygénation. Cette famille regroupe sept membres (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5 et Duox1, Duox2) et est pratiquement présente dans tous les règnes du vivant puisqu'on la retrouve aussi bien dans des bactéries<sup>150</sup>, que dans des champignons<sup>151</sup> ou dans des plantes. Ces enzymes participent à des processus très variés<sup>152</sup> dont certains sont très spécialisés tel que la formation des otolithes dans l'oreille interne qui sont important pour l'équilibre (Nox3), la synthèse d'hormones thyroïdienne et la défense de l'épithélium pulmonaire (Duox).



**Figure 16. Schéma de l'organisation et du fonctionnement de la NADPH oxydase.** Le complexe protéique comporte cinq sous-unités : deux sont membranaires ( $p22^{phox}$  et  $Nox2/gp91^{phox}$ ) et trois sont cytoplasmiques ( $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  et  $p67^{phox}$ ). Une petite protéine G (Rac2) est nécessaire à son fonctionnement. La protéine Nox2 porte l'activité catalytique et transfère les électrons vers le dioxygène, la protéine  $p22^{phox}$  participe à sa stabilisation à la membrane. La protéine  $p67^{phox}$  est la protéine activatrice de Nox2 tandis que  $p40^{phox}$  et  $p47^{phox}$  sont des sous-unités organisatrices. La phosphorylation de  $p47^{phox}$  permet d'ancrer les sous-unités cytoplasmiques aux sous-unités membranaires. Enfin la protéine Rac2 contribue au changement conformationnel du complexe nécessaire à son activation. D'après Lambeth<sup>153</sup>.

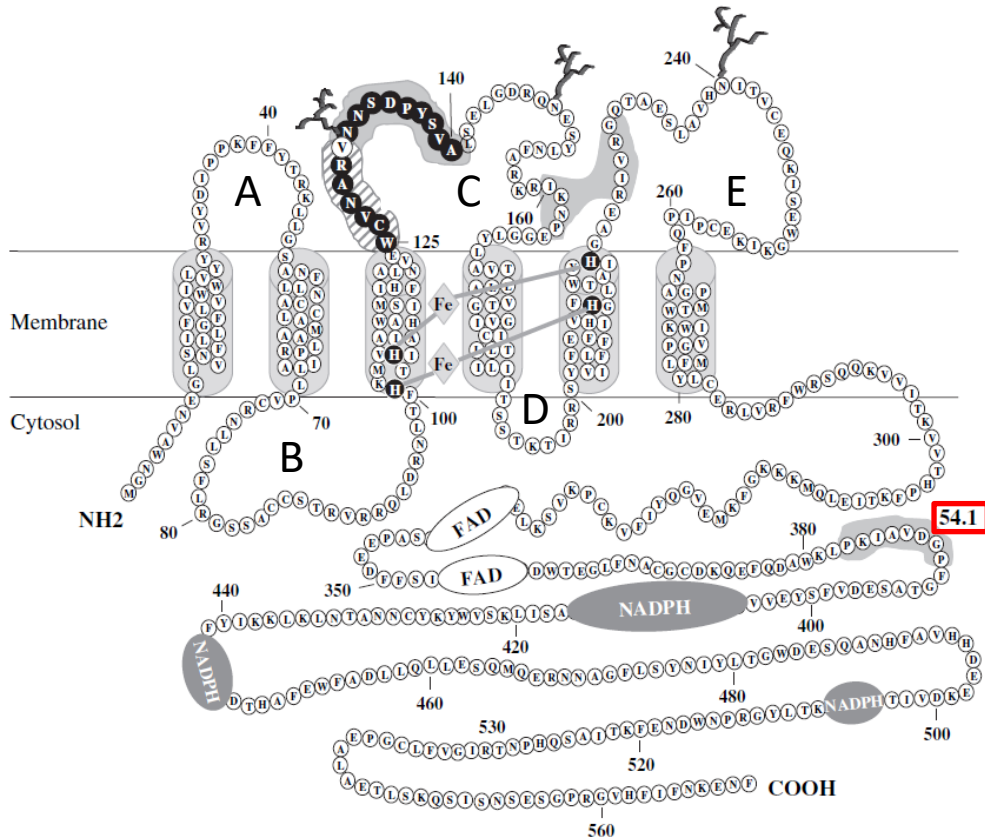
L'enzyme historique de cette famille, Nox2<sup>c</sup>, est une enzyme centrale de la destruction des pathogènes par les neutrophiles. C'est un complexe multiprotéique composé de cinq sous-unités principales, deux sont membranaires (Nox2 et p22<sup>phox</sup>) et forment le cytochrome b<sub>558</sub> et trois sont cytoplasmiques (p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup>). Elle catalyse avec son cofacteur le FAD l'oxydation du NADPH en  $\text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^-$  et le transfert transmembranaire des électrons d'abord au premier hème de Nox2 ( $E_{m7} = -225 \text{ mV}$ ) puis à son second ( $E_{m7} = -265 \text{ mV}$ ) et enfin à deux molécules de dioxygène servant d'accepteurs qui forment alors l'anion superoxyde<sup>152</sup> (Figure 16). Celui-ci va rapidement former par dismutation, du peroxyde d'hydrogène qui lui-même sera transformé, en présence d'ion chlorure par la myéloperoxydase, en acide hypochloreux ou qui formera en présence de fer le radical hydroxyle (Réaction de Fenton). Parmi ces espèces hautement réactives, le peroxyde d'hydrogène est capable de diffuser à travers les membranes et d'activer de nombreuses voies de signalisation notamment en oxydant des cystéines<sup>154</sup>.

#### Les sous-unités membranaires

La protéine Nox2 est une protéine de cinq cent soixante-dix acides aminés dont la forme immature fait soixante-cinq kilo Dalton. La structure de la protéine Nox2, n'est pas encore déterminée cependant de multiples travaux permettent d'approcher finement son organisation<sup>155,156</sup>. Elle se compose de deux grandes parties. La première partie correspond au N-terminal (cytoplasmique<sup>155</sup>) et aux six hélices transmembranaires reliées entre elles par des boucles A, C, E dans leur partie externe et B, D dans leur portion cytoplasmique. La seconde partie est intégralement cytoplasmique. Elle contient les sites de fixation du FAD et du NADPH, le site du NADPH étant masqué par une boucle de vingt acides aminés tant que l'enzyme reste inactive<sup>157</sup>. Son homologue Nox5 a été récemment cristallisé<sup>158</sup> nous permettant d'affiner notre représentation de Nox2 mais le fait qu'il soit son homologue le plus éloigné phylogénétiquement (identité de 27%)<sup>159</sup> incite à une certaine prudence. Cela est d'autant plus vrai que la protéine Nox5 cristallisé n'a que 50% d'identité avec la protéine Nox5 humaine (car elle provient de *Cylindrospermum stagnale*). De très nombreux résidus et possiblement des résidus importants doivent donc différer entre la protéine Nox2 humaine et la protéine Nox5 cristallisée.

---

<sup>c</sup> La sous-unité catalytique a donné son nom au membre de la famille NADPH oxydase correspondant. Ainsi Nox2 correspond à la NADPH oxydase présente dans les neutrophiles mais aussi à sa sous-unité catalytique.



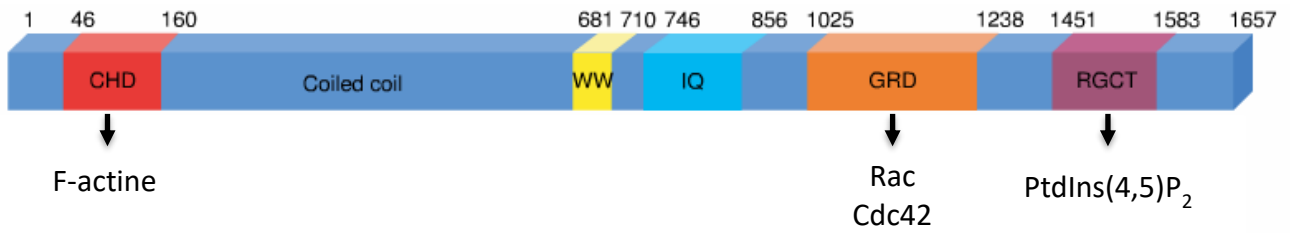
**Figure 17. Structure tridimensionnelle supposée de la protéine Nox2.** Le N-terminal et le C-terminal de la protéine se situe dans le cytoplasme. La protéine se compose de six segments transmembranaires qui sont spatialement dans des plans différents puisque les hèmes sont maintenues par des histidines situées sur les segments trois et cinq. Il n’y a qu’un site de fixation du FAD et du NADPH mais ils occupent plusieurs emplacement dans la séquence. L’encadré rouge correspond à la séquence reconnue par l’anticorps anti-Nox2 utilisé dans notre étude. D’après Campion *et al.*<sup>156</sup>

Les deux hèmes permettant le transfert d'électrons se lient aux histidines 101 et 209 (premier hème) et 115 et 222 (second hème) de la protéine Nox2 (Figure 17). L'ajout des hèmes est nécessaire à la correcte expression de la protéine comme le montre la mutation des histidines impliquées dans la liaison des hèmes qui entraîne une absence de Nox2 à la membrane, une absence de la forme mature de quatre-vingt-onze kilo Dalton dans les cellules<sup>160</sup> et même une absence d'interaction de la protéine Nox2 avec la protéine p22<sup>phox</sup>. Cette introduction des hèmes dans la protéine se fait dans le réticulum endoplasmique en parallèle de la formation de l'hétérodimère entre les protéines p22<sup>phox</sup> et la protéine Nox2<sup>161,162</sup> : le cytochrome b<sub>558</sub>. L'interaction entre les protéines p22<sup>phox</sup> et Nox2 est mal connue mais elle impliquerait le tryptophane 18 (premier segment transmembranaire), la glutamine 309, l'isoleucine 325 et la glycine 389 de la protéine Nox2<sup>163</sup>. L'absence de p22<sup>phox</sup> entraîne elle aussi une séquestration de Nox2 dans le réticulum endoplasmique des neutrophiles avant sa dégradation par le protéasome<sup>152</sup>.

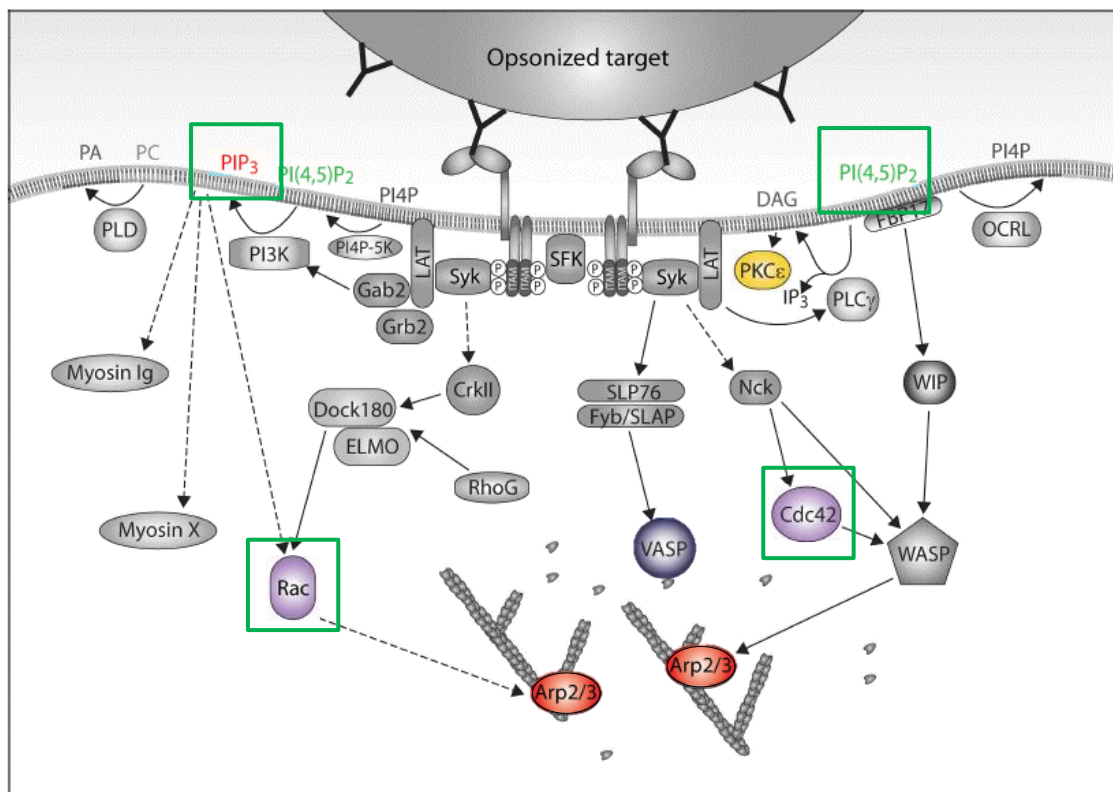
Durant son processus de maturation, la protéine passe du réticulum endoplasmique vers le Golgi grâce à la formation de *cargo containing coat protein complex II* et à l'action de la voie Sar1/Syntaxine 5<sup>164</sup>. Dans l'appareil de Golgi sont ajoutées trois glycosylations sur les asparagines 131, 148 et 239 situées dans des séquences consensus (Asn-X-Ser/Thr), la protéine atteignant alors un poids total de quatre-vingt-onze kilo Dalton. Ces modifications post-traductionnelles sont nécessaires à sa stabilité et à son adressage à la membrane.

#### Adressage des sous-unités membranaires et protéines impliquées dans leur recrutement au phagosome

Au repos le cytochrome b<sub>558</sub> se situe majoritairement dans les granules spécifiques, dans les vésicules sécrétoires et en faible proportion à la membrane plasmique<sup>165</sup> ainsi que dans les endosomes<sup>166</sup>. C'est la fusion de ces granules dès les étapes précoces de la phagocytose qui permet l'augmentation de la quantité de cytochrome b<sub>558</sub> à la membrane du phagosome, l'inhibition de cette fusion entraînant une perte de la production de FRO de 60%<sup>142</sup>. Dans les macrophages possédant un phagosome contenant le ligand de TLR2, la protéine Rubicon habituellement impliquée dans l'autophagie, agit sur le recrutement de la protéine p22<sup>phox</sup> au phagosome<sup>167</sup>.



**Figure 18.** Interaction de différents acteurs de la phagocytose avec les domaines de la protéine IQGAP1. La protéine se compose d'un domaine d'homologie à la calponine (CHD) liant l'actine, d'un domaine poly-proline (WW), d'un motif IQ, d'un Ras *GTPase-activating protein related domain* (GRD) qui permet la fixation de Rac et Cdc42 et d'un domaine RasGAP\_C terminus (RGCT) où se fixe le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Modifié à partir de Brown *et al.*<sup>168</sup>



**Figure 19.** Protéines et phospholipides connus pour être impliqués dans la phagocytose, dans le macrophage, et dont l'interaction avec la protéine IQGAP1 a été montrée. L'interaction de la protéine IQGAP1 avec toutes les protéines en couleurs a été mise en évidence. Les encadrés verts représentent les constituants cellulaires ayant aussi un lien avec l'activation de la NADPH oxydase. Modifié à partir de Jaumouillé *et al.*<sup>123</sup>

### Quid de la protéine IQGAP1

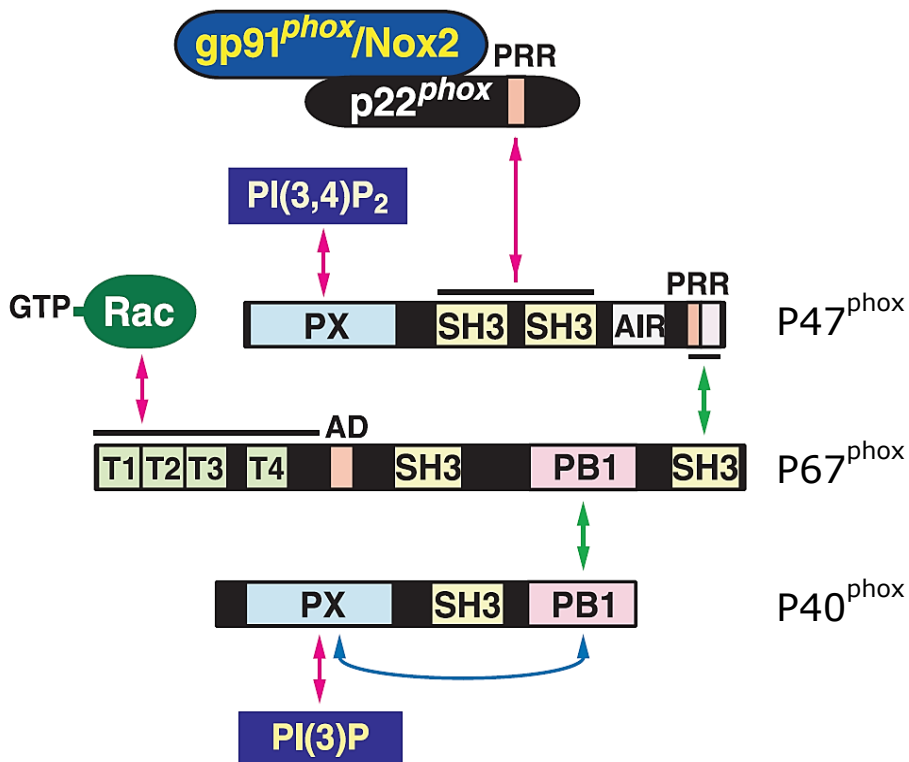
La protéine IQGAP1 est une protéine possiblement importante pour le trafic de la protéine Nox2. C'est une protéine d'échafaudage, très conservée chez les eucaryotes, impliquée dans de nombreux processus de signalisation, d'interaction protéique et particulièrement dans l'organisation du cytosquelette. Elle se compose d'un domaine d'homologie à la calponine, d'un domaine poly-proline, d'un motif IQ, d'un Ras *GTPase-activating protein related domain* et d'un domaine RasGAP\_C terminus<sup>168</sup> (Figure 18). En tant que protéine échafaudage, maintes protéines et constituants cellulaires ont été décrits comme interagissant avec elle<sup>168,169,170,171</sup>. Parmi eux se trouvent l'actine et la protéine Arp2/3 impliquées dans la formation des pseudopodes du phagosome, les PI(3,4,5)P<sub>3</sub> et PI(4,5)P<sub>2</sub> que l'on retrouve au phagosome dans les étapes précoces de sa maturation, la protéine VASP et les petites protéines G Cdc42 et Rac2 nécessaire au fonctionnement de la NADPH oxydase dans les neutrophiles (Figure 19). L'implication de la protéine IQGAP1 lors de la phagocytose a été démontrée dans les macrophages murins où la présence de cette protéine échafaudage est nécessaire à la phagocytose<sup>172,173</sup>. Dans les neutrophiles, son association au phagosome et aux granules à gélatinase a été observée<sup>174</sup>.

Son association avec la protéine Nox2 s'avère déterminante pour la mobilité de cette dernière dans les cellules endothéliales<sup>175</sup> laissant imaginer qu'il en va de même dans les neutrophiles. De plus des stratégies sont apparues chez certains pathogènes pour détourner son utilisation et notamment chez *Salmonella enterica* du sérotype *Typhimurium* qui produit grâce à son îlot de pathogénicité 2 une protéine Ssel qui s'associe à la protéine IQGAP1<sup>176</sup>. Or dans les macrophages, les phagosomes contenant cette bactérie présentent moins de cytochrome b<sub>558</sub> à leur membrane<sup>177</sup>. La protéine IQGAP1 pourrait donc être impliquée dans la mobilité de Nox2 au sein des neutrophiles.

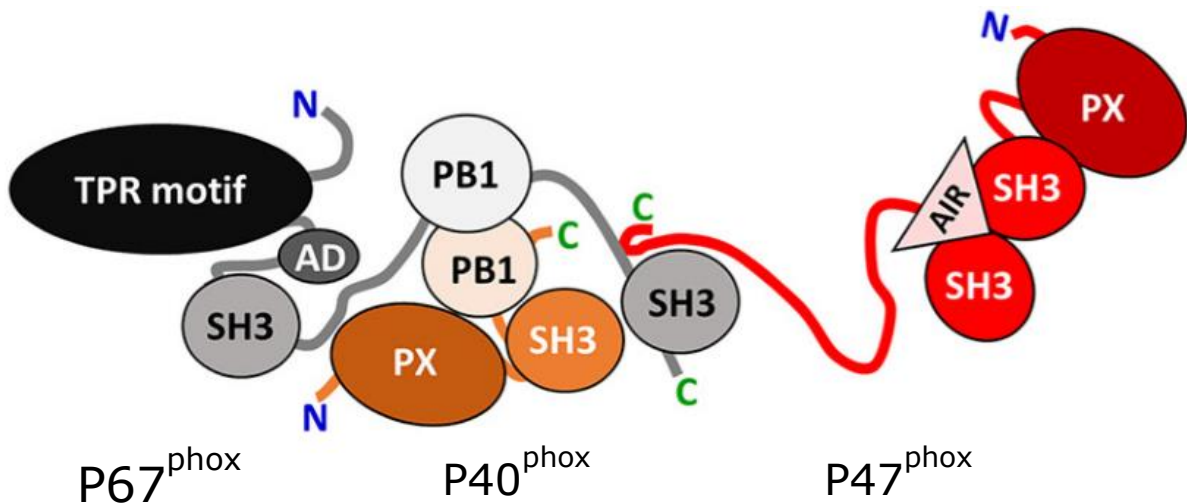
### Les sous-unités cytosoliques

Les sous-unités cytoplasmiques sont directement produites dans le cytoplasme. La protéine organisatrice de cette fraction cytoplasmique celle qui, une fois active, entraîne les autres sous-unités auprès du cytochrome b<sub>558</sub>, est la sous-unité p47<sup>phox</sup>. Cette protéine de trois cent quatre-vingt-dix acides aminés se compose d'un domaine *phagocyte oxidase* (PX), de deux domaines SH3 et d'un *proline rich domain* (PRR). Dans sa configuration inactive, les deux





**Figure 20. Interaction des sous-unités cytoplasmique de la NADPH oxydase dans les neutrophiles.** La sous-unité p67<sup>phox</sup> est la sous-unité catalytique. Elle interagit avec la protéine Nox2 grâce à son *activator domain*. Elle interagit aussi avec sa protéine activatrice Rac grâce à ses motifs TPR. Les protéines p47<sup>phox</sup> (grâce à ses domaines SH3 et PX) et p40<sup>phox</sup> (grâce à son domaine PX) servent de protéines organisatrices participant à la stabilité de la forme assemblée de la NADPH oxydase en liant la protéine p22<sup>phox</sup> et les lipides membranaires. Figure provenant de Sumimoto *et al.*<sup>178</sup>



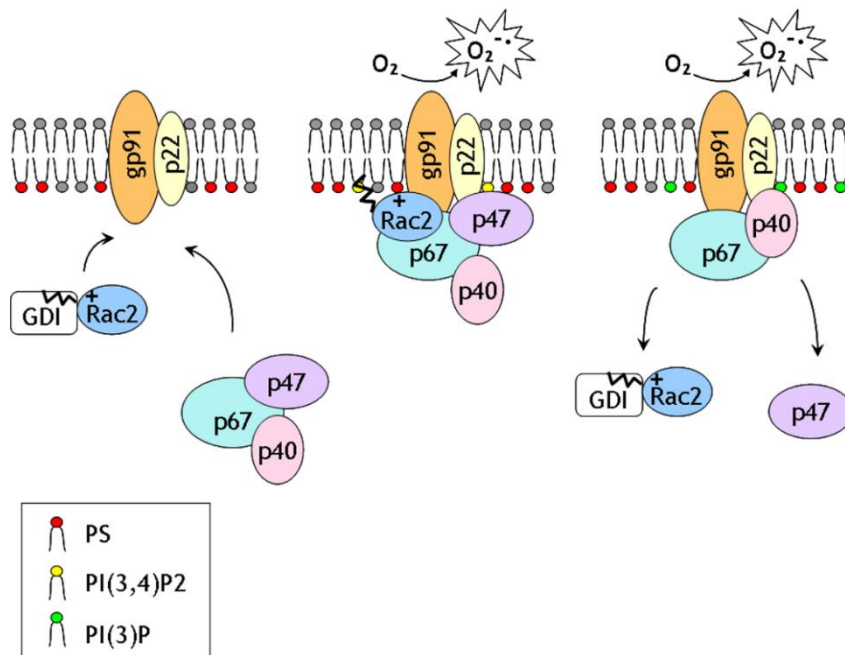
**Figure 21. Interaction des sous-unités cytoplasmique dans leur configuration inactive.** En gris se trouve p67<sup>phox</sup>, en orange p40<sup>phox</sup> et en rouge p47<sup>phox</sup>. Les sous-unités cytoplasmiques interagissent entre elles grâce aux interactions entre PRR et le domaine SH3 (p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup>) ou entre PB1 et PB1 (p67<sup>phox</sup> et p40<sup>phox</sup>). C'est l'interaction du domaine AIR avec les domaines SH3 de p47<sup>phox</sup> et de son domaine PX avec le domaine SH3 qui empêchent l'activation et la translocation du complexe à la membrane. Modèle obtenu par FRET et par analyse de données de SAXS. Figure provenant de Ziegler *et al.*<sup>179</sup>

domaines SH3 de p47<sup>phox</sup> sont liés à la région auto-inhibitrice de la protéine située dans sa partie C-terminal tandis que le domaine PX, qui possède deux sites de fixation pour des phospholipides anioniques, est lui aussi dans une configuration inactive par une liaison avec l'un des domaines SH3<sup>153</sup>. Le PRR de p47<sup>phox</sup> est lié au domaine SH3 de p67<sup>phox</sup> permettant la liaison des deux protéines. La protéine p67<sup>phox</sup> est la partie cytoplasmique activatrice<sup>180</sup>. Elle se compose de quatre motifs TPR dans sa partie N-terminale qui vont lier Rac2, d'un domaine activateur liant Nox2, d'une région riche en proline et dans sa partie C-terminale de deux domaines SH3 entrecoupé par un domaine PB1<sup>153</sup>. Le domaine PB1 interagit avec celui de p40<sup>phox</sup> pour lier les trois sous-unités ensemble<sup>152,179</sup>. La dernière sous-unité du trimère, p40<sup>phox</sup> contient un domaine PX qui ne possède qu'un site de liaison des phospholipides avec une forte affinité pour le PI(3)P<sup>167</sup>. Elle dispose aussi d'un domaine SH3 et d'un domaine PB1 qui, dans la configuration inactive de l'enzyme, serait lié à la fois au domaine PB1 de p67<sup>phox</sup> et à son domaine PX (Figure 20 & Figure 21).

#### Activation et dynamique du complexe

L'activation du complexe peut se faire à la membrane plasmique ou au phagosome. Elle résulte d'au moins quatre étapes plus ou moins intriquées : la phosphorylation de certaines protéines, la translocation du complexe cytoplasmique à la membrane, l'échange de nucléotide associé à la protéine Rac et la synthèse de certains lipides.

La phosphorylation clef permettant le changement de conformation du complexe cytosolique (d'une configuration inactive vers une configuration active) lors de la phagocytose est inconnue mais lors du *priming* des cellules avec du TNF- $\alpha$  ou du GM-CSF il s'agit de la phosphorylation de la sérine 345 de p47<sup>phox</sup>. Cette première phosphorylation favorise celle de plusieurs des huit autres sites lors d'une seconde stimulation du neutrophile permettant une fine régulation de l'activation de la NADPH oxydase<sup>33</sup>. On peut formuler l'hypothèse qu'une fois le complexe cytoplasmique dans sa conformation active, p47<sup>phox</sup> va fixer l'actine<sup>181</sup> probablement grâce à l'interaction de son domaine PX avec la moésine<sup>182</sup> permettant la présence des sous-unités cytoplasmique à la membrane dès la formation de la coupe phagocytaire<sup>183</sup>. Une fois à la membrane, la conformation active du complexe permet : la fixation des deux domaines SH3 de la protéine p47<sup>phox</sup> sur la région riche en proline de p22<sup>phox</sup>, interaction qui est importante pour la translocation des sous-unités cytoplasmique<sup>184</sup> et pour



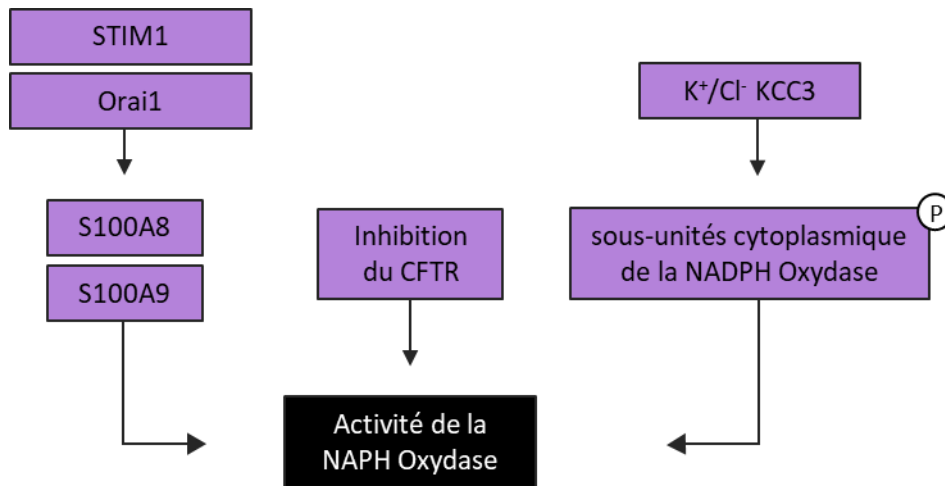
**Figure 22. Modèle d'activation de la NADPH oxydase au phagosome dans les neutrophiles.** Les sous-unités cytoplasmiques sont liées entre elles dans une configuration inactive. La phosphorylation de  $p47^{\text{phox}}$  permet un changement conformationnel et la translocation du complexe à la membrane. Celui-ci s'associe avec les sous-unités membranaires grâce à la fixation de  $p47^{\text{phox}}$  sur la protéine  $p22^{\text{phox}}$ . La protéine  $p47^{\text{phox}}$  lie aussi des phospholipides anioniques ( $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ , phosphatidylsérine et acide phosphatidique). L'activité catalytique du complexe nécessite aussi la fixation de la protéine  $\text{Rac2 GTP}$  qui entraîne un changement de conformation de la protéine  $p67^{\text{phox}}$ . Après quelques minutes,  $\text{Rac2}$  et  $p47^{\text{phox}}$  se détachent et c'est la fixation de  $p40^{\text{phox}}$  sur le  $\text{PI}(3)\text{P}$  qui permet la continuité de la production de  $\text{FRO}$ . Figure provenant de Faure *et al.* <sup>185</sup>

l'activité catalytique du complexe<sup>186</sup> ; la fixation du domaine PX de p47<sup>phox</sup> qui se lierait à certains phospholipides anioniques (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, acide phosphatidique et phosphatidylsérine)<sup>178</sup> ce qui permettrait la stabilisation des sous-unités cytoplasmiques à la membrane. De plus l'activité du complexe est régulée par des phosphorylations des sous-unités membranaires qui vont moduler l'activité de Nox2 dans les neutrophiles humains<sup>187</sup>. Parallèlement dans les neutrophiles la protéine Rac2 se dissocie de la protéine *Rho GDP dissociation Inhibitor* (sa protéine inhibitrice) et un échange du nucléotide associé à Rac, du GDP vers le GTP va s'opérer avec l'aide d'une protéine *Guanine exchange Factor*. Sous sa forme active lié au GTP, Rac2 interagit avec p67<sup>phox</sup> et cette interaction provoque un changement de conformation de p67<sup>phox</sup> qui lui permet d'activer Nox2 et la production de FRO. Cependant les protéines p47<sup>phox</sup> et Rac2 ne restent que transitoirement au phagosome<sup>185</sup> et lorsque la composition lipidique du phagosome évolue, que le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>/ PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> disparaît faisant place aux PtdIns(3)P, la fixation de p40<sup>phox</sup> par son domaine PX à ces lipides permet à p67<sup>phox</sup> d'interagir avec le cytochrome b<sub>558</sub> pour maintenir la production de FRO<sup>188</sup> (Figure 22).

#### NADPH oxydase et phagosome

La consommation de proton pour produire le peroxyde d'hydrogène à partir de l'anion superoxyde produit par la NADPH oxydase devrait conduire à une alcalinisation du phagosome dans les neutrophiles mais son pH, bien qu'encore débattu, semble rester neutre et ce grâce à un canal à proton<sup>189</sup> dont la perméabilité augmente lorsque la NADPH oxydase est active. Il n'y a pas non plus d'acidification du phagosome car l'activation de la NADPH oxydase entraîne une diminution de la présence de la V-ATPase au phagosome<sup>190</sup>. Cela apparaît contre intuitif au regard du pH optimal de fonctionnement des protéases mais leur activité biocide repose aussi sur des interactions électrostatiques qui ne nécessitent pas une activité de l'enzyme<sup>108</sup>. S'il n'y a pas de variation du pH au phagosome, il y a probablement en revanche une acidification du cytoplasme due à l'oxydation du NADPH comme c'est le cas lors d'une stimulation des neutrophiles par des phorbol ester<sup>191</sup>. Dans les macrophages en revanche il y a rapidement une acidification du phagosome, son pH atteignant moins de cinq après dix minutes<sup>167</sup>.

L'activité de ce complexe protéique au phagosome est régulée par la concentration calcique. Les partenaires STIM1 et Orai1 promeuvent le recrutement au phagosome de l'hétérodimère S100A8/A9 qui se fixe sur le cytochrome b<sub>558</sub> et interagit avec la protéine



**Figure 23.** Schéma des mécanismes régulant l'activité de la NADPH oxydase au phagosome dans les neutrophiles. Le calcium (relargué grâce à STIM1/Orai1) favorise l'activité de la NADPH oxydase grâce aux protéines S100A8/9. Il en va de même avec l'inhibition du canal CFTR, probablement grâce à une modification du potentiel de membrane. Cependant cela réduit l'activité biocide du phagosome (du fait de la diminution de la quantité d'acide hypochloreux). En modulant les phosphorylations des sous-unités cytoplasmiques du complexe,  $K^+/Cl^-$  KCC3 favorise l'activité de la NADPH oxydase bien que les mécanismes exacts restent encore inconnus.

p67<sup>phox</sup>. En conséquence le complexe NADPH oxydase passe dans une conformation pleinement ouverte<sup>192</sup> et son activité augmente<sup>167,193</sup>. L'activité du transporteur d'ion chlore, CFTR, est un autre régulateur de l'activité de la NADPH oxydase au phagosome son inhibition provoquant une augmentation de l'activité de l'enzyme possiblement par une modification du potentiel de membrane au phagosome<sup>167</sup>. Dans la même revue Nunes *et al.*<sup>167</sup> expliquent que le co-transporteur K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> KCC3 est capable de moduler les phosphorylations et le recrutement des sous-unités de la NADPH oxydase par un mécanisme qui reste à identifier (Figure 23).

### Les pathologies liées à une absence/diminution de la production de FRO

Les défauts de production de FRO par la NADPH oxydase dans les neutrophiles entraînent une pathologie, la granulomatose septique chronique caractérisée par des infections répétées par certaines bactéries et par des champignons. De plus une fraction importante de ces malades souffre souvent de maladies inflammatoires intestinales proche de la maladie de Crohn ou plus rarement d'arthrite, de gingivite, d'uvéïte, de glomérulonéphrite voir même de lupus érythémateux<sup>194</sup>. Malgré un traitement prophylactique, l'espérance de vie de ces patients est moindre du fait des complications inflammatoires<sup>195</sup> et à ce jour les remèdes efficaces sont la thérapie génique<sup>196</sup> ou la greffe de moelle osseuse. Ce défaut de production de FRO est dû à une mutation dans l'une des sous-unités de la NADPH oxydase et bien que chacune d'entre elles peuvent être concernées, 75% des cas concerne Nox2<sup>197</sup> (en raison de sa présence sur le chromosome X), 25% des patients possède une mutation dans p47<sup>phox</sup><sup>197</sup>, tandis qu'à ce jour un seul patient identifié souffre de cette maladie suite à une mutation dans p40<sup>phox</sup><sup>198</sup>. Récemment vingt-quatre patients possédant une mutation dans p40<sup>phox</sup> ont été identifiés comme souffrant d'une forme atypique de granulomatose septique chronique puisqu'ils présentent une hyperinflammation et des infections périphériques mais pas d'infections bactériennes ou fongiques comme chez les patients souffrant de la forme classique de granulomatose septique chronique<sup>199</sup>. Une absence de glucose-6-phosphate déshydrogénase peut aussi conduire à une absence de production de FRO car cette enzyme est nécessaire à la formation du NADPH à partir du NADP<sup>+</sup><sup>200</sup>.



### Inhibition de la production de FRO au phagosome par les pathogènes

Ces maladies montrent l'importance des FRO dans la défense de l'organisme il n'est donc là encore pas surprenant de constater qu'au cours de l'évolution certains pathogènes, parmi lesquels *Bacillus anthracis* (anthrax) ou *Yersinia pestis* (Peste Noire)<sup>201</sup>, ont trouvé des stratégies afin de détourner ou d'inhiber cette production de FRO. La bactérie *Helicobacter pylori*, dont la prévalence atteint 50% chez les individus de plus de cinquante ans et dont la présence est associée aux ulcères, est soupçonnée de favoriser les cancers de l'estomac<sup>202</sup>. Elle est capable d'échapper à l'opsonisation et de provoquer par la suite sa propre phagocytose par la voie des lectines. En influant sur la composition lipidique du phagosome naissant elle arrive dans un premier temps à ralentir la formation des pseudopodes puis dans les neutrophiles à retarder la phagocytose. De plus elle empêche l'adressage de la NADPH oxydase au phagosome et celle-ci se retrouve assemblée à la membrane plasmique. L'absence de marqueur des granules spécifiques au phagosome pourrait indiquer que le pathogène détourne leurs adressage<sup>203</sup>. La bactérie *Francisella tularensis* a pour particularité de pouvoir entraîner une tularémie après l'inoculation de seulement 10 individus et d'être mortelle dans 30% des cas ce qui en fait une potentielle arme bactériologique<sup>204</sup>. Contrairement à *Helicobacter* l'opsonisation de la bactérie est nécessaire à son entrée dans les neutrophiles puisque la phagocytose est ici dépendante du récepteur du complément. Mais cette fois encore, il n'y a pas de production de FRO dans le phagosome car elle empêche l'assemblage de la NADPH oxydase. Elle finit ensuite par rompre le phagosome et rester dans le cytoplasme du neutrophile<sup>205</sup>.





### 3.

## Objectifs de l'étude

### Quel modèle pour étudier la protéine Nox2 dans les neutrophiles ?

#### Les PLB-985, la référence

La courte durée de vie des neutrophiles et l'impossibilité de travailler avec des cultures primaires, rend leur étude délicate. En effet jusqu'à récemment les neutrophiles ne pouvaient être conservés plus de vingt-quatre heures après leur prélèvement. Une nouvelle approche basée sur leur culture en conditions anoxique et en présence de diméthylaloxalylglycine rallongent leur viabilité *in vitro* autorisant leur conservation et leur utilisation pendant quarante-huit à soixante-douze heures<sup>206</sup>. De surcroît les neutrophiles supportent mal la transfection compliquant encore leur étude. Là encore de nouveaux protocoles semblent résoudre partiellement le problème<sup>206,111</sup> mais la transfection des neutrophiles différenciés ne permet pas le marquage des granules par des protéines fluorescentes. Devant ces obstacles de nombreux modèles ont émergé ou ont été essayés. Des hétérocaryons à partir de neutrophiles murins et de fibroblastes ont été réalisés mais l'absence de réplication de l'ADN provenant du neutrophile, complique leur immortalisation par ce procédé<sup>207</sup>. Plus récemment des cellules progénitrices murines, capable de se différencier normalement en neutrophile ou en macrophage, ont été immortalisées avec l'oncoprotéine Hoxb8<sup>208</sup>. Du fait du dilemme éthique posé par l'introduction d'une oncoprotéine dans le génome de cellule humaine saine, les deux principaux modèles utilisés (HL-60 et PLB-985) sont des lignées provenant de patients atteint de leucémie<sup>209</sup>. Cependant la validation du modèle HL-60/PBL-985 *neutrophil like* a montré que l'utilisation de ces cellules est plus pertinente que celle des neutrophiles murins car leur expression génique est plus proche de celle des neutrophiles humains<sup>210</sup>. D'autres études génétiques ont mises en évidence que les cellules PLB-985 ne sont en réalité que des cellules HL-60<sup>211</sup> présentant des différences dans l'expression de certains gènes<sup>210</sup>. Si leur simplicité de culture, de différenciation, de transfection<sup>212</sup> et leur similarité avec les neutrophiles ont assis leur notoriété, seul la différenciation pratiqué par Pedruzzi et al. a réussi à mettre en évidence des granules autres que les granules azurophiles<sup>213</sup>. Concernant leur



phénotype, la morphologie de leur noyau ; leur absence de granules spécifiques, d'exocytose des granules à gélatinase et des vésicules sécrétoires leur confère un phénotype similaire à celui des métamyélocytes ou des *band cells*<sup>214</sup>.

Ces défauts motivent actuellement le développement de nouveaux modèles à partir d'une technologie prometteuse, les *induced pluripotent stem cells*. Les premiers neutrophiles obtenus à partir de cette technique permettent d'envisager l'obtention à moyen terme de neutrophiles similaires à ceux provenant des prélèvements sanguins<sup>215,216</sup> et pouvant servir de modèle dans des pathologies rares pour lesquels il est difficile de trouver des donneurs<sup>217</sup>. Cependant des problèmes subsistent encore et devront d'abord être réglés avant de devenir le modèle de référence. Ainsi l'insertion du vecteur permettant la reprogrammation des cellules est susceptible d'induire des modifications génétiques importantes tout comme le processus de reprogrammation lui-même qui conduit après quelques générations à l'obtention d'anomalies génétiques qui s'additionnent aux anomalies épigénétiques<sup>218</sup>. En attendant l'utilisation des PLB-985 reste privilégiée d'autant que leurs capacités de phagocytose<sup>214</sup>, de production de cytokines et d'expression des marqueurs membranaires<sup>212</sup> sont similaires à celles des neutrophiles. L'opportunité qu'ils représentaient en termes de compréhension des neutrophiles a conduit au développement d'un modèle PLB-985 mimant les neutrophiles de patients souffrant de granulomatose septique chronique<sup>219</sup>.

#### Création des PLB-985 X-CGD GFP-Nox2

L'absence d'alternative crédible aux cellules PLB-985 en fit aussi le modèle pour l'étude de la NADPH oxydase dans les neutrophiles. L'une des questions qui se posa alors était le suivi au cours du temps de la NADPH oxydase dans la cellule pour étudier sa dynamique et son assemblage. Dans un premier temps, par recombinaison homologue à partir de PLB-985 Nox2<sup>+0</sup> une variante sans la protéine Nox2 endogène fut créé : PLB-985 Nox2<sup>-0</sup> (PLB-985 KO)<sup>219</sup>.

Plusieurs constructions ont été réalisées fusionnant une protéine fluorescente avec l'une des sous-unités membranaires de Nox2, la difficulté étant de maintenir la production de FRO malgré l'ajout de la protéine fluorescente. L'ajout d'une protéine fluorescente en C-terminal de p22<sup>phox</sup> n'a aucun effet sur la production de FRO, contrairement à un tel ajout en C-terminal



de Nox2<sup>220</sup>. Dès l'année suivante Murillo et al. expriment dans des fibroblastes une construction codant pour une protéine fusion où la protéine GFP se situe en N-terminal de Nox2<sup>221</sup>. En reprenant cette construction, en l'introduisant dans un vecteur rétroviral et en introduisant ce vecteur rétroviral dans les cellules PLB-985 X-CGD van Manen *et al.* arrivent à obtenir des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 qui l'expriment de manière stable<sup>222</sup> ouvrant la porte à des études de FRET entre les différentes sous-unités du complexe mais aussi au suivi en microscopie de la protéine Nox2 lors de la phagocytose.

### **Objectifs de l'étude**

La force du neutrophile réside dans sa capacité à produire rapidement des FRO ce qui lui permet d'éliminer des pathogènes qui sont autrement résistant à la phagocytose. Cela se matérialise par la présence de la NADPH oxydase dès la formation de la coupe du phagosome et par l'action de certains pathogènes qui, comme on l'a vu, sont capables de détourner son assemblage ou d'inhiber son activation.

Le but de ce travail était d'étudier les mécanismes responsables de la dynamique de la protéine Nox2 lors de la phagocytose. Pour cela il fallut d'abord caractériser le modèle que représentent les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2. Grâce à la protéine GFP on a pu par la suite suivre en microscopie la protéine Nox2 au cours de la phagocytose.

Puisque ces cellules n'ont pas de granules spécifiques, à gélatinases ou des vésicules sécrétoires, la seconde partie de ce travail a consisté à déterminer les structures contenant les protéines GFP-Nox2 dans nos cellules. Il a fallu regarder la localisation de la protéine GFP-Nox2 par rapport aux endosomes car dans les macrophages l'importance des endosomes dans la maturation du phagosome et dans l'apport de Nox2 est bien documentée<sup>223</sup> et que dans les neutrophiles les marqueurs des endosomes sont associés aux granules à gélatinase puis au phagosome<sup>174,12</sup>.

Une fois les structures contenant la protéine GFP-Nox2 identifiées deux objectifs se dessinèrent : savoir si ces structures contribuent à l'apport de la protéine GFP-Nox2 au phagosome et tester l'hypothèse qu'il y a une accumulation de la protéine GFP-Nox2 à la membrane plasmique avant la fermeture du phagosome. En effet à la synapse immunologique il y a un recyclage polarisé des TCR vers la synapse<sup>224</sup>, des mouvements actifs de LFA-1 vers la



synapse<sup>225</sup> et une sécrétion polarisée de protéines nouvellement formées<sup>226</sup>. La synapse immunologique partageant de nombreuses similarités avec la synapse phagocytaire<sup>227</sup> l'hypothèse a été faite que la protéine Nox2 pourrait s'accumuler à la synapse phagocytaire, là où se forme le phagosome, grâce à de tels mécanismes.

La suite du projet chercha à déterminer si la protéine IQGAP1 est impliquée dans le trafic de la protéine Nox2 au phagosome. Comme évoqué précédemment *Salmonella enterica* du sérotype *Typhimurium* diminue la quantité de cytochrome b<sub>558</sub> à la membrane du phagosome dans les macrophages grâce à son îlot de pathogénicité 2<sup>177</sup>. Or cet îlot code pour une protéine Ssel qui utilise la protéine IQGAP1<sup>176</sup>, qui est elle-même nécessaire aux mouvements de la protéine Nox2 dans la membrane des cellules endothéliales<sup>175</sup> et que l'on retrouve associé aux granules à gélatinase et au phagosome après leurs fusion<sup>174</sup>. La protéine IQGAP1 pourrait donc être impliquée dans la mobilité de Nox2 au sein des neutrophiles.

Le dernier point abordé dans ce travail concerne l'organisation moléculaire de la protéine Nox2. Les protéines tels que le TCR à la synapse immunologique ou les récepteurs Fcγ à la synapse phagocytaire s'organisent en microclusters<sup>228</sup> et de précédents travaux ont montré que la protéine Nox2 avait tendance à former des clusters à la membrane plasmique après stimulation par le PMA<sup>229</sup>. L'idée était donc de savoir si la protéine Nox2 présentait une organisation particulière et de comparer cette organisation dans différentes conditions.





# **Deuxième partie**

## **Résultats**



## 1.

### Caractérisation des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2

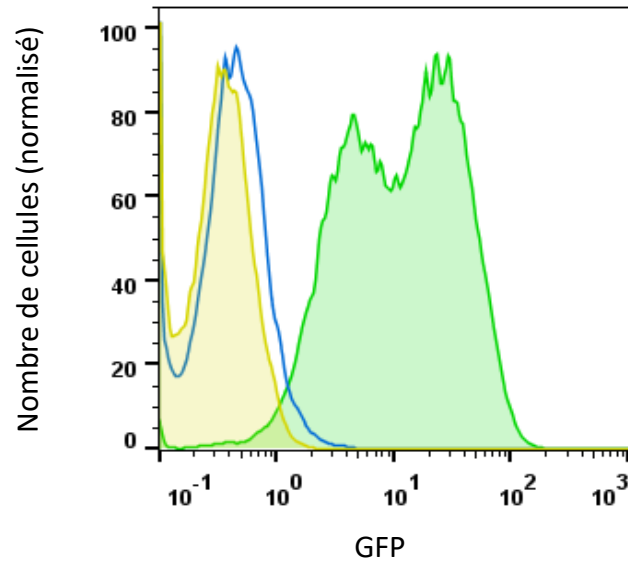
Avant d'étudier la question de la mobilité de la protéine Nox2 au cours de la phagocytose, il fallait tout d'abord caractériser les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2. Elles devaient nous permettre, grâce la protéine GFP, de suivre la protéine Nox2 dans les cellules. Pour ce faire deux types d'analyses ont été réalisées. Une première analyse s'est concentrée sur l'expression et la localisation de la protéine GFP-Nox2 tandis qu'une seconde analyse a permis d'étudier les propriétés fonctionnelles de la protéine.

#### Expression de la protéine GFP-Nox2

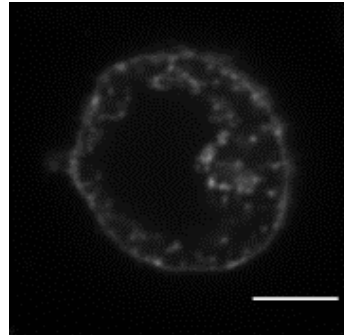
##### Détection des protéines GFP-Nox2

Les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 expriment une protéine Nox2 comprenant en N-terminal une chaîne de onze acides aminés (SGLRSRAQASA) précédée de la protéine GFP placée sous le contrôle du promoteur CMV (Figure 24A).

L'isolement des membranes cellulaires se fait par ultracentrifugation des cellules PLB-985 WT, des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 ou des neutrophiles humains. Grâce au dosage des protéines on dépose la même quantité d'échantillon dans chacun des puits du gel de polyacrylamide permettant la séparation des protéines contenues dans les préparations membranaires. Avec un anticorps dirigé contre la protéine Nox2 on observe la présence, dans les cellules X-CGD GFP-Nox2, d'une bande diffuse aux alentours de 130 kilos Dalton (kDa) ce qui correspond à la masse théorique de la protéine GFP-Nox2. En effet, la taille de la protéine de fusion devrait correspondre à la somme de la masse de la protéine Nox2 (91 kDa) plus celle de la protéine GFP (27 kDa) soit environ 120 kDa. Le fait que cette bande soit diffuse est dû aux glycosylations présentes sur la protéine. Dans les préparations provenant des cellules PLB-985 WT cette bande diffuse est plus basse, sa masse se situant à 95 kDa la masse de la protéine Nox2 seule. Enfin les préparations obtenues à partir des neutrophiles humains présentent un profil similaire à celui des PLB-985 WT mais avec une bande de plus forte intensité (Figure 24B).

**A****B**

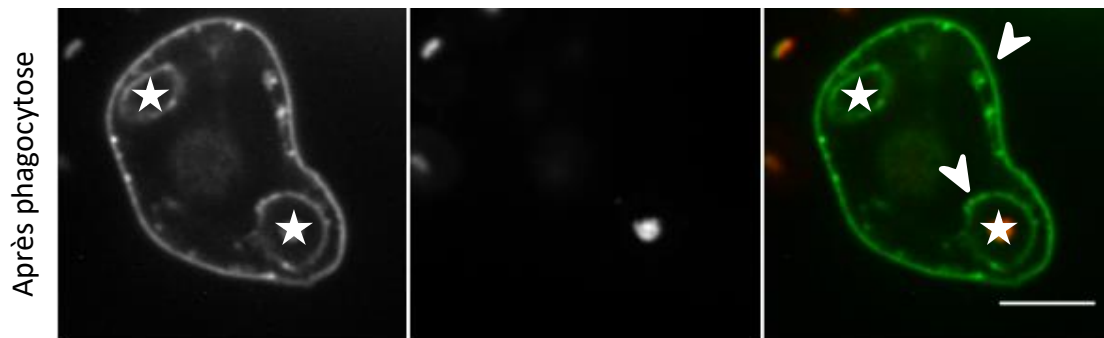
GFP-Nox2

**C**

GFP-Nox2

ZO A405

Merged



**Figure 25. Hétérogénéité de l'expression de la protéine GFP-Nox2 et sa répartition dans les cellules.** (A) L'expression de la protéine GFP-Nox2 dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 a été vérifiée en cytométrie en flux (ligne verte). Des cellules PLB-985 WT (ligne jaune) et des cellules PLB-985 Nox2<sup>-/-</sup> (ligne bleue) ont servi de contrôle. Les panels (B) et (C) sont des images de microscopie confocale, l'échelle représente cinq micromètres. (B) Dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2, la protéine Nox2 se localise à la membrane plasmique et dans des vésicules cytoplasmiques lorsque les cellules sont non stimulées. (C) Après cinq minutes de phagocytose en présence de particules de zymosane opsonisées avec du sérum humain complet et marqué par de l'Alexa 405 (ZO A405), la protéine Nox2 se retrouve à la membrane du phagosome et à la membrane plasmique (flèche blanche). Dans le phagosome du haut, le ZO n'est pas visible car il n'est pas dans le même plan que l'image prise. Les étoiles blanches indiquent la localisation des phagosomes. Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm.

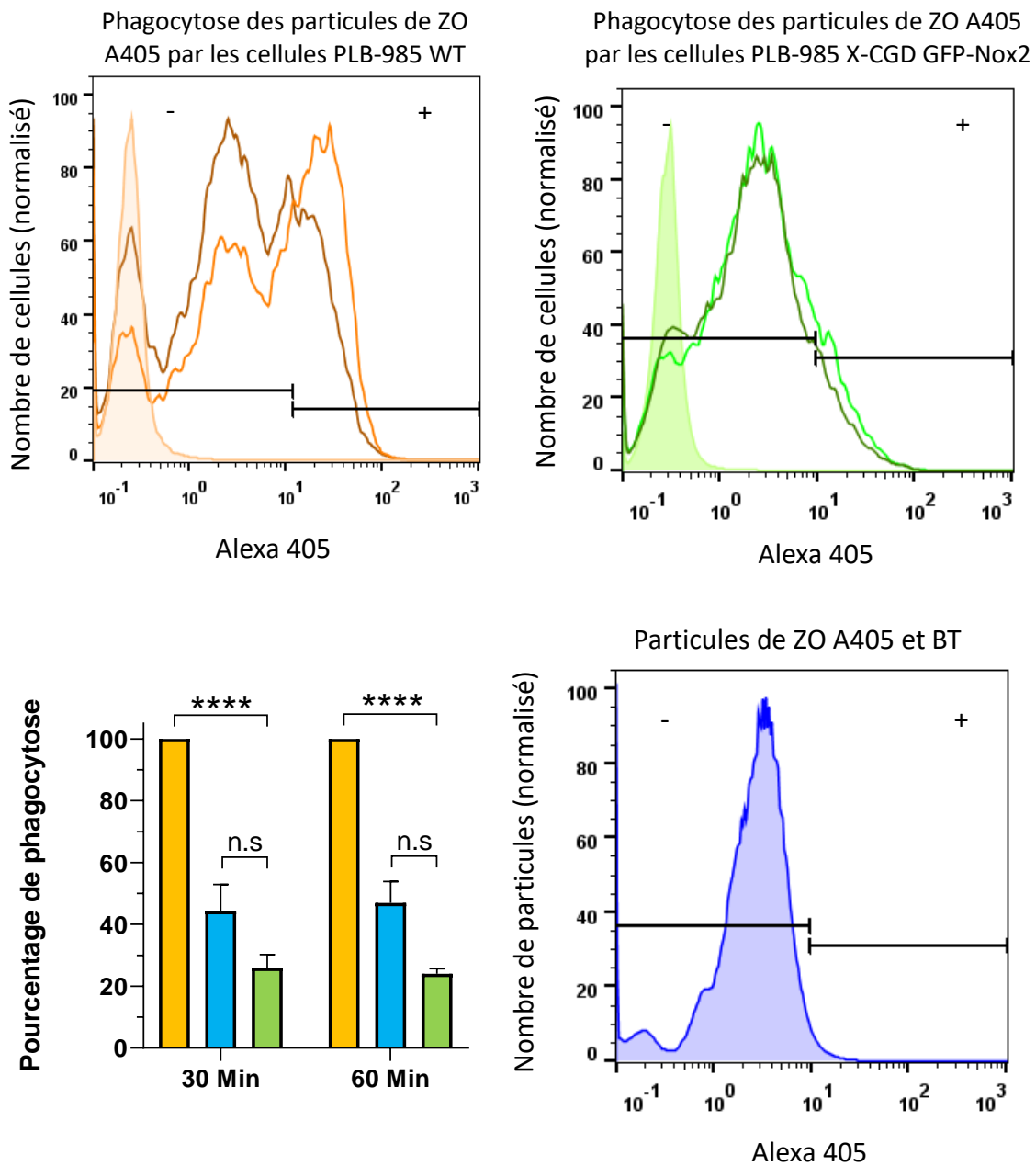
Les résultats obtenus avec un anticorps dirigé contre la protéine GFP corroborent ceux obtenus avec un anticorps dirigé contre la protéine Nox2. On obtient toujours une bande aux alentours de 130 kDa avec les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 mais il n'y a pas de bande visible avec les cellules PLB-985 WT et les polynucléaires neutrophiles. L'absence d'une bande de 30 kDa dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 indique que la GFP ne se présente pas sous forme libre dans les cellules.

#### Homogénéité de l'expression de la protéine GFP-Nox2 au sein d'une population

L'homogénéité de l'expression de la protéine GFP-Nox2 au sein des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 a été évaluée par cytométrie en flux ; l'auto-fluorescence des cellules PLB-985 WT (jaune) et des cellules PLB-985 Nox2<sup>-/-</sup> (bleu) servant de référence. Le profil de fluorescence des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 (vert) montre deux populations distinctes de cellules exprimant la protéine d'intérêt avec une différence d'intensité de fluorescence d'un log entre les deux (Figure 25A). Ces populations apparaissent dès la décongélation des cellules et se maintiennent tout au long de leur culture. Elles pourraient être due à l'impossibilité d'isoler individuellement ces cellules conduisant, après la transfection permettant l'insertion de la construction, à l'obtention de différents clones cellulaires contenant le gène à différents endroits dans le génome ce qui influencerait sur son niveau d'expression.

#### Localisation subcellulaire de la protéine

L'observation des cellules en microscopie confocale a permis la détermination de la répartition spatiale de la protéine GFP-Nox2 dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 (Figure 25B et C). Dans les cellules au repos, la protéine GFP-Nox2 se répartie entre la membrane plasmique et des structures intracellulaires. Lors de la phagocytose de particules de zymosane recouvertes d'opsonines (ZO) et marquées avec de l'Alexa 405, la quasi-totalité des structures cytoplasmiques semblent disparaître. La protéine Nox2 est alors présente à la membrane plasmique et à la membrane du phagosome.



**Figure 26. Taux de phagocytose des cellules.** La cytométrie permet le suivi de la phagocytose de particules de ZO et marquées avec de l’Alexa 405, après trente ou soixante minutes, dans les cellules PLB-985 WT (jaune/orange), PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 (vert) ou PLB-985 Nox2<sup>-/-</sup> (bleu). Dans les cytogrammes (en haut), l’orange pâle et le vert pâle représentent les cellules seules, l’orange foncé et le vert foncé les trente minutes, l’orange vif et le vert vif les soixante minutes. La délimitation sépare les cellules qui n’ont pas phagocyté (gauche) des cellules qui ont phagocyté (droite). Est considéré comme n’ayant pas phagocyté toute cellule dont la fluorescence est inférieure à la fluorescence des particules de ZO A405 seules en présence de BT (en bas à droite). Le pourcentage de phagocytose relatif (par rapport aux cellules PLB-985 WT) est obtenu par cytométrie en flux après l’ajout de BT pour éliminer la fluorescence des particules fixées mais non internalisées. Chaque expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante, sont représentées ici les moyennes  $\pm$  erreur standard moyenne. Le test statistique réalisé est un multiple t test ( $p < 0,0001$ ).

## Fonctionnalité des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2

Après s'être assuré de la correcte expression de la protéine de fusion, il fallait s'assurer que les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 et la protéine Nox2 demeuraient fonctionnelles malgré l'ajout de la protéine GFP. Les équipes précédemment en possession de cette construction ne l'avaient pas formellement démontré et plusieurs constructions impliquant la protéine Nox2 avaient par le passé été réalisées mais elles entraînaient la perte de fonctionnalité de l'enzyme, donc de production de FRO.

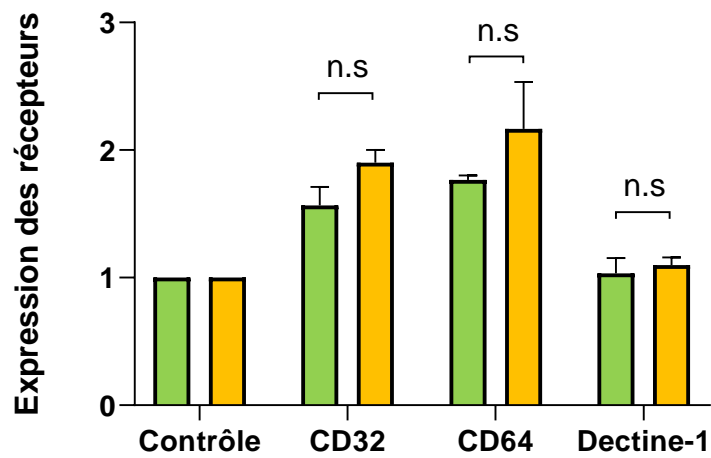
### Etude de la phagocytose des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2

L'étude de la phagocytose se fait grâce à la cytométrie en flux. Elle nécessite l'utilisation de ZO et de bleu de trypan (BT) afin de différencier les particules phagocytées des particules fixées aux cellules<sup>230</sup> (Voir *Quatrième partie, chapitre 3, cytométrie en flux*). L'analyse des résultats de phagocytose des cellules PLB-985 WT montre trois populations différentes de cellules ([Figure 26](#)). Les cellules seules (non fluorescentes), n'ayant ni fixées ni phagocytées de particules de ZO sont symbolisées ici par la courbe pleine ; le second pic correspond aux cellules ayant fixées mais pas phagocytées des particules de ZO (leur conférant une fluorescence similaire à celles des particules de ZO seules en présence de BT) ; la troisième population correspond aux cellules ayant phagocytées (protégeant ainsi les particules de ZO de l'action du BT). Entre trente et soixante minutes de phagocytose, le nombre de cellules ayant internalisées la proie augmente. Le décalage du pic correspondant pourrait indiquer que les cellules internalisent plusieurs particules. Avec les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 en revanche, on ne distingue pas de pic correspondant aux cellules ayant phagocytées (comme pour les cellules PLB-985 Nox2<sup>-/-</sup>). De fait les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 phagocytent significativement moins de particules de ZO marquées avec de l'Alexa 405 que les cellules PLB-985 WT.

Expression des récepteurs suffisant pour induire la phagocytose à la surface des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2

Si la différence de phagocytose entre des neutrophiles de personnes saines et de patients atteint de granulomatose septique chronique est connue<sup>231</sup>, expliquer la diminution du taux de phagocytose dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 par rapport aux cellules PLB-985 WT tient de la conjecture. En effet la réexpression de la protéine Nox2 aurait dû restaurer un





**Figure 27. Expression des récepteurs suffisant pour induire la phagocytose.** Les récepteurs de surface suffisant pour induire la phagocytose ont été analysés. Les cellules PLB-985 WT (jaune) ou PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 (vert) sont préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1  $\mu\text{g/ml}$  d'interféron gamma. La fixation d'anticorps dirigés contre : une protéine contrôle (exprimée par les virus de plante), CD32, CD64 ou dectine-1 est évaluée par cytométrie en flux. Chaque expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante, sont représentées ici les moyennes  $\pm$  erreur standard moyenne. Le test statistique réalisé est un multiple t test.

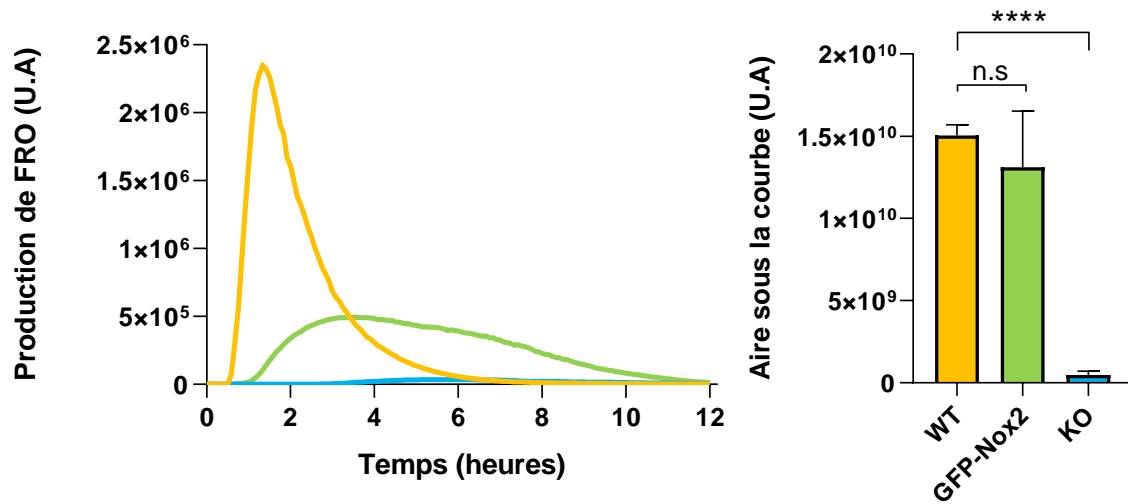
taux de phagocytose proche de celui des cellules PLB-985 WT. L'origine de ces cellules ainsi que les diverses modifications génétiques dont elles sont issues (recombinaison homologue pour éliminer la protéine Nox2 endogène, transfection pour introduire la séquence codant pour la protéine GFP-Nox2) ont pu altérer l'expression de gènes directement impliqués dans la phagocytose conduisant à ce phénotype.

Afin de tester cette hypothèse, l'expression à la surface des cellules de récepteurs suffisants pour induire la phagocytose a été quantifiée. Afin de mesurer l'expression des FcγRI à la surface des cellules, de l'interféron gamma a été ajouté pendant vingt-quatre heures aux cellules. L'étude conduite en cytométrie pour évaluer l'expression de FcγRI, FcγRII et dectine-1 n'a cependant indiquée aucune différence d'expression de ces récepteurs à la surface des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 par rapport aux cellules PLB-985 WT (Figure 27). Les récepteurs du complément et les FcγRIII n'ont pas été testés (car ils ne sont pas connus comme étant suffisant pour induire la phagocytose) ne permettant pas d'exclure qu'une diminution de leur expression est à l'origine de ce taux plus faible de phagocytose dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 par rapport aux cellules PLB-985 WT. Autre éventualité, la production de FRO dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 est inférieure à celle dans les cellules PLB-985 WT, malgré la réexpression de la protéine Nox2, mimant le phénotype observé avec les neutrophiles de patients atteints de granulomatose septique chronique.

#### Etude de la production de FRO avec les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2

La réalisation d'une construction permettant d'attacher une protéine fluorescente à la sous-unité Nox2 tout en maintenant son activité catalytique a représenté une véritable gageure. Dans leurs travaux d'Ambasta *et al.*<sup>220</sup> perdent l'activité catalytique de la NADPH oxydase en fixant une protéine fluorescente en C-terminal de la protéine Nox2. Si Murillo *et al.*<sup>221</sup> puis van Manen *et al.*<sup>222</sup> ont réalisé puis perfectionné la construction dont on dispose ils n'avaient pas formellement prouvé qu'elle permettait la production de FRO.

La cinétique de la production de FRO est mesurée par luminométrie en présence de L-012 (analogue du luminol) et de l'enzyme *Horse Radish Peroxidase*. Dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 la production de FRO est plus lente, avec un maximum d'intensité beaucoup plus faible par rapport aux cellules PLB-985 WT. Ces dernières atteignent le maximum de



**Figure 28. Evaluation de la production de FRO par les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2.** L'activité de la NADPH oxydase a été mesurée par chimiluminescence grâce au L-012 pendant douze heures dans les cellules PLB-985 WT (jaune), PLB-985 Nox2<sup>-/-</sup> (bleu) ou dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 (vert). Est représenté ici, la cinétique de production des FRO au cours du temps (à gauche) ainsi que l'aire sous la courbe correspondante à douze heures de production de FRO (droite). Ces résultats correspondent à trois expériences indépendantes, sont représentées ici les moyennes  $\pm$  erreur standard moyenne. Le test statistique réalisé est un *unpaired t test* (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

leur production de FRO deux heures après la stimulation par le PMA avant une diminution progressive de la production et son arrêt au bout de six heures ; tandis que les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 atteignent leur maximum environ deux heures et demie après l'ajout de PMA mais leur production se poursuit douze heures durant. Cela compense la différence d'intensité de production puisqu'à leur maximum les cellules PLB-985 WT produisent pratiquement cinq fois plus de FRO que les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 (Figure 28). Cette différence de cinétique ne se traduit cependant pas par une différence dans la production totale de FRO entre les deux types cellulaires. Une possibilité pour expliquer la différence de cinétique observée est que la séquence de liaison entre les deux protéines influence la production de FRO<sup>232</sup>. Une séquence trop courte doit induire une diminution de la stabilité du complexe sous sa forme active, donc une diminution du nombre de complexes actifs à un instant donné retardant de ce fait la production de FRO.

En conclusion les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 expriment la protéine GFP-Nox2 correctement. La présence de cette construction se traduit par une diminution du taux de phagocytose et une modification de la cinétique de la production de FRO par rapport aux cellules PLB-985 WT. La diminution du taux de phagocytose pourrait s'expliquer par une diminution de la production de FRO aux temps étudiés (trente et soixante minutes) puisque les FRO jouent un rôle dans la phagocytose<sup>233,234</sup>. Comme semble le montrer la figure 25C la protéine Nox2 est incluse dans des compartiments cytoplasmiques mobilisables lors de la phagocytose. La nature de ces structures est le prochain point abordé.

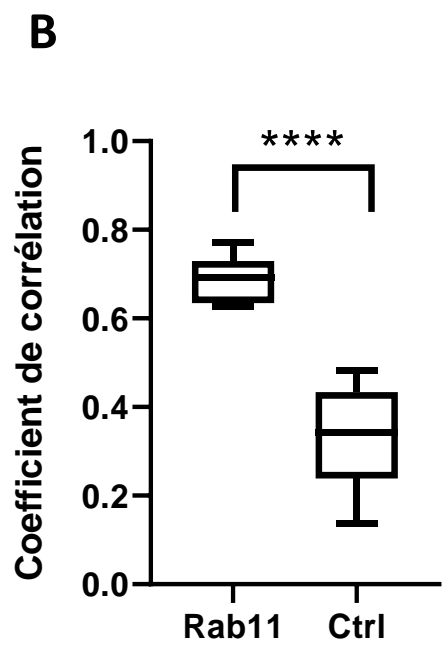
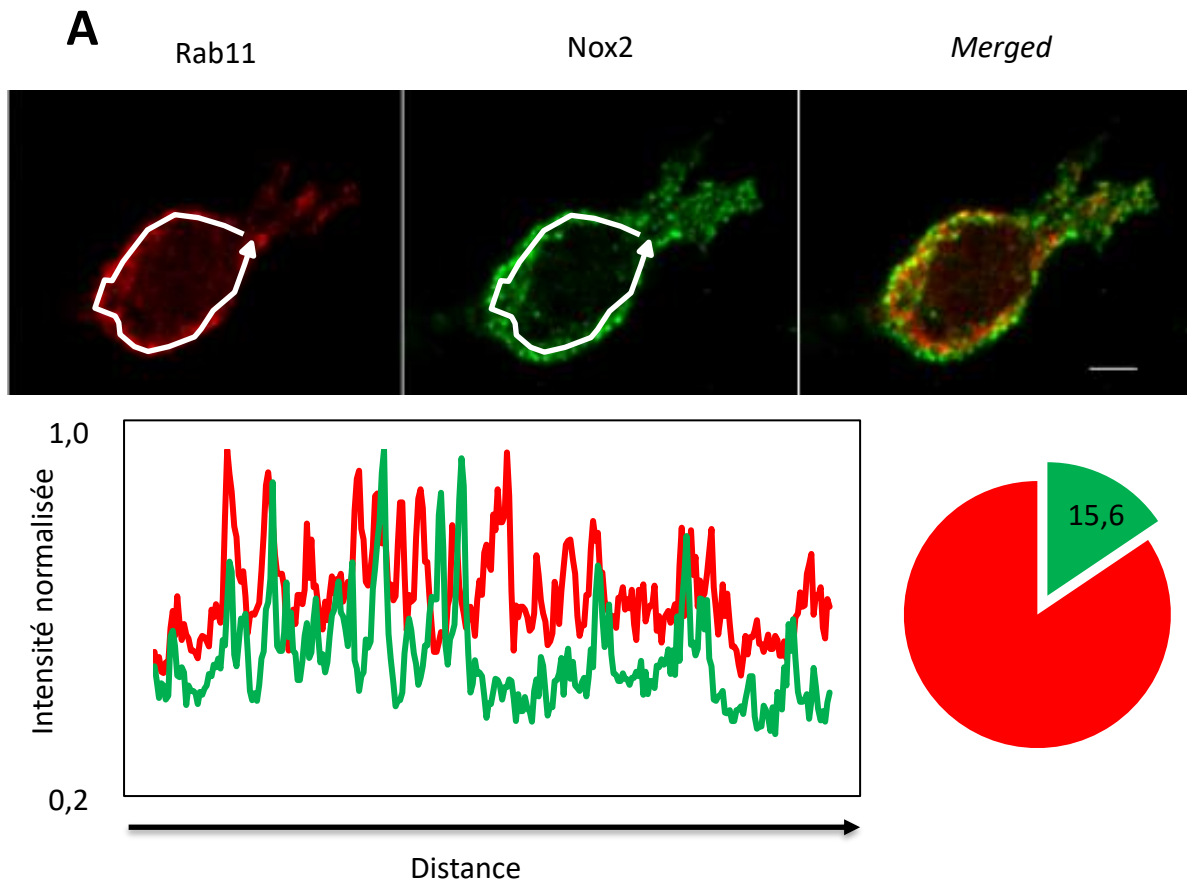


## 2.

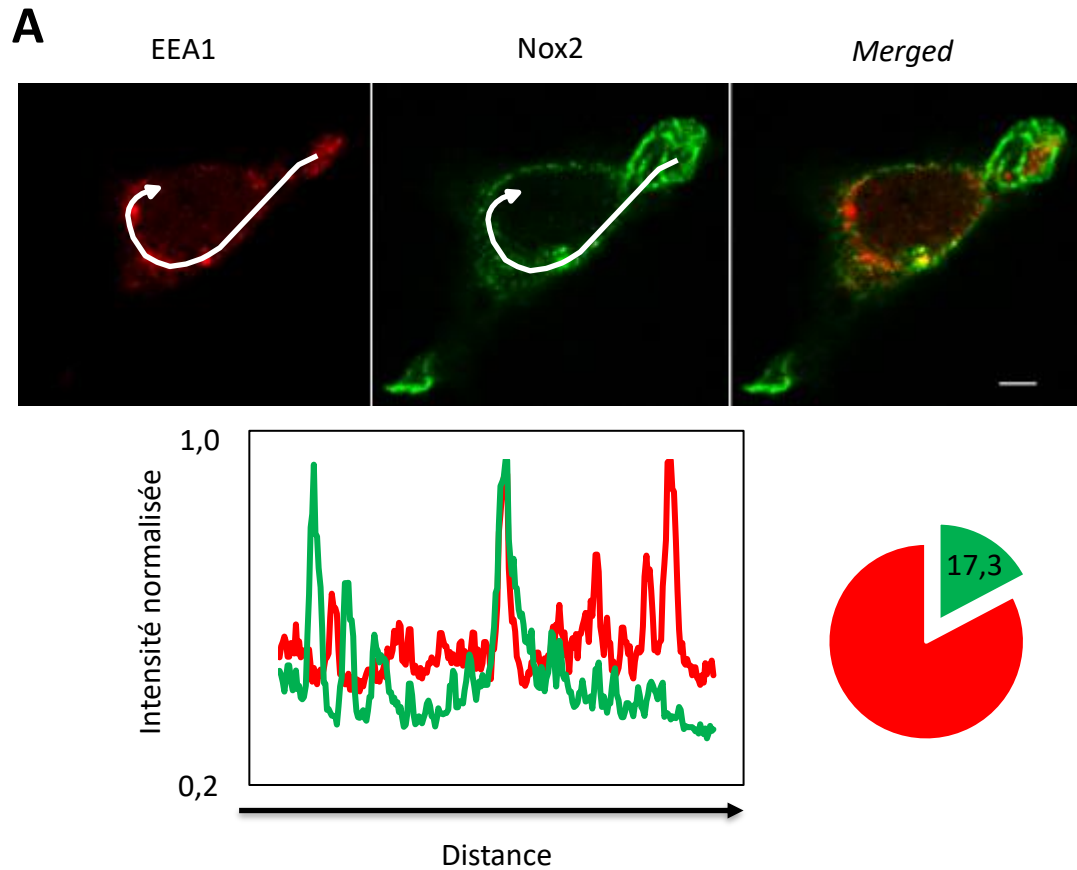
### **Les compartiments cytoplasmiques contenant Nox2 : nature et implication dans la phagocytose**

Une fois la fonctionnalité des cellules testée, il a fallu déterminer la nature des structures intracellulaires contenant la protéine Nox2 et qui semblent mobilisées durant la phagocytose. La supposition a été faite que ces structures correspondaient aux endosomes. Plusieurs éléments ont amené à établir cette hypothèse. Bien qu'elle ait été peu étudiée dans les neutrophiles, l'implication des voies endosomales dans l'apport de la protéine Nox2 au phagosome est connue dans les autres phagocytes<sup>235,223</sup>. De plus certaines molécules permettant le *priming* des neutrophiles (endotoxine<sup>236</sup>, PAF<sup>237</sup>) ont mis en évidence un lien entre la protéine Nox2 et les endosomes au sein des neutrophiles justifiant notre assertion.

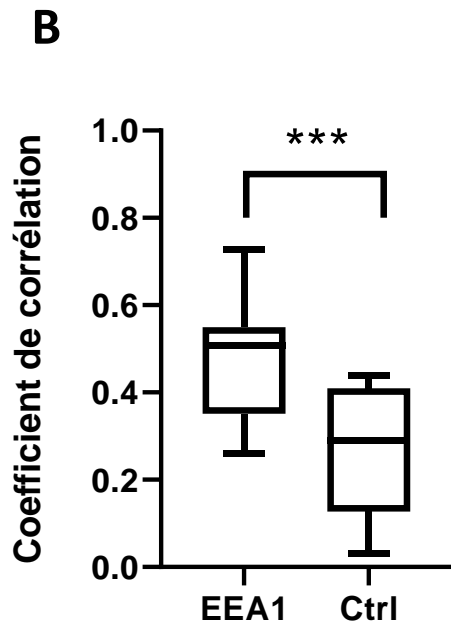
Puisque les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 phagocytent moins bien que les cellules PLB-985 WT, avant toute expérience, afin d'améliorer l'efficacité de la phagocytose, les cellules ont subi un *priming* avec de l'interféron gamma. Son effet d'activateur des neutrophiles est connu<sup>238,38</sup> et il se retrouve aussi avec les PLB-985. Il y modifie l'expression de nombreux gènes impliqués dans divers processus cellulaires tel que les fonctions « classiques » (phagocytose, chimiotactisme, production de FRO, expression des récepteurs de l'immunité innée), la présentation antigénique ou l'expression de protéines participant à l'homéostasie des neutrophiles<sup>239</sup>. Il provoque notamment une augmentation de la production de FcγR et particulièrement du FcγRI qui a une haute affinité pour les IgG1 ; ainsi qu'une augmentation de la synthèse de la protéine Nox2<sup>240</sup> qui dans son promoteur, a un élément de réponse à l'interféron gamma. Dans notre contexte, ce second point doit être tempéré par le fait que dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2, la protéine Nox2 n'est pas sous le contrôle de son promoteur endogène et qu'il n'y aura donc pas d'effet de l'interféron sur sa production dans ces cellules.



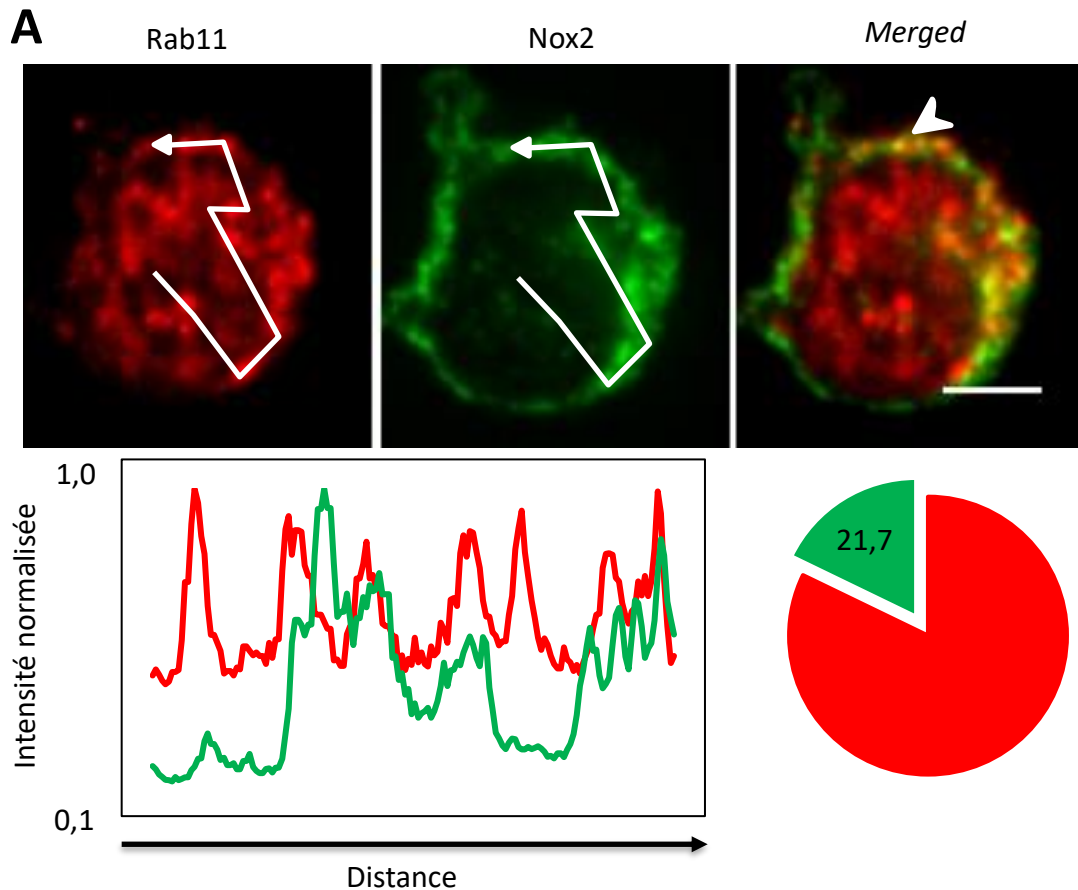
**Figure 29. Présence de Nox2 dans les endosomes Rab11<sup>+</sup> des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 non stimulées.** Immunofluorescence de cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1 µg/ml d'interféron gamma et visualisée en microscopie confocale *spinning-disk* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z) 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou Rab11. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images d'un seul plan d'une pile de quarante-et-une images. En blanc est représenté le profil d'intensité. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines Rab11 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants de Rab11. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (A-3) En utilisant le « plug-in » d'Image J JACoP *object based method*, le pourcentage d'endosomes positifs pour les protéines Rab11 et Nox2 a été dénombré (diagramme circulaire, portion verte) dans cinquante cellules (trois jours différents). (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson (CCP) entre endosomes Rab11 positifs / protéine Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de dix cellules issues de deux expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un *paired t test* ( $p < 0,0001$ ).



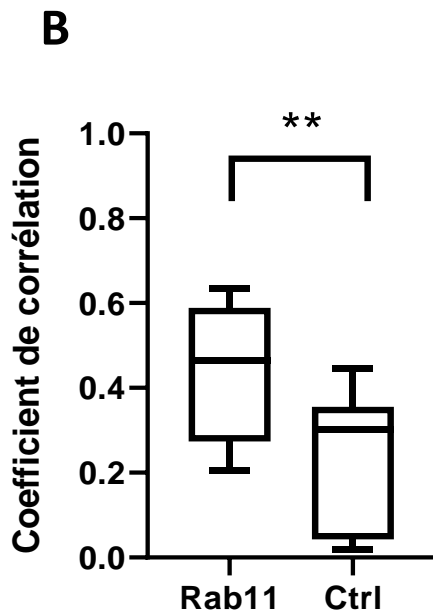
**Figure 30.** Présence de Nox2 dans les endosomes EEA1<sup>+</sup> des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 non stimulées. Immunofluorescence de cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1 µg/ml d'interféron gamma et visualisée en microscopie confocale *spinning-disk* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou EEA1. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images d'un seul plan d'une pile de quarante-et-une images. En blanc est représenté le profil d'intensité. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines EEA1 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants de EEA1. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (A-3) En utilisant le « plug-in » d'Image J JACoP *object based method*, le pourcentage d'endosomes positifs pour les protéines EEA1 et Nox2 a été dénombré (diagramme circulaire, portion verte) dans quatre-vingt-quinze cellules (trois jours différents). (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre endosomes EEA1 positifs / protéine Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de huit cellules issues de deux expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un *paired t test* ( $p=0,0002$ ).

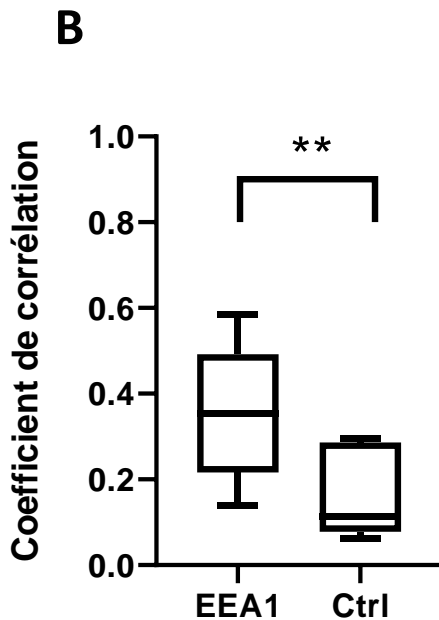
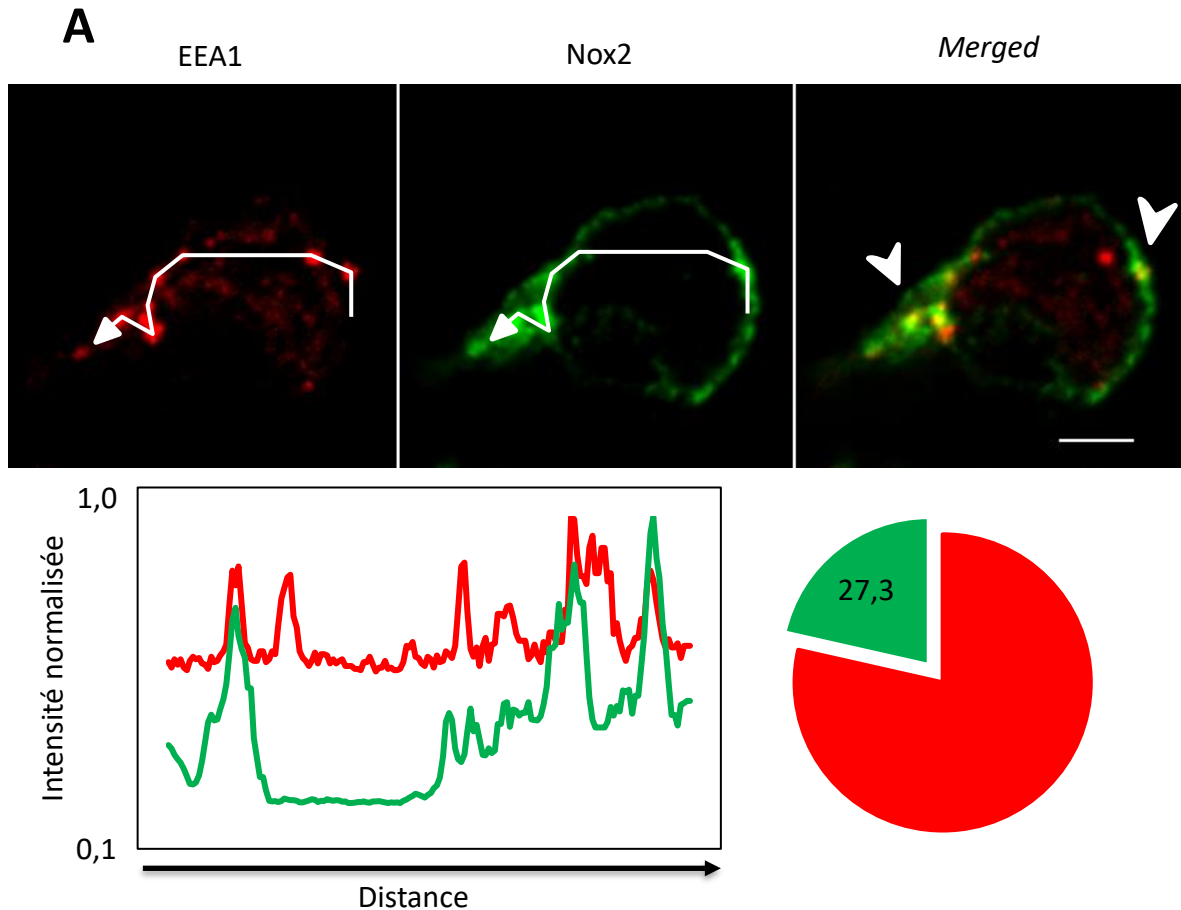




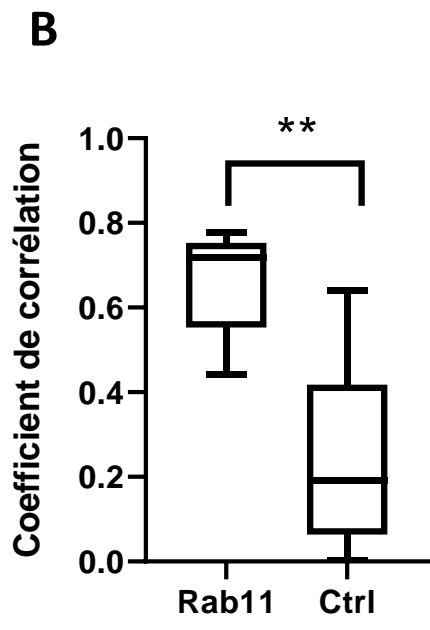
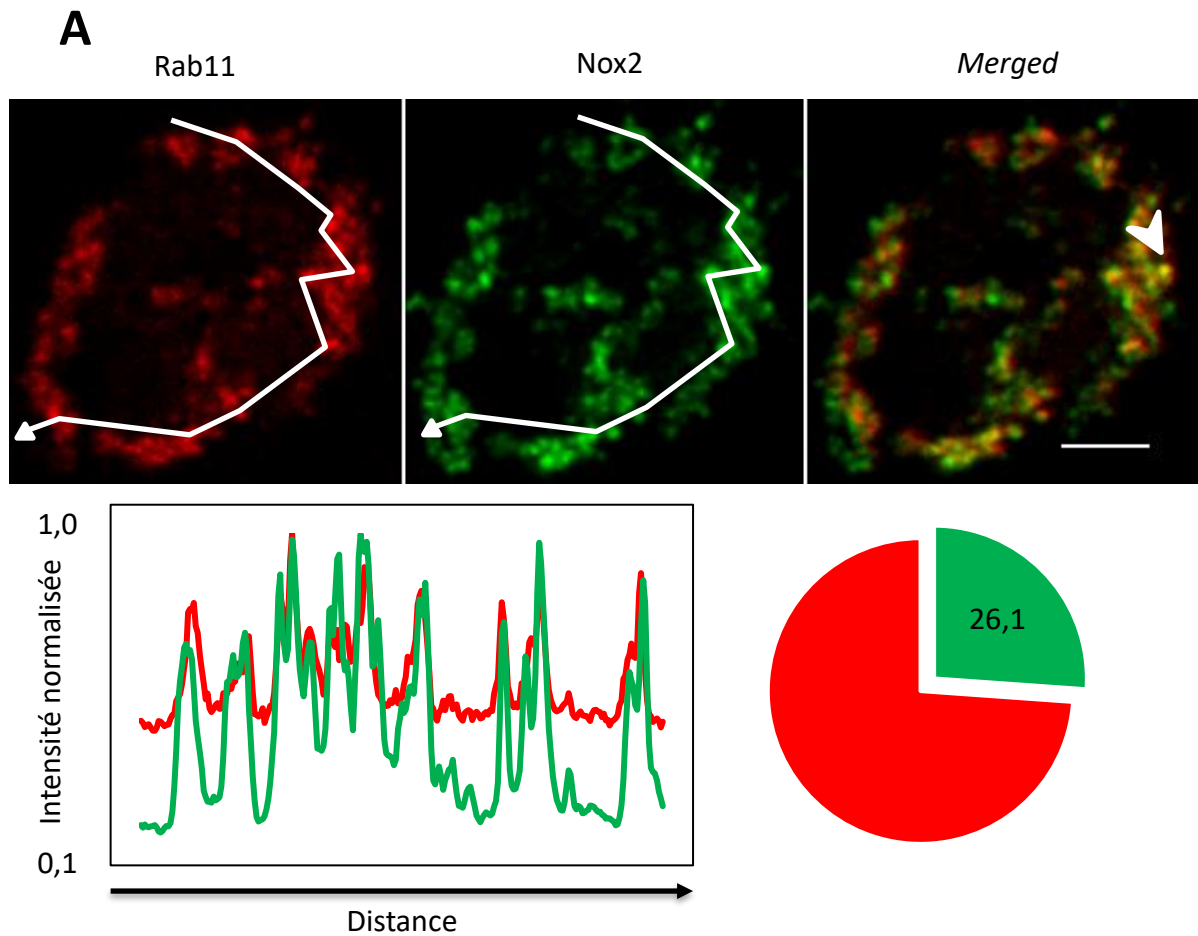


**Figure 31.** Présence de Nox2 dans les endosomes Rab11<sup>+</sup> des cellules PLB-985 WT non stimulées. Immunofluorescence de cellules PLB-985 WT préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1 µg/ml d'interféron gamma et visualisée en microscopie confocale *spinning-disk* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou Rab11. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images d'un seul plan d'une pile de quinze images. En blanc est représenté le profil d'intensité. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines Rab11 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants de Rab11. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (A-3) En utilisant le « plug-in » d'Image J JACoP *object based method*, le pourcentage d'endosomes positifs pour les protéines Rab11 et Nox2 a été dénombré (diagramme circulaire, portion verte) dans soixante-sept cellules (deux jours différents). (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre endosomes Rab11 positifs / protéine Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de huit cellules issues de trois expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon ( $p=0,0078$ ).

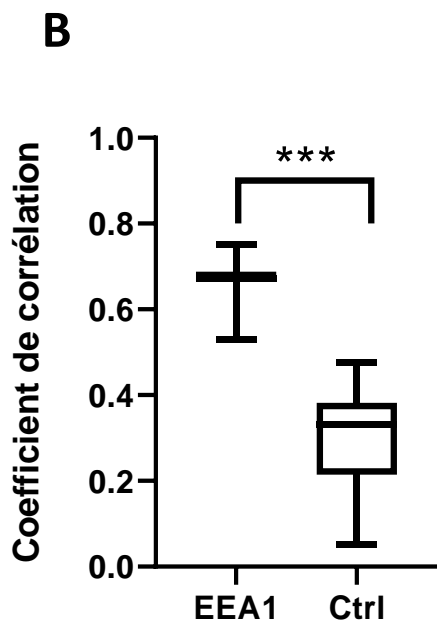
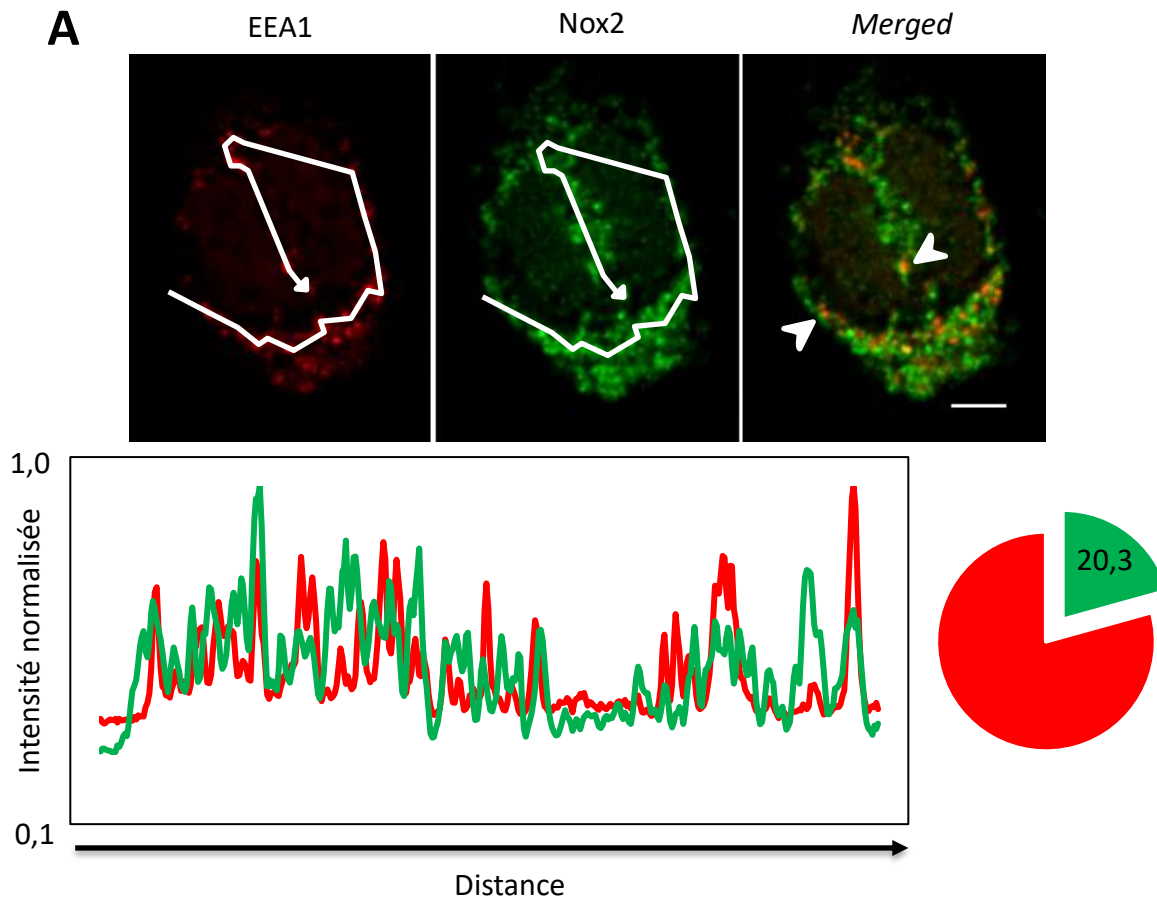




**Figure 32.** Présence de Nox2 dans les endosomes EEA1<sup>+</sup> des cellules PLB-985 WT non stimulées. Immunofluorescence de cellules PLB-985 WT préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1 µg/ml d'interféron gamma et visualisée en microscopie confocale *spinning-disk* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou EEA1. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images d'un seul plan d'une pile de quinze images. En blanc est représenté le profil d'intensité. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines EEA1 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants de EEA1. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (A-3) En utilisant le « plug-in » d'Image J JACoP *object based method*, le pourcentage d'endosomes positifs pour les protéines Rab11 et Nox2 a été dénombré (diagramme circulaire, portion verte) dans soixante-trois cellules (trois jours différents). (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre endosomes Rab11 positifs / protéine Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de huit cellules issues de trois expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon ( $p=0,0078$ ).



**Figure 33. Présence de Nox2 dans les endosomes Rab11<sup>+</sup> des neutrophiles humains non stimulés.** Immunofluorescence de neutrophiles humains visualisés en microscopie confocale *spinning-disk* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou Rab11. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images d'un seul plan d'une pile de dix-neuf images. En blanc est représenté le profil d'intensité. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines Rab11 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants de Rab11. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (A-3) En utilisant le « plug-in » d'Image J JACoP *object based method*, le pourcentage d'endosomes positifs pour les protéines Rab11 et Nox2 a été dénombré (diagramme circulaire, portion verte) dans quatre-vingt-huit cellules (trois jours différents). (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre endosomes Rab11 positifs / protéine Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de huit cellules issues de trois expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon ( $p=0,0078$ ).



**Figure 34.** Présence de Nox2 dans les endosomes EEA1<sup>+</sup> des neutrophiles humains non stimulés. Immunofluorescence de neutrophiles humains visualisés en microscopie confocale *spinning-disk* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou EEA1. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images d'un seul plan d'une pile de dix-neuf images. En blanc est représenté le profil d'intensité. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines EEA1 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants de EEA1. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (A-3) En utilisant le « plug-in » d'Image J JACoP *object based method*, le pourcentage d'endosomes positifs pour les protéines Rab11 et Nox2 a été dénombré (diagramme circulaire, portion verte) dans cent cinquante-et-une cellules (trois jours différents). (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre endosomes Rab11 positifs / protéine Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de douze cellules issues de trois expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon ( $p=0,0005$ ).



## Colocalisation des endosomes EEA1 et Rab11 positifs avec la protéine Nox2

### Etude dans les cellules non stimulées

L'endocytose participe au contrôle de la composition de la membrane ainsi qu'au renouvellement de ses composants en les internalisant, puis en les recyclant ou en les dégradant. Les endosomes précoces deviennent des endosomes de recyclage (qui sont ensuite réadressés à la membrane) ou des endosomes tardifs qui en continuant leur processus de maturation fusionnent avec les lysosomes. Parmi les marqueurs des endosomes précoces, se trouve l'*Early Endosome Antigen 1* (EEA1) qui lie le PtdIns(3)P des membranes permettant l'attachement des endosomes à d'autres compartiments cellulaires avant leur fusion grâce aux complexes de protéines *SNAP Receptor*. Les endosomes de recyclage eux, sont notamment associés à *Ras-related in brain 11* (Rab11).

L'étude de ces deux marqueurs dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 non stimulées montre une présence des endosomes Rab11 à proximité de la membrane plasmique ce qui correspond à la biologie de ces endosomes qui restent généralement proche du plasmalemme<sup>241</sup> (Figure 29). Le calcul du coefficient de corrélation de Pearson (CCP) moyen entre les canaux montrant les protéines Nox2 et Rab11 vaut 0,69 ce qui est significativement différent du CCP moyen du contrôle négatif (rotation de 180° de l'image montrant la protéine Nox2 puis calcul du coefficient de Pearson) qui vaut 0,34 indiquant une corrélation (partielle) entre les deux protéines. Un profil d'intensité tracé pour relier les principaux endosomes de la cellule (pixels les plus brillants) montre que certains pics d'intensité correspondant à la protéine Rab11 se situent au même endroit que des pics correspondant à la protéine Nox2 ce qui signifie que ces deux protéines sont partiellement colocalisées. La détermination du pourcentage d'endosome positifs pour les protéines Rab11 et Nox2 atteint 15,6% dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 confirmant le caractère partiel de cette colocalisation. Concernant les endosomes positifs pour EEA1, le CCP moyen est d'une valeur de 0,48 ce qui représente une différence significative par rapport au contrôle négatif correspondant (0,26). Le profil de fluorescence indique nettement une colocalisation partielle entre les protéines Nox2 et EEA1. Là encore cette observation est renforcée par le taux d'endosomes précoces contenant Nox2 (17,3%) (Figure 30).

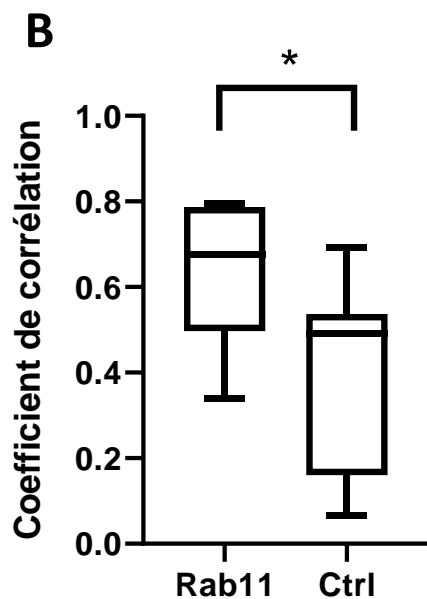
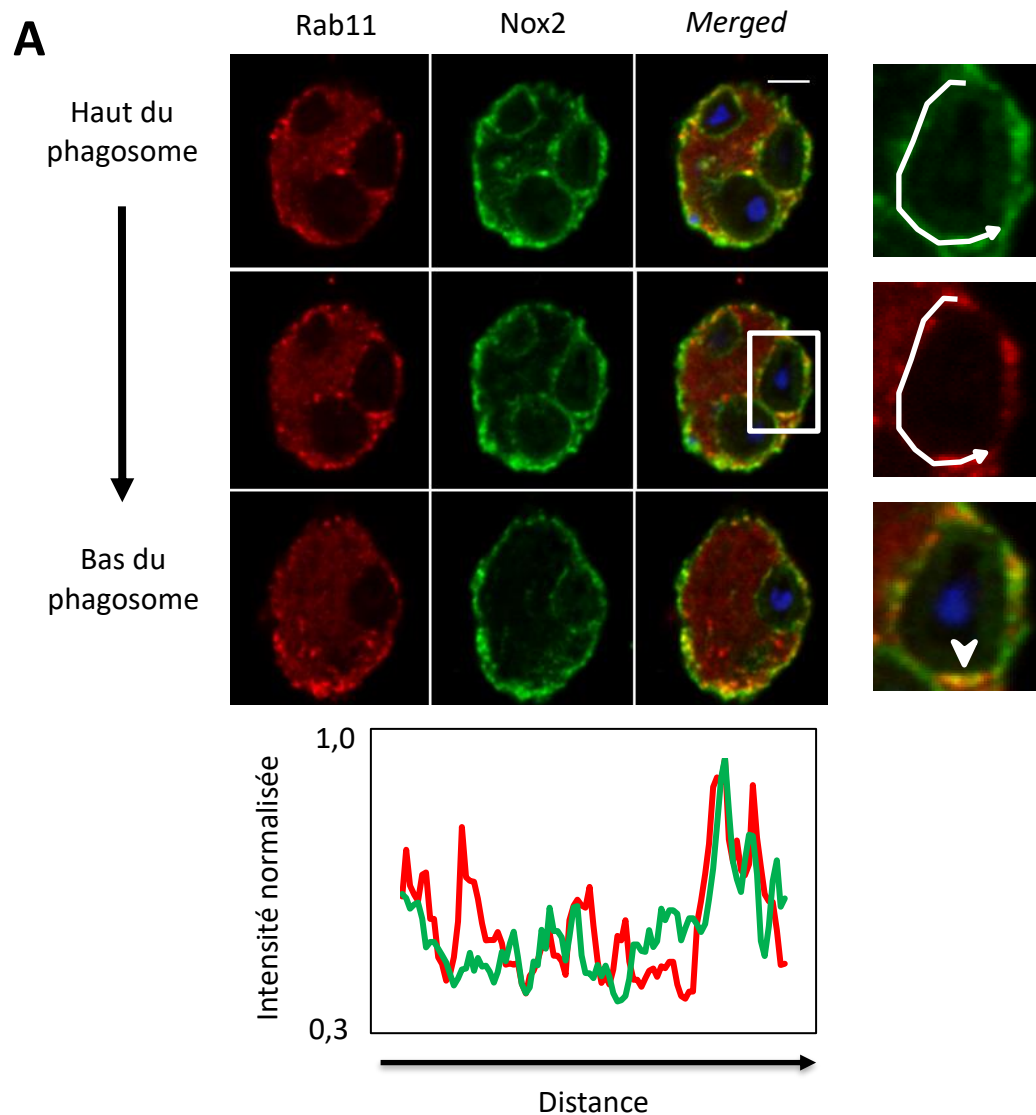


Afin de s'assurer que ce phénomène de colocalisation entre la protéine Nox2 et les voies endosomales précoce et de recyclage n'est pas artificiel, les expériences ont été répétées dans les PLB-985 WT (pour s'assurer que ce n'est pas la GFP qui entraîne un adressage de Nox2 aux endosomes) et dans les neutrophiles humains. Les résultats dans les cellules PLB-985 WT sont similaires à ceux obtenus avec les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 (Figure 31 et Figure 32).

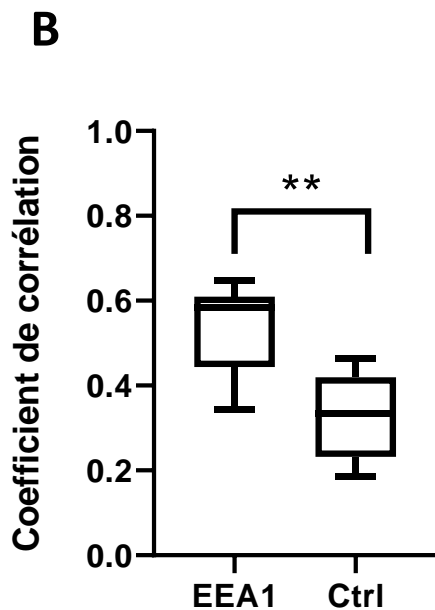
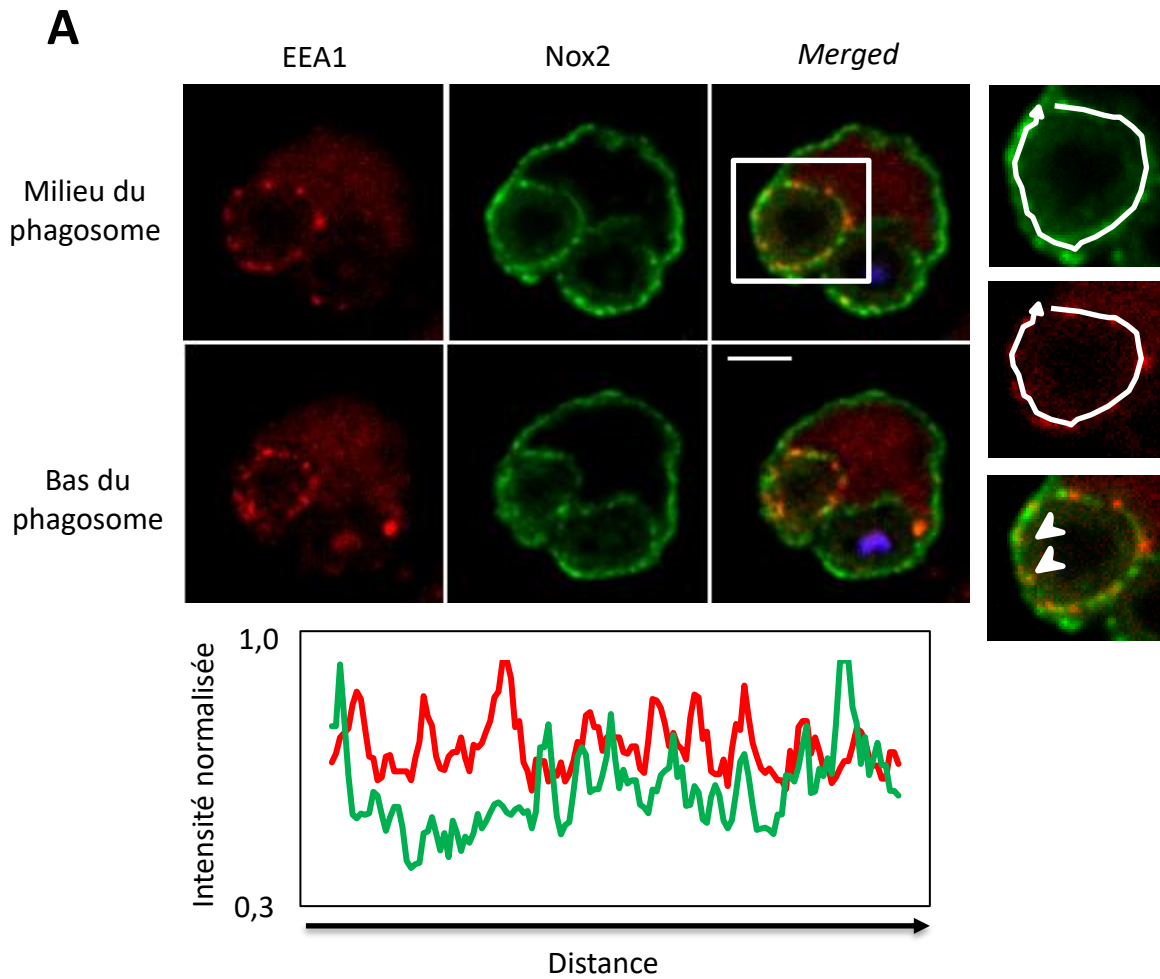
La présence de la protéine Nox2 est corrélée à celle des endosomes précoces et de recyclage, le CCP moyen obtenu avec les deux types d'endosomes (0,45 pour les endosomes positifs pour Rab11 et 0,35 pour les endosomes positifs pour EEA1) étant significativement supérieur à la moyenne des CCP obtenus avec les contrôles négatifs (0,23 et 0,16). Lorsqu'un profil d'intensité est réalisé les endosomes et la protéine Nox2 colocalisent partiellement et ce résultat est là encore conforté par le taux d'endosomes Rab11 et EEA1 positifs contenant Nox2 (respectivement 21,7% et 27,3%). Cela confirme que ce n'est pas la protéine GFP qui entraîne un adressage de la protéine GFP-Nox2 aux endosomes dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2.

Dans les neutrophiles humains, la protéine Rab11 est aussi associée aux granules à gélatinase<sup>174</sup> ce qui fausse probablement les résultats de la colocalisation entre la protéine Nox2 et les endosomes. Les résultats sont aussi similaires à ceux obtenus avec les cellules PLB-985 WT (Figure 33 et Figure 34). La moyenne des CCP vaut 0,67 (EEA1) et 0,65 (Rab11) ce qui est significativement supérieur à la moyenne des CCP contrôle qui eux valent 0,30 (EEA1) et 0,23 (Rab11). Les profils d'intensités indiquent que la protéine Nox2 colocalise avec les endosomes EEA1 et Rab11 positifs. Plus d'un quart (26,1%) des endosomes Rab11 et 20,7% des endosomes EEA1 contiennent la protéine Nox2. Ces résultats confirment le lien entre endosome et Nox2 dans les neutrophiles dont il a déjà été fait mention précédemment<sup>236,237</sup>.

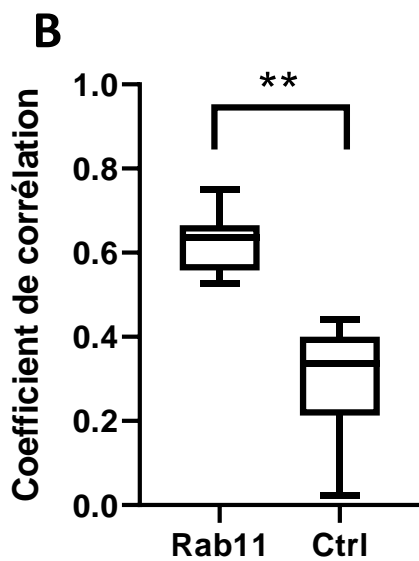
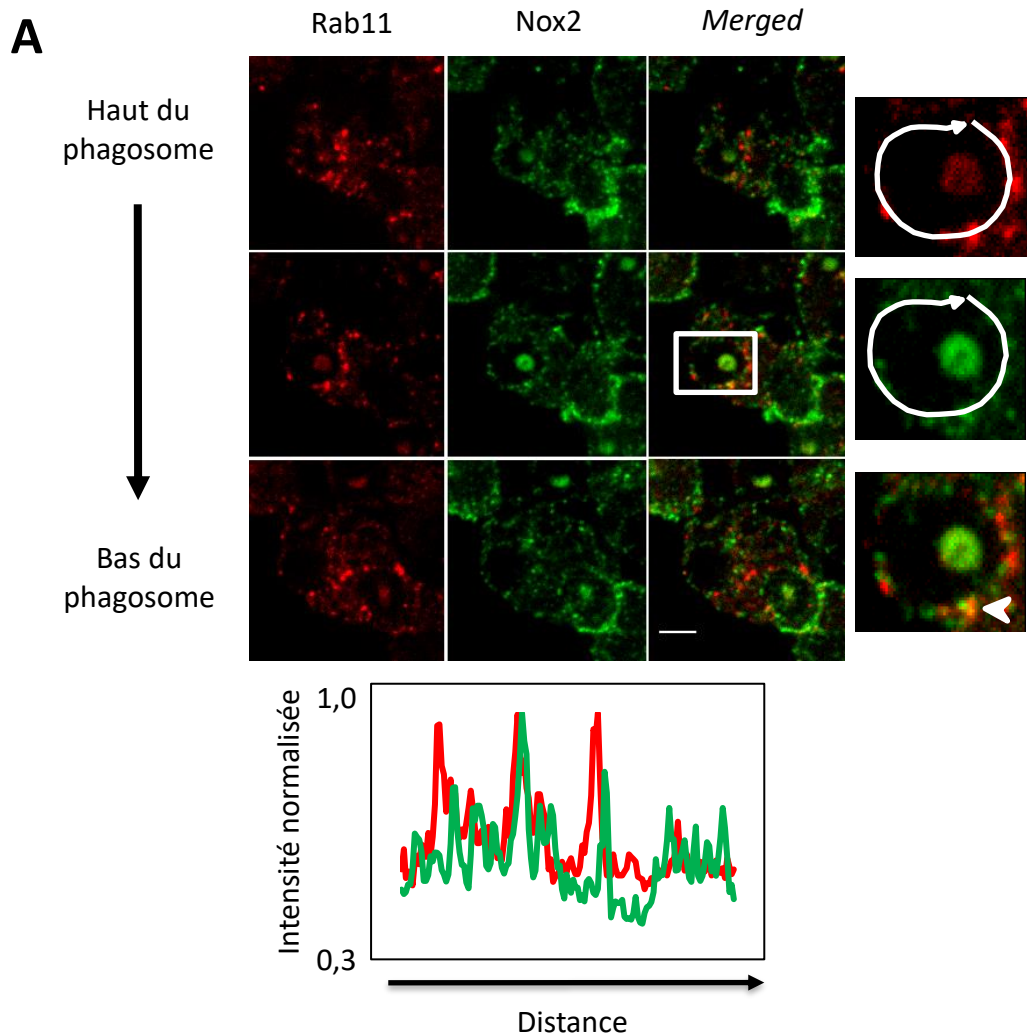




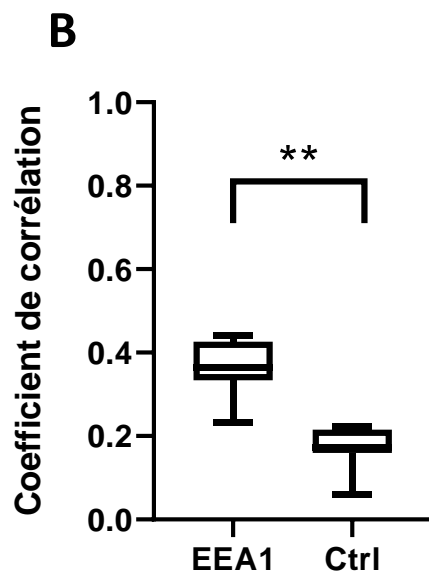
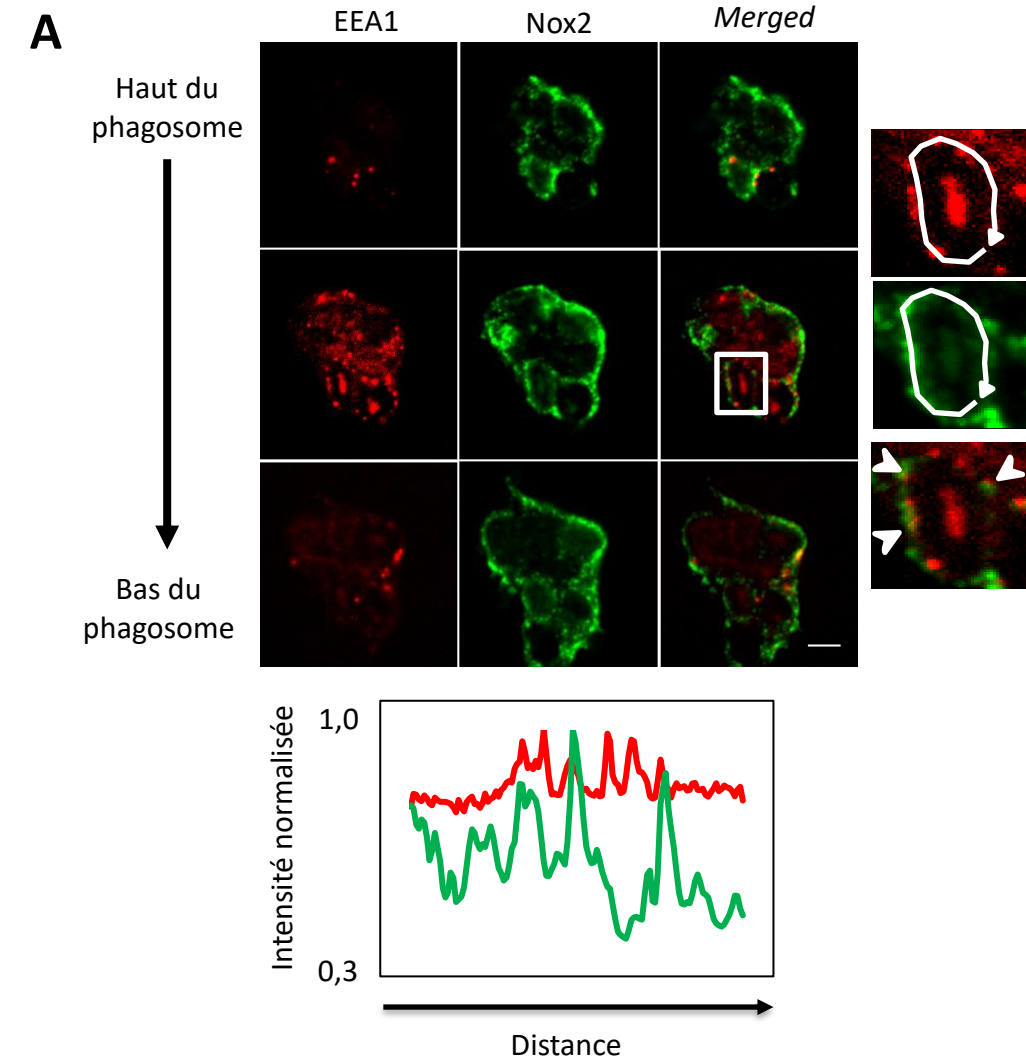
**Figure 35. Présence des endosomes Rab11 positif à proximité des phagosomes dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2.** Immunofluorescence de cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1  $\mu\text{g/ml}$  d'interféron gamma et visualisée en microscopie confocale *spinning-disk* après dix minutes de phagocytose synchronisée de particules de ZO marquées avec du *Texas Red* (100x). Épaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou Rab11. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images de trois plans d'une pile de vingt-et-une images. L'encadré correspond à la zone agrandie à droite. En blanc est représenté le profil d'intensité. La flèche indique les régions où les profils d'intensité des protéines correspondent. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines Rab11 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants de Rab11. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre endosomes Rab11 positifs / protéine Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de huit cellules issues de trois expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon ( $p=0,015$ ).



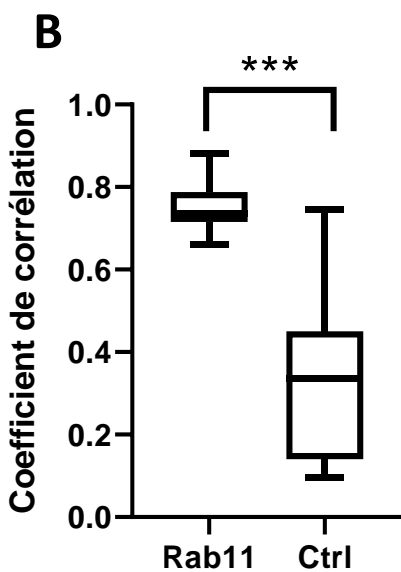
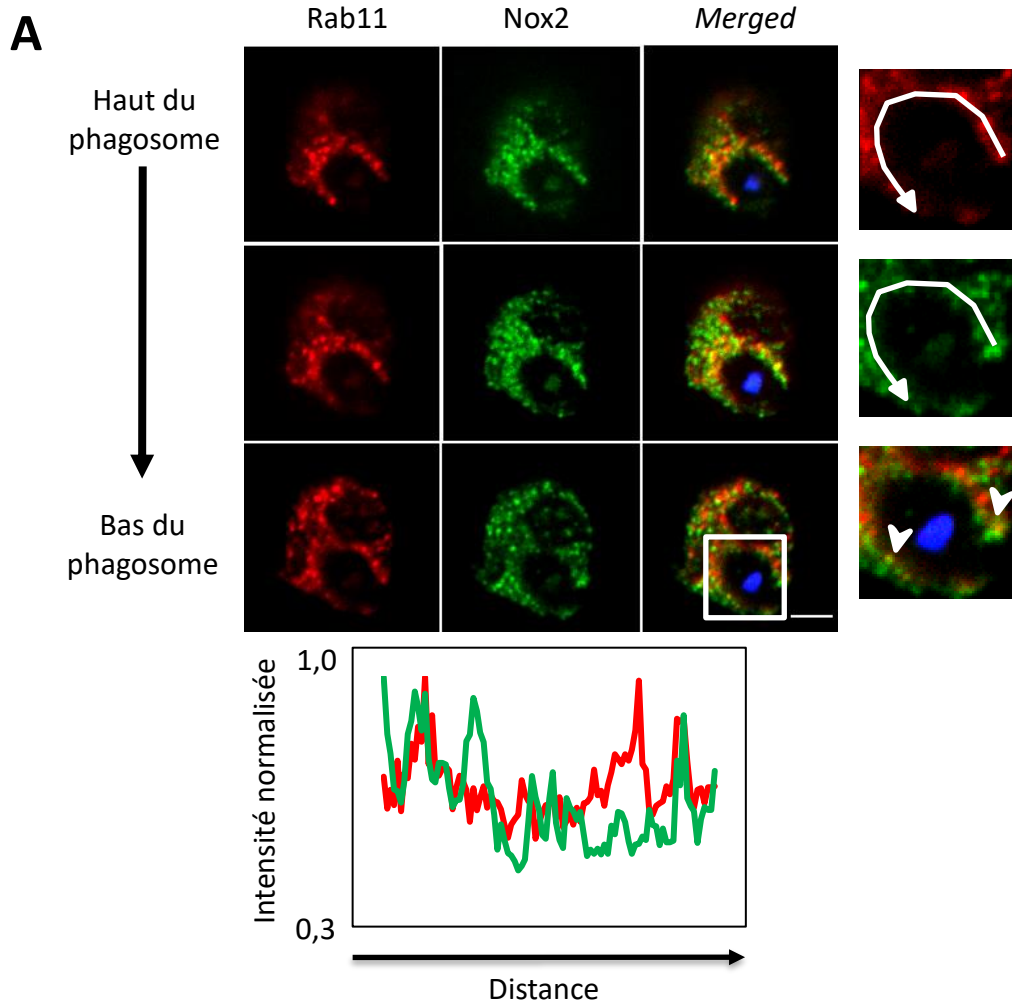
**Figure 36. Présence des endosomes EEA1 positifs à proximité des phagosomes dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2.** Immunofluorescence de cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1  $\mu\text{g/ml}$  d'interféron gamma et visualisée en microscopie confocale *spinning-disk* après dix minutes de phagocytose synchronisée de particules de ZO marquées avec du *Texas Red* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou Rab11. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images de deux plans d'une pile de vingt-et-une images. L'encadré correspond à la zone agrandie à droite. En blanc est représenté le profil d'intensité. La flèche indique les régions où les profils d'intensité des protéines correspondent. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines Rab11 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants de Rab11. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre endosomes EEA1 positifs / protéine NOX2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de huit cellules issues de trois expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon ( $p=0,0078$ ).



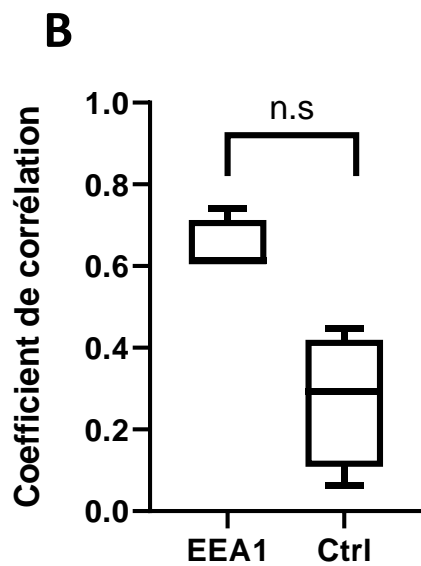
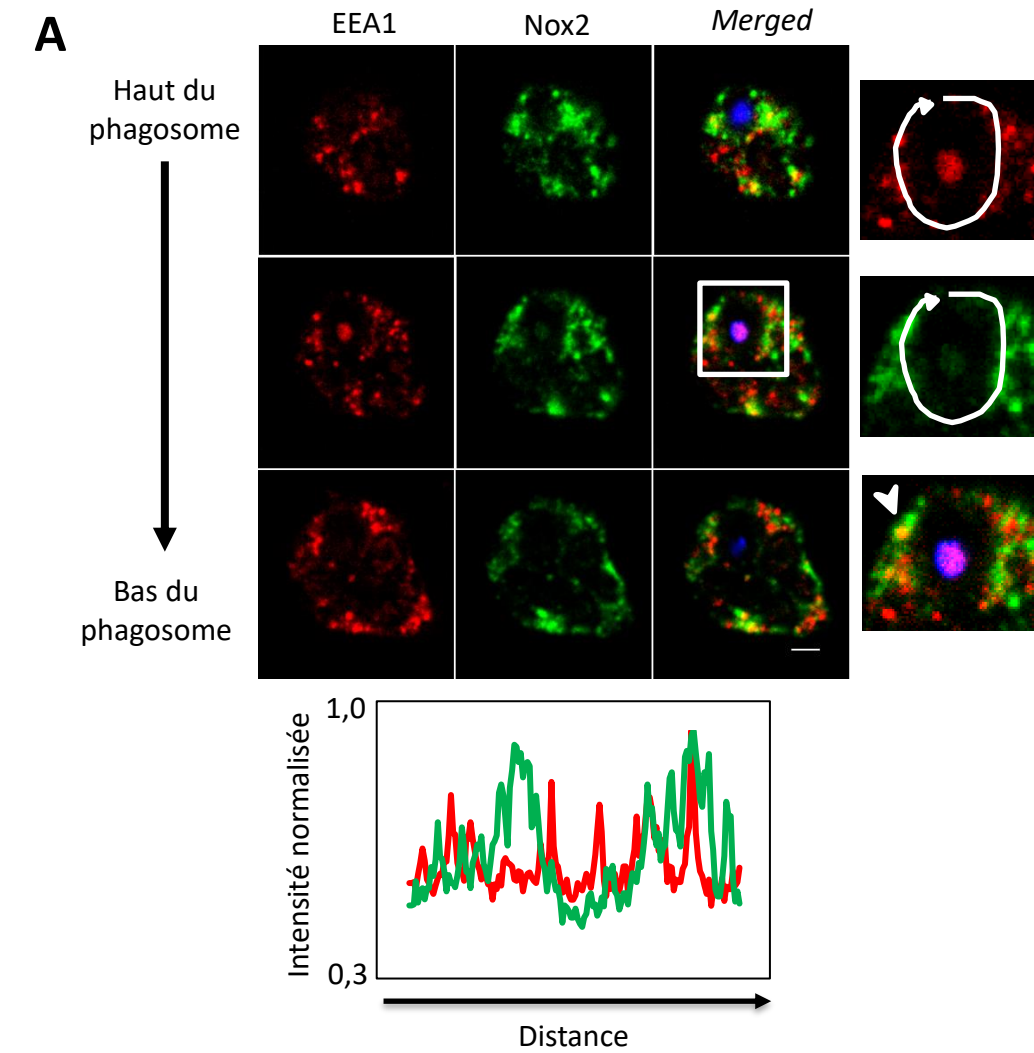
**Figure 37. Présence des endosomes Rab11 positifs à proximité des phagosomes dans les cellules PLB-985 WT.** Immunofluorescence de cellules PLB-985 WT préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1  $\mu\text{g/ml}$  d'interféron gamma et visualisée en microscopie confocale *spinning-disk* après dix minutes de phagocytose synchronisée de particules de ZO marquées avec du *Texas Red* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou Rab11. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images de trois plans d'une pile de vingt-et-une images. L'encadré correspond à la zone agrandie à droite. En blanc est représenté le profil d'intensité. La flèche indique les régions où les profils d'intensité des protéines correspondent. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines Rab11 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants de Rab11. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre endosomes Rab11 positifs / protéine Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de neuf cellules issues de deux expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon ( $p=0,0039$ ).



**Figure 38.** Présence des endosomes EEA1 positifs à proximité des phagosomes dans les cellules PLB-985 WT. Immunofluorescence de cellules PLB-985 WT préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1  $\mu\text{g/ml}$  d'interféron gamma et visualisée en microscopie confocale *spinning-disk* après dix minutes de phagocytose synchronisée de particules de ZO marquées avec du *Texas Red* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou EEA1. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images de trois plans d'une pile de vingt-et-une images. L'encadré correspond à la zone agrandie à droite. En blanc est représenté le profil d'intensité. La flèche indique les régions où les profils d'intensité des protéines correspondent. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines EEA1 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants de EEA1. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre endosomes EEA1 positifs / protéine Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de huit cellules issues de trois expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon ( $p=0,0078$ ).



**Figure 39. Présence des endosomes positifs pour les protéines Rab11 et Nox2 à proximité des phagosomes dans les neutrophiles humains.** Immunofluorescence de neutrophiles humains visualisés en microscopie confocale *spinning-disk* après dix minutes de phagocytose synchronisée de particules de ZO marquées avec du *Texas Red* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou Rab11. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images de trois plans d'une pile de dix-neuf images. L'encadré correspond à la zone agrandie à droite. En blanc est représenté le profil d'intensité. La flèche indique les régions où les profils d'intensité des protéines correspondent. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines Rab11 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants de Rab11. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre endosomes Rab11 positifs / protéine NOX2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de huit cellules issues de deux expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un *paired t test* ( $p=0,0001$ ).



**Figure 40.** Présence des endosomes positifs pour les protéines EEA1 et Nox2 à proximité des phagosomes dans les neutrophiles humains. Immunofluorescence de neutrophiles humains visualisés en microscopie confocale *spinning-disk* après dix minutes de phagocytose synchronisée de particules de ZO marquées avec du Texas Red (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou EEA1. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images de trois plans d'une pile de vingt-et-une images. L'encadré correspond à la zone agrandie à droite. En blanc est représenté le profil d'intensité. La flèche indique les régions où les profils d'intensité des protéines correspondent. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines EEA1 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants de EEA1. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre endosomes EEA1 positifs / protéine Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de quatre cellules issues de deux expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon ( $p=0,125$ ).





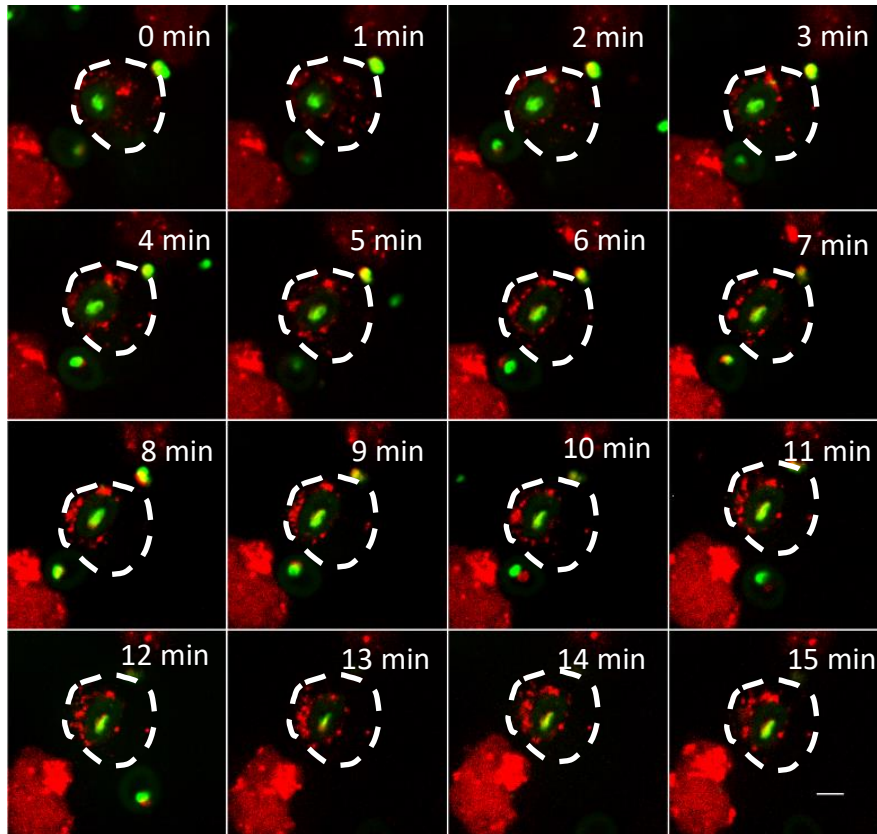
### Endosomes Nox2 positifs et phagocytose

La présence de la protéine Nox2 dans les endosomes ne signifie cependant pas que ses derniers soient impliqués dans son éventuelle accumulation au phagosome. Afin d'éclaircir ce point, la localisation des endosomes et de la protéine Nox2 a été étudiée lors de la phagocytose de particules de ZO marquées avec du *Texas Red*.

Dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 les endosomes de recyclage se situent toujours sous la membrane plasmique mais on les retrouve aussi à proximité de la membrane du phagosome tandis que les endosomes précoces ne se retrouvent plus qu'à proximité du phagosome. La moyenne des CCP (0,54 pour EEA1 et 0,64 pour Rab11) est significativement différente de la moyenne des CCP contrôle (0,33 pour EEA1 et 0,39 pour Rab11) indiquant un lien entre la localisation des endosomes et celle de la protéine Nox2 durant la phagocytose. Le profil d'intensité tracé à proximité de la membrane du phagosome montre que les endosomes précoces et de recyclages colocalisent partiellement avec la protéine Nox2 (Figure 35 et Figure 36).

Les expériences menées dans les cellules PLB-985 WT (Figure 37 et Figure 38) et les neutrophiles humains (Figure 39 et Figure 40) aboutissent à des résultats similaires, les endosomes étant aussi présents à proximité de la membrane du phagosome. La moyenne des CCP dans les PLB-985 WT est de 0,37 pour les endosomes EEA1 positifs et 0,62 pour les endosomes Rab11 positifs. Cela est significativement différents de la moyenne des CCP contrôle (respectivement 0,17 et 0,30). Dans les neutrophiles humains il n'y a pas de différence significative entre la moyenne du CCP pour les endosomes EEA1 positifs (0,64) et le contrôle négatif correspondant (0,27). Plus qu'une absence de colocalisation, cela souligne le manque de cellules étudiées (seulement quatre) dû à la versatilité de la qualité du marquage par l'anticorps dirigé contre la protéine EEA1 qui empêchent d'obtenir un résultat statistiquement significatif. Pour les endosomes Rab11 positifs la moyenne des CCP est significativement différente (0,75) par rapport à la condition contrôle (0,34). Ces résultats suggèrent une présence des endosomes EEA1 ou Rab11 positifs contenant la protéine Nox2 à proximité du phagosome après dix minutes de phagocytose. Les profils d'intensités indiquent invariablement une colocalisation partielle entre les endosomes Rab11 et EEA1 positifs et la protéine Nox2 dans les PLB-985 WT comme dans les neutrophiles humains.





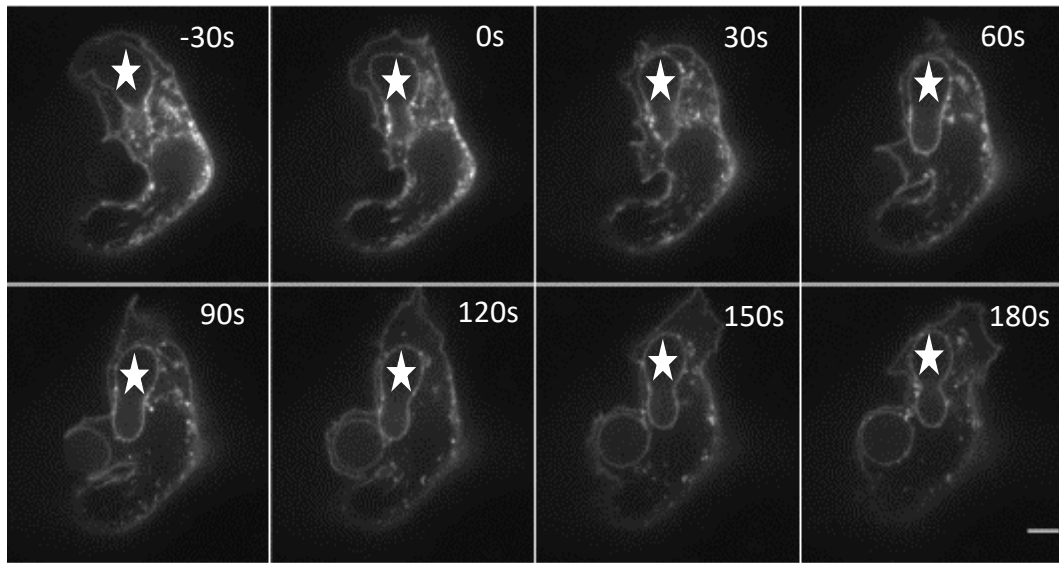
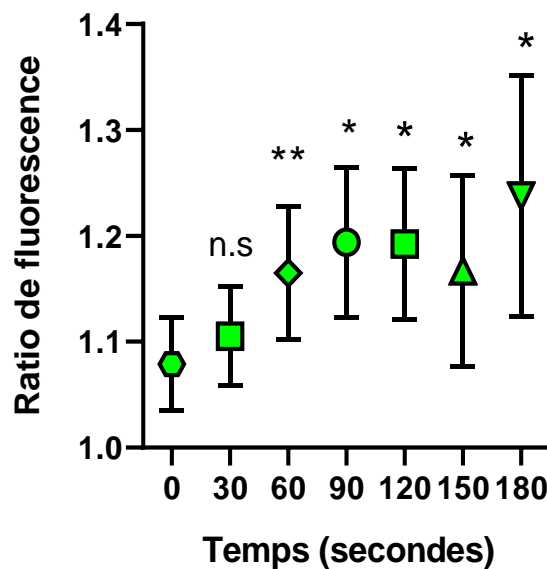
**Figure 41. Dynamique des endosomes au cours de la phagocytose dans les cellules PLB-985 WT.** Les cellules sont préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1  $\mu\text{g/ml}$  d'interféron gamma et une heure avec du dextran tetramethylrhodamine avant d'être mis en présence de particules de ZO marquées avec de l'Alexa 488. Les particules de ZO sont ajoutées extemporanément afin que le contact entre la cellule et ces dernières soit observable et que la phagocytose puisse être suivie au cours du temps (microscopie confocale *spinning-disk*, grossissement x100). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. L'échelle équivaut à trois micromètres. Les pointillées marquent la délimitation de la cellule dont le suivi commence à la fermeture du phagosome (temps zéro). Deux expériences indépendantes ont été réalisées.

### Fusion des endosomes avec le phagosome

Pour tenter de mettre en lumière une fusion des endosomes avec le phagosome, les endosomes ont été chargés avec du dextran marqué à la tetramethylrhodamine préalablement à la phagocytose de particules de ZO marquées avec de l'Alexa 488. Du fait de son poids moléculaire de 10 000 Daltons ce dextran est spécifiquement internalisé selon une voie clathrine dépendante dans les endosomes<sup>242</sup> tout comme la protéine Nox2 lors de son endocytose dans les macrophages<sup>243</sup>.

Une brève observation nous permet de constater la présence de deux particules de ZO marquées avec de l'Alexa 488 dans le plan. Celle au centre est en train d'être phagocytée, la fermeture de ce phagosome marque le temps zéro. La particule en haut à droite quant à elle est hors de la cellule. Au cours du temps la répartition des endosomes autour du phagosome varie ce qui témoigne de leur dynamique. A partir de cinq minutes la particule libre vire au jaune. Si elle était au sein d'un phagosome cela pourrait témoigner d'une fusion des endosomes avec le phagosome, mais puisqu'elle est libre il s'agit plutôt d'une diminution du signal de l'Alexa 488 laissant apparaître l'auto-fluorescence de la particule de ZO dans le canal rouge correspondant à la fluorescence de la tetramethylrhodamine. Cette diminution du signal de l'Alexa 488 empêche d'affirmer que la coloration jaune qui apparaît après quatorze minutes au niveau de la particule phagocytée correspond à une fusion des endosomes (Figure 41). Un marqueur de la membrane permettrait de montrer distinctement que les endosomes fusionnent avec le phagosome même si deux limites seraient à dépasser : le photoblanchiment du marqueur de la membrane et saisir l'instant fugace où les endosomes fusionnent avec la membrane.

En conclusion la protéine Nox2 est présente dans les endosomes Rab11 et EEA1 positifs dans les cellules non stimulées ou durant la phagocytose. Un faisceau d'indices permet de suggérer que les endosomes fusionnent avec le phagosome. Durant la phagocytose les endosomes Rab11 et EEA1 positifs se retrouvent à proximité immédiate du phagosome suggérant leur fusion avec ce dernier. Cette hypothèse est renforcée par l'expérience faite avec le dextran marqué à la tetramethylrhodamine qui laisse supposer que les endosomes fusionnent avec le phagosome. Fort de cette hypothèse on a testé l'accumulation de la protéine Nox2 au phagosome.

**A****B**

**Figure 42. Accumulation de la protéine GFP-Nox2 au phagosome.** Les cellules sont préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1 µg/ml d'interféron gamma. Cinétique de la protéine GFP-Nox2 au phagosome, lors de la phagocytose de particules de ZO, à partir de sa fermeture et durant 180s. Les particules de ZO sont ajoutées extemporanément afin que le contact entre la cellule et ces dernières soit observable (microscopie confocale *spinning-disk*, grossissement x100). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. (A) Images à différents temps de phagocytose. Chaque image est issue d'une pile de onze images. L'étoile blanche correspond au phagosome dont la fermeture a marqué le début des prises de vue et dont la fluorescence a été suivie au cours du temps. L'échelle représente cinq micromètres. (B) Chaque point correspond au ratio de la fluorescence moyenne de la protéine GFP-Nox2 à la membrane du phagosome (à laquelle on soustrait le bruit de fond) divisée par la fluorescence moyenne de la membrane plasmique (moins le bruit de fond) dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2. Est ici représenté la moyenne ± l'erreur standard moyenne de huit à dix-neuf cellules prises trois jours différents. Les tests statistiques réalisés sont des *ratios paired t tests* (30s vs 0s p=0,27 ; 60s vs 0s p=0,0059 ; 90s vs 0s p= 0,023 ; 120s vs 0s p=0,035 ; 150s vs 0s p=0,024 ; 180s vs 0s p=0,022).

### 3.

## Cinétique de Nox2 au phagosome : de l'internalisation à la destruction

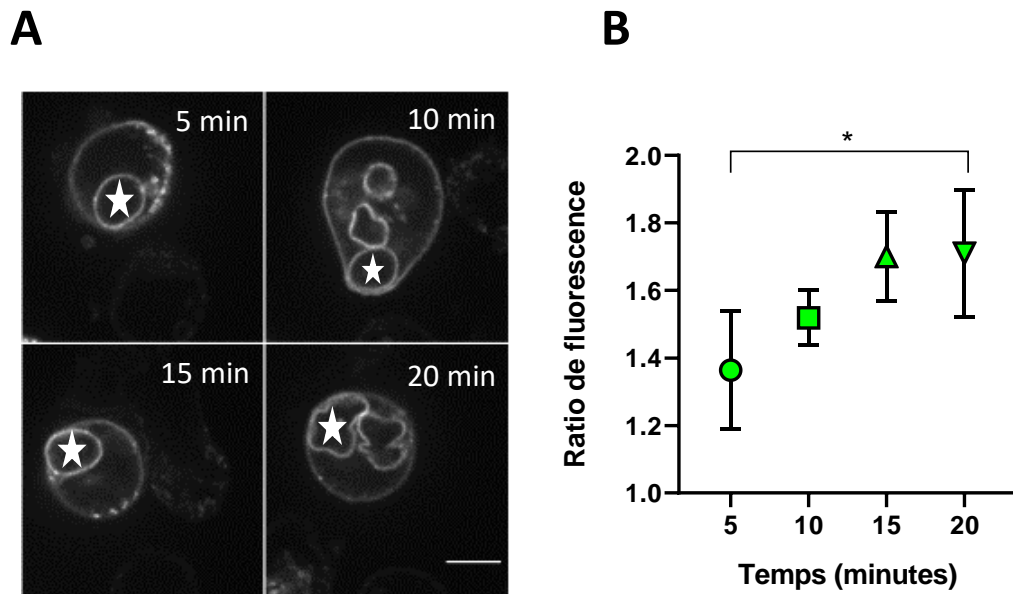
Le fait que les endosomes semblent fusionner avec le phagosome interroge sur une éventuelle accumulation de la protéine GFP-Nox2 au phagosome dans notre modèle. En effet nos cellules sont dépourvues des granules spécifiques et à gélatinase qui, dans les neutrophiles, sont la source principale de l'apport en protéine Nox2 au phagosome. L'accumulation relative de la protéine GFP-Nox2 au phagosome comparativement à la membrane plasmique a donc été évaluée sur des temps courts ou plus long après la fermeture du phagosome.

### Cinétique de la protéine GFP-Nox2 au phagosome pendant les temps courts

Afin de déterminer l'accumulation de la protéine GFP-Nox2 au phagosome les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 sont mises en contact avec des particules de ZO et, lors de l'internalisation d'une de ces particules, une séquence de clichés est réalisée.

A partir de la fermeture du phagosome, le ratio de fluorescence entre la membrane du phagosome et la fluorescence de la membrane plasmique est calculé pour chaque point de temps. Ce ratio indique qu'au moment de la fermeture du phagosome (zéro seconde) il n'y a pas d'enrichissement en protéine Nox2 (Figure 42). Il faut attendre une minute après cette fermeture pour voir un enrichissement significatif de la protéine Nox2 au phagosome par rapport à la fermeture du phagosome. Le ratio reste ensuite stable dans le temps jusqu'à trois minutes après la fermeture du phagosome, avec une fluorescence environ 1,2 fois plus importante au phagosome par rapport à la membrane plasmique.

Les images en microscopie confocale montre que dans l'environnement immédiat du phagosome marqué dans la figure 42 par une étoile, la protéine Nox2 est présente dans ce qui semble être des structures vésiculaires qui doivent être, au moins en partie, les endosomes (voir chapitre deux). Elles semblent disparaître majoritairement entre la fermeture du phagosome et une minute ce qui coïncide avec l'enrichissement en Nox2 du phagosome et



**Figure 43. Accumulation de la protéine GFP-Nox2 au phagosome.** Les cellules sont préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1  $\mu\text{g/ml}$  d'interféron gamma. Cinétique de la protéine GFP-Nox2 au phagosome lors de la phagocytose de particules de ZO à partir de cinq minutes après fermeture du phagosome. Les particules de ZO sont centrifugées à 13°C avec les cellules, la fin de la centrifugation marquant le temps zéro. Une image est réalisée toutes les cinq minutes en microscopie confocale *spinning-disk*, au grossissement x100. Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. (A) Images à différents temps de phagocytose. Chaque image est issue d'une pile de vingt-six images. L'étoile blanche correspond au phagosome dont la fluorescence a été suivie au cours du temps. L'échelle représente cinq micromètres. (B) Chaque point correspond au ratio de la fluorescence moyenne de la membrane du phagosome (à laquelle on soustrait le bruit de fond) divisée par la fluorescence moyenne de la membrane plasmique (moins le bruit de fond) dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2. Est ici représenté la moyenne  $\pm$  l'erreur standard moyenne de dix à seize cellules prises quatre jours différents. Les tests statistiques réalisés sont des tests de Wilcoxon (vingt minutes vs cinq minutes  $p=0,0313$ ) et un *one sample Wilcoxon test* (accumulation à cinq minutes vs ratio de fluorescence de 1  $p=0,0313$  ; accumulation à dix minutes vs ratio de fluorescence de 1  $p=0,0002$  ; accumulation à quinze minutes vs ratio de fluorescence de 1  $p=0,0005$  ; accumulation à vingt minutes vs ratio de fluorescence de 1  $p=0,0039$ ).

pourrait indiquer leur implication dans le phénomène d'enrichissement de la protéine GFP-Nox2 au phagosome. Concernant l'hétérogénéité de leur répartition, elle pourrait s'expliquer par la présence du volumineux noyau de la cellule.

#### Cinétique de la protéine GFP-Nox2 au phagosome pendant les temps longs

Le devenir de la protéine sur des temps plus long est plus compliqué à observer car la GFP est sujette au photoblanchiment entraînant une perte du signal après trois minutes. Pour résoudre ce problème une expérience similaire a été entreprise en forçant le contact entre ZO et cellule par centrifugation (synchronisation de la phagocytose) à 13°C (afin que la phagocytose ne commence pas durant la procédure) et les prises de vue ont été espacées. Les images de microscopie confocale montre moins de vésicules cinq et dix minutes après la phagocytose comparativement aux images prises aux temps plus court ([Figure 43](#)).

Après cinq minutes le ratio de fluorescence est de  $1,4 \pm 0,18$  (erreur type de la moyenne) ce qui est cohérent avec le ratio à trois minutes qui se trouvait autour de 1,2. Si l'accumulation se poursuit au cours du temps, elle ne devient significative par rapport à ce référentiel de cinq minutes qu'après vingt minutes de phagocytose où le ratio de fluorescence est de  $1,7 \pm 0,19$ . Cela indique que l'accumulation de Nox2 se poursuit encore vingt minutes après la fermeture du phagosome. Lorsque l'on compare les moyennes des ratios obtenues avec une valeur théorique de 1,0 (signifiant que la fluorescence au phagosome équivaut à celle à la membrane plasmique) on constate que tous les temps présentent une différence significative avec cette valeur théorique signifiant que l'accumulation se maintient pendant au moins vingt minutes.

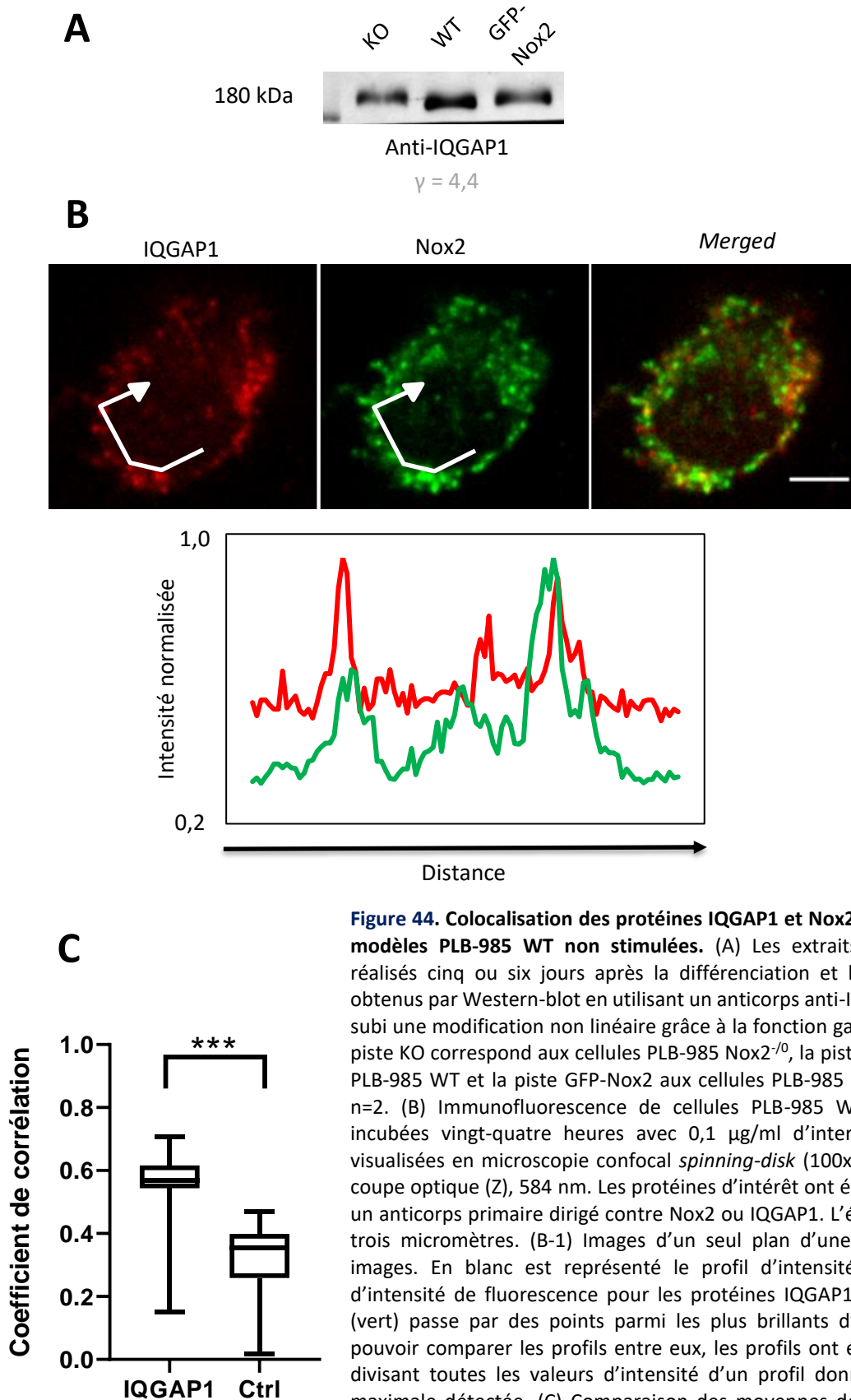
Dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 la protéine GFP-Nox2 s'accumule au phagosome malgré l'absence de granules spécifiques et à gélatinase pour l'y apporter suggérant que d'autres mécanismes sont à l'œuvre. Cela conforte les résultats précédents qui indiquent que les endosomes précoces et de recyclage contenant la protéine Nox2 fusionnent avec le phagosome contribuant à l'enrichissement de la protéine Nox2 au phagosome. De plus les vésicules cytoplasmiques qui contiennent la protéine Nox2 semblent



disparaître au cours de la phagocytose selon une cinétique qui correspond à l'accumulation de la protéine au phagosome. L'accumulation de la protéine commence une minute après le scellement du phagosome et se poursuit encore après vingt minutes. Les expériences laissent entrevoir une accumulation rapide au commencement (le ratio de fluorescence augmentant jusqu'à 1,4 en cinq minutes) puis plus lente par la suite (puisque le ratio n'atteint 1,7 qu'au bout de vingt minutes) coïncidant avec la disparition des vésicules.

Certains pathogènes sont capables de détourner l'assemblage et/ou l'adressage de la NADPH oxydase du phagosome des neutrophiles. Notre modèle ayant montré qu'il est possible de quantifier l'accumulation de la protéine Nox2 au phagosome au cours de la phagocytose, on a tenté d'influer sur l'adressage de la protéine Nox2 dans notre modèle afin de mimer l'action de ces pathogènes.





**Figure 44. Colocalisation des protéines IQGAP1 et Nox2 dans les cellules modèles PLB-985 WT non stimulées.** (A) Les extraits cellulaires sont réalisés cinq ou six jours après la différenciation et les résultats sont obtenus par Western-blot en utilisant un anticorps anti-IQGAP1. L'image a subi une modification non linéaire grâce à la fonction gamma ( $\gamma = 4,4$ ). La piste KO correspond aux cellules PLB-985 Nox2<sup>-/-</sup>, la piste WT aux cellules PLB-985 WT et la piste GFP-Nox2 aux cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2. n=2. (B) Immunofluorescence de cellules PLB-985 WT préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1  $\mu\text{g/ml}$  d'interféron gamma et visualisées en microscopie confocale *spinning-disk* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou IQGAP1. L'échelle équivaut à trois micromètres. (B-1) Images d'un seul plan d'une pile de dix-neuf images. En blanc est représenté le profil d'intensité. (B-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines IQGAP1 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants d'IQGAP1. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (C) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélation de Pearson entre les protéines IQGAP1 et Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de douze cellules issues de deux expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon ( $p=0,0005$ ).

## 4.

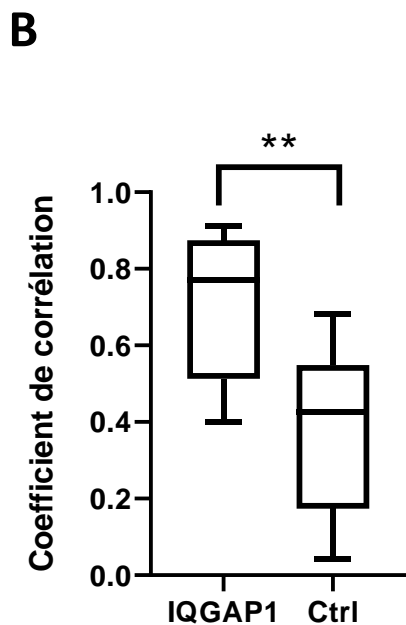
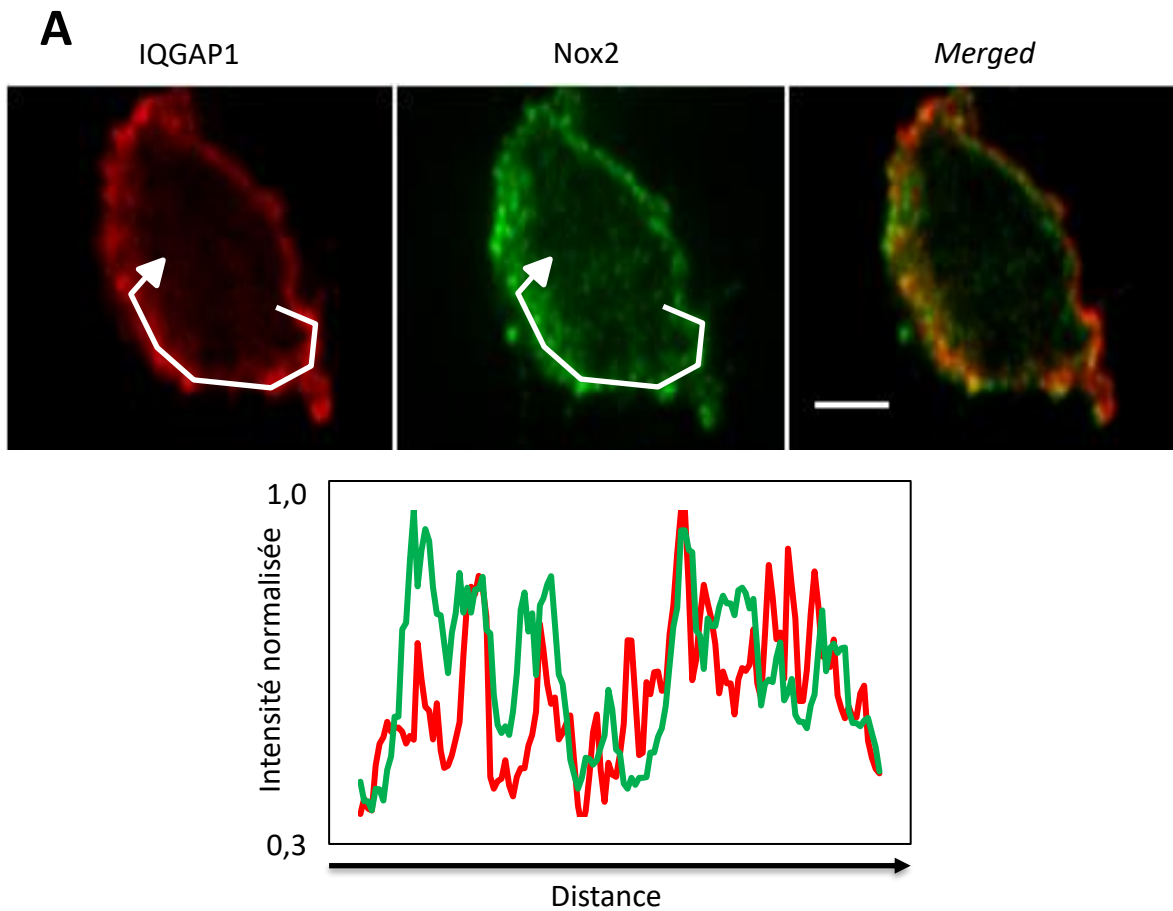
### Modulation du recrutement de Nox2 : rôle de IQGAP1

Dans le but de moduler la quantité de la protéine Nox2 au phagosome, on a choisi de cibler la protéine IQGAP1. Plusieurs éléments indiquaient son implication dans le recrutement de Nox2 au phagosome : son association avec la protéine Nox2 s'avère déterminante pour la mobilité de cette dernière dans les cellules endothéliales<sup>175</sup> ; la protéine IQGAP1 grâce à son association avec l'actine est importante pour le correct adressage des endosomes dans les cellules épithéliales<sup>244</sup> laissant imaginer pareil rôle dans notre modèle. Enfin elle est ciblée par *Salmonella enterica* du sérotype *Typhimurium* qui diminue la quantité de cytochrome b<sub>558</sub> à la membrane du phagosome dans les macrophages lors de sa phagocytose<sup>177</sup>.

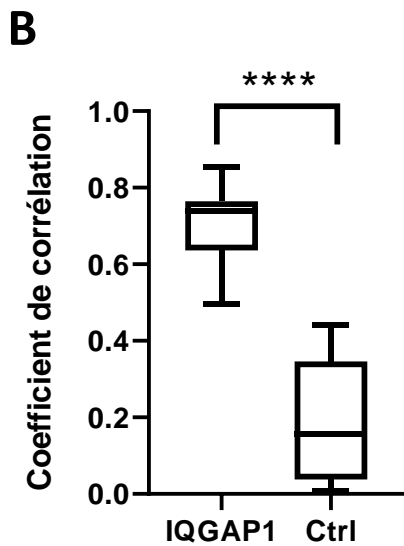
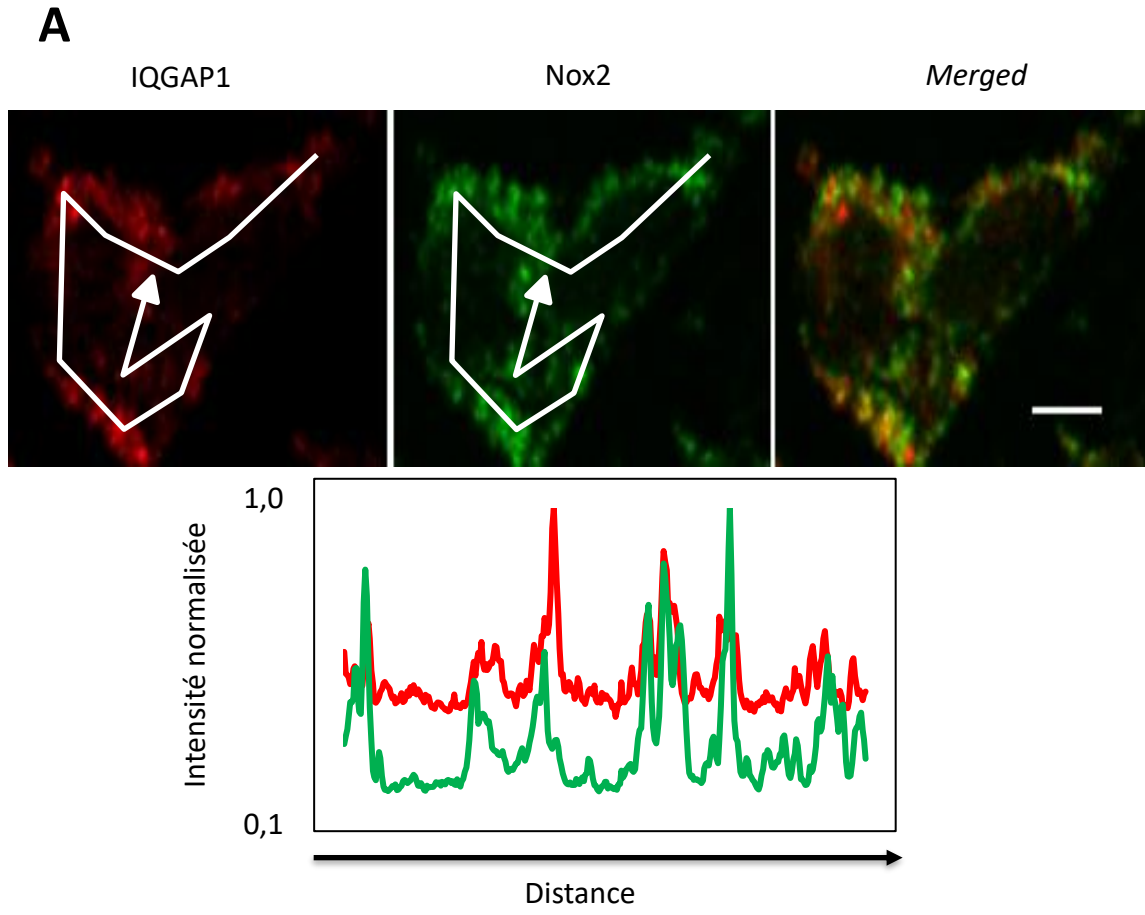
#### Expression de la protéine IQGAP1 dans les cellules PLB-985

##### Expression d'IQGAP1 dans les cellules non stimulées

La présence de la protéine IQGAP1 avait déjà été confirmée dans les neutrophiles et dans les cellules HL-60<sup>245</sup>. Nous avons donc analysé son expression dans les cellules PLB-985 ainsi que sa colocalisation avec la protéine Nox2 dans ces cellules. Les cellules PLB-985 Nox2<sup>-/-</sup> (KO), les cellules PLB-985 WT et les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 présentent une bande correspondant à une masse supérieure à 180 kDa (Figure 44A) ce qui correspond à la masse attendue pour la protéine IQGAP1 (190 kDa) bien qu'elle soit capable de former des homodimères ou des oligomères plus importants<sup>246</sup>. Dans les cellules PLB-985 WT le CCP moyen vaut 0,54, dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 il vaut 0,70 et dans les neutrophiles il est égal à 0,70 ; valeurs qui sont significativement supérieures aux conditions contrôle correspondantes (respectivement 0,31 ; 0,38 ; 0,20) indiquant une corrélation entre les protéines Nox2 et IQGAP1. Les profils d'intensités obtenus à partir des images prises des cellules PLB-985 WT, des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 ou des neutrophiles montrent quant à eux une colocalisation partielle entre les protéines Nox2 et IQGAP1 (Figure 44B et C et Figure 45, Figure 46).



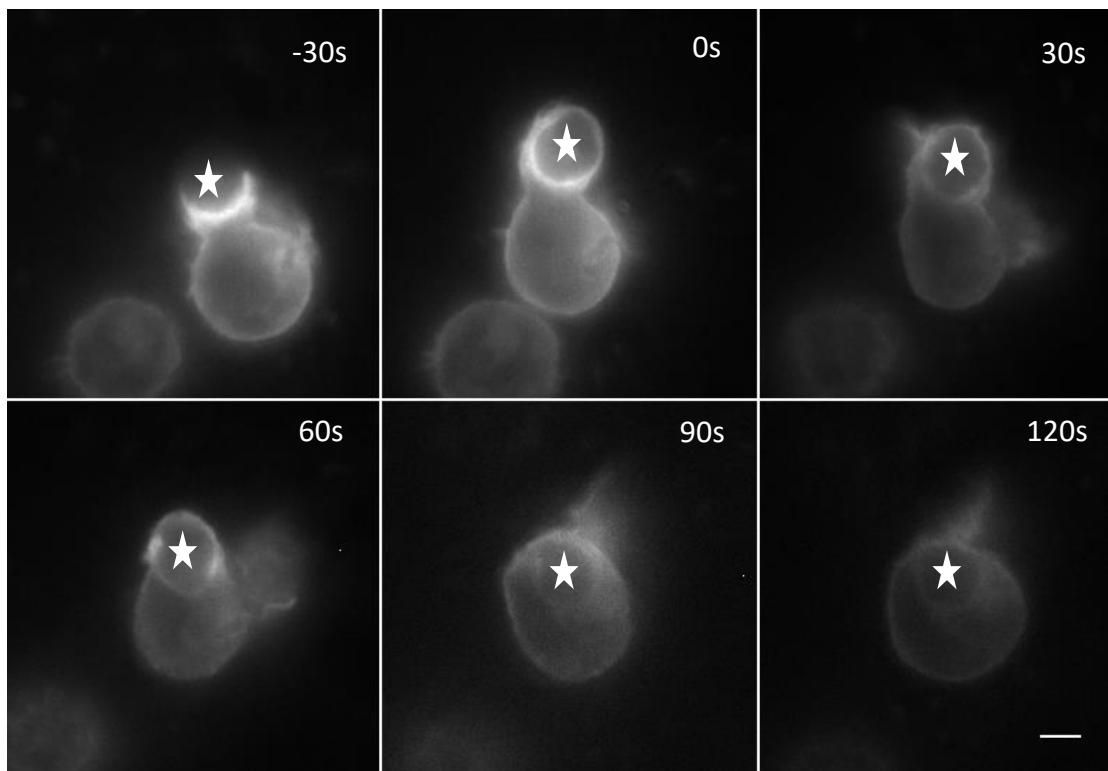
**Figure 45. Colocalisation des protéines IQGAP1 et Nox2 dans les cellules modèles PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 non stimulées.** (A) Immunofluorescence de cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1  $\mu\text{g/ml}$  d'interféron gamma et visualisées en microscopie confocale *spinning-disk* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou IQGAP1. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images d'un seul plan d'une pile de vingt-et-une images. En blanc est représenté le profil d'intensité. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines IQGAP1 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants d'IQGAP1. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre les protéines IQGAP1 et Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de huit cellules issues de trois expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon ( $p=0,0078$ ).



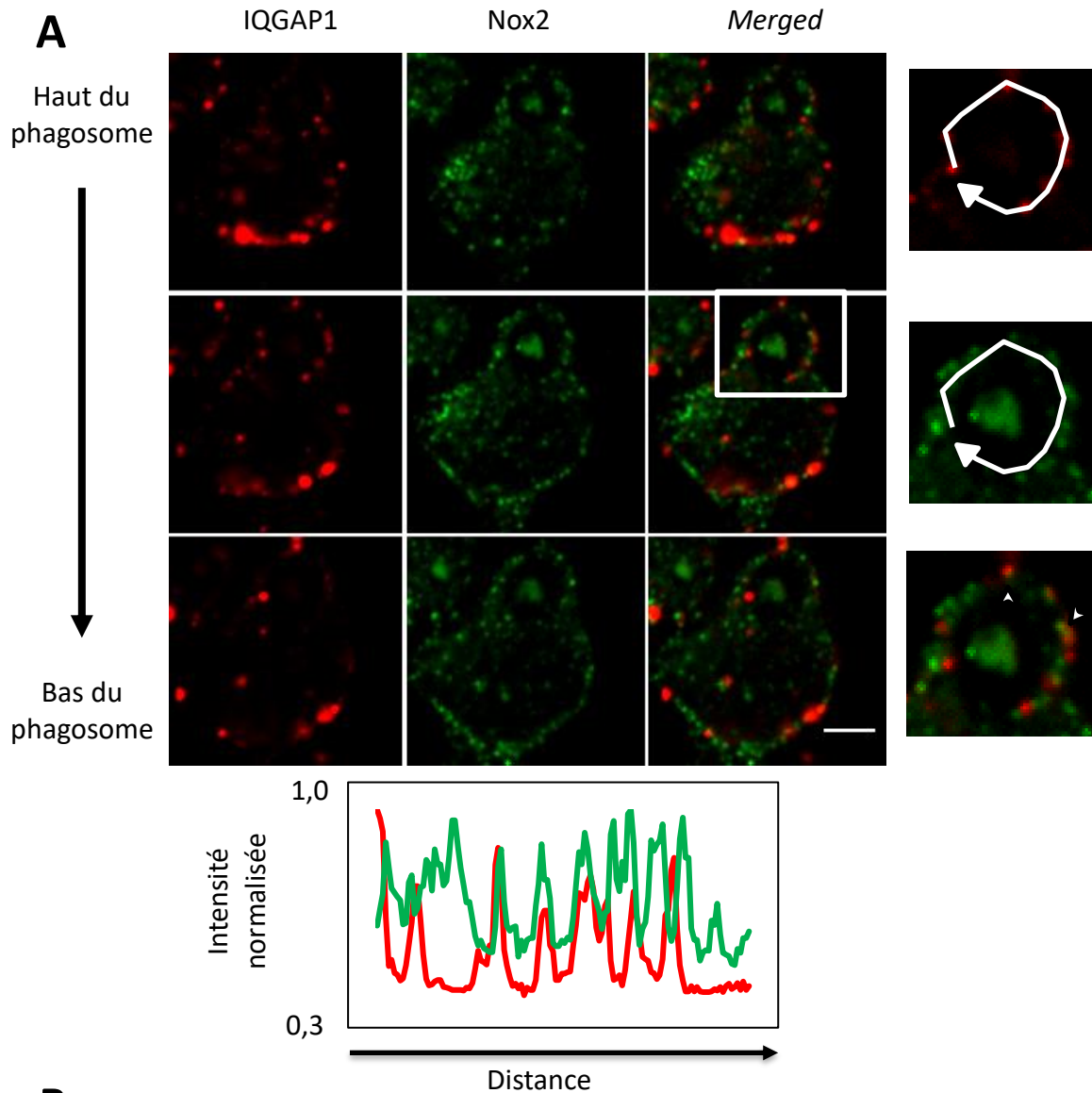
**Figure 46. Colocalisation des protéines IQGAP1 et Nox2 dans les neutrophiles humains non stimulés.**

(A) Immunofluorescence de neutrophiles visualisées en microscopie confocale *spinning-disk* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou IQGAP1. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images d'un seul plan d'une pile de vingt-et-une images. En blanc est représenté le profil d'intensité. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines IQGAP1 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants d'IQGAP1. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre les protéines IQGAP1 et Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de dix cellules issues de trois expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un *paired t test* ( $p < 0,0001$ )

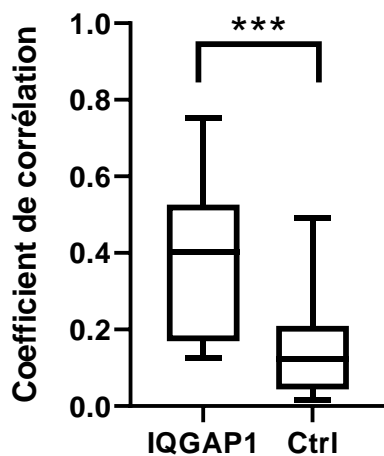




**Figure 47. Cinétique de la protéine GFP-GFP-IQGAP1 au phagosome dans les cellules PLB-985 WT.** Les cellules PLB-985 WT sont préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1  $\mu\text{g/ml}$  d'interféron gamma. Les cellules sont transfectées six heures avant l'expérience. Cinétique de la protéine GFP-GFP-IQGAP1 au phagosome, lors de la phagocytose de particules de ZO, trente secondes avant sa fermeture et jusqu'à deux minutes après la fermeture du phagosome. Les particules de ZO sont ajoutées extemporanément de sorte que le contact entre la cellule et ces dernières soit observable (microscopie à épifluorescence, grossissement x60). Images à différents temps de phagocytose. Chaque image est issue d'une pile de treize images. L'étoile blanche correspond au phagosome suivi au cours du temps. L'échelle représente cinq micromètres. n=1.

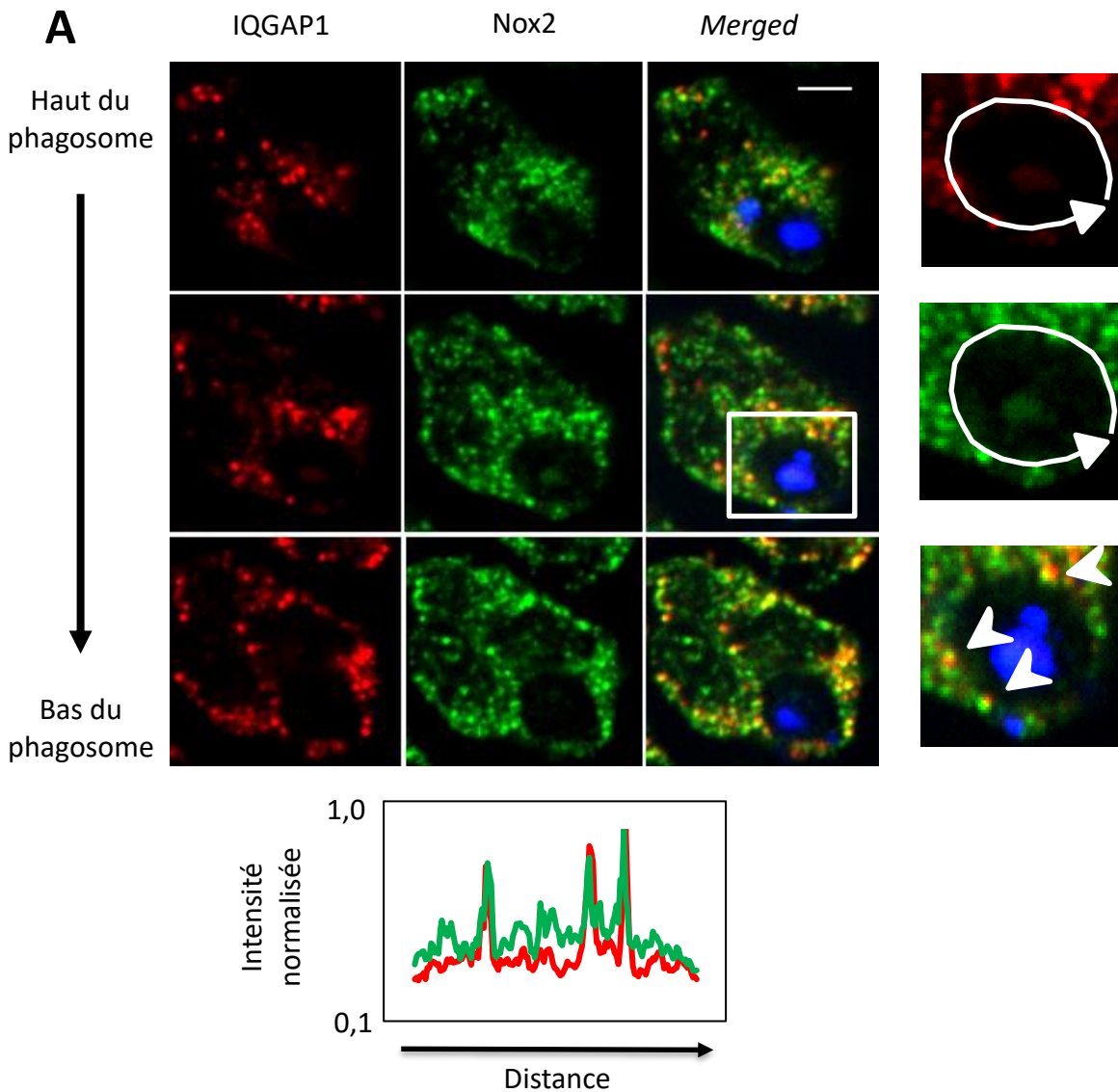
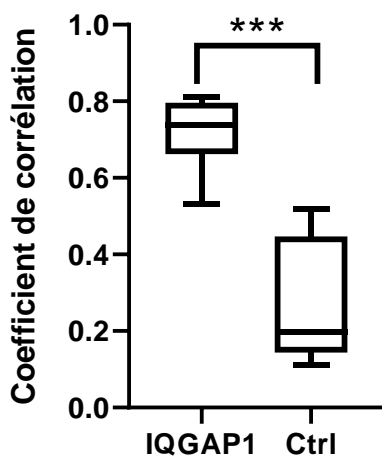


**B**



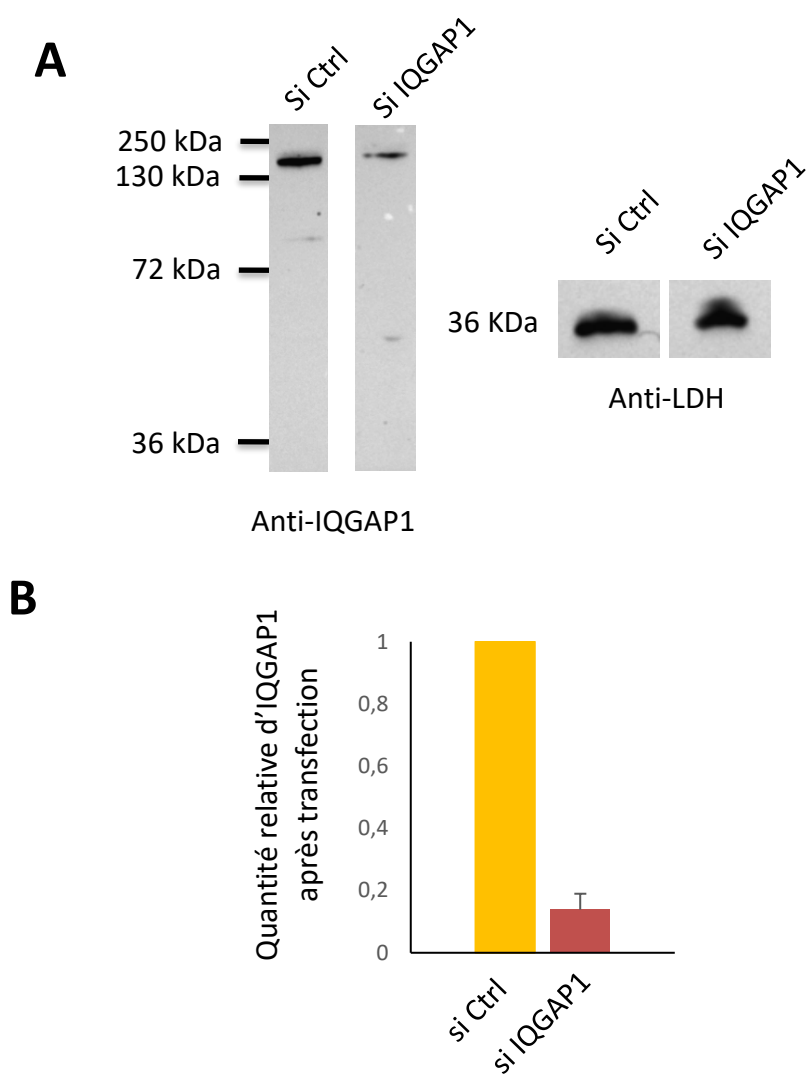
**Figure 48. Colocalisation des protéines IQGAP1 et Nox2 à proximité du phagosome dans les cellules PLB-985 WT.** (A)

Immunofluorescence de cellules PLB-985 WT préalablement incubées vingt-quatre heures avec 0,1  $\mu\text{g/ml}$  d'interféron gamma et visualisées en microscopie confocale *spinning-disk* après dix minutes de phagocytose synchronisée de particules de ZO marquées avec du *Texas Red* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou IQGAP1. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images de trois plans d'une pile de quinze images. L'encadré correspond à la zone agrandie à droite. En blanc est représenté le profil d'intensité. La flèche indique les régions où les profils d'intensité des protéines correspondent. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines IQGAP1 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants d'IQGAP1. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre les protéines IQGAP1 et Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de quatorze cellules issues de deux expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon ( $p=0,0002$ ).

**B**

**Figure 49. Colocalisation des protéines IQGAP1 et Nox2 à proximité du phagosome dans les neutrophiles humains.** (A) Immunofluorescence de neutrophiles visualisées en microscopie confocale *spinning-disk* après dix minutes de phagocytose synchronisée de particules de ZO marquées avec du *Texas Red* (100x). Epaisseur de la coupe optique (Z), 584 nm. Les protéines d'intérêt ont été marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Nox2 ou IQGAP1. L'échelle équivaut à trois micromètres. (A-1) Images de trois plans d'une pile de dix-neuf images. L'encadré correspond à la zone agrandie à droite. En blanc est représenté le profil d'intensité. La flèche indique les régions où les profils d'intensité des protéines correspondent. (A-2) Le profil d'intensité de fluorescence pour les protéines IQGAP1 (rouge) et Nox2 (vert) passe par des points parmi les plus brillants d'IQGAP1. Afin de pouvoir comparer les profils entre eux, les profils ont été normalisés en divisant toutes les valeurs d'intensité d'un profil donné par l'intensité maximale détectée. (B) Comparaison des moyennes des coefficients de corrélations de Pearson entre les protéines IQGAP1 et Nox2 et le contrôle négatif (rotation de 180° de l'image représentant Nox2 et calcul du coefficient de Pearson). CCP de onze cellules issues de trois expériences indépendantes. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon ( $p=0,001$ ).





**Figure 50. Effet des siARN dirigés contre la protéine IQGAP1 dans les cellules PLB-985 WT.** La transfection des siARN contrôle ou IQGAP1 est effectuée soixante-douze heures avant l'extraction protéique. Les images ont subi une modification non linéaire grâce à la fonction gamma ( $\gamma = 4,35$ ).  $n=2$ . (A) Les extraits cellulaires sont réalisés cinq ou six jours après la différenciation et les résultats sont obtenus par Western-blot en utilisant un anticorps anti-IQGAP1. (B) La détermination de l'expression de la protéine IQGAP1 après transfection par les siARN a été obtenue après normalisation de l'intensité des bandes correspondant à la protéine IQGAP1 par l'intensité des bandes correspondant à la protéine LDH. Est ici représentée la moyenne  $\pm$  l'erreur standard moyenne de deux expériences indépendantes.

### Présence de la protéine IQGAP1 lors de la phagocytose dans notre modèle

Après transfection des cellules PLB-985 WT par un plasmide codant pour la protéine de fusion GFP-GFP-IQGAP1, les cellules ont été mises en présence de particules de ZO pour déterminer la localisation de la protéine IQGAP1 durant la phagocytose dans notre modèle. Ce résultat préliminaire suggère que la protéine IQGAP1 s'accumule dès la formation des pseudopodes à la coupe phagocytaire, trente secondes avant la fermeture du phagosome. Lors de la fermeture du phagosome (zéro seconde) la protéine est encore fortement accumulée à la base du phagosome (anciennement la coupe phagocytaire). Elle se répartit au phagosome de manière plus homogène après trente secondes de phagocytose et elle n'est plus présente que localement une minute après la fermeture du phagosome. Sur des temps plus longs, elle semble ne plus être présente au phagosome (Figure 47).

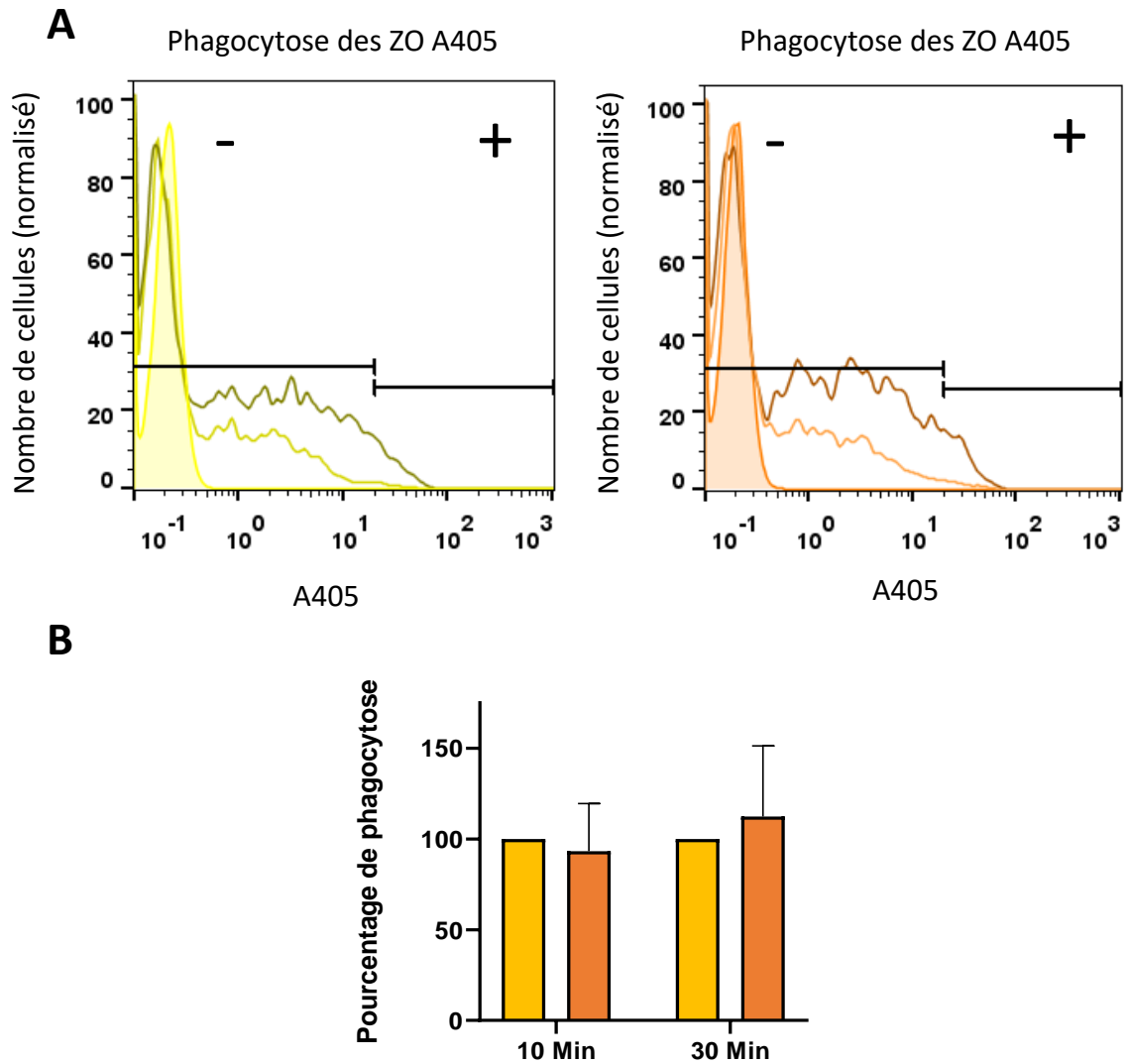
Cette expérience doit être confirmée mais elle semble indiquer que la protéine IQGAP1 est bien impliquée dans la phagocytose au sein des cellules PLB-985. Sa présence semble suivre celle de la disparition des vésicules contenant la protéine GFP-Nox2 dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2.

### Colocalisation des protéines IQGAP1 et Nox2 lors de la phagocytose dans notre modèle

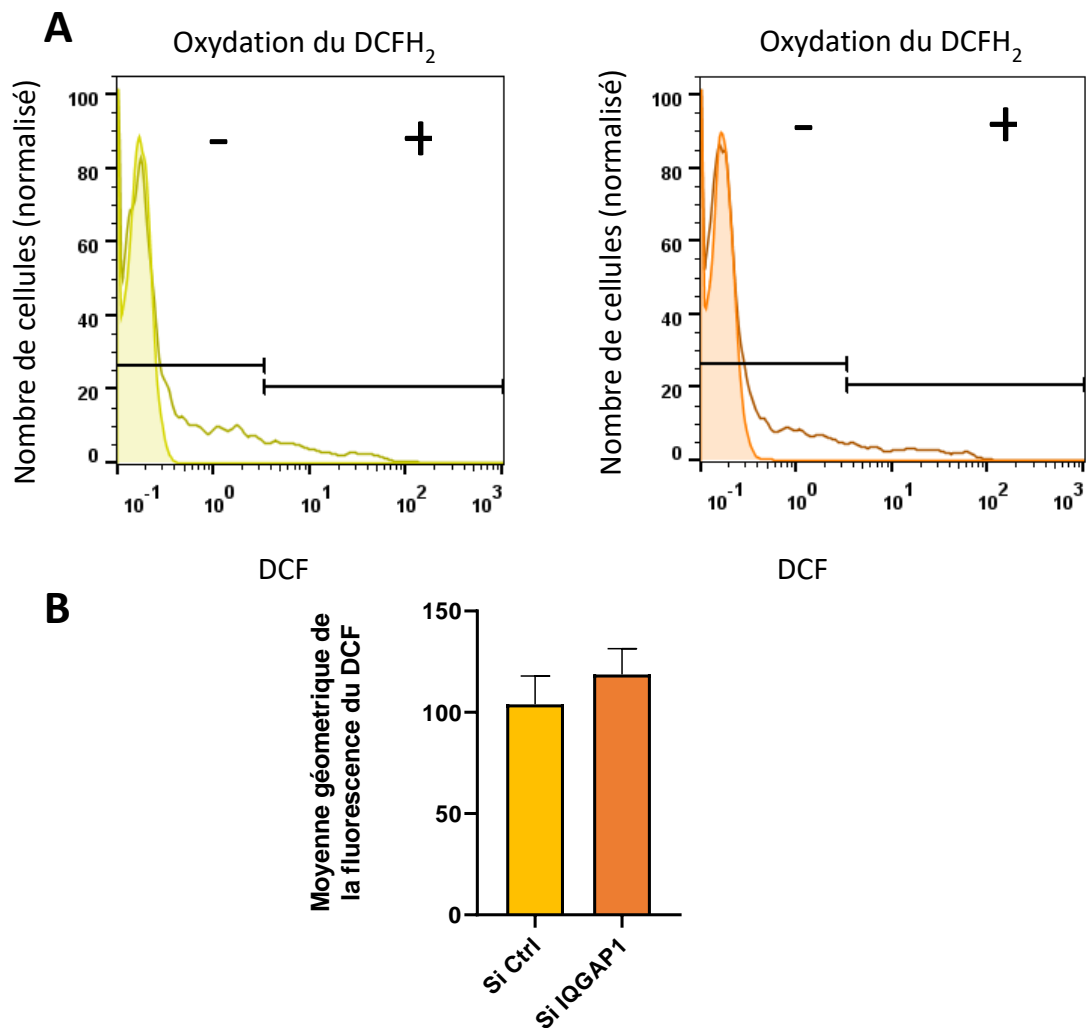
Lors de la phagocytose les protéines Nox2 et IQGAP1 sont toutes deux observées à proximité du phagosome dans les cellules PLB-985 WT et dans les neutrophiles. Le CCP vaut 0,39 dans les cellules PLB-985 WT et 0,72 dans les neutrophiles ce qui est significativement supérieur à ceux calculés pour les contrôles correspondant (respectivement 0,16 ; 0,25) indiquant une corrélation entre les deux protéines. Les profils d'intensités révèlent une colocalisation partielle de ces protéines dans les deux types cellulaires (Figure 48 et Figure 49).

### **Rôle de la protéine IQGAP1 dans notre modèle**

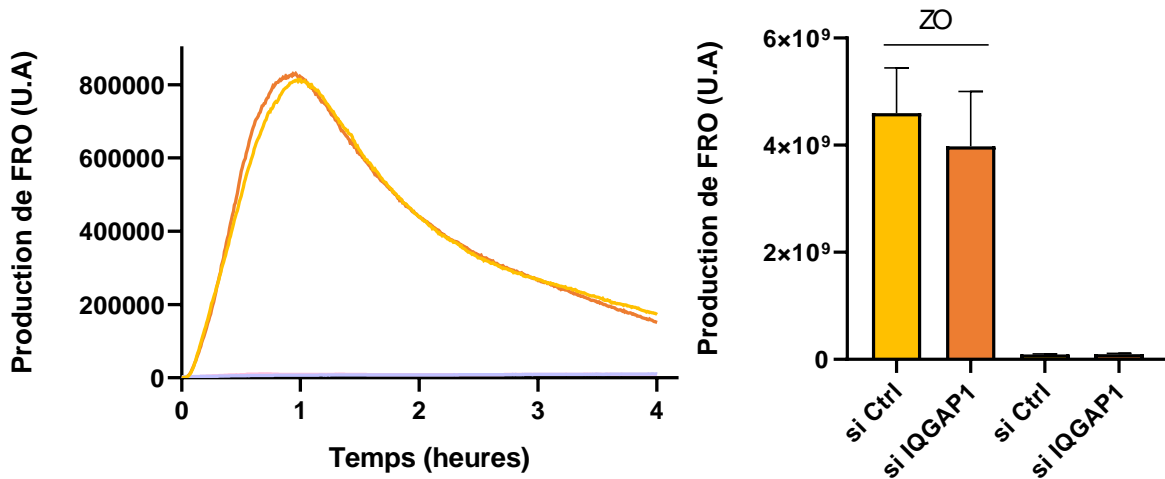
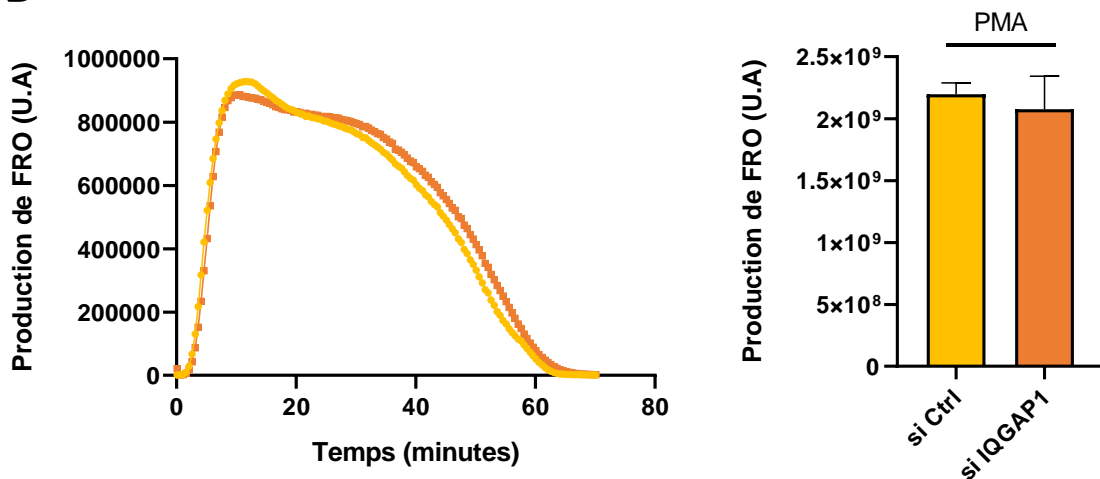
L'évaluation de l'importance de la protéine IQGAP1 dans notre modèle nécessita la diminution de son expression grâce à des *small interfering* ARN (siARN) dans les cellules PLB-985 WT. En utilisant ceux décrit précédemment<sup>172</sup>, l'expression de la protéine a pu être diminué de 90%, soixante-douze heures après la transfection (Figure 50).



**Figure 51. Effet des siARN dirigés contre la protéine IQGAP1 sur la phagocytose dans les cellules PLB-985 WT.** La transfection des siARN contrôle ou IQGAP1 est effectuée soixante-douze heures avant l'expérience. Les cellules sont préalablement incubées avec 0,1  $\mu\text{g/ml}$  d'interféron gamma pendant vingt-quatre heures. La phagocytose de particules de ZO marquées avec de l'Alexa 405 est suivi, après dix ou trente minutes, par cytométrie en flux dans les cellules transfectées avec les siARN contrôle (jaune) ou les siARN IQGAP1 (orange). (A) Dans les cytogrammes les courbes pleines représentent les cellules seules, les courbes claires le temps dix minutes et les foncées le temps trente minutes. La délimitation sépare les cellules qui n'ont pas phagocytées (gauche, -) des cellules qui ont phagocytées (droite, +). Est considéré comme négative toute cellule dont la fluorescence, après ajout de BT, est inférieure à la fluorescence des particules de ZO A405 seules en présence de BT. (B) Le pourcentage de cellules ayant phagocytées (par rapport aux cellules transfectées avec un siARN contrôle) est obtenu après l'ajout de BT pour éliminer la fluorescence des particules fixées mais non internalisées. Est ici représenté le pourcentage de cellules ayant phagocytées aux différents temps par rapport à la condition contrôle (moyenne  $\pm$  l'erreur standard moyenne de trois expériences indépendantes).



**Figure 52.** Effet des siARN dirigés contre la protéine IQGAP1 sur la production de FRO en cytométrie. La transfection des siARN contrôle ou IQGAP1 est effectuée soixante-douze heures avant l'expérience. Les cellules sont préalablement incubées avec 0,1 µg/ml d'interféron gamma pendant vingt-quatre heures. L'oxydation après leur phagocytose des levures liées au DCFH<sub>2</sub> est suivie après trente minutes par cytométrie dans les cellules transfectées avec le siARN contrôle (jaune) ou avec le siARN IQGAP1 (orange). (A) Dans les cytogrammes les courbes pleines représentent les cellules seules et les foncées le temps trente minutes. La délimitation correspond aux cellules qui ne contiennent pas de levures dont le DCFH<sub>2</sub> a été oxydé (gauche, -) et aux cellules dans lesquelles le DCFH<sub>2</sub> des levures a été oxydé (droite, +). Est considéré comme négative toute cellule dont la fluorescence est inférieure à la fluorescence des levures DCFH<sub>2</sub> seules. (B) La moyenne de fluorescence est obtenue après l'ajout de BT pour éliminer la fluorescence des particules fixées mais non internalisées. Est ici représentée la moyenne de fluorescence en pourcentage par rapport au contrôle (moyenne ± l'erreur standard moyenne de quatre expériences indépendantes).

**A****B**

**Figure 53. Effet des siARN sur la production de FRO en luminométrie.** La transfection des siARN contrôle ou IQGAP1 est effectuée soixante-douze heures avant l'expérience. Les cellules sont préalablement incubées avec  $0,1 \mu\text{g/ml}$  d'interféron gamma pendant vingt-quatre heures. L'activité de la NADPH oxydase a été mesurée par chimiluminescence grâce au L-012 dans les cellules siARN contrôle (jaune) ou siARN IQGAP1 (orange). (A) Est représenté ici, la cinétique de production de FRO au cours du temps en présence de particules de ZO et l'aire sous la courbe correspondante (gauche). La courbe mauve correspond à la production de FRO par les cellules transfectées avec le siARN contrôle en absence de particules de ZO. La courbe rose (masqué par la courbe mauve) correspond à la production de FRO par les cellules transfectées avec le siARN IQGAP1 en absence de particules de ZO. (B) Le même protocole a été réalisé pour la mesure de l'activité de la NADPH oxydase en présence de PMA et l'aire sous la courbe en présence de PMA est présentée à droite. Est ici représentée la moyenne  $\pm$  l'erreur standard moyenne de trois expériences indépendantes.

Par la suite on a quantifié l'effet de cette réduction de l'expression de la protéine IQGAP1 sur le taux de phagocytose et la production de FRO.

#### Impact de l'inhibition de la protéine IQGAP1 sur la phagocytose

Les cellules ont été incubées avec des particules de ZO marquées avec un fluorophore pour déterminer l'impact de la protéine IQGAP1 sur la phagocytose dans les PLB-985 WT. Après dix minutes, les cellules ayant subi une transfection avec le siARN contrôle ou le siARN IQGAP1 ont internalisé un taux similaire de particules de ZO et cette même propension à la phagocytose se confirme dans le temps (Figure 51). L'absence d'effet des siARN pourrait indiquer qu'il existe des mécanismes compensatoires dans notre modèle.

#### Impact de l'inhibition de la protéine IQGAP1 sur la production de FRO

L'absence d'effet sur la phagocytose ne signifie pas que la protéine IQGAP1 n'intervient pas dans le recrutement de la protéine Nox2 au phagosome. La production de FRO a donc été évaluée par cytométrie en flux en mesurant l'oxydation de levures liées de manière covalente à la dichlorofluoresceine (DCFH<sub>2</sub>) et en luminométrie en présence de particules de ZO. Les résultats avec les levures DCFH<sub>2</sub> montrent une oxydation similaire des levures DCFH<sub>2</sub> par les cellules transfectées avec le siARN contrôle et par les cellules transfectées avec le siARN IQGAP1 aux différents temps étudiés (Figure 52). Cette oxydation entraîne une fluorescence cinq fois plus importante des levures après dix minutes et dix fois plus importante après trente minutes par rapport aux levures DCFH<sub>2</sub> seules en l'absence de BT (non montré). Ces observations sont confirmées par celles effectuées en luminométrie, où la cinétique de production des FRO, de même que la production totale, sont similaires quel que soit le siARN utilisé. La stimulation des cellules PLB-985 WT transfectées avec les siARN contrôle ou IQGAP1, par du PMA, ne montre là encore aucune différence dans la quantité de FRO après soixante minutes (Figure 53).

En conclusion la protéine IQGAP1 est présente dans notre modèle et semble impliquée dans la phagocytose puisqu'elle est présente à la coupe phagocytaire. De plus elle colocalise partiellement avec la protéine Nox2 dans les cellules non stimulées ou à proximité du phagosome lors de la phagocytose de particules de ZO. Cependant sa présence ne semble pas



nécessaire à la phagocytose ou à la production de FRO dans les cellules PLB-985 puisque la réduction de 90% de son expression n'entraîne pas de phénotype observable. Il est possible que la protéine IQGAP2 également présente dans les neutrophiles compense l'absence de la protéine IQGAP1. Il faudrait donc reprendre cette étude en diminuant l'expression des deux protéines. Pour compléter cette étude sur le trafic membranaire de la protéine Nox2, on s'est intéressé à l'organisation de la protéine Nox2 au niveau de la synapse phagocytaire et à son évolution au cours du temps.





## 5.

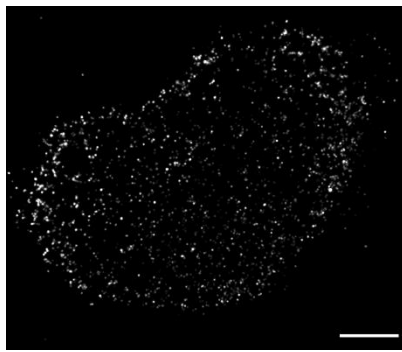
### Organisation spatiale de Nox2 à la synapse phagocytaire

On désirait notamment déterminer si une organisation particulière de la protéine Nox2 prédomine au niveau de la synapse phagocytaire comme c'est le cas pour certaines protéines connues pour y être impliquées (actine, intégrine, phosphatase, récepteurs Fc $\gamma$ ). Certaines de ces protéines forment des clusters (rassemblement de protéines allant de quelques nanomètres à l'échelle du micromètre) de la taille du micromètre aussi était-il intéressant de regarder l'organisation éventuelle de la protéine Nox2 en clusters.

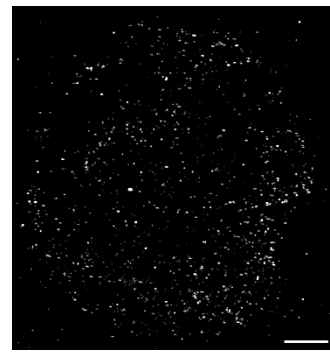
Des cellules PLB-985 WT et PLB-985 p47<sup>phox</sup>  $\Delta$ GT (n'exprimant plus la protéine p47<sup>phox</sup> du fait d'une délétion de dinucléotide GT conduisant à l'insertion d'un codon stop précoce) ont été mises en condition de phagocytose frustrée et étudiées grâce aux techniques de microscopie TIRF-*d*STORM. L'organisation des protéines Nox2 dans la membrane a été comparée dans deux conditions semblable à celles utilisées par Yokosuka *et al.*<sup>228</sup> et Freeman *et al.*<sup>119</sup> : cellules adhérentes sur poly-lysine mimant une cellule non activée (pas de production de FRO) ; cellules adhérentes à un complexe anticorps-antigène une ou dix minutes. Cette condition correspond à une phagocytose frustrée, les complexes anticorps-antigènes sont reconnus par les récepteurs Fc $\gamma$ , les cellules ne peuvent cependant réaliser une phagocytose complète avec fermeture du phagosome.

#### Analyse de la répartition et de la taille des clusters

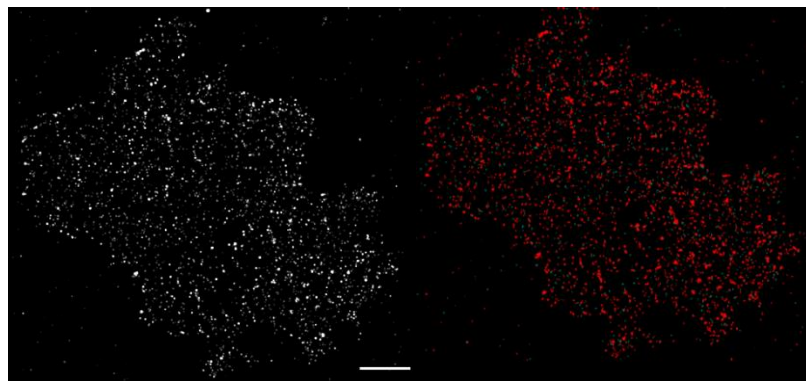
L'analyse des images obtenues nécessite l'utilisation de deux logiciels indépendants. Le premier, ThunderSTORM, va détecter les événements (clignotement d'un fluorophore) acquis dans les 20 000 séquences. Le second logiciel, SR Tessler, utilise la liste des événements obtenus pour détecter des clusters grâce à la technique du DBSCAN. Dans notre cas sont considérés comme cluster tout ensemble de quinze événements où chaque événement est à moins de quarante nanomètres de diamètre de dix autres événements. On obtient alors une seconde liste comportant la taille, le nombre d'évènements et la position de chacun des clusters.

**A**

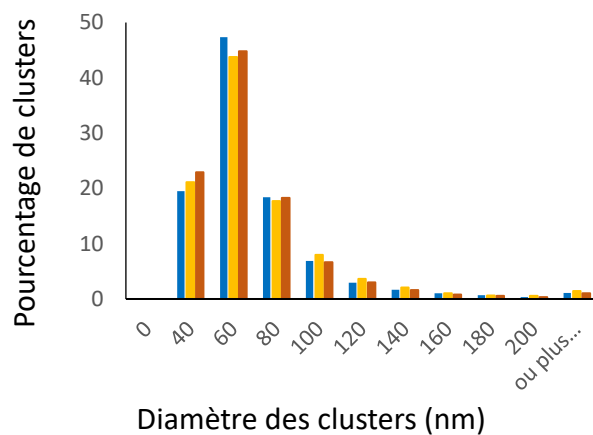
Poly-Lysine



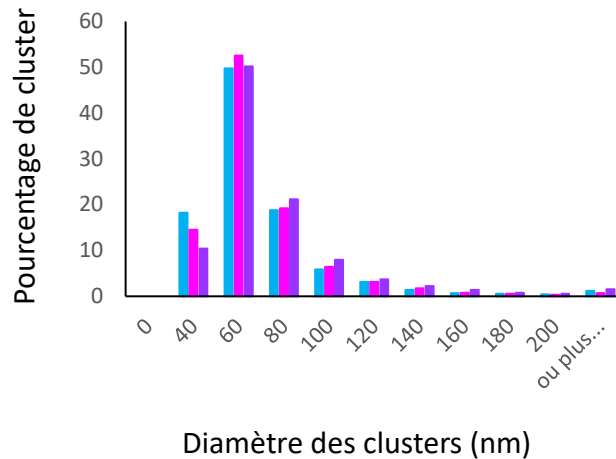
Phagocytose frustrée 1 min



Phagocytose frustrée 10 min

Carte des clusters  
Phagocytose frustrée 10 min**B**

**Figure 54. Organisation des clusters à la surface des cellules PLB-985 WT.** Les cellules ont été incubées sur des lamelles recouvertes de poly-lysine ou de complexe BSA/anti-BSA pendant une à dix minutes à 37°C. Elles ont par la suite été fixées puis marquées avec un anticorps anti-Nox2 (souris) puis un anti-souris A647 avant d'être visualisées en microscopie *d*STORM (x100). L'échelle représente trois micromètres. (A) Carte des localisations des évènements dans une cellule, dans chacune des conditions. Pour la condition phagocytose frustrée dix minutes, la carte des clusters dans cette cellule est également présentée. Sur la carte des clusters chaque point rouge correspond à un cluster. (B) Graphique représentant la répartition de la taille de l'ensemble des clusters présents dans les cellules. Le pourcentage de clusters ayant un diamètre donné dans les cellules adhérentes à la poly-lysine est représentée en bleu, les cellules en condition de phagocytose frustrée une minute sont représentées jaune et celles à dix minutes en orange. n= 11 cellules adhérentes sur de la poly-lysine (deux jours indépendants), n=8 cellules adhérentes en condition de phagocytose frustrée un minute et n=31 cellules en conditions de phagocytose frustrée dix minutes (trois jours indépendants).



**Figure 55. Taille des clusters à la surface des cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT.** Les cellules ont été incubées sur des lamelles recouvertes de poly-lysine ou de complexe BSA/anti-BSA pendant une à dix minutes à 37°C. Elles ont par la suite été fixées puis marquées avec un anticorps anti-Nox2 (souris) puis un anti-souris A647 avant d'être visualisées en microscopie dSTORM (x100). L'échelle représente trois micromètres. Le graphique représente la répartition de la taille de l'ensemble des clusters présents dans les cellules. Le pourcentage de clusters ayant un diamètre donné dans les cellules adhérentes à la poly-lysine est représenté en bleu, dans la condition phagocytose frustré une minute en rose, dans la condition phagocytose frustré dix minutes en violet. n=10 cellules adhérentes sur la poly-lysine (deux jours indépendants), n=12 cellules adhérentes en condition de phagocytose frustrée une minute (trois jours indépendants), n=10 cellules adhérentes en condition de phagocytose frustrée dix minutes (deux jours indépendants).



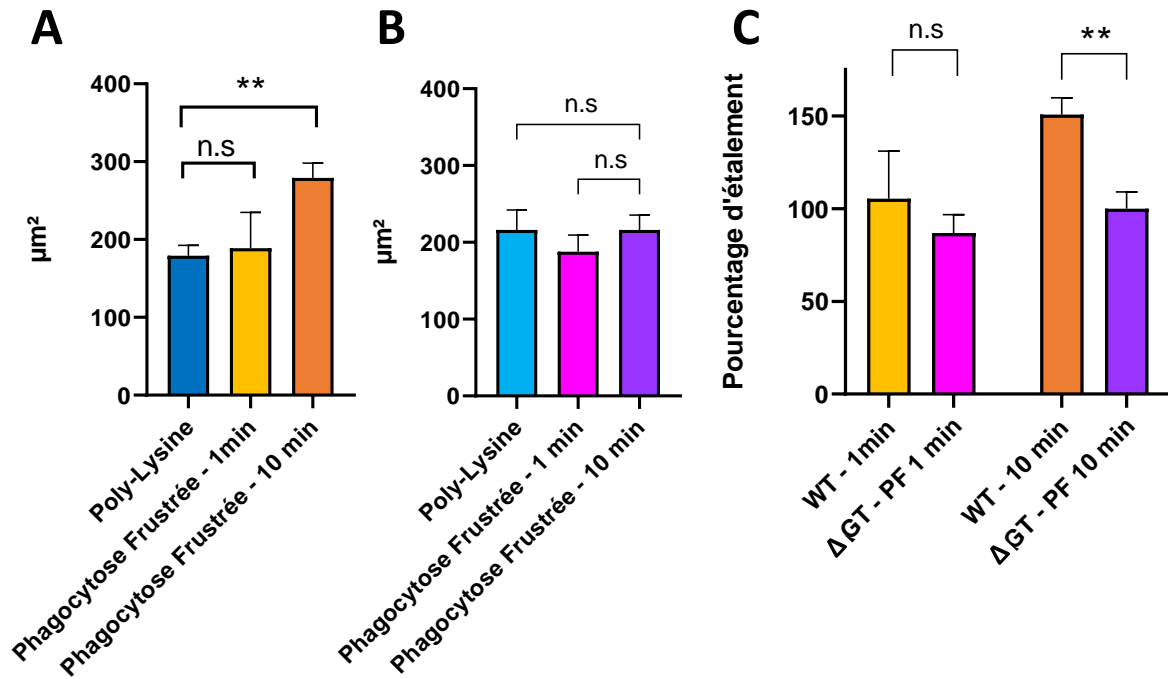
### Répartition des clusters

Visuellement lorsque l'on regarde la répartition des clusters de la protéine Nox2 à la surface des cellules, ils se répartissent de manière localisée. Bien que des zones de densité plus faible transparaissent, leur répartition semble équivalente dans les conditions testées. De plus aucun schéma caractéristique ne se dégage comme le montre la carte associée à la cellule après dix minutes de phagocytose frustré, où chaque cluster est représenté par un point rouge (Figure 54A).

### Taille des clusters

L'analyse DBSCAN nous indique que la taille moyenne des clusters de la protéine Nox2 dans les cellules PLB-985 WT est de  $60,5 \pm 7,1$  nanomètres de diamètre (écart-type) lorsqu'il s'agit des cellules adhérentes sur poly-lysine. Le diamètre moyen des clusters de la protéine Nox2 dans les cellules en condition de phagocytose frustrée, après une minute, est de  $66,2 \pm 10,5$  nanomètres et de  $63,6 \pm 17,25$  nanomètres après dix minutes (Figure 54B). La surface occupée par un cluster de 60 nm de diamètre est de  $2827 \text{ nm}^2$  tandis qu'une fois assemblé le complexe de la NADPH oxydase mesure entre 3 et  $10 \text{ nm}^{247}$ , ce qui lui confère une surface approximative de  $78,5 \text{ nm}^2$  (pour un diamètre théorique de 10 nm) soit trente-six fois moins que la surface du cluster. Il pourrait donc y avoir jusqu'à trente-six protéines Nox2 par cluster.

Pour savoir si la présence des sous-unités cytoplasmiques à la membrane influence la taille des clusters de la protéine Nox2, des cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup>  $\Delta$ GT ont été utilisées (Figure 55). Sans la protéine p47<sup>phox</sup> il n'y a plus de recrutement des protéines p40<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> à la membrane plasmique. C'est donc une condition similaire à celle des cellules adhérentes sur poly-lysine où la NADPH oxydase n'est pas activée et donc où les sous-unités cytoplasmiques ne sont pas recrutées à la membrane. Avec les cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup>  $\Delta$ GT la distribution de la taille des clusters est similaire à celle observée avec les cellules PLB-985 WT. La taille moyenne des clusters de la protéine Nox2 dans les cellules adhérentes sur poly-lysine est de  $58,3 \pm 11,5$  nanomètres de diamètre, dans les cellules adhérentes en condition de phagocytose frustrée après une minute min elle est de  $60,5 \pm 5,2$  et pour les cellules en condition de phagocytose frustrée après dix minutes elle est de  $64,13 \pm 8$  nanomètres de



**Figure 56.** Comparaison de l'étalement des cellules PLB-985 WT et des cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT. Les cellules ont été incubées sur des lamelles recouvertes de poly-lysine ou de complexe BSA/anti-BSA pendant une à dix minutes à 37°C. Elles ont par la suite été fixées puis marquées avec un anticorps anti-Nox2 (souris) puis un anti-souris A647 avant d'être visualisées en microscopie *d*STORM (x100). (A) La surface d'étalement des cellules PLB-985 WT est représentée en micromètre carré pour les trois conditions : cellules adhérentes à la poly-lysine (bleu), condition phagocytose frustré une minute (jaune), condition phagocytose frustré dix minutes (orange). Est représentée la moyenne  $\pm$  l'erreur standard moyenne.  $n=11$  cellules adhérentes sur de la poly-lysine (deux jours indépendants),  $n=8$  cellules adhérentes en condition de phagocytose frustré une minute min et  $n=31$  cellules en conditions de phagocytose frustré dix minutes (trois jours indépendants). (B) Surface d'étalements des cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT selon le même protocole que précédemment. Les cellules adhérentes à la poly-lysine sont représentées en bleu, la condition phagocytose frustré une minute en rose, la condition phagocytose frustré dix minutes en violet. Est représentée la moyenne  $\pm$  l'erreur standard moyenne.  $n=10$  cellules adhérentes sur la poly-lysine (deux jours indépendants),  $n=12$  cellules adhérentes en condition de phagocytose frustré une minute (trois jours indépendants),  $n=10$  cellules adhérentes en condition de phagocytose frustré dix minutes (deux jours indépendants). (C) Pourcentage de l'étalement des cellules PLB-985 WT et PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT lors de la phagocytose frustrée  $t=1$  min ou  $t=10$  min, par rapport à la surface d'étalement moyenne des cellules en condition poly-lysine. Les tests statistiques réalisés (A et B) sont des tests de Mann-Whitney (\*\*  $p=0,0013$ ) et pour C il s'agit d'un test de student (\*\*  $p=0,0032$ ).

diamètre. Cela indique que le recrutement des sous-unités cytoplasmique n'a pas d'influence sur le regroupement des clusters de la protéine Nox2 au plasmalemme lors de la phagocytose frustrée.

La taille des clusters dans les conditions contrôle montre que la protéine Nox2 est naturellement organisée en nano-clusters dont la taille n'évolue pas au cours de la phagocytose. Ces nano-clusters se répartissent dans la membrane sans suivre un schéma précis. Cette répartition aléatoire des clusters de la protéine Nox2 au niveau de la synapse phagocytaire permet d'imaginer un parallèle avec la synapse immunologique entre les thymocytes et les cellules du stroma où les thymocytes sont polarisés mais où les clusters de TCR sont répartis de manière aléatoire<sup>248</sup>.

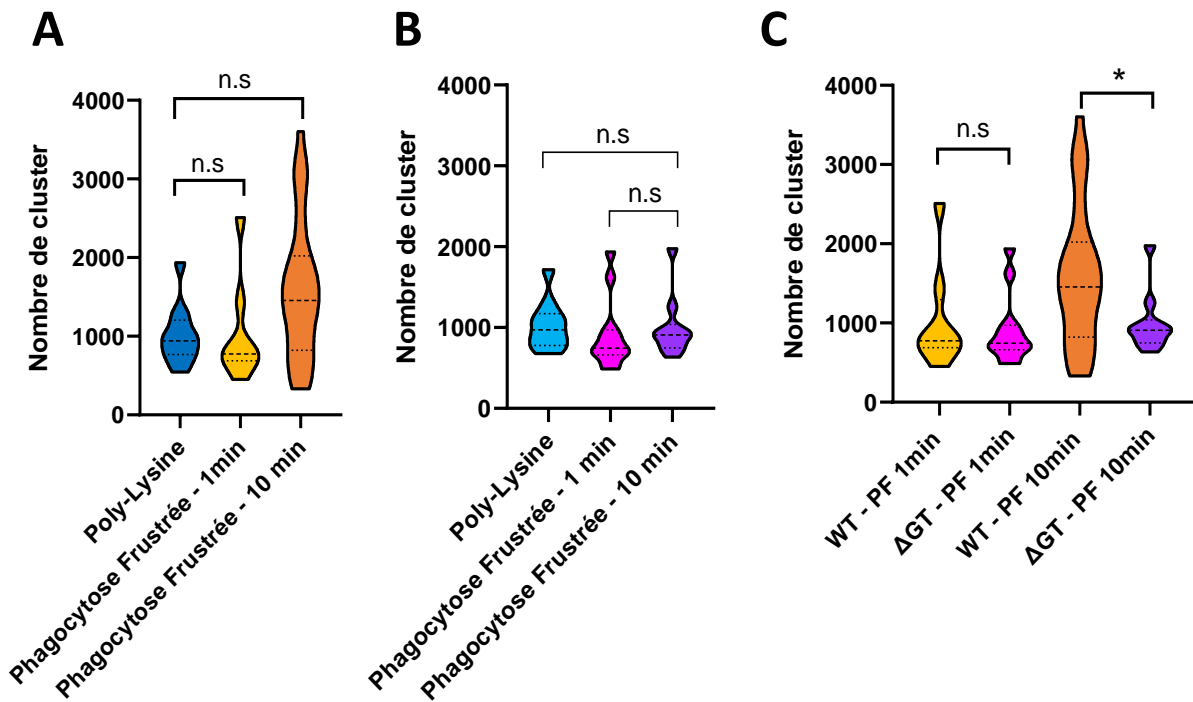
### **Analyse de l'étalement des cellules et du nombre de clusters à la membrane**

#### Mesure de l'étalement des cellules

Il n'y a pas de différences significatives d'étalement entre les cellules PLB-985 WT mises en condition de phagocytose frustrée au bout d'une minute ( $189 \mu\text{m}^2$ ) et celles déposées sur de la poly-lysine ( $179 \mu\text{m}^2$ ). En revanche après dix minutes de phagocytose frustrée, il y a une augmentation significative de la surface des cellules ( $270 \mu\text{m}^2$ ) comparativement à celles déposées sur poly-Lysine (Figure 56A). Lorsque l'on s'intéresse aux cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup>  $\Delta$ GT il n'y a pas de différence significative dans la surface d'étalements des cellules qui est de  $216 \mu\text{m}^2$  pour les cellules adhérentes sur poly-lysine, de  $188 \mu\text{m}^2$  après une minute de phagocytose frustrée et de  $216 \mu\text{m}^2$  après 10 minutes de phagocytose frustrée (Figure 56B). La comparaison de l'étalement relatif des cellules en condition de phagocytose frustrée après t=1 min ou t=10 min par rapport à l'étalement moyen des cellules en condition poly-lysine montre une augmentation significative de l'étalement des cellules PLB-985 WT (167,9%) par rapport aux cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup>  $\Delta$ GT (95%) après dix minutes de phagocytose frustrée (Figure 56C).

Cette expérience suggère un rôle de l'activation de la NADPH oxydase dans l'étalement des cellules lors de la phagocytose frustrée. Trois points appuient cette hypothèse. Tout d'abord dans les cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup>  $\Delta$ GT, où il n'y a pas d'activation de la NADPH oxydase, il n'y a pas de variation de l'étalement des cellules en fonction des conditions. De plus avec les PLB-985 WT l'étalement est significativement plus important après dix minutes de phagocytose





**Figure 57. Comparaison de la concentration des clusters à la surface des cellules PLB-985 WT et PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT.** Les cellules ont été incubées sur des lamelles recouvertes de poly-lysine ou de complexe BSA/anti-BSA pendant une à dix minutes à 37°C. Elles ont par la suite été fixées puis marquées avec un anticorps anti-Nox2 (souris) puis un anti-souris A647 avant d'être visualisées en microscopie dSTORM (x100). (A) Est représenté le nombre de clusters de la protéine Nox2 à surface des cellules PLB-985 WT pour les trois conditions en valeur absolu : cellules adhérentes à la poly-lysine (bleu), condition phagocytose frustré une minute (jaune), condition phagocytose frustré dix minutes (orange). Est représentée la moyenne ± l'erreur standard moyenne. n= 11 cellules adhérentes sur de la poly-lysine (deux jours indépendants), n=8 cellules adhérentes en condition de phagocytose frustrée une minute et n=31 cellules en conditions de phagocytose frustrée dix minutes (trois jours indépendants). (B) Nombre de clusters de la protéine Nox2 à la surface des cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT, selon le même protocole que précédemment. Les cellules adhérentes à la poly-lysine sont représentées en bleu, la condition phagocytose frustré une minute en rose, la condition phagocytose frustré dix minutes en violet. Est représentée la moyenne ± l'erreur standard moyenne. n=10 cellules adhérentes sur la poly-lysine (deux jours indépendants), n=12 cellules adhérentes en condition de phagocytose frustrée une minute (trois jours indépendants), n=10 cellules adhérentes en condition de phagocytose frustrée dix minutes (deux jours indépendants). (C) Comparaison du nombre de clusters de la protéine Nox2 à la surface des cellules PLB-985 WT et PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT lors de la phagocytose frustrée une minute ou dix minutes. Les tests statistiques réalisés sont des tests de Mann-Whitney (\* p=0,046).

frustrée (activation de la NADPH oxydase) comparativement à l'étalement des cellules adhérentes sur poly-lysine (pas d'activation de la NADPH oxydase). Enfin on constate un étalement relatif (surface d'étalement en condition de phagocytose frustrée divisé par la surface moyenne d'étalement en condition poly-lysine) significativement plus important des cellules PLB-985 WT par rapport aux cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT après dix minutes de phagocytose frustrée (72,9% de plus). Le rôle du complexe NADPH oxydase dans l'étalement des cellules pourrait être vérifié en empêchant le fonctionnement de la NADPH oxydase dans les cellules PLB-985 WT, en utilisant du diphenyleiodonium<sup>249</sup>.

#### Nombre de clusters à la membrane

Dans les cellules PLB-985 WT, il n'y a pas de différence significative quant au nombre de clusters de la protéine Nox2 entre les différentes conditions (Figure 57A). Cependant une hétérogénéité se manifeste au sein des cellules PLB-985 WT dans chacune des conditions où il semble constamment y avoir une population ayant entre 700 et 1100 clusters. Cette population représente six cellules sur les onze adhérentes en présence de poly-lysine (54%), quatre cellules sur les huit (50%) en condition de phagocytose frustrée une minute mais seulement cinq cellules sur les trente-et-une (16%) en condition de phagocytose frustrée dix minutes. A l'inverse après dix minutes de phagocytose frustrée, huit cellules sur trente-et-une (25%) expriment plus de 2000 clusters à leur surface alors qu'aucune des onze cellules adhérentes sur la poly-lysine ne présente autant de cluster à sa surface (le maximum étant de 1937 clusters) et qu'une seule des huit cellules en condition de phagocytose frustrée une minute atteint ce nombre. De même quinze cellules sur les trente-et-une (48%) en condition de phagocytose frustrée dix minutes présentent plus de 1500 clusters à leur surface quand seulement une seule cellule dépasse ce seuil dans chacune des deux autres conditions.

Dans les cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT (Figure 57B) les populations présentes sont sensiblement les mêmes que dans les cellules PLB-985 WT. Ainsi six cellules adhérentes sur poly-lysine sur dix (60%) ont entre 700 et 1100 clusters à leur surface. Cette population représente 50% des cellules en condition de phagocytose frustrée une minute et 63% des cellules en condition de phagocytose frustrée dix minutes. Seule une cellule a plus de 1500 clusters à sa surface pour les cellules adhérentes sur poly-lysine comme pour les cellules en



condition de phagocytose frustrée dix minutes. Pour les cellules en condition de phagocytose frustrée une minute se sont deux cellules sur douze (16%) seulement qui ont plus de 1500 clusters à leur surface.

La comparaison des résultats obtenus avec les cellules PLB-985 WT et avec les cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT révèle une augmentation significative de la quantité de clusters à la membrane plasmique dans les cellules PLB-985 WT après dix minutes de phagocytose frustrée par rapport aux cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT (Figure 57C).

Comme observé en microscopie confocale lors de la phagocytose de particule de ZO par les PLB-985 X-CGD GFP-Nox2, il y a bien une accumulation de la protéine Nox2 après dix minutes de phagocytose frustrée dans les cellules PLB-985 WT. L'hétérogénéité du nombre de cluster présent à leur surface pourrait s'expliquer par les travaux montrant qu'au sein d'une population de neutrophiles seul une moitié est capable de phagocyter de prime abord<sup>167,250</sup>. Concernant l'absence d'augmentation du nombre de cluster après dix minutes de phagocytose frustrée dans les cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT par rapport aux cellules PLB-985 WT (Figure 57), il est possible que cela soit dû à l'absence de production de FRO. En effet, comme déjà précisé, l'absence de la protéine p47<sup>phox</sup> dans les cellules se traduit par une absence de translocation des sous-unités cytoplasmiques à la membrane et donc une absence d'activation de la NADPH oxydase. Cette expérience laisse donc penser que la présence de la protéine p47<sup>phox</sup> au plasmalemme avec les autres sous-unités cytoplasmiques est nécessaire pour le recrutement de la protéine Nox2 à la membrane plasmique lors de la phagocytose frustrée. Puisque ce recrutement implique une fusion des endosomes avec le phagosome (chapitre deux), ces résultats suggèrent un mécanisme de fusion dépendant des FRO. La diminution de cette fusion des endosomes avec la membrane plasmique en phagocytose frustrée pourrait également expliquer la différence d'étalement après dix minutes de phagocytose frustrée dans les cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT par rapport aux cellules PLB-985 WT du fait de contraintes mécaniques (Introduction – Chapitre deux).



Troisième partie

Discussion



Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées au site de l'inflammation, qu'elle soit stérile ou infectieuse. L'une de leur réponse la plus étudiée concerne la production de FRO par la NADPH oxydase. A l'aide du modèle de cellules *neutrophil-like* PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 on s'est intéressé à la dynamique de la protéine Nox2 (la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase) lors de la phagocytose. Tout d'abord nous avons caractérisé ce modèle cellulaire en évaluant le taux de phagocytose et la production de FRO. Puis nous avons étudié la présence de la protéine GFP-Nox2 dans des structures vésiculaires cytoplasmiques mobilisables durant la phagocytose. Notre étude suggéra qu'au moins une partie de ces structures sont des endosomes précoces et de recyclage contenant Nox2. En poursuivant nos investigations, nos résultats indiquèrent que ces endosomes fusionnent avec le phagosome lors de la phagocytose, expliquant la disparition des structures vésiculaires observées. De plus notre modèle a permis la mise en évidence d'une accumulation de la protéine GFP-Nox2 au phagosome dès sa fermeture, suggérant l'apport de la protéine Nox2 au phagosome par les endosomes. Nos expérimentations ont montré que la protéine IQGAP1 ne semble impliquée ni dans la phagocytose ni dans la mobilité de la protéine Nox2 lors de la phagocytose de levure DCFH<sub>2</sub> recouvertes d'opsonines. Enfin les travaux menés en microscopie super-résolution indiquèrent que la protéine Nox2 se présente sous forme de clusters. Le nombre de ces clusters augmente lors de la phagocytose frustrée. Cette augmentation serait dépendante de la formation d'un complexe actif avec les sous-unités cytosoliques. En effet, dans les cellules déficientes pour la protéine p47<sup>phox</sup> (où il n'y a pas d'assemblage de la NADPH oxydase) le nombre de clusters de protéines Nox2 reste stable au cours de la phagocytose.

Après discussion de la pertinence de notre modèle, on abordera les différentes localisations possibles de la protéine Nox2 dans nos cellules. On discutera ensuite du trafic de la protéine Nox2 vers et depuis le phagosome ainsi que des mécanismes responsables de ce trafic. Pour finir nous reviendrons sur l'organisation en cluster de la protéine Nox2 et sur les mécanismes permettant son recrutement en phagocytose frustrée.





### **Pertinence du modèle cellulaire PLB-985 X-CGD GFP-Nox2**

La caractérisation des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 a montré qu'elles ont une cinétique de production de FRO différente des cellules PLB-985 WT. Elles produisent autant de FRO que les cellules PLB-985 WT en présence de PMA mais cette production est moins intense et s'étale sur douze heures. De plus elles phagocytent moins efficacement que les cellules PLB-985 WT ce qui pourrait être en lien avec cette modification de la cinétique de production de FRO.

#### Rôle de la séquence de liaison dans la production de FRO

La différence de cinétique de production de FRO pourrait s'expliquer par la présence des onze acides aminés entre la protéine GFP et la protéine Nox2. Des résultats préliminaires obtenus par nos soins avec une séquence de liaison plus longue entre la protéine Nox2 et la protéine fluorescente suggèrent l'importance de ce paramètre dans la cinétique de production des FRO. La structure de la protéine Nox5 (un homologue de la protéine Nox2) montre que si la séquence de liaison entre la protéine Nox2 et la protéine fluorescente est trop courte, cela risque d'interférer avec la partie cytoplasmique de la protéine où se trouvent les sites de fixation du FADH et du NADPH<sup>158,251</sup> ou avec la fixation des sous-unités cytoplasmiques. La partie C-terminale de la protéine Nox2 interagit avec la protéine p22<sup>phox</sup><sup>252</sup> ce qui pourrait expliquer la difficulté d'obtenir une protéine de fusion fonctionnelle lorsque la protéine fluorescente se trouve en C-terminal. Cependant les travaux menés par von Löhneysen *et al.*<sup>253</sup> montrent que même l'ajout d'une courte séquence comme l'épitope V5 (GKPIPPLLGLDST) en N-terminal de la protéine Nox2 suffit à fortement diminuer la production de FRO laissant supposer que l'encombrement spatial n'est pas le seul paramètre impliqué.

Une revue de Chen *et al.*<sup>232</sup> portant sur l'importance de la taille et de la composition des séquences de liaison, indique que plus la taille de la séquence de liaison entre deux protéines est grande plus la cytotoxicité de la protéine de fusion est faible, son activité biologique importante et son repliement facilité.



### Phagocytose des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2

Les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 phagocytent 80% moins que les cellules PLB-985 WT mais leur taux de phagocytose n'est pas significativement différent de celui des cellules PLB-985 Nox2<sup>-/0</sup> dont elles sont issues. Cette différence avec les cellules PLB-985 WT coïncide partiellement avec les résultats obtenus avec les neutrophiles de patients ne produisant pas de FRO (car souffrant de granulomatose septique chronique) dont le taux de phagocytose des neutrophiles est inférieur de 20% par rapport au taux de phagocytose de neutrophiles de personnes saines lors de la phagocytose de bactéries *Staphylococcus aureus* recouvertes d'opsonines<sup>231</sup>. Ces résultats suggèrent un lien entre phagocytose et production de FRO. En effet Fialkow *et al.* ont montré dans les neutrophiles que cette absence de FRO provoque une absence d'interaction entre les récepteurs FcγRIIIa et FcγRIIIb ce qui entraîne une diminution de la phagocytose FcγRIIIa dépendante<sup>233</sup>. De plus Gresham *et al.* ont mis en évidence qu'une absence de lactoferrine, d'anion superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène provoquait une absence d'amplification de la phagocytose, diminuant le nombre de proie par phagocyte<sup>234</sup>. Dans nos cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 il y a une réexpression de la protéine Nox2, on s'attendrait donc à un taux de phagocytose plus élevé que celui des cellules PLB-985 Nox2<sup>-/0</sup>. Au vu de la cinétique de production de FRO des cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 en présence de PMA, on peut émettre l'hypothèse que lors de la phagocytose il y a aussi une production retardée de FRO, mimant le phénotype des neutrophiles de patient atteint de granulomatose septique chronique. Cette production de FRO durant la phagocytose serait à évaluer avec des levures liées à du DCFH<sub>2</sub><sup>254</sup>. Les FRO n'étant pas en concentration suffisante à un instant donné, ils ne favoriseraient plus la phagocytose.

Pour prouver que c'est bien la diminution de FRO qui explique la différence de phagocytose observée, il faudrait réexprimer la protéine Nox2 sans la GFP dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 et regarder si ce déficit de phagocytose perdure. De même on devrait alors voir une cinétique de production de FRO similaire à celle des cellules PLB-985 WT.

### Utilisation de l'interféron gamma

Afin de pallier ce déficit de phagocytose des cellules, nombre des expériences ont été réalisées avec des cellules pré-activées avec de l'interféron gamma. De prime abord l'utilisation d'interféron peut sembler artificielle dans notre cadre d'étude car c'est une



molécule associée aux infections virales et aux cellules *Natural killer* qui participent à la lutte contre les pathogènes intracellulaires. Cependant sa présence lors des infections bactériennes<sup>255</sup>, lors des « tempêtes » cytokiniques qui surviennent lors d'un choc septique<sup>256</sup> ou d'une infection virale<sup>257</sup>, ainsi que son utilisation en thérapeutique<sup>258</sup> sont autant de contexte où les neutrophiles sont susceptibles d'être activés par cette molécule ce qui justifie d'un point de vue physiologique son utilisation.

### **Compartiments subcellulaire contenant la protéine Nox2**

Comme précédemment mentionné, notre attention s'est concentrée sur une autre particularité entrevue lors de la caractérisation des cellules. La protéine Nox2 se trouve dans des vésicules cytoplasmiques alors que ces cellules ne possèdent pas de granules spécifiques ou de granules à gélatinase. Or se sont eux qui ont été décrits dans les neutrophiles comme contenant la protéine Nox2 dans le cytoplasme<sup>259</sup>. De plus les vésicules observées semblent disparaître lors de la phagocytose suggérant leur mobilisation. Dans les macrophages et les cellules dendritiques la protéine Nox2 est associée aux endosomes<sup>260,243,223</sup>. Dans les macrophages murins ces endosomes fusionnent avec le phagosome contribuant à son enrichissement en protéine Nox2<sup>261</sup> tandis que dans les cellules dendritiques cette fusion est importante pour la mise en place de la présentation antigénique<sup>235</sup>. Ces éléments ont permis d'émettre l'hypothèse que les vésicules présentes dans notre modèle correspondent à des endosomes qui fusionnent avec le phagosome durant la phagocytose.

#### Endosomes et protéine Nox2

On observe une colocalisation partielle entre la protéine Nox2 et les endosomes précoces ou de recyclage dans nos cellules modèles ou dans les neutrophiles humains. Cette colocalisation s'observe dans les cellules au repos ou lors de la phagocytose de particules de ZO. Dans notre modèle, il n'y a pas de granules à gélatinase donc la protéine Rab11 ne peut y être associée<sup>174</sup> elle est donc uniquement un marqueur des endosomes de recyclage. Cela nous permet d'affirmer que se sont bien ces endosomes qui sont mis en évidence dans notre expérience. On observe que lors de la phagocytose, les endosomes se retrouvent à proximité de la membrane du phagosome, suggérant une fusion des endosomes avec le phagosome. Cela concorde avec les résultats de Perskvist *et al.* qui observent la protéine Rab5a, dont la protéine effectrice est EEA1, au phagosome en présence de bactéries recouvertes d'opsonines



dans des neutrophiles humains<sup>262</sup>. Cependant Minakami *et al.* ont détecté la protéine EEA1 mais pas la protéine Rab5 au phagosome dans des conditions similaires aux nôtres<sup>263</sup>. Il pourrait être intéressant de regarder Rab5a dans notre modèle avec le même anticorps que Perskvist *et al.* ou d'utiliser la même protéine de fusion que Minakami *et al.* afin de confirmer nos observations. Pour terminer ce travail il faudrait regarder si la protéine Nox2 est présente dans les endosomes tardifs dans les neutrophiles, ce qui n'est pas le cas dans les macrophages<sup>223</sup>.

Autre point important, il faut déterminer si la protéine Nox2 est activement adressée aux endosomes précoces puis de recyclage ou s'il s'agit d'une endocytose non sélective. Du fait de l'importance des FRO comme molécules de signalisation, la présence de la protéine Nox2 dans les compartiments intracellulaires est de plus en plus étudiée<sup>233</sup>. C'est ainsi que des travaux ont montré que dans des lignées de cellules épithéliales humaines, une fois la protéine interleukine-1 bêta fixée sur son récepteur, il y a fixation des protéines Rac1 et MyD88. La protéine Rac1 favorise le recrutement de la protéine Nox2 tandis que la protéine MyD88 favorise l'endocytose de cet ensemble<sup>264</sup>. On peut imaginer que dans les neutrophiles la protéine Rac2 joue un rôle similaire associée à d'autres récepteurs.

#### Evaluation de la colocalisation

Avant d'estimer si deux protéines colocalisent il est tout d'abord important de différencier la co-occurrence qui correspond à la superposition de deux protéines dans un endroit donné, de la corrélation qui indique une distribution similaire dans toute la cellule<sup>265</sup>. L'évaluation de la corrélation entre deux protéines a été faite grâce au calcul du coefficient de corrélation de Pearson (CCP) (voir matériel et méthode). Dans notre cas les résultats du calcul du CCP indiquent une corrélation entre nos protéines. Il aurait aussi été possible de comparer nos résultats avec un coefficient de Pearson obtenus avec un contrôle positif. Cela aurait pu être la chaîne  $\alpha 5$  des intégrines qui est connue pour être recyclée par les endosomes dans les neutrophiles<sup>266</sup>.

Pour déterminer la co-occurrence soit la superposition des deux protéines au niveau d'une structure intracellulaire, nous avons réalisé des profils d'intensités (*plot profil*) et utilisé la technique « *object-based method* » présente dans le plugin d'ImageJ « JACoP ». Cette dernière permet de déterminer la position des centroïdes (centre géométrique) des objets





dans chaque image après segmentation. Si la distance entre deux centroïdes est inférieure à la distance de résolution alors les deux objets colocalisent<sup>267</sup>.

Le calcul du CCP et l'utilisation de deux autres techniques puissantes pour déterminer la co-occurrence (*object-based method* et les profils d'intensité) légitiment nos résultats, confirmant que la protéine Nox2 colocalise bien avec les endosomes précoces et de recyclage.

### **Trafic de la protéine Nox2 dans les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2**

On a ensuite suivi la protéine GFP-Nox2 dans nos cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 lors de la phagocytose de particules de ZO afin de savoir si elle s'accumulait au phagosome.

#### Accumulation de la protéine Nox2 au phagosome

Dans notre modèle on observe une accumulation de la protéine GFP-Nox2 au phagosome qui commence dès sa fermeture et qui est significative après une minute de phagocytose. Cette accumulation dure pendant au moins vingt minutes avec une augmentation de la fluorescence au phagosome d'un facteur 1,7 par rapport à la membrane plasmique. L'une des sources de cette accumulation pourrait être les endosomes précédemment identifiés. Cependant en inhibant SNAP-23 (avec une construction tat-SNAP-23), une protéine SNARE notamment impliquée dans la fusion des granules ou des endosomes avec le phagosome<sup>268</sup>, Uriarte *et al.* observent une diminution de seulement 60% de la production de FRO lors de la phagocytose dans les neutrophiles humains<sup>269</sup>. Outre les protéines Nox2 présentes à la membrane plasmique à l'endroit où se forme le phagosome, cela suggère l'implication d'autres sources de Nox2. Dans les neutrophiles la protéine Nox2 pourrait provenir du réticulum endoplasmique car d'après Guernonprez *et al.* dans les cellules dendritiques de souris il fusionne avec le phagosome en cours de formation ou nouvellement formé<sup>270</sup>. Une autre hypothèse est l'existence d'un trafic entre l'appareil de Golgi et le phagosome comme observé dans les macrophages murins<sup>271,272</sup>. Une manière de vérifier ses suppositions serait de regarder si l'on retrouve les mêmes marqueurs du réticulum endoplasmique (calnexine) ou de l'appareil de Golgi (acide sphingomyelinase ou PKCε) au phagosome dans nos cellules.

Avant de tester ces hypothèses, il pourrait être intéressant de créer une nouvelle lignée stable avec une autre protéine fluorescente associée à la protéine Nox2. En effet, lors du suivi



de la protéine Nox2 durant la phagocytose, la protéine GFP-Nox2 a été fortement impactée par le phénomène de photoblanchiment. Ce phénomène a dû être accéléré par le fait que la protéine GFP est sensible à une acidification du milieu, ce qui doit être localement le cas lors de l'oxydation du NADPH. Une solution serait de la remplacer par la protéine mKO2<sup>273</sup> ou mCherry2<sup>274</sup> qui sont issues de protéines moins sensibles à l'acidification du milieu mais possédant du reste des propriétés physiques similaires<sup>275</sup>.

Dans cette expérience, deux questions restent en suspens. La première concerne le devenir de la protéine Nox2 au phagosome et la seconde la proportion de protéine Nox2 apportée par chacune des voies au phagosome.

#### Recyclage des composés du phagosome

Les conditions dans lesquelles l'accumulation de la protéine Nox2 est observée ne permettent pas de déterminer s'il y a un trafic de la protéine Nox2 depuis le phagosome comme cela a pu être observé dans les macrophages<sup>276,277</sup>. En effet Damiani *et al.* et Pitt *et al.* montrèrent que le contenu du phagosome est recyclé et que des vésicules englobant son contenu se forment et gagnent ensuite les autres régions de la cellule. Pour mettre ce phénomène en évidence ils utilisèrent plusieurs méthodes :

- La radioactivité puis la séparation des différents compartiments par gradients de densité pour détecter les compartiments radioactifs
- La microscopie électronique après marquage de la proie avec des particules d'or ou des immunoglobulines marquées avec du *Texas Red*.

Pour déterminer si la protéine Nox2 est recyclée lors de la phagocytose, il faudrait disposer de cellules PLB-985 exprimant une version étiquetée de la protéine Nox2 avec une protéine photo-activable tel mEos3.2 ou mEos4b. Il s'agit de protéines vertes qui peuvent fluorescer dans le rouge suite à une illumination à 405 nm<sup>278,279</sup>. Les protéines de fusion présentes au phagosome pourraient être stimulées à 405 nm et leur devenir dans la cellule serait alors observé.

#### Rôle de chacune des voies dans l'apport de Nox2

Afin de déterminer précisément la part des granules et des autres voies dans l'apport de la protéine Nox2 au phagosome dans les neutrophiles, il faudrait posséder des neutrophiles



humains exprimant une protéine de fusion mKO2-Nox2 pour quantifier l'accumulation totale de la protéine Nox2 au phagosome. Ceci fait, il faudrait supprimer spécifiquement les granules spécifiques et à gélatinase en « recréant » une maladie, la déficience en granule spécifique des neutrophiles, où les granules spécifiques et à gélatinase ne sont pas présents<sup>280</sup>. Cette maladie est due à une mutation dans le gène codant pour la protéine C/EBP- $\epsilon$ . On pourrait donc recréer la mutation ou peut-être supprimer l'expression du gène grâce à la technique de CRISPR/Cas9. En utilisant une des protéines photo-convertible décrites précédemment dans ces cellules, on pourrait déterminer :

- l'accumulation de la protéine Nox2 sans les granules (et donc déduire l'apport des granules)
- La part de la membrane dans l'apport de la protéine Nox2 au phagosome. En photo-convertissant les protéines mEos4b-Nox2 de la membrane avant la phagocytose on pourrait différencier la contribution des compartiments cytoplasmiques de celle de la membrane.

La question du modèle cellulaire à utiliser est plus délicate car on doit avoir une différenciation parfaite et similaire à celle qui se déroule chez l'homme. Les cellules iPS sont un modèle intéressant mais le rendement (entre 20 et 50x10<sup>6</sup> cellules iPS permettent l'obtention de 1x10<sup>6</sup> neutrophiles) et le temps pour les générer (vingt-cinq jours)<sup>217</sup> constitue un obstacle à leur utilisation.

### **Influence de la protéine IQGAP1 sur le recrutement de la protéine Nox2**

Après avoir vu une accumulation au phagosome de la protéine GFP-Nox2 dans nos cellules PLB-985 GFP-Nox2 on a voulu influencer la quantité de cette protéine au phagosome. Pour ce faire on ciblait la protéine IQGAP1. La protéine IQGAP1 est avant tout une protéine organisatrice du cytosquelette d'actine. Grâce à sa liaison à la protéine CLIP1 (*CAP-GLY domain containing linker protein 170*) elle est aussi capable de lier les microtubules ce qui en fait un acteur important dans les zones de fortes réorganisations du cytosquelette<sup>281</sup>. Les endosomes se déplaçant à l'aide du réseau de tubuline et d'actine<sup>282</sup>, inhiber l'expression de la protéine IQGAP1 paraissait être un bon moyen pour limiter l'accumulation de la protéine Nox2 au phagosome.



Nos observations montrent une colocalisation entre les protéines IQGAP1 et Nox2 dans nos cellules PLB-985 ou dans les neutrophiles que cela soit durant la phagocytose ou dans les cellules non stimulées. De plus la protéine GFP-GFP-IQGAP1 s'accumule à la coupe phagocytaire. Cependant l'inhibition de l'expression de la protéine IQGAP1 par des siARN n'entraîne pas de différence de taux de phagocytose de particules de ZO contrairement à ce qui se passe dans les macrophages murins<sup>172</sup>. De même l'inhibition de la protéine n'a pas d'effet sur la production de FRO au sein du phagosome ou en présence de PMA. Une possibilité est qu'il existe des mécanismes compensatoires nous empêchant d'observer le rôle de la protéine IQGAP1. Ainsi une telle hypothèse a déjà été émise dans le cas des neurones murins où les protéines IQGAP2 et/ou IQGAP3 sont soupçonnées de compenser la suppression de la protéine IQGAP1<sup>283</sup>. Cette hypothèse est d'autant plus crédible que la protéine IQGAP2 est exprimée dans les neutrophiles<sup>284</sup> (rien n'indique l'expression de la protéine IQGAP3). Afin de déterminer si les protéines IQGAP1/2 affectent la phagocytose et l'apport de la protéine Nox2 au phagosome dans les neutrophiles, les expériences devraient être réalisées avec des siARN dirigés contre les deux protéines IQGAP présentes dans les neutrophiles (IQGAP1 et IQGAP2). Il serait aussi intéressant de regarder l'interaction de la protéine Nox2 avec ces deux protéines par immunoprécipitation dans nos cellules.

### **La synapse phagocytaire**

La synapse phagocytaire (qui est une forme de synapse immunologique) correspond à l'interface entre la proie et le neutrophile lors de la formation de la coupe phagocytaire. On a souhaité regarder l'organisation moléculaire de la protéine Nox2 à la synapse phagocytaire et l'évolution de celle-ci au cours de la phagocytose.

#### Comparaison avec les autres synapses immunologiques

Du fait de son apparition précoce au cours de l'évolution, la synapse phagocytaire est le prototype de toutes les synapses immunologiques<sup>285</sup>. De fait les mêmes mécanismes sont impliqués dans la formation de la synapse immune dans les différentes cellules<sup>227</sup>. Cependant le neutrophile est resté peu étudié et ses spécificités inexplorées alors que la comparaison avec les lymphocytes T cytotoxiques et leurs granules semble pertinente. Si l'on se concentre sur les liens existants avec nos expériences, l'étude des travaux réalisés sur les lymphocytes T indique que la protéine IQGAP1 est impliquée dans la mise en place de la synapse





immunologique dans les lymphocytes T cytotoxique<sup>286</sup>. De plus, une voie apportant directement les molécules spécifiques des granules de ces cellules (perforine, granzyme) depuis l'appareil de Golgi a été mise en évidence tout comme la fusion polarisée des lysosomes<sup>286</sup> et des endosomes<sup>287</sup> durant la durée de vie de la synapse.

Concernant la présence de la protéine Nox2 dans les synapses immunologiques, elle se retrouve dans plusieurs types de synapses. Elle est notamment présente dans celle qui nous intéresse, la synapse phagocytaire. Elle est aussi impliquée dans une autre synapse qui se forme lors de contact entre les neutrophiles et les lymphocytes T, où la protéine Nox2 permet l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T<sup>288</sup>. Cependant personne ne s'est intéressé à l'organisation de la protéine Nox2 à l'échelle moléculaire dans ces synapses, alors qu'il serait intéressant de comparer leur organisation. Le meilleur moyen pour étudier l'organisation de la synapse phagocytaire reste d'utiliser la phagocytose frustrée. Cette méthode couramment utilisée à l'avantage d'entraîner l'étalement de la cellule sur une lamelle permettant l'observation de son organisation au microscope<sup>131,119</sup>.

#### Taille et rôle des clusters de la protéine Nox2

Nous avons observé que la protéine Nox2 était présente sous forme de clusters dans chacune des conditions observées. Les clusters de la protéine Nox2 ont tous une taille moyenne de soixante nanomètres de diamètre et ce, même dans les cellules n'exprimant pas la protéine p47<sup>phox</sup>. Or la protéine p47<sup>phox</sup> est responsable de l'adressage des sous-unités cytoplasmiques à la membrane, indiquant que l'absence des sous-unités cytoplasmiques ne modifie pas la taille des clusters de la protéine Nox2. Cette taille est dans le même ordre de grandeur que la taille des clusters de la majorité des protéines présentes à la membrane plasmique<sup>289</sup>. Si on la compare avec celle d'autres protéines transmembranaires impliquées dans l'immunité comme la chaîne  $\zeta$  de la molécule CD3 (le co-récepteur du TCR) celle-ci forme, au repos, des clusters de cinquante-quatre nanomètres tandis qu'une fois activée la taille des clusters est de cent quatre-vingt-cinq nanomètres de diamètres<sup>290</sup>. La différence majeure entre les deux protéines semble donc être l'absence de modification de la taille des clusters lors de l'activation de la NADPH oxydase.

Dans leur revue, Garcia-Parajo *et al.* avancent plusieurs hypothèses pour expliquer l'organisation en nano-clusters des protéines dans la membrane (dans notre cas de la protéine



Nox2)<sup>289</sup>. Cela pourrait servir à augmenter localement la disponibilité de la protéine Nox2. Lorsque ses partenaires cytoplasmiques se décrochent ils pourraient ainsi rapidement se raccrocher à une autre sous-unité Nox2. En effet la probabilité qu'un ligand se raccroche après s'être décroché correspond à la densité de site de liaison possible au carré. Ces nano-clusters pourraient aussi permettre lorsque l'on somme les signaux produits de provoquer un signal suffisamment fort pour initier une cascade de signalisation. Autre possibilité, quelque peu liée aux précédentes, une organisation en cluster favorise l'activation du complexe. Dans le cas de la NADPH oxydase, la production des PIP3 nécessaire à son activation est alors plus locale que si les protéines étaient indépendantes les uns des autres ce qui doit faciliter la signalisation. De la même manière les cytochromes  $b_{558}$  étant rassemblés à certains endroits de la membrane, leur phosphorylation est plus aisée que s'ils étaient distribués dans toute la membrane.

#### Importance des FRO dans l'étalement des cellules

Les cellules PLB-985 WT sont significativement plus étalées après dix minutes en condition de phagocytose frustrée que lorsqu'elles sont adhérentes sur de la poly-lysine, contrairement aux cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup>  $\Delta$ GT. Une comparaison de la condition phagocytose frustrée dix minutes entre les deux types cellulaires montre aussi que les cellules PLB-985 WT sont 72,9% plus étalées (étalement relatif) que les cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup>  $\Delta$ GT. L'absence de la protéine p47<sup>phox</sup> dans les cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup>  $\Delta$ GT s'accompagne d'une absence de protéine p67<sup>phox</sup> à la membrane puisqu'elle ne peut s'y rendre seule, il n'y a donc pas de production de FRO par la NADPH oxydase. On en déduit que les FRO pourraient contribuer à l'étalement des cellules en activant la PKC. Dans leur revue, Wu *et al.* évoquent le lien entre production de FRO et activation de la protéine PKC qui participe à l'étalement des cellules musculaires en interagissant avec les intégrines<sup>291</sup>. Ce lien entre FRO et intégrines a aussi été mis en évidence dans les fibroblastes murins par Taddei *et al.*<sup>292</sup> mais dans notre cas ce serait plutôt l'action des FRO dans l'engagement des récepteurs Fc $\gamma$  qui serait impliqué.

#### Importance des FRO dans le recrutement de la protéine Nox2 à la membrane plasmique

Après dix minutes de phagocytose frustrée, il y a significativement plus de clusters de la protéine Nox2 à la surface des cellules PLB-985 WT comparativement aux cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup>  $\Delta$ GT. Les FRO semblent donc impliqués dans l'augmentation du nombre de clusters de



la protéine Nox2 dans les cellules PLB-985 WT comparativement aux cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup>  $\Delta$ GT.

Une hypothèse pour expliquer cette augmentation du nombre de cluster (donc de protéine Nox2) à la surface des cellules est que les FRO induisent l'exocytose des endosomes. Différents articles suggèrent une telle possibilité. Les FRO produits dans les cellules PLB-985 WT pourraient oxyder la protéine PTEN ce qui l'inactive favorisant la voie de la protéine PI3 Kinase. Cela a été démontré dans des lignées de neuroblastomes humains par Seo *et al.*<sup>293</sup>. Cette activation de la voie de la PI3 Kinase permettrait l'exocytose des vésicules se trouvant dans la voie de recyclage rapide des endosomes dans les macrophages comme l'ont évoqué Chiergatti *et al.*<sup>294</sup> dans leur revue. Cette hypothèse est renforcée par le fait que ces endosomes se distinguent par la présence de la protéine Rab35<sup>295</sup> que l'on retrouve également à la synapse immunologique dans les lymphocytes T et qui est nécessaire à sa formation<sup>296</sup>. De plus les FRO, en inactivant des PTP phosphatases (DUSP, PTP1B), permettent le maintien de la protéine ERK phosphorylée<sup>297</sup>. S'il en va de même dans notre système, cette activation de la protéine ERK pourrait activer la protéine ARF6, l'un des acteurs nécessaires à la voie lente de recyclage des endosomes comme indiqué par Robertson *et al.* dans les cellules épithéliales<sup>298</sup>. Cela conduirait à une exocytose des vésicules situées dans la voie lente de recyclage des endosomes (voie symbolisée par la protéine Rab11) et corroborerait nos observations d'immunofluorescence.

Afin de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses, il faudrait suivre le nombre de cluster de la protéine Nox2 présent à la surface des cellules après dix minutes de phagocytose frustrée dans des cellules PLB-985 WT exprimant un mutant des protéines ARF6 ou de Rab35<sup>299,300</sup>. Cela inhiberait les voies de recyclage des endosomes et permettrait de mesurer leur implication dans l'augmentation du nombre de cluster de la protéine Nox2.

#### Développement et limites du dSTORM

Le dSTORM et la super-résolution en général sont des outils puissants permettant une résolution fine de l'organisation protéique. Cependant leur relative nouveauté, fait que ce sont des outils manquants d'une procédure d'acquisition et d'analyse standardisée. Une des limites de notre montage est l'utilisation du TIRF en configuration HILO (*highly inclined and laminated optical sheet microscopy*). En HILO on ne se place pas qu'à la membrane plasmique



car on observe la cellule avec une illumination oblique. Cela ne permet pas de différencier les vésicules présentes sous la membrane plasmique du plasmaleme lui-même. Une des manières d'améliorer le montage serait d'utiliser la technologie du *Supercritical Angle Fluorescence*<sup>301</sup> (qui permet de différencier la membrane du cytoplasme) ou la microscopie électronique qui est aussi suffisamment résolutive pour observer la différence entre endosomes sous membranaires et membrane plasmique.

Afin d'améliorer la détection du signal lorsque la densité des fluorophores est trop forte, de s'affranchir des choix de paramètres dépendants du manipulateur lors de la détection des clusters, et d'obtenir une seconde méthode pour comparer les résultats obtenus, un nouveau protocole d'analyse est actuellement en cours de mise en place, en collaboration avec la plateforme Imagerie-Gif. Celui-ci consiste à réaliser un prétraitement des 20 000 images de *dSTORM* obtenus avec le logiciel Hawk<sup>302</sup> pour obtenir un rendu plus fidèle à l'image de TIRF, qui est considérée comme une référence moins résolutive mais exacte de la répartition de la protéine d'intérêt dans la cellule. Après traitement par ThunderSTORM<sup>303,304</sup>, les clusters seront analysés avec FOCAL<sup>305</sup>, qui est une variante du DBSCAN qui a été spécialement conçu pour l'analyse de la super-résolution. Ce logiciel choisit lui-même les paramètres optimaux, seul le choix du nombre d'évènements nécessaires pour considérer qu'il s'agit d'un cluster reste à la charge de l'utilisateur. De plus il permet l'élimination de faux positifs. Pour cela à partir de la liste des évènements détectés un *binning* est réalisé, les évènements se retrouvent répartis dans des carrés dont le côté équivaut à l'incertitude de localisation ( $\sigma$ ). Pour augmenter les contrastes locaux, l'intensité de chaque carré non nul est sommée avec celle des huit carrés l'entourant. En comparant les valeurs obtenues à une valeur seuil et en ne considérant comme clusters que les ensembles de carrés dont la taille est supérieure à  $3 \times 3 + 1$ , le logiciel élimine ainsi un même fluorophore qui brillerait plusieurs fois (ou plusieurs anticorps secondaires rattachés au même anticorps primaire).

L'un des problèmes de la microscopie *dSTORM* est que contrairement à la technique de PALM (photo-activated localization microscopy), sauf condition particulière, on ne peut faire une quantification absolue de notre objet d'intérêt (ici la protéine Nox2). L'une des principales raisons à cela est qu'un même fluorophore (et donc aussi le  $F(ab')^2$  sur lequel le fluorophore est fixé) peut apparaître à différents endroits et cela pour plusieurs raisons : la dilatation de l'échantillon dû à la puissance du laser qui chauffe l'échantillon, ce qui entraîne un décalage





de la position du fluorophore au cours du temps (*drift*) ; la flexibilité des anticorps primaire et du  $F(ab')^2$ , qui avec leurs mouvements browniens vont faire apparaître le fluorophore à des endroits différents. De plus un fragment  $F(ab')^2$  est marqué avec plusieurs fluorophores et la précision de localisation du centre de l'émission des photons est inférieure à la taille du fragment  $F(ab')^2$  ce qui peut donc conduire à la détection de plusieurs fluorophores sur un même anticorps à deux endroits légèrement décalés. Tous ces inconvénients font que mise à part dans des conditions extrêmement calibré, il est impossible d'utiliser du *dSTORM* pour une analyse quantitative absolue (exemple : obtenir le nombre de protéine Nox2 par cluster), il ne peut être utilisé que pour une quantification relative (comparaison de plusieurs conditions entre elles).

Une question reste sans réponse : quelle molécule contrôle utiliser pour s'assurer de la bonne détection des clusters ? La membrane est hautement organisée et les protéines qui y sont présentes sont majoritairement organisées en clusters de l'ordre de dizaines de nanomètres même si une même protéine peut être présente en tant que monomère ou comme oligomère<sup>289</sup>. La réelle question est donc de trouver une protéine dont la taille des clusters est connue afin de pouvoir régler correctement les paramètres du DBSCAN. Les ancras GPI peuvent servir de référence comme dans les travaux de Levet *et al.*<sup>306</sup>. Des études de *Förster resonance energy transfer* ont montré qu'elles sont organisées en clusters qui n'excède pas cinq nanomètres de diamètres, on peut donc utiliser les ancras GPI comme protéine de référence et ajuster en post-acquisition les paramètres du DBSCAN.

## Conclusions

L'objectif initial de ce travail était de caractériser les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2. Malgré l'observation de différences dans la cinétique de production de FRO et dans le taux de phagocytose avec la référence que sont les cellules PLB-985 WT, il s'avéra que ces cellules sont capables de phagocyter et de produire une quantité de FRO équivalente à celle des PLB-985 WT après stimulation par du PMA, signe que la protéine de fusion est bien fonctionnelle. La compréhension des différences entre ces deux types de PLB-985 prendra du temps, elle passera par la réalisation de nouvelles constructions afin de mieux comprendre l'importance de la séquence liant les protéines fluorescentes et la protéines Nox2 dans la fonctionnalité de la NADPH oxydase.



La caractérisation des cellules révéla des structures cytoplasmiques contenant la protéine GFP-Nox2. Ces structures, mobilisable lors de la phagocytose, sont au moins en partie des endosomes précoces et de recyclage qui semblent fusionner avec le phagosome lors de la phagocytose. Ces résultats ont été confirmés dans les neutrophiles même si certaines expériences doivent être refaites pour compléter les résultats. La difficulté provient du fait qu'il faut obtenir une cellule qui soit correctement marquée alors que les anticorps permettant le marquage des endosomes sont peu efficaces. A moyen terme il pourrait être instructif de refaire de telles expériences avec des marqueurs des lysosomes (LAMP-1), de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique afin d'approfondir nos connaissances sur les différentes localisations de la protéine Nox2.

On observa également une accumulation de la protéine GFP-Nox2 au phagosome lors de la phagocytose de particules de ZO avec une fluorescence 1,7 fois plus importante au phagosome qu'à la membrane plasmique après vingt minutes. Cette accumulation continue pendant au moins vingt minutes dans notre modèle sans granules spécifique ou à gélatinase signe que d'autres phénomènes contribuent à l'accumulation de Nox2 au phagosome. Déterminer l'importance des différentes sources (granules, membrane plasmique, endosomes/appareil de Golgi/réticulum endoplasmique) dans l'accumulation de la protéine Nox2, dans nos conditions permettrait de répéter de tels expériences avec des pathogènes qui détournent l'assemblage de la NADPH oxydase du phagosome pour mieux comprendre leur action.

Autre point abordé, le rôle de la protéine IQGAP1 dans la mobilisation de la protéine Nox2 au phagosome. Un faisceau d'indices laissait imaginer un rôle de la protéine IQGAP1 dans le trafic de la protéine Nox2 vers le phagosome. Si ces deux protéines colocalisent au repos et lors de la phagocytose (dans notre modèle et dans les neutrophiles) l'inhibition de la protéine IQGAP1 n'entraîne pas de réduction de la phagocytose dans les cellules PLB-985 WT ni de réduction de la production de FRO lors de la phagocytose de particules de ZO. La protéine IQGAP2, aussi présente dans les neutrophiles, compense peut-être la suppression de la protéine IQGAP1. Une meilleure compréhension de la relation qui peut exister entre les protéines IQGAP et la protéine Nox2 aiderait à mieux appréhender le rôle des protéines IQGAP dans la phagocytose.



Enfin il reste un dernier point, l'organisation moléculaire de la protéine Nox2 lors de la phagocytose frustrée dépendante des récepteurs Fcγ. Elle s'organise en nano-clusters de 60 nm de diamètre en moyenne. Un calcul purement théorique permet de supposer que ces clusters comptent une trentaine de protéine Nox2. La surface d'étalement des cellules varie entre les cellules PLB-985 WT et les cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT ce qui suggère un rôle des FRO dans l'étalement des cellules lors d'une phagocytose frustrée IgG dépendante. Autre élément important de cette expérimentation, le nombre de cluster augmente après dix minutes de phagocytose frustrée dans les cellules PLB-985 WT comparativement aux cellules PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT. Cela suggère un rôle des FRO dans l'accumulation des clusters à la synapse phagocytaire, lors de la phagocytose frustrée. Ces expériences doivent être confirmées dans des neutrophiles et pour ce faire il sera nécessaire d'utiliser des siARN dirigés contre la protéine p47<sup>phox</sup>. Le lien supposé entre FRO et présence de la protéine Nox2 à la synapse phagocytaire mérite d'être approfondi. Pour ce faire l'utilisation d'un inhibiteur de la production de FRO ou de mutants de protéines impliquées dans l'exocytose pourraient permettre de confirmer ce résultat et d'éclairer les mécanismes sous-jacents. D'autres question se pose, comme de savoir si tous les clusters présents à la membrane sont activés ou si les clusters de protéines Nox2 colocalisent avec d'autres protéines impliquées dans la mise en place du phagosome. Aborder ces questions présente cependant de nombreuses difficultés techniques. Afin de déterminer le taux d'activation des clusters des anticorps dirigés contre les sous-unités cytosoliques et produits chez l'âne ou le cochon d'inde seraient nécessaire mais il n'existe pas pour l'instant. Il s'agit ensuite de trouver des conditions pour faire du dSTORM deux couleurs et de réussir à déterminer l'outil le plus pertinent pour étudier de la colocalisation de cluster.

A terme ces résultats doivent permettre une meilleure compréhension des mécanismes permettant l'arrivée de la protéine Nox2 au phagosome. Cela accroîtrait aussi nos connaissances concernant l'organisation de la synapse phagocytaire et cela pourrait éclairer certains mécanismes utilisés par des pathogènes pour modifier le fonctionnement de la NADPH oxydase.



Quatrième partie  
Matériels et Méthodes





## 1.

### Lignées cellulaires : cultures et différenciation

#### Culture cellulaire

Durant ces travaux, les cellules PLB-985 ont servi de modèle d'étude et lorsque cela était possible, les résultats ont été étendus aux neutrophiles humains. Ces derniers ont été isolés des autres constituants sanguins grâce à la réalisation de gradient de Ficoll à partir de prélèvement de donneur sain<sup>307</sup>. Concernant les cellules PLB-985, plusieurs lignées ont été utilisées au cours de ce projet :

- Les cellules PLB-985 WT<sup>209</sup>
- Les cellules PLB-985 Nox2<sup>-/-</sup> (PLB-985 KO)<sup>219</sup>
- Les cellules PLB-985 *NCF1*  $\Delta$ GT<sup>308</sup> (PLB-985 p47<sup>phox</sup>  $\Delta$ GT) offertes par Jeanine Reichenbach (Université de Zürich). Son équipe a introduit une délétion de dinucléotide GT dans le gène codant pour la protéine p47<sup>phox</sup> grâce à la méthode CRISPR/Cas9, entraînant l'apparition précoce d'un codon stop.
- Les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2<sup>309</sup> qui nous ont été gracieusement fournies par le docteur Dirk Roos (Sanquin Research and Landsteiner Laboratory - University of Amsterdam, Pays-Bas).

Chacune de ces lignées est cultivée à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, dans du milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 (Lonza) auquel est adjoint 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de glutamine et 1% de streptomycine /pénicilline/amphotéricine B (Gibco). Les cellules sont diluées à une concentration de 2x10<sup>5</sup> cellules par millilitre. Deux fois par semaine les cellules sont diluées afin de les maintenir à une densité comprise entre 2x10<sup>5</sup> et un 1x10<sup>6</sup> cellules par millilitre.

#### Différenciation

Afin d'obtenir un phénotype proche du neutrophile, le lendemain de la dilution 1,25% de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) est ajouté. Deux à trois jours après la dilution du DMSO est de nouveau ajouté après changement du milieu. Après cinq à



six jours de différenciation, l'expression des marqueurs de surface des PLB-985, leur réponse à des stimuli physiologiques, leur profil de sécrétion cytokinique sont similaires à ceux des neutrophiles sanguins<sup>212</sup>. Ces cellules PLB-985 différenciées sont donc utilisées pour la majorité des expériences de cette thèse.

## Transfection

### Transfection des *small interference* ARN

La transfection des siARN se fait par électroporation (Lonza, 4D-Nucleofector) soixante-six heures après repiquage des cellules et quarante-deux heures après le début de la différenciation. Pour cela  $3 \times 10^6$  cellules sont re-suspendus dans 100  $\mu$ l de tampon ad hoc (Lonza, SF Cell Line 4D-Nucleofector X Kit L) auquel on ajoute ensuite les siARN :

- Contrôle non spécifique des gènes eucaryotes (Eurogenetec, SR-CL000-005) (1 mg/ml)
- Dirigé contre la protéine IQGAP1 (5'-UUAUCGCCCAACAUCUUGUUGG-3') (2,4 mg/ml). Cet siARN permet une inhibition de la protéine IQGAP1 de 90% dans les macrophages ce qui a permis de montrer l'importance de la protéine IQGAP1 lors de la phagocytose dans ces cellules<sup>172</sup>.

Après transfection, 500  $\mu$ l de milieu de culture sans antibiotique est ajouté. Six heures après, la seconde dose de 1,25% de DMSO est ajoutée pour parfaire la différenciation.

### Transfection du plasmide GFP-GFP-IQGAP1

La transfection du plasmide codant pour la protéine GFP-GFP-IQGAP1 (Addgene, 30112) se déroule six jours après dilution des cellules et cinq jours après le début de la différenciation. Le protocole est similaire à celui de la transfection des siARN, seule la quantité d'ADN ajoutée à la préparation change. Ainsi on ajoute 3,16 mg/ml d'ADN plasmidique par préparation. Ce plasmide provient des travaux de Ren *et al.*<sup>246</sup> il code pour une protéine de fusion où deux protéines GFP se trouvent en N-terminal de la protéine IQGAP1. Les expériences de phagocytose sont visualisées six heures après transfection.



## 2.

### Biochimie : Extraction protéique et marquage de zymosane

#### Western-Blot et immunoblot

##### Préparation des membranes et extraction protéique

Afin d'extraire la protéine GFP-Nox2,  $50 \times 10^6$  cellules sont lavées avec du tampon phosphate (47,9 mg de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 278,6 mg  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4) avant d'être mises dans du tampon de cassage (8,75 g de saccharose, 63 mg de  $\text{MgSO}_4$ , 7 mg de Leupeptine, 13 mg de PMSF). Leurs membranes sont ensuite cassées par sonication (Branson Sonifier 250) pendant six fois dix secondes avec une minute d'intervalle, sur glace. Les cellules sont ensuite centrifugées à 10000 g pendant dix minutes à 6°C pour éliminer les noyaux et éviter l'action de protéase. Le surnageant est récupéré et centrifugé cent cinq minutes à 200 000 g à 6°C. Les membranes sont ensuite re-suspendues dans le tampon de cassage avant dosage des protéines.

L'extraction de la protéine IQGAP1 suit un protocole quelque peu différent puisqu'il s'agit d'une protéine cytoplasmique. Cinquante millions de cellules sont centrifugées à 400 g pendant trois minutes avant d'être re-suspendues dans 500  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse (20 mM Tris/HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl et 1% de Triton X-100). La préparation est incubée trente minutes à 4°C sur roue. Suite à une centrifugation à 20000 g (4°C) pendant dix minutes le surnageant est conservé et le dosage des protéines est effectué.

La concentration en protéine est déterminée par un dosage Bradford (Biorad). Une gamme BSA réalisée dans l'eau, dont la concentration varie de 0 à 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , sert de référence. Les échantillons sont dilués au millième dans l'eau. Deux cents microlitres de solution *Biorad protein* sont ajoutées par condition et la densité optique est mesurée à 595 nm. Les échantillons sont ensuite dilués en tampon Laemmli 2X (4% SDS, 20% glycérol, 10%  $\beta$ -Mercaptoéthanol, 0,4% Bleu de Bromophénol, 125 mM Tris/HCl pH 6,8).



### Electrophorèse et Immunoblot

Après incubation dix minutes à 100°C, 25 µg de protéines sont déposés dans un gel de polyacrylamide 10% en présence de dodécylsulfate de sodium. L'électrophorèse terminée, les protéines sont transférées avec le Trans-blot Turbo (Bio-Rad, Hercules, CA) sur membrane de nitrocellulose suivant les instructions du fabricant. La membrane est saturée une heure à température ambiante (PBS 1X, Tween 0,05%, 3% lait). Les anticorps primaires anti-Nox2 (sc130543, 1:1500, Santa Cruz), anti-IQGAP1 (ab86064, 1:2000, Abcam) ou anti-LDH (ab52488, 1:5000, Abcam) sont dilués dans du PBS/Tween (PBS 1X, Tween 0,05%, 3% lait) et incubés pendant toute la nuit, à 4°C, avec agitation. La membrane est lavée trois fois (PBS/Tween 0,1%). Elle est ensuite incubée une heure à température ambiante avec les anticorps secondaires dirigés contre les anticorps de souris (HRP-conjugated IgG, mouton, 1:2000, GE Healthcare) ou de lapin (HRP-conjugated IgG, âne, 1:2000, GE Healthcare) dilués dans du PBS/Tween 0,1%. Après trois lavages avec du PBS/Tween 0,1% et un avec du PBS 1X, la membrane est incubée avec 1ml de kit permettant de détecter l'activité de la HRP par chimiluminescence (GE Healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni). La chimiluminescence est mesurée grâce à un appareil équipé d'une caméra adaptée (pxi, Syngene, Cambridge, Angleterre) en suivant le protocole du fabricant.

### **Préparation des particules de zymosane et des levures DCFH<sub>2</sub>**

Afin de fixer un fluorophore à la surface des particules de zymosane (glucose lié par des liaisons β1-3), 1x10<sup>6</sup> particules de zymosane sont incubées pendant une heure avec 100 µg d'un fluorophore (Alexa 405, Texas Red ou Alexa 488) lié à une fonction succinimidyl-ester (Thermo Fisher) dans 0,1 M de carbonate de sodium à pH 8,3. Il en résulte la formation de liaison covalente entre les particules de zymosane et les fluorophores. Après incubation les particules sont lavées deux fois avec du PBS avant d'y être re-suspendues dans un millilitre.

Les levures DCFH<sub>2</sub> utilisées ont été faites selon un protocole permettant de lier de manière covalente le DCFH<sub>2</sub> aux levures<sup>310</sup>. La mesure de l'oxydation du DCFH<sub>2</sub> en DCF en cytométrie permet d'évaluer la production de FRO dans le phagosome.





Pour leur opsonisation, les particules de zymosane ( $5 \times 10^5$ ) ou les levures DCFH<sub>2</sub> sont incubées sur roue, pendant une heure, à 37°C avec du sérum humain complet selon un ratio 1:1. Afin de préserver les fluorophores et le DCFH<sub>2</sub> de la lumière, l'incubation se déroule à l'obscurité. Après incubation, la préparation de particules de zymosane recouvertes d'opsonine (ZO) ou la préparation de levures DCFH<sub>2</sub> est lavée deux fois avec du PBS 1x pour éliminer l'excès d'opsonines non liées. Elles sont ensuite re-suspendues dans du PBS de telle sorte que l'on retrouve leur concentration avant opsonisation.



### 3.

## Biologie cellulaire : Etude à l'échelle d'une population

### Mesure des FRO en luminométrie

Les cellules sont lavées une fois avec du PBS 1x (Eurobio, Montpellier, France) avant d'être re-suspendus dans du tampon Hepes additionné de glucose et de SVF (NaCl 140 mmol/l, KCl 5 mmol/l, MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/l, CaCl<sub>2</sub> 2 mmol/l, Hepes pH 7,4 10 mmol/l, glucose 1,8 mg/ml et SVF 5%) (tampon Hepes « complet ») ou lorsqu'elles ont été transfectées, dans du tampon HBSS (H8264, Sigma). Elles sont ensuite distribuées dans une plaque 96 puits à fond blanc (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) à une densité de  $5 \times 10^5$  cellules/puits, chaque puit contenant du L-012 (Wako, Osaka, Japon) à 20 mmol/l ainsi que 16 U/ml de HRP (Sigma-Aldrich) dans un volume final de 200  $\mu$ l.

Pour les conditions avec du phorbol myristate acétate (PMA), 200 nM de PMA (qui est un activateur des PKC qui activent la NADPH oxydase) est ajouté et la production de FRO est mesurée toutes les cinq minutes pendant douze heures. Pour la mesure de la production de FRO lors de la phagocytose après transfection par les siARN, des particules de ZO sont ajoutées selon un ratio d'un phagocyte pour cinq particules de ZO et la production de FRO est mesurée pendant quatre heures. La cinétique de la luminescence est réalisée avec un luminomètre (SynergyH1, Biotek, Winooski, VT). Chaque condition est réalisée en duplicata.

### Cytométrie en flux

#### Phagocytose des particules de zymosane et des levures DCFH<sub>2</sub>

Pour les expériences de phagocytose,  $1 \times 10^6$  de cellules sont incubées à 37°C, avec des particules de ZO marquées avec de l'Alexa 405 selon un ratio de cinq particules pour une cellule. Lorsque les cellules sont non transfectées, la phagocytose se déroule pendant trente minutes ou une heure dans du tampon Hepes « complet ». Lorsque les cellules ont été transfectées, elles sont activées pendant vingt-quatre heures avec 0,1  $\mu$ g/ml d'interféron gamma avant la phagocytose. Celle-ci est observée après dix à trente minutes dans de l'HBSS.



La mesure de l'oxydation des levures DCFH<sub>2</sub><sup>310</sup> est réalisée trente minutes après le début de la phagocytose dans les mêmes conditions que la phagocytose de particules de ZO A405 par les cellules après transfection. Cependant la fluorescence du produit de l'oxydation du DCFH<sub>2</sub> (le DCF) s'excite avec le laser émettant à 488 nm du cytomètre CyFlow (Partec, Görlitz, Allemagne) tandis que l'Alexa 405 est excité avec le laser émettant à 405 nm.

Pour s'assurer que les particules de ZO sont phagocytées et non fixées à la surface, on ajoute, pour chacune des conditions, du bleu de trypan qui diminuera la fluorescence des particules fixées mais pas de celles phagocytées car le BT ne peut pas pénétrer dans le phagosome<sup>230</sup>. Les données sont analysées avec le logiciel FlowJo (FlowJo LLC, Oregon).

### Phénotypage des récepteurs

Concernant le phénotypage des récepteurs, les cellules sont au préalable exposées à 0,1 µg/ml d'interféron gamma pendant vingt-quatre heures. Toute la préparation des échantillons se déroule à 13°C pour éviter l'endocytose des récepteurs. Pour éviter une fixation aspécifique des anticorps, les FcγR sont saturés grâce à une incubation avec 10% de sérum humain décomplémenté dilué dans de l'HBSS (0,5 ml pour 1x10<sup>6</sup> cellules) pendant une heure. Après lavage, les cellules sont re-suspendues dans du tampon HBSS avec l'un des anticorps suivants : anti-CD32 (303201, 1:100, BioLegend), anti-CD64 (MA1-10270, 1:50, ThermoFisher), anti-Dectine-1 (mabg-hdect, 500 ng pour 1x10<sup>6</sup> cellules, InvivoGen) ou l'isotype contrôle (400101, 1:100, Biolegend) pendant quarante minutes. Après un lavage avec l'HBSS les cellules sont incubées avec un anticorps caprin dirigé contre les anticorps de souris, marqué par l'Alexa 647 (A21235, 1 :2000, ThermoFisher). L'Alexa 647 est excitée avec le laser 635 nm du cytomètre CyFlow. Les données sont analysées avec le logiciel FlowJo (FlowJo LLC, Oregon).



## 4.

### Biologie cellulaire : Etude d'une cellule en microscopie

#### Cinétique de la protéine GFP-Nox2 au phagosome

Les expériences sont réalisées à la plateforme Imagerie-Gif sur un microscope Nikon Eclipse Ti E inversé doublé d'un spinning-Disk (Yokogawa CSU-X1-A1) et équipé d'une caméra Evolve 512 EMCCD (Photometrics). Un objectif 100x PLAN APO immersion à huile d'une ouverture numérique de 1,4 (Nikon) est utilisé. Afin de suivre la protéine GFP-Nox2, elle est excitée avec un laser 491 nm (Cobolt Calypso, 100 mW) à 10% de sa puissance maximale pendant 200 ms. Un miroir dichroïque *single band* 491 nm (Semrock) est utilisé. Le signal est ensuite filtré par un filtre d'émission 525/45 nm (Semrock). Un dispositif de chauffage (okolab) permet de maintenir l'environnement de l'échantillon à 37°C. L'ensemble est piloté par le logiciel MetaMorph version 7,7 (Molecular Devices).

Les cellules sont préalablement incubées pendant vingt-quatre heures avec 0,1 µg/ml d'interféron gamma. Les expériences de phagocytose se déroulent dans du tampon HEPES « complet » à 37°C. Les cellules PLB-985 X-CGD GFP-Nox2 sont préalablement déposées sur la lamelle puis elles sont mises en contact avec des particules de ZO selon un ratio de cinq particules pour une cellule pour permettre un suivi en temps réel de la phagocytose. Une fois un phagosome en formation localisé, des prises sont réalisées toutes les 30 secondes et, afin de permettre le suivi dans l'espace de la protéine, des coupes optiques sont réalisées selon l'axe z tous les 0,5 ou 1 µm. L'analyse des images se fait avec le logiciel ImageJ.

Pour les temps long (supérieur à trois minutes), le protocole est identique mais le contact entre le ZO et les cellules est induit par une centrifugation à 400 g, à 13°C, pendant trois minutes (la fin de la centrifugation marque le temps zéro) et les prises de vue ne sont effectuées que toutes les cinq minutes. La centrifugation à basse température permet de forcer le contact entre les cellules et les particules de ZO, ce qui augmente le nombre de cellules qui phagocytent, tout en empêchant l'internalisation des particules. De plus cette procédure, en ne prenant que quatre temps différents, limite le photoblanchiment de la protéine GFP.





### **Dynamique de la protéine GFP-GFP-IQGAP1 lors de la phagocytose**

L'étude du rôle de la protéine GFP-GFP-IQGAP1 dans notre modèle a été réalisée avec un microscope Leica DM18 inversé et équipé d'une caméra Hamamatsu Orca Flash 4 (Hamamatsu). Un objectif 60x PL APO immersion à huile d'une ouverture numérique de 1,4 (Leica) est utilisé. Afin de suivre la protéine, elle est excitée avec une source Sola (Lumencor) pendant 200 ms. Le signal est ensuite filtré par un cube GFP : excitation 482/18-25, émission 520/28-25. L'ensemble est piloté par le logiciel Metamorph.

Les cellules sont préalablement incubées pendant vingt-quatre heures avec 0,1 µg/ml d'interféron gamma. Les expériences de phagocytose se déroulent dans du tampon Hepes « complet » à température ambiante. Les cellules PLB-985 WT transfectées avec le plasmide codant pour la protéine GFP-GFP-IQGAP1 sont préalablement déposées sur la lamelle puis elles sont mises en contact avec des particules de ZO selon un ratio de cinq particules pour une cellule pour permettre un suivi en temps réel de la phagocytose. Une fois un phagosome en formation localisé, des prises de vue sont réalisées toutes les 30 secondes, le temps zéro correspond à la fermeture du phagosome. L'analyse des images se fait avec le logiciel ImageJ.

### **Dynamique des endosomes chargés avec le dextran tetramethylrhodamine (TMR) lors de la phagocytose**

Les expériences sont réalisées sur le même système de microscopie que celui utilisé pour la cinétique de la protéine GFP-Nox2 au phagosome avec cependant une amélioration de certains composants du système. La caméra devient une Prime 95B sCMOS (Photometrics), et un laser 488 nm plus puissant a été installé (Vortran, 150 mW). Le laser 488 nm et le laser 561 nm (Coherent, 100 mW) sont utilisés à 10% de leur puissance maximale pendant 100 ms avec le miroir dichroïque *dual band* 491/561 nm (Semrock). Le signal est ensuite filtré par un filtre d'émission double 525/45-590/20 nm (Semrock). Un dispositif de chauffage (okolab) permet de maintenir l'environnement de l'échantillon à 37°C.

Les cellules sont préalablement incubées pendant vingt-quatre heures avec 0,1 µg/ml d'interféron gamma. Le jour de l'expérience les cellules PLB-985 WT sont incubées une heure avec du dextran TMR à une concentration de 100 µg/ml dans du tampon Hepes « complet » à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS froid pour éliminer l'excès de



dextran. Le fait qu'il soit froid limite la formation de nouveaux endosomes non chargés avec le dextran TMR<sup>242</sup>. Les expériences de phagocytose se déroulent à 37°C, dans du tampon Hepes « complet ». Les cellules PLB-985 WT dont les endosomes sont marqués avec le dextran TMR sont préalablement déposées sur la lamelle puis elles sont mises en contact avec des particules de ZO selon un ratio de cinq particules pour une cellule pour permettre un suivi en temps réel de la phagocytose. Une fois un phagosome en formation localisé, des prises de vue sont réalisées toutes les 30 secondes, le temps zéro correspond à la fermeture du phagosome. L'analyse des images se fait avec le logiciel ImageJ.

### **Immunofluorescence**

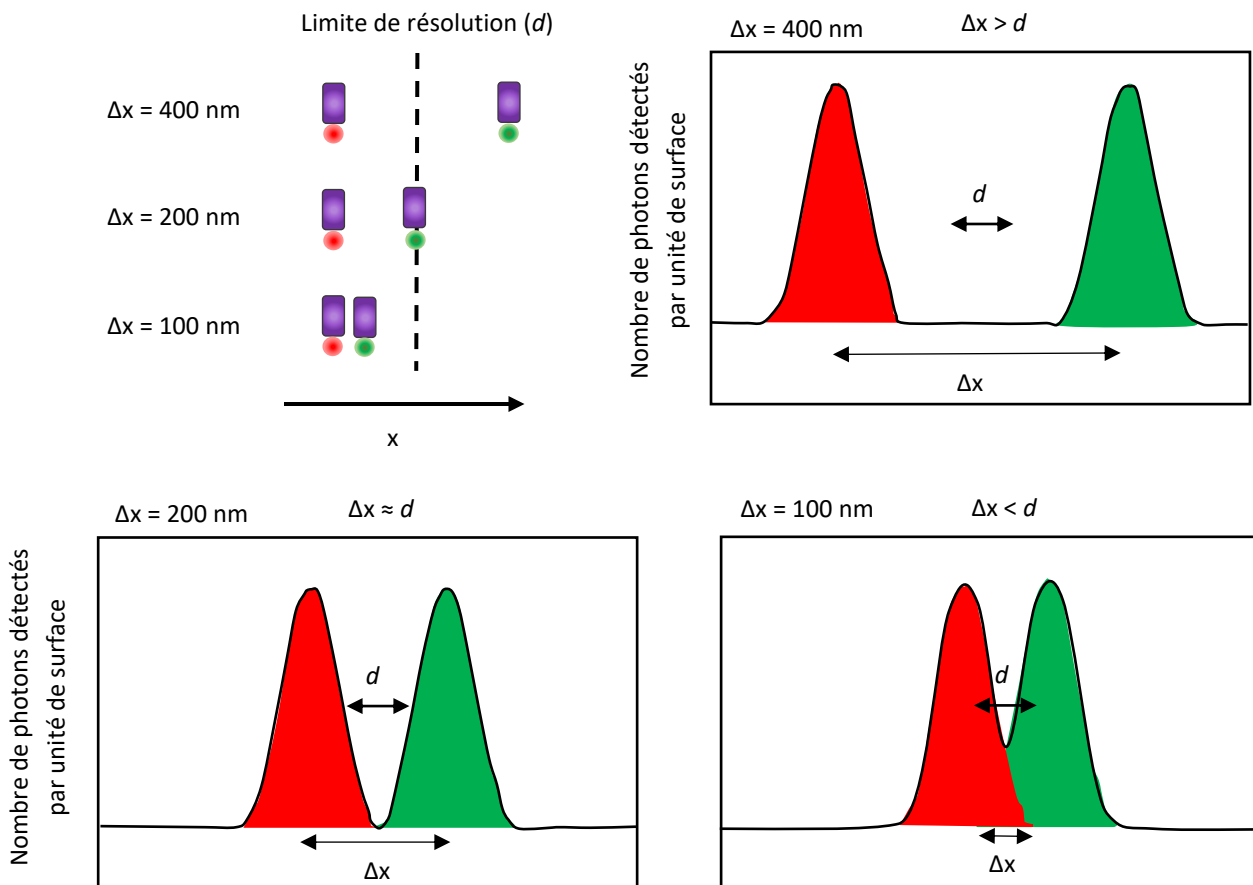
Les expériences sont réalisées sur le même système de microscopie que celui utilisé pour la cinétique de la protéine GFP-Nox2 au phagosome et pour l'étude de la dynamique des endosomes chargés avec le dextran TMR. En plus des lasers 488 nm et 561 nm, le laser 405 nm (Vortran, 100 mW) est utilisé avec le miroir dichroïque *quad band* 405/491/561/641 nm (Semrock) et le filtre d'émission *quad bandpass* 440/40 nm, 521/20 nm, 607/34 nm, 700/45 nm (Semrock).

Les cellules sont préalablement incubées pendant vingt-quatre heures avec 0,1 µg/ml d'interféron gamma. Deux millions de cellules sont re-suspendues dans de l'HBSS et déposées sur une lamelle de 0,17 mm d'épaisseur (Marienfeld) posée dans une plaque de douze puits. Les cellules sont ensuite centrifugées à 13°C pendant trois minutes avec ou sans particules de ZO marquées avec du *Texas Red* pour que le contact entre les deux puisse se faire. Ensuite les cellules sont incubées pendant dix minutes à 37°C pour que la phagocytose ait le temps de commencer.

Les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% (PFA) pendant quarante-cinq minutes à 13°C. Afin de saturer le PFA libre, une solution de glycine 10% est ajoutée pendant dix minutes. Les échantillons sont ensuite perméabilisés pendant dix minutes avec du Triton X100 puis les récepteurs Fcγ et les sites aspécifiques sont saturés avec une solution de PBS 1X contenant 10% de sérum humain décomplémenté, pendant une heure à 37°C. Les anticorps primaire anti-EEA1 (PA5-17228, 1:100, Invitrogen),

$$d_{x,y} = \frac{\lambda}{2NA} \quad d_z = \frac{2\lambda n}{NA^2} \quad NA = n \sin \alpha$$

**Equation 1 : Loi d'Abbe sur la limite de résolution d'un microscope confocale.** La résolution selon les plans  $d_{x,y}$  et  $d_z$  dépendent donc de la longueur d'onde utilisée ( $\lambda$ ), de l'indice de réfraction du milieu ( $n$ ) et du demi-angle maximale du cône de lumière pouvant sortir de la lentille ( $\alpha$ ). Dans la pratique même en associant une longueur d'onde courte et une importante ouverture numérique (1.4), on obtient difficilement une résolution  $x,y$  inférieure à 200 nm et une résolution en  $z$  inférieur à 500 nm <sup>311</sup>.



**Figure 58 : Représentation de la résolution.** Tant que la distance entre deux objets (la distance entre le centre des disques de Airy,  $\Delta x$ ) est supérieure à la limite de résolution (équivalente à la distance à mi-hauteur de l'intensité d'un disque de Airy,  $d$ ) les deux objets seront discernables.

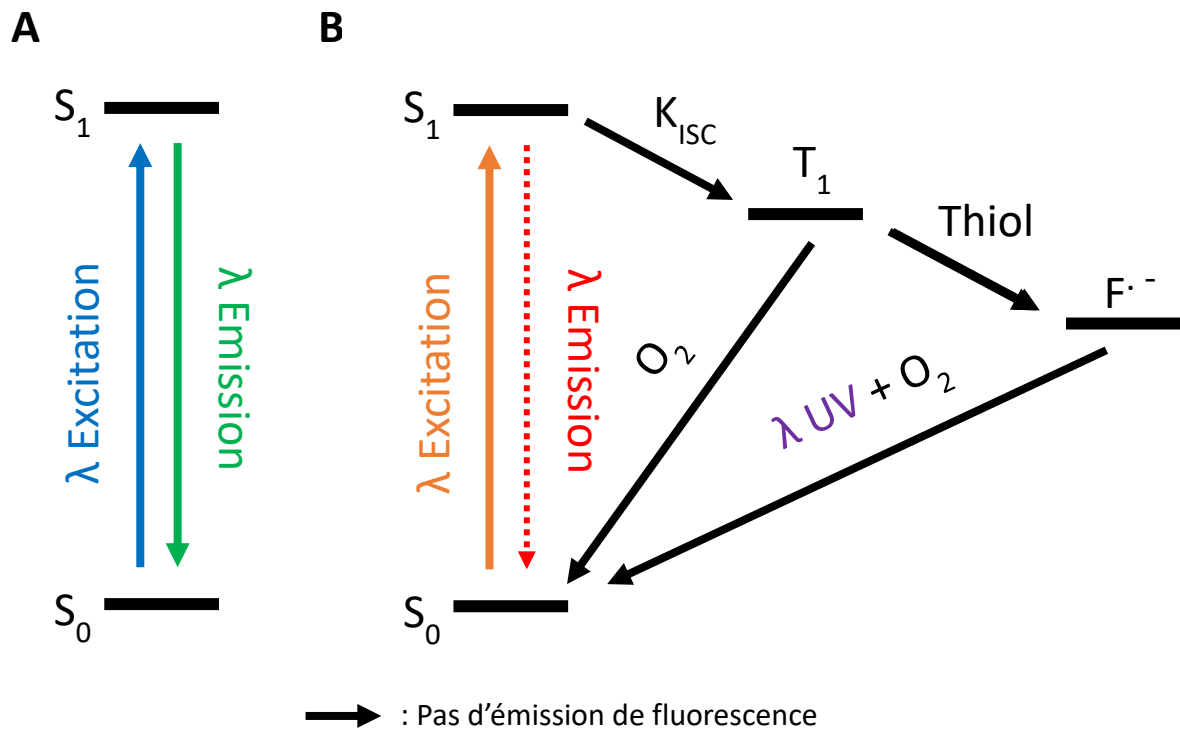
anti-Nox2 (ab80897, 1:1000, Abcam), anti-Rab11 (71-5300, 1-5 $\mu$ g, Thermofisher), anti-IQGAP1 (ab86064, 1 $\mu$ g/ml, Abcam) sont incubés sur la nuit à 4°C dans du PBS 1X. Après lavages, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire anti-immunoglobuline de souris marqué avec de l’Alexa 488 (A11029, 1:1000, Life technologies) ou avec un anticorps anti-immunoglobuline de lapin marqué avec du Dylight 405 (35550, 1:200, Thermofisher) pendant une heure à 37°C.

## Le TIRF-*d*STORM

### Intérêt de la technique

Bien que le microscope soit emblématique de la biologie et qu’il ait considérablement contribué à améliorer les connaissances des sciences du vivant, son inventeur est inconnu. Tout juste sait-t-on que la première observation microscopique publiée date de 1625 par les italiens Frederico Cesi et Francesco Stelluti. En 1665 Robert Hooke dans son ouvrage *Micrographia* utilise pour la première fois le terme de cellule suite à une observation d’un morceau de liège avec un microscope simple de son invention<sup>312</sup>. Il faudra attendre la première moitié du dix-neuvième siècle pour que la formalisation de la théorie cellulaire apparaisse grâce à Theodor Schwann et Matthias Schleiden. Dans la seconde moitié de ce dix-neuvième siècle, plus de deux cent cinquante ans après la première observation en microscopie, l’allemand Ernst Abbe ([Equation 1](#)) et de manière indépendante le britannique George Airy formulent des équations définissant la résolution spatiale d’un système optique. Ces équations affirment que la résolution est limitée par la diffraction de la lumière. La résolution correspond à la distance minimale qui doit séparer deux objets ( $\Delta x$ ) pour qu’ils soient distinguables ([Figure 58](#)). En effet, du fait de la diffraction, un point apparaît comme un disque de Airy (ou une *point spread function* (PSF)) de taille déterminée auquel est associé un profil d’intensité. La largeur de ce profil pour une intensité valant la moitié de l’intensité maximale (*full width at half maximum* - FWHM) correspond à la résolution maximale ( $d$ )<sup>311</sup>.

Récemment plusieurs techniques ont été développées pour s’affranchir de ce plafond de verre, ce sont les techniques de super-résolution. Elles se divisent en deux grandes familles chacune reposant sur un principe différent : la manipulation optique de la PSF (comme dans le STED) ou la localisation précise d’une seule molécule fluorescente (comme dans le *direct Stochastic Optical Resolution Microscopy* ou *d*STORM)<sup>313</sup>.



**Figure 59 : Diagramme de Jablonski.** (A) En microscopie classique les fluorophores oscillent en permanence entre l'état excité ( $S_1$ ) et l'état fondamental ( $S_0$ ). En conséquence toutes les molécules sont activées en même temps. (B) En *d*STORM la transition de l'état  $S_1$  vers l'état  $S_0$  dépend de la probabilité  $K_R$ . En stimulant fortement les fluorophores avant acquisition, ils se retrouvent souvent dans l'état  $S_1$  et ont alors une probabilité  $K_{ISC}$  de se retrouver dans l'état  $T_1$ . Puisque la glucose oxydase et les thiols du milieu stabilisent les fluorophores qui sont en configuration  $T_1$  ou radicalaire, statistiquement la multiplication des passages par l'état  $S_1$  conduit les fluorophores à se retrouver (pratiquement) tous dans un état  $T_1$  ou radicalaire. Modifié d'après Endesfelder *et al.*<sup>314</sup>

### Principe

La fluorescence est le résultat du passage d'une molécule, après absorption d'un photon, d'un état fondamental ( $S_0$ ) à un état électronique supérieur ( $S_1$ ) puis de l'émission spontanée d'un photon par relaxation vibrationnelle permettant le retour de la molécule vers un état de plus faible énergie, son état fondamental ( $S_0$ ). Cependant cette transition vers l'état fondamental peut aussi s'effectuer sans émission de photon lorsque :

- La molécule se trouve dans un état triplet ( $T_1$ )
- La molécule reste dans l'état triplet suffisamment longtemps, en présence d'agent réducteur correspondant à son potentiel redox (thiol), pour permettre la formation de forme radicalaire stable.

Ces formes représentent l'état « off » du fluorophore dont la stabilité varie de quelques minutes à plusieurs heures en solvant aqueux bien que cette stabilité soit affectée par la quantité d'oxygène présente dans le milieu et par la stimulation dans l'ultraviolet qui favorisent le retour de la molécule à l'état fondamental (Figure 59). Utiliser des conditions où la demi-vie du fluorophore dans son état « off » est grande garantit de ne faire fluorescer qu'un faible nombre de fluorophores à la fois et c'est sur ce principe que repose la technique de STROM. En effet, avant l'acquisition, les fluorophores sont excités avec une puissance laser maximale afin de les faire passer le plus souvent possible dans l'état  $S_1$ . Ils ont alors une probabilité  $K_{ISC}$  de basculer vers l'état noir  $T_1$  et une probabilité  $K_R$  d'émettre de la fluorescence et de retrouver l'état  $S_0$  (il existe aussi une probabilité  $K_{NR}$  de retourner directement à l'état  $S_0$  sans émettre de la fluorescence). Les probabilités  $K_{ISC}$  et  $K_R$  dépendent des propriétés du fluorophore tandis que  $K_{NR}$  est influencée par l'environnement. En multipliant le nombre de fois où les fluorophores se retrouvent dans un état  $S_1$  on maximise le nombre de fluorophores qui statistiquement basculent vers l'état  $T_1$  et vers l'état radicalaire, la glucose oxydase en supprimant le dioxygène de l'environnement et les thiols en favorisant la formation de la forme radicalaire stabilisant les fluorophores dans leur état noir. La réactivation des fluorophores sera rare et stochastique ce qui permettra de les séparer spatialement et de manière temporelle afin de pouvoir déterminer avec une précision de l'ordre de la trentaine de nanomètres leur localisation<sup>314</sup>.

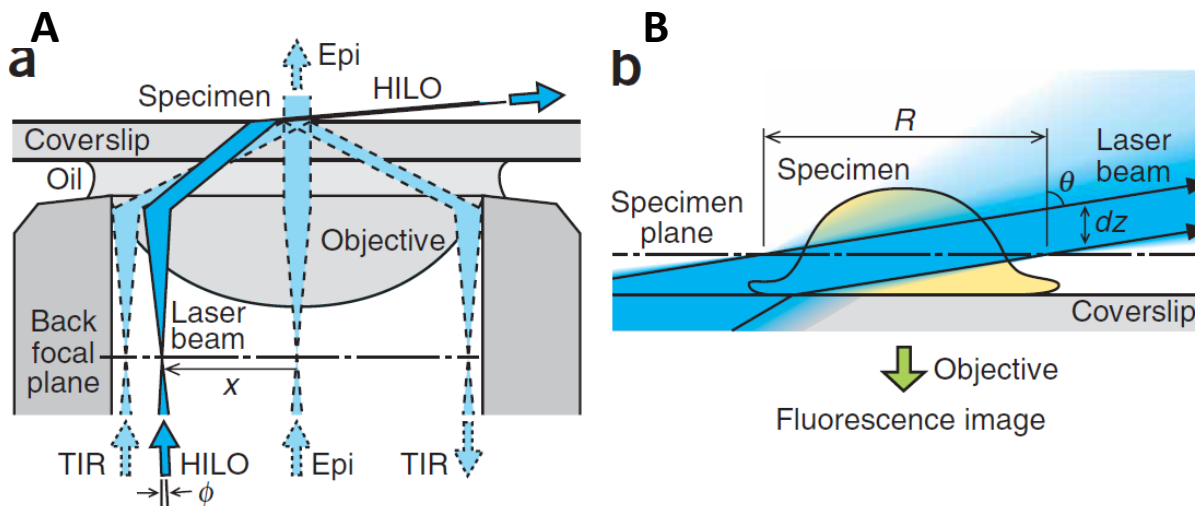


$$n_1 \theta_i = n_2 \theta_r$$

**Equation 2 : Loi de Snell-Descartes.** L'angle du rayon réfracté ( $\theta_r$ ) dépend des indices de réfractions des milieux traversés ( $n_1$  et  $n_2$ ) ainsi que de l'angle du rayon incident ( $\theta_i$ ).

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_i - n_2^2}} \quad I_z = I_0 e^{-z/d}$$

**Equation 3 & Equation 4 : Propriétés de l'onde évanescente en TIRF.** La profondeur de l'onde évanescente dépend de la longueur d'onde du rayon incident ( $\lambda_0$ ), de son angle ( $\theta_i$ ) et des indices de réfractions des milieux. L'utilisateur ne peut généralement influencer que sur l'angle  $\theta_i$  (Equation 3). L'intensité de cette onde évanescente décroît exponentiellement avec la distance suivant une constante  $d$  (Equation de Fresnel – Equation 4)<sup>315</sup>.

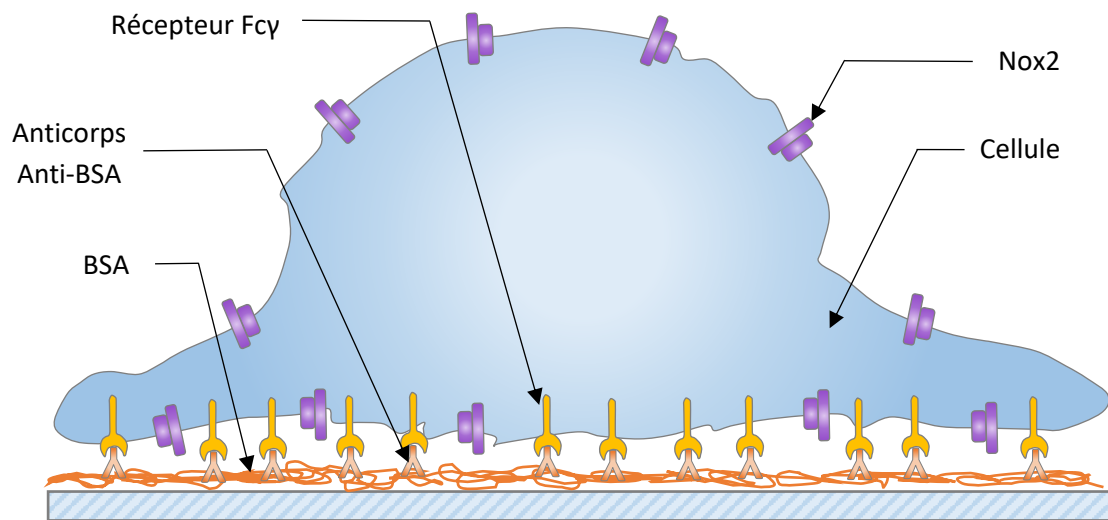


**Figure 60 : Schéma illustrant la configuration HILO.** (A) En configuration *highly inclined and laminated optical sheet microscopy* l'augmentation de l'angle d'incidence due à l'augmentation de  $x$  augmente l'inclinaison du faisceau lumineux et réduit sa taille. (B) L'épaisseur de l'illumination ( $dz$ ) correspond à la largeur de l'illumination dans le plan du spécimen ( $R$ ) divisé par la tangente de l'angle  $\theta$ . D'après Tokunaga et al.<sup>316</sup>

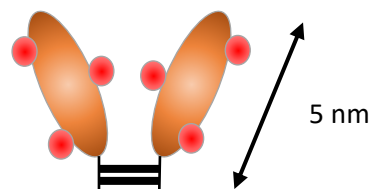
La microscopie *d*STORM peut s'appliquer à plusieurs types de microscopie puisqu'il est possible d'utiliser un microscope à épifluorescence<sup>317</sup> ou un microscope confocal avec un module de *Total Intern Reflexion Fluorescence* (TIRF). Il est même possible d'imager une cellule entière en microscopie STORM<sup>318</sup>. Cependant afin de limiter la quantité de fluorophore stimulés, dans notre étude on utilise un module TIRF ce qui permet de se concentrer sur les phénomènes se déroulant à moins d'une centaine de nanomètres de la membrane. Le principe du TIRF repose sur la loi de Snell-Descartes. Selon cette loi l'angle du rayon incident ( $\Theta_i$ ) multiplié par l'indice de réfraction du milieu ( $n_1$ ) permet, si on divise le produit par l'indice de réfraction du milieu dans lequel évoluera le rayon réfracté ( $n_2$ ), de déterminer l'angle du rayon réfracté ( $\Theta_r$ ) (Equation 2). Si  $\Theta_i$  est égal ou supérieur à un angle critique,  $\Theta_r$  sera égal ou supérieur à  $90^\circ$  et ne sortira pas du milieu  $n_1$ . Cependant il a été montré que bien qu'il n'y ait pas de rayon réfracté dans le milieu d'indice de réfraction  $n_2$ , une onde électromagnétique se propage dans ce milieu. La distance sur laquelle l'onde se propage dépend de la longueur d'onde du rayon incident, de  $\Theta_i$ , et des indices de réflexion des deux milieux (Equation 3). Comme l'a montrée Fresnel, la perte d'intensité de cette onde n'est pas linéaire, elle décroît de manière exponentielle par rapport à sa source (Equation 4). Seuls les fluorophores proches de la source de l'onde évanescente seront donc excités, limitant le bruit de fond. Cependant en pratique trouver cet angle critique est compliqué, aussi le TIRF est bien souvent utilisé en configuration HILO (*highly inclined and laminated optical sheet microscopy*)<sup>316</sup>. Dans cette configuration  $\Theta_i$  est inférieur à l'angle critique mais suffisamment important pour obtenir une fine illumination oblique de l'échantillon permettant : de pénétrer dans la profondeur de la cellule (ou de rester à la membrane), de ne pas stimuler les fluorophores de la cellule qui ne sont pas excités par cette illumination oblique (Figure 60).

### Préparation des lamelles

Bien que la préparation des échantillons pour la technique de *d*STORM corresponde à celle effectuée pour une immunofluorescence traditionnelle, la préparation des lamelles requiert une attention particulière du fait de la détection de chacune des molécules qui fluorescent. Afin de limiter le bruit de fond due aux sources de contamination exogène, les lamelles (No. 1.5H (tol.  $\pm 5 \mu\text{m}$ ), Marienfeld) sont lavées par sonication pendant trente minutes avec 0,1% de Decon 90 et 100 mM d'hydroxyde de sodium. Elles sont ensuite



**Figure 61 : Schéma expérimental de la phagocytose frustrée.** Après dépôt de sérum d'albumine bovine sur la lamelle, un anticorps anti-BSA est ajouté. Lorsque les cellules sont déposées sur les lamelles, leurs récepteurs Fc $\gamma$  reconnaissent les anticorps anti-BSA, les cellules s'étalent initiant les mécanismes de la phagocytose.



**Figure 62 : Représentation des F(ab')<sup>2</sup> et de leur marquage.** La précision de localisation du centre de la PSF est de deux nanomètres. En conséquence deux fluorophores clignotant à des moments différents, présent sur le même F(ab) et distant de plus de deux nanomètres seront perçus comme deux événements indépendants.

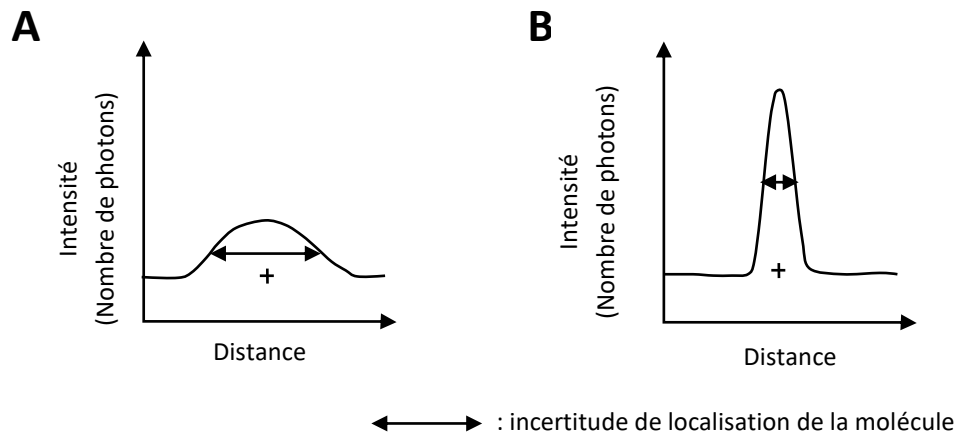
gardées deux heures dans 2N d'hydroxyde de sodium puis lavées à l'eau miliQ avant de l'être avec de l'éthanol 70%. Enfin elles passent une heure dans un bain d'éthanol absolu puis d'acétone avant d'être séchées au four pendant trente minutes à 70°C.

### Expérience

Dans le cadre de cette étude, les cellules ont été mises dans deux conditions :

- En phagocytose frustré (Figure 61). Les lamelles sont recouvertes de sérum d'albumine bovine (BSA) à 10 mg/ml durant une nuit à température ambiante. Elles sont ensuite lavées et un anticorps anti-BSA (Immunoglobuline de lapin, 1:500) est ajouté pendant une heure à température ambiante avant lavage pour éliminer l'excédent d'anticorps.
- Sur poly-lysine. Les lamelles sont recouvertes de 0,01% de poly-L-Lysine pendant une heure à température ambiante. Les lamelles sont rincées avec de l'eau puis de l'éthanol absolu avant de sécher sous hotte jusqu'à évaporation de l'éthanol.

Un million de cellules re-suspendues dans de l'HBSS sont déposées par lamelle. Après centrifugation à 13°C, les cellules sont incubées pendant une ou dix minutes à 37°C pour que la phagocytose frustrée se fasse. Les cellules sont ensuite fixées avec du PFA 4% à 13°C pendant quarante-cinq minutes. Afin de saturer le PFA libre, une solution de glycine 10% est ajoutée pendant dix minutes. Les échantillons sont ensuite perméabilisés pendant dix minutes avec du Triton X100 puis les récepteurs Fcγ et les sites aspécifiques sont saturés grâce à 10% de sérum humain inactivé pour le complément pendant une heure à 37°C. Enfin l'incubation avec l'anticorps primaire monoclonal anti-Nox2 (ab80897, 1:1000, Abcam) se déroule durant deux heures à 37°C dans du PBS 1X tandis que l'incubation avec le F(ab')<sup>2</sup> polyclonal marqué avec de l'Alexa 647, dirigé contre les immunoglobulines murines (A21237, 1:3000, ThermoFisher) et l'anticorps bloquant dirigé contre les immunoglobulines anti-BSA provenant de lapin (ab6831, 1:1000, Abcam) s'étale sur une heure uniquement à 37°C. Chaque F(ab')<sup>2</sup> possède entre deux et huit molécules fluorescentes (ThermoFisher), cela permet d'améliorer le signal dans les techniques d'imagerie classiques mais cela peut entraîner la détection du même anticorps (et donc par extension de la même protéine Nox2) plusieurs fois en dSTORM (Figure 62).



**Figure 63 : Profil d'intensité du disque de Airy en fonction de la distance.** Le nombre de photons émis par le fluorophore affecte directement la qualité de sa localisation. (A) Lorsque le fluorophore émet peu de photon, le profil d'intensité correspondant est relativement étalé. Conséquence la FWHM est importante ce qui se traduit par une grande incertitude concernant la localisation exacte de la molécule. (B) A l'inverse lorsque nombre de photons sont produits, le signal se détache facilement du bruit de fond et la FWHM est alors étroite. La localisation sera dans ce cas, précise.

### Acquisition

L'utilisation de l'Alexa 647 en *d*STORM est due au fait que la précision de la localisation est directement dépendante de la quantité de photons collectée et donc que seul des molécules organiques très brillantes sont compatibles avec cette approche (Figure 63). Or parmi les nombreuses molécules testées<sup>319</sup>, l'Alexa 647 s'est établi comme la référence du fait de son fort signal et de sa capacité à répéter les cycles « on-off ».

Concernant l'anticorps bloquant, du fait qu'il soit spécifiquement dirigé contre les immunoglobulines de lapin il a une plus forte affinité pour les immunoglobulines anti-BSA que le F(ab')<sub>2</sub> marqué avec l'A647 dirigé contre les immunoglobulines de souris, limitant ainsi la fixation aspécifique de ce dernier.

Comme dit précédemment, le dioxygène favorise le retour des fluorophores dans leur état fondamental tandis que les composés thiols participent à l'augmentation de la durée de vie des fluorophores dans leur état « off ». Pour limiter la présence de dioxygène, le milieu utilisé pour l'acquisition des images se compose donc principalement de :

- Glucose oxydase à une concentration de 0,63 mg/ml (G2133, Sigma) qui réduit le dioxygène en peroxyde d'hydrogène
- Glucose (0,1 g/ml) qui sert de substrat à la glucose oxydase
- Catalase à 40 µg/ml (C100, Sigma) qui par dismutation forme deux molécules d'eau et une molécule de dioxygène à partir de deux molécules de peroxyde d'hydrogène
- Mercaptoéthylamine (110 mM) qui est le composé thiol permettant le passage du fluorophore vers sa forme radicalaire.

Concernant le système d'acquisition présent sur la plateforme Imagerie-Gif il se compose d'un microscope Nikon Eclipse Ti E inversé doté d'une platine motorisée x, y, z avec *Perfect Focus System*, d'un objectif 100x APO TIRF SR immersion à huile d'une ouverture numérique de 1,49 (Nikon) et une caméra Andor iXon Ultra 897 EM-CCD. Afin d'exciter l'Alexa 647 le laser 647 nm (MPB Communication, 300 mW) a été utilisé avec le cube QUAD : 450/60-525/50-605/50-730/120 (Nikon, Chroma). Lorsque le nombre d'évènements détecté devient trop faible, la diode 405 nm (Cube, 100 mW, Coherent) est aussi utilisée pour faire basculer l'Alexa 647 de son état radicalaire vers son état fondamental. L'ensemble est piloté par le



logiciel NIS-Elements Advanced Research. Vingt milles séquences de 16 ms chacune sont prises par acquisition <sup>d</sup>, une acquisition illustrant généralement une seule cellule.

---

<sup>d</sup> En *d*STROM une image correspond à la reconstruction faites à partir des 20 000 séquences acquises. Une acquisition correspond donc aux 20 000 séquences avant reconstruction.





## 5.

### Statistiques et analyses d'images

#### Statistiques

L'ensemble des tests statistiques ont été effectués avec le logiciel Prism8 (GraphPad). Chaque barre d'erreur représente la *Standard Error of Mean* de l'expérience. Les coefficients de corrélation de Pearson sont représentés à l'aide de diagramme en boîte à moustache illustrant le premier quartile, la médiane (deuxième quartile) et le troisième quartile. Sont ensuite ajoutée des barres allant jusqu'au cinquième et quatre-vingt-quinzième centile.

Pour les expériences de cytométrie et de luminométrie, un test de student a été utilisé. La comparaison statistique des CCP a été faites grâce à des tests de student ou des tests de Wilcoxon selon que les données suivaient ou non une loi normale. Concernant l'accumulation de la protéine GFP-Nox2 au phagosome, un ratio *paired t test* a été employé pour les temps courts tandis qu'un test de Wilcoxon a été effectué pour les temps plus longs car les données correspondantes ne suivaient pas une loi normale. Pour comparer les ratios à la valeur théorique de un, des *one sample t test* ou *one sample Wilcoxon test* ont été effectués selon que les valeurs suivent ou non une loi normale. Enfin les expériences de super-résolution nécessitèrent l'utilisation du test de Mann-Whitney car les données ne suivaient pas une loi normale et n'étaient pas appariées (sauf pour la comparaison de l'étalement relatif des cellules PLB-985 WT et PLB-985 p47<sup>phox</sup> ΔGT après dix minutes de phagocytose frustrée où les données suivaient une loi normale, justifiant l'utilisation d'un test de student). Concernant la significativité des *P-value*, une étoile correspond à une valeur inférieure à 0,05, deux étoiles à une valeur inférieure à 0,01, trois étoiles à une valeur inférieure à 0,001 et quatre étoiles à une valeur inférieure à 0,0001.

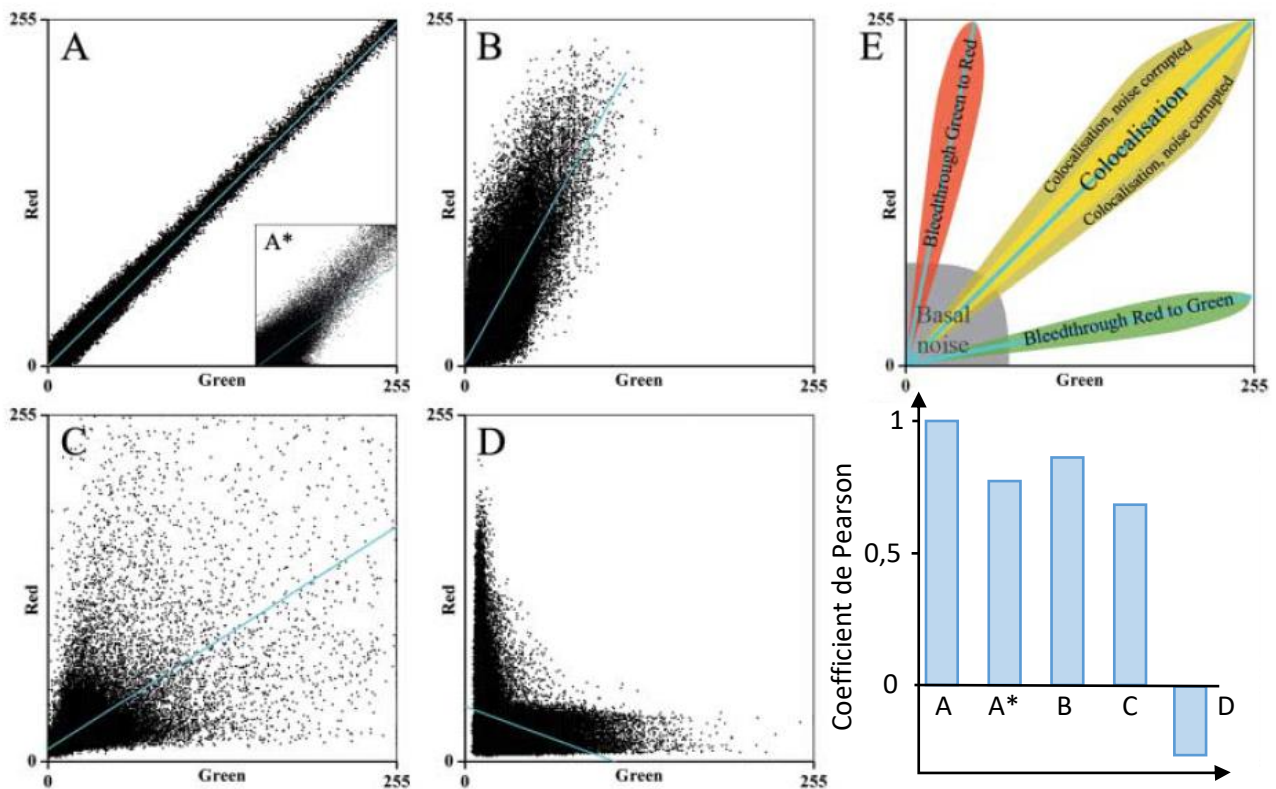
#### Analyse d'images

##### Etude de la colocalisation

L'étude de la colocalisation des protéines a été faite en traçant des profils d'intensité ou grâce au plugin d'ImageJ « JACoP » : en calculant le coefficient de Pearson ou en utilisant la méthode *object-based* comme expliqué par Bolte et Cordelières<sup>267</sup>.

$$PCC = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \times \sum_i (G_i - \bar{G})^2}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \times \sum_i (G_i - \bar{G})^2}}$$

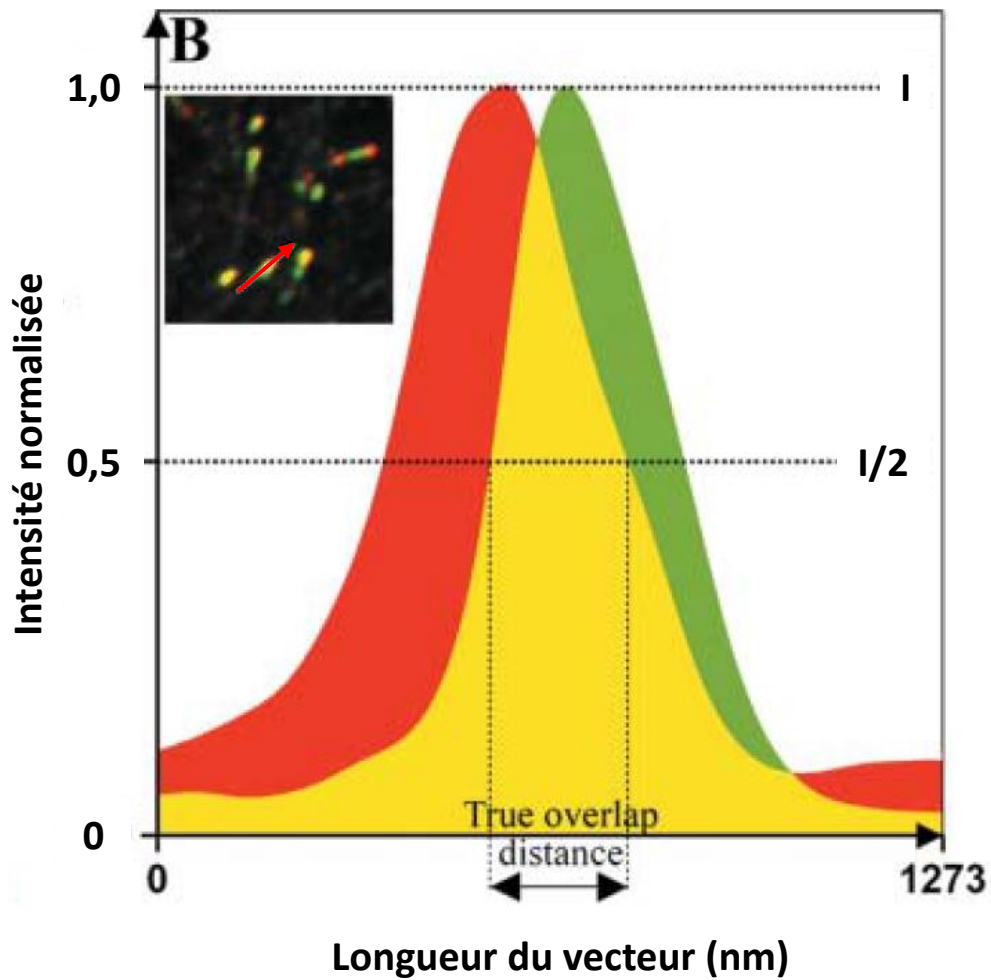
**Equation 5 : Coefficient de corrélation de Pearson (CCP).**  $R_i$  et  $G_i$  correspondent à l'intensité du pixel  $i$  dans respectivement le canal rouge et le canal vert tandis que  $\bar{R}$  et  $\bar{G}$  sont la moyenne d'intensité de l'image dans le canal rouge ou vert <sup>320</sup>.



**Figure 64 : Profil type de scatter plots et coefficient de Pearson correspondant.** L'intensité de chaque pixel dans les deux images où la colocalisation est comparée est traduite en coordonnées x, y. La configuration A correspond au cas idéal (coefficient de Pearson égal à un) mais l'ajout de bruit dans l'une des deux images affecte le coefficient de Pearson obtenu (A\*). Le résultat de ces configurations est représenté par l'aire jaune dans la figure E. Lorsque les fluorophores n'ont pas la même intensité un biais s'installe diminuant là encore le coefficient de Pearson même si la colocalisation est complète (B et aire rouge et verte figure E). La colocalisation partielle se traduit par une corrélation moindre des intensités des pixels dans les deux canaux induisant une baisse du coefficient de corrélation de Pearson (C). Enfin s'il y a une exclusion mutuelle deux populations se dégagent chacune le long de l'axe x ou y et le coefficient de Pearson est négatif (D)<sup>267</sup>.

Le calcul du coefficient de Pearson (Equation 5) peut s'illustrer avec une représentation graphique (Figure 64). En effet il est possible de représenter l'intensité d'un pixel donné dans les deux images où l'on souhaite étudier la colocalisation de protéine, comme une paire de coordonnées  $x, y$ . S'il y a une corrélation entre les deux images, la répartition des pixels doit former une droite dont la pente dépend de l'intensité de fluorescence de chaque fluorochrome. La dispersion des points par rapport à la droite théorique peut alors être estimée par le calcul du coefficient de Pearson. Cependant cette méthode est sensible au bruit et elle compare toute l'image en ne se limitant pas aux structures d'intérêt (car la formule tient compte de l'intensité moyenne des pixels qui composent l'image empêchant le seuillage). Pour contourner ce problème, on s'assure des résultats en utilisant un contrôle négatif. Dans nos expériences pour chaque CCP calculé l'image du canal représentant la protéine Nox2 subit une rotation de  $180^\circ$  avant un nouveau calcul du CCP. Après rotation l'intensité des pixels dans les deux images ne doivent plus être corrélées.

Le CCP ne permet pas d'évaluer spatialement les zones de colocalisation. Pour cela on utilise deux méthodes parmi les plus efficaces pour évaluer la colocalisation de deux éléments. La première consiste à tracer un profil d'intensité dans chacune des images et à comparer la superposition des pics d'intensités. Si la distance de superposition des pics à mi-hauteur de l'intensité maximale est supérieure à la résolution spatiale de la caméra alors il y a colocalisation entre les deux objets (Figure 65). Cependant le *plot profil* ne permet pas d'évaluer la colocalisation dans l'ensemble de l'échantillon d'où l'utilisation de la seconde méthode. Cette méthode *object-based*, permet d'isoler les objets dans chacun des canaux par un seuillage et une segmentation et d'identifier leur centroïde (le centre géométrique de l'objet) et leur centre d'intensité qui tient compte de la distribution de l'intensité dans l'objet. Dans notre cas on a réalisé une projection selon l'axe  $z$  suivant le maximum d'intensité puis comparé la distance entre les objets identifiés par leur centroïde dans le canal A aux objets du canal B, si elle est inférieure à la résolution alors les objets sont colocalisés. En divisant par le nombre total d'objet présent dans chacun des canaux on a pu déterminer pourcentage d'endosome positif, pour Rab11 ou EEA1 et pour Nox2. Ces trois techniques sont donc complémentaires apportant une analyse globale de la colocalisation pour le CCP, une analyse spatiale mais limitée à la région choisie pour le *plot profil*, une analyse spatiale globale mais nécessitant un prétraitement du signal dans le cas de la méthode *object-based*.



**Figure 65 : Colocalisation avec la technique de profil d'intensité.** Une flèche est tracée aux mêmes coordonnées dans les deux canaux où l'on souhaite évaluer la colocalisation (flèche rouge, encadré). Les profils sont superposés. Si la distance de recouvrement des deux pics à mi-hauteur de l'intensité est supérieure à la résolution spatiale de la caméra alors les deux éléments colocalisent. D'après Bolte *et al.*<sup>267</sup>

### Accumulation de Nox2 au phagosome

L'accumulation de la fluorescence de la protéine GFP-Nox2 au phagosome est analysée avec le logiciel ImageJ. Une ligne segmentée, qui recouvre la membrane du phagosome ou la membrane plasmique, est manuellement tracée pour chaque cellule. Le plan choisi est si possible le plan médian du phagosome sauf si ce phagosome est accolé à la membrane plasmique ne permettant pas de faire la différence entre les deux membranes ou que la membrane n'est pas parfaitement nette. En cas de fusion entre deux phagosomes pendant l'expérience, seule la fluorescence sur la partie de la membrane qui était suivie avant la fusion est mesurée.

Le ratio de fluorescence est déterminé par la moyenne d'intensité de fluorescence au phagosome moins la moyenne d'intensité du bruit de fond divisé par la moyenne d'intensité à la membrane plasmique moins la moyenne d'intensité du bruit de fond. L'intensité moyenne du bruit de fond est déterminée par la moyenne des intensités moyennes de quatre régions d'intérêt rectangulaire tracées en dehors des cellules.

### Expression de la protéine IQGAP1 dans les PLB-985 WT après transfection des siARN

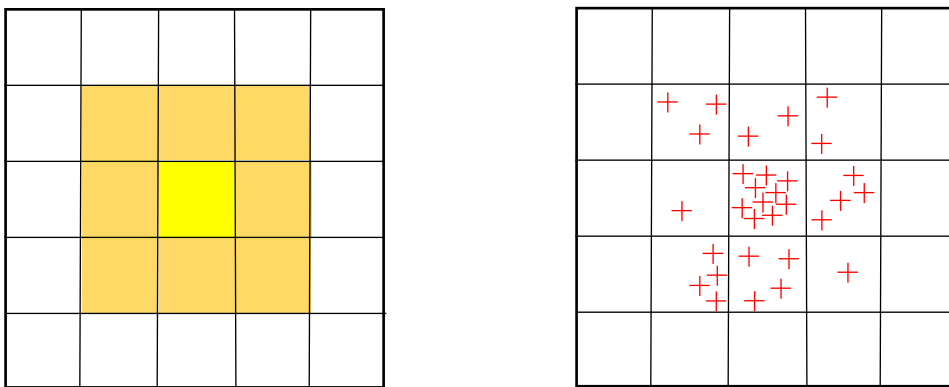
Le calcul d'extinction de l'expression d'IQGAP1 après transfection par le siARN correspondant se fait à l'aide du logiciel ImageJ grâce à la fonction dédié, analyse de gel. Cette fonction réalise un histogramme d'intensité de chaque piste de migration permettant de déterminer l'aire sous la courbe de chacune des bandes présentes puis de les comparer entre elles.

### Super-résolution

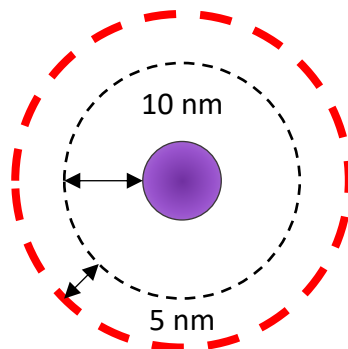
L'analyse d'image la plus ardue concerne la super-résolution. Du fait de l'absence de protocole standardisé, les paramètres que nous avons utilisés sont ceux recommandés par la littérature<sup>321,303</sup>. Tout d'abord les différents logiciels d'analyse (ici thunderSTROM<sup>304</sup>) utilisent un algorithme de *band-pass filter*, dans notre cas un *difference of averaging filters* afin de distinguer les signaux du bruit. Ils déterminent ensuite les signaux susceptibles d'être un clignotement grâce à l'une des méthodes proposées. Dans le cas présent la méthode du maximum local est utilisée, l'intensité du pixel étudié doit être supérieure à une valeur seuil (correspondant à trois fois l'écart-type du bruit de fond) ainsi que supérieure ou égale à celle

$$\sigma = \sqrt{\frac{S^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi S^4 b^2}{a^2 N^2}}$$

**Equation 6 : Calcul de l'incertitude de localisation en dSTORM.** Le  $\sigma$  correspond à l'écart-type et donc à l'incertitude de localisation. Il dépend de l'écart-type du bruit de fond (b), de la taille du détecteur (a), du nombre de photons collectés (N) et de l'écart-type de la PSF (S)<sup>311</sup>.



**Figure 66 : Différence entre la représentation d'une image de dSTORM et la localisation des évènements aux coordonnées correspondantes.** (A gauche) Représentation visuelle de la quantité d'évènements aux coordonnées correspondantes. Contrairement à ce que l'on pourrait penser cela ne représente pas un évènement et son incertitude  $\sigma$ . (A droite) Position (et quantité) des évènements réellement détectés aux coordonnées correspondantes



**Figure 67 : Représentation du complexe Nox2 – Ac primaire – F(ab')<sup>2</sup>.** La représentation à l'échelle montre le diamètre de Nox2 avec le cercle violet (10 nm), la distance maximale à laquelle peut se trouver l'extrémité du fragment Fc de l'anticorps primaire (cercle noir) soit à 10 nm de Nox2, la distance maximale à laquelle peut se trouver le F(ab')<sup>2</sup> de l'anticorps primaire soit 5 nm (cercle rouge). Le total représente bien 20 nm de rayon.

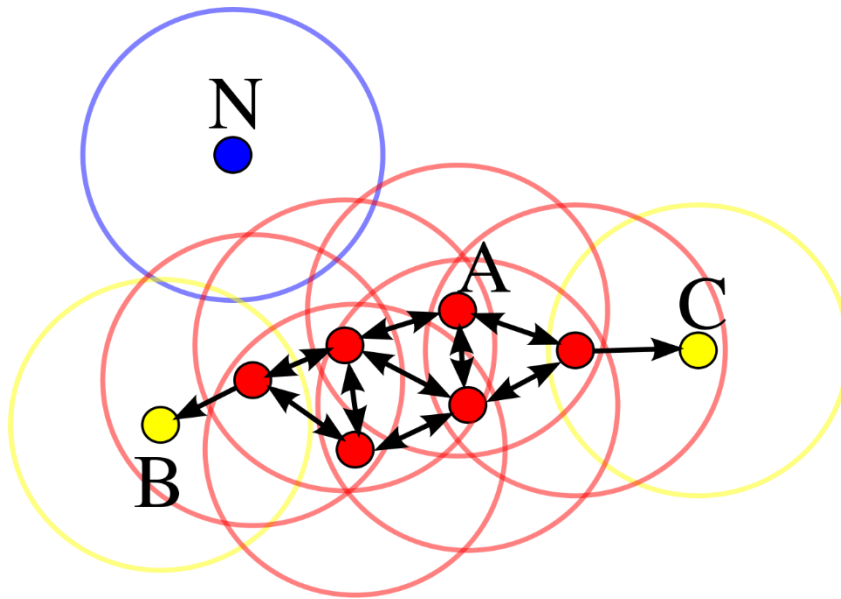
des huit pixels l'environnant. Une fois tous les signaux candidats identifiés, il compare la distribution de l'intensité pour chaque signal avec celle d'une PSF théorique, le centre de cette PSF représentant la localisation du fluorophore. La dispersion de la PSF ( $\sigma$ ), qui correspond à la résolution ainsi qu'à l'incertitude de localisation, dépend de plusieurs facteurs (Equation 6) dont l'un est le nombre de photons collectés. Ce nombre N est notamment dépendant :

- De l'orientation du fluorophore par rapport au laser et par rapport au détecteur (donc de l'orientation de l'anticorps sur lequel il est fixé)
- Du moment où la molécule passe dans son état « on ». Si c'est au début des 16 ms de la séquence tous les photons émis seront collectés durant cette séquence ; si elle s'active vers le milieu ou la fin, les photons seront collectés sur plusieurs séquences d'acquisition.

En utilisant l'un des modèles de PSF proposés (*PSF : Integrated Gaussian*) on obtient une liste contenant les coordonnées de tous les événements, ainsi que le nombre de photons détectés, la taille de  $\sigma$  et une représentation visuelle de la répartition des molécules. Il est important de noter que cette représentation ne reflète pas la précision de la liste obtenue puisqu'un pixel peut contenir de nombreuses molécules dont les coordonnées ont été identifiées à l'intérieur de ce pixel (Figure 66). Cette liste doit ensuite être affinée pour éliminer les points avec des paramètres fantaisistes. Par exemple, le rayon maximal entre le centre de la protéine Nox2 et la fin de l'anticorps secondaire correspond à : cinq nanomètres (rayon de la protéine Nox2)<sup>247</sup> plus dix nanomètres (longueur de l'anticorps primaire) et cinq nanomètres (longueur de l'anticorps secondaire) (car il s'agit d'un F(ab')<sub>2</sub>) ce qui fait un total de vingt nanomètres (Figure 67). Les événements dont l'incertitude de localisation est supérieure à la distance maximale entre la protéine Nox2 et l'extrémité du F(ab')<sub>2</sub> sont donc éliminées.

Une fois terminée, la liste des événements et de leurs propriétés est transférée dans le logiciel SR Tessler<sup>306</sup>. En effet la liste des événements seule ne permet pas d'étudier l'organisation des protéines Nox2 les unes par rapport aux autres. Pour ce faire il est nécessaire d'utiliser un algorithme capable de détecter des organisations nano ou micromoléculaires, les clusters. L'utilisation du DBSCAN permet la détection de cluster. C'est





**Figure 68 : Principe du DBSCAN.** Dans le cercle centré sur A, il y a plus de molécule que le seuil fixé (ici trois) donc ces molécules font partie d'un même cluster. Dans tous les cercles centrés sur les molécules en rouge il y a plus de molécules que le seuil fixé et elles contiennent toutes au moins une molécule remplissant aussi ce critère. Elles appartiennent donc au même cluster. Pour les molécules B et C, le cercle centré sur elles contient une molécule du cluster mais il n'y a pas assez de molécules présentes dans leur cercle pour qu'elles dépassent le seuil fixé. Elles forment donc la limite du cluster. Le cercle centré sur N ne contient aucune molécule du cluster il n'appartient donc pas à celui-ci. Wikimedia Commons contributors, "File:DBSCAN-Illustration.svg," *Wikimedia Commons, the free media repository*, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:DBSCAN-Illustration.svg&oldid=219879325>

un outil puissant mais il repose sur un choix empirique des paramètres par l'utilisateur aboutissant à une analyse heuristique. Dans notre cas, on a choisi de considérer comme cluster tout ensemble d'évènements dont la taille est supérieure à l'incertitude théorique maximale (soit 40 nm de diamètre) et comprenant au moins quinze évènements (soit au moins deux  $F(ab')^2$ ). Le principe repose sur le dénombrement des molécules présentes dans un cercle de rayon  $R$  centré sur  $a$ . Si le nombre de molécules est supérieur au seuil fixé, alors la molécule  $a$  fait partie d'un cluster ; l'algorithme recommence alors avec le point  $b$  compris dans le cercle de centre  $a$ . Si le nombre de molécule est supérieur au seuil fixé, alors la molécule  $b$  fait partie du même cluster que  $a$ . L'utilisateur définit un nombre de molécules minimum remplissant les conditions précitées pour définir l'ensemble comme un cluster. Si la molécule  $n+1$  comprend un ou des points du cluster mais que le nombre de molécule présente dans le cercle de rayon  $R$  est inférieur au seuil fixé alors la molécule  $n+1$  appartient au cluster mais elle en marque la limite (Figure 68). Le résultat est une liste des clusters présents dans la cellule avec leur position, leur taille, le nombre d'évènement de fluorescence détecté dans le cluster. Il est ensuite possible de comparer la distribution des clusters et leurs paramètres dans chacune des conditions afin de déterminer si elles influencent les clusters de Nox2.



# **Cinquième partie**

## **Bibliographie**



1. Ceredig, R., Rolink, A. G. & Brown, G. Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 293–300 (2009).
2. Albani, A. E. *et al.* Large colonial organisms with coordinated growth in oxygenated environments 2.1 Gyr ago. *Nature* **466**, 100 (2010).
3. Buchmann, K. Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Front. Immunol.* **5**, 459 (2014).
4. Villmoare, B. *et al.* Early Homo at 2.8 Ma from Ledi-Geraru, Afar, Ethiopia. *Science* **347**, 1352–1355 (2015).
5. Karamitros, D. *et al.* Single-cell analysis reveals the continuum of human lympho-myeloid progenitor cells. *Nat. Immunol.* **19**, 85–97 (2018).
6. Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. & Dick, J. E. Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell* **10**, 120–136 (2012).
7. Shepherd, B. E., Gutterop, P., Lansdorp, P. M. & Abkowitz, J. L. Estimating human hematopoietic stem cell kinetics using granulocyte telomere lengths. *Exp. Hematol.* **32**, 1040–1050 (2004).
8. Görgens, A. *et al.* Revision of the Human Hematopoietic Tree: Granulocyte Subtypes Derive from Distinct Hematopoietic Lineages. *Cell Rep.* **3**, 1539–1552 (2013).
9. Goardon, N. *et al.* Coexistence of LMPP-like and GMP-like Leukemia Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* **19**, 138–152 (2011).
10. Skokowa, J. *et al.* LEF-1 is crucial for neutrophil granulocytopoiesis and its expression is severely reduced in congenital neutropenia. *Nat. Med.* **12**, nm1474 (2006).
11. Klausen, P., Bjerregaard, M. D., Borregaard, N. & Cowland, J. B. End-stage differentiation of neutrophil granulocytes in vivo is accompanied by up-regulation of p27kip1 and down-regulation of CDK2, CDK4, and CDK6. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 569–578 (2004).
12. Rørvig, S., Østergaard, O., Heegaard, N. H. H. & Borregaard, N. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 711–721 (2013).
13. Cowland, J. B. & Borregaard, N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol. Rev.* **273**, 11–28 (2016).
14. Bjerregaard, M. D., Jurlander, J., Klausen, P., Borregaard, N. & Cowland, J. B. The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow. *Blood* **101**, 4322–4332 (2003).
15. SKOKOWA, J. & WELTE, K. LEF-1 Is a Decisive Transcription Factor in Neutrophil Granulopoiesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1106**, 143–151 (2007).
16. Li, F.-Q. *et al.* Lymphoid Enhancer Factor-1 Links Two Hereditary Leukemia Syndromes through Core-binding Factor  $\alpha$  Regulation of ELA2. *J. Biol. Chem.* **279**, 2873–2884 (2004).
17. Mora-Jensen, H. *et al.* Technical Advance: Immunophenotypical characterization of human neutrophil differentiation. *J. Leukoc. Biol.* **90**, 629–634 (2011).
18. Johansen, L. M. *et al.* c-Myc Is a Critical Target for C/EBP $\alpha$  in Granulopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3789–3806 (2001).
19. Fazi, F. *et al.* A Minicircuitry Comprised of MicroRNA-223 and Transcription Factors NFI-A and C/EBP $\alpha$  Regulates Human Granulopoiesis. *Cell* **123**, 819–831 (2005).
20. Gombart, A. F. *et al.* Neutrophil-specific granule deficiency: homozygous recessive inheritance of a frameshift mutation in the gene encoding transcription factor CCAAT/enhancer binding protein- $\epsilon$ . *Blood* **97**, 2561–2567 (2001).
21. Bartels, M. *et al.* Acetylation of C/EBP $\epsilon$  is a prerequisite for terminal neutrophil differentiation. *Blood* **125**, 1782–1792 (2015).
22. Velu, C. S., Baktula, A. M. & Grimes, H. L. Gfi1 regulates miR-21 and miR-196b to control myelopoiesis. *Blood* **113**, 4720–4728 (2009).
23. Notta, F. *et al.* Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* **351**, aab2116 (2016).
24. Hou, Y.-H. *et al.* Identification of a human B-cell/myeloid common progenitor by the absence of CXCR4. *Blood* **105**, 3488–3492 (2005).



25. Gulino, A. V. *et al.* Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood* **104**, 444–452 (2004).
26. Martin, C. *et al.* Chemokines Acting via CXCR2 and CXCR4 Control the Release of Neutrophils from the Bone Marrow and Their Return following Senescence. *Immunity* **19**, 583–593 (2003).
27. Nagase, H. *et al.* Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 711–717 (2002).
28. Tak, T., Tesselaar, K., Pillay, J., Borghans, J. A. M. & Koenderman, L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 595–601 (2013).
29. Pillay, J. *et al.* In vivo labeling with <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* **116**, 625–627 (2010).
30. Vera, F. *et al.* Acute Effects on the Counts of Innate and Adaptive Immune Response Cells After 1 Month of Taoist Qigong Practice. *Int J Behav Med* **23**, 198–203 (2016).
31. Zhang, Y. *et al.* Alteration of the number and percentage of innate immune cells in preschool children from an e-waste recycling area. *Ecotox Env. Safe* **145**, 615–622 (2017).
32. Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissières, P. & Pugin, J. Innate Immune Functions of Immature Neutrophils in Patients With Sepsis and Severe Systemic Inflammatory Response Syndrome\*: *Crit. Care Med.* **41**, 820–832 (2013).
33. El-Benna, J. *et al.* Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol. Rev.* **273**, 180–193 (2016).
34. Spits, H., Bernink, J. H. & Lanier, L. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat. Immunol.* **17**, 758–764 (2016).
35. Yeaman, G. R. *et al.* IFN-gamma is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **160**, 5145–53 (1998).
36. Ramana, C. V., Gil, M. P., Schreiber, R. D. & Stark, G. R. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN- $\gamma$ -dependent signaling. *Trends Immunol.* **23**, 96–101 (2002).
37. AAS, V., LARSEN, K. & IVERSEN, J.-G. IFN- $\gamma$  Induces Calcium Transients and Increases the Capacitative Calcium Entry in Human Neutrophils. *J. Interferon Cytokine Res.* **18**, 197–205 (1998).
38. Ellis, T. N. & Beaman, B. L. Interferon- $\gamma$  activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology* **112**, 2–12 (2004).
39. Cassatella, M. A. *et al.* Interferon-gamma transcriptionally modulates the expression of the genes for the high affinity IgG-Fc receptor and the 47-kDa cytosolic component of NADPH oxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 22079–82 (1991).
40. Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159 (2013).
41. Petri, B., Phillipson, M. & Kubes, P. The Physiology of Leukocyte Recruitment: An In Vivo Perspective. *J. Immunol.* **180**, 6439–6446 (2008).
42. Zarbock, A., Ley, K., McEver, R. P. & Hidalgo, A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* **118**, 6743–6751 (2011).
43. Kuwano, Y., Spelten, O., Zhang, H., Ley, K. & Zarbock, A. Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood* **116**, 617–624 (2010).
44. Monneau, Y., Arenzana-Seisdedos, F. & Lortat-Jacob, H. The sweet spot: how GAGs help chemokines guide migrating cells. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 935–953 (2016).
45. Oliveira, S. de, Rosowski, E. E. & Huttenlocher, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, nri.2016.49 (2016).
46. Lefort, C. T. *et al.* Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood* **119**, 4275–4282 (2012).





47. Sengeløv, H. *et al.* Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **154**, 4157–65 (1995).
48. Parsons, S. A. *et al.* Endothelial paxillin and focal adhesion kinase (FAK) play a critical role in neutrophil transmigration. *Eur. J. Immunol.* **42**, 436–446 (2012).
49. Yang, L. *et al.* ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- $\alpha$ -activated vascular endothelium under flow. *Blood* **106**, 584–592 (2005).
50. Foxman, E. F., Campbell, J. J. & Butcher, E. C. Multistep Navigation and the Combinatorial Control of Leukocyte Chemotaxis. *J. Cell Biol.* **139**, 1349–1360 (1997).
51. Heit, B., Tavener, S., Raharjo, E. & Kubes, P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J. Cell Biol.* **159**, 91–102 (2002).
52. Marini, O. *et al.* Identification of granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) in the peripheral blood of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma patients. *Oncotarget* **7**, 27676–27688 (2016).
53. Pillay, J., Tak, T., Kamp, V. M. & Koenderman, L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3813–3827 (2013).
54. Scapini, P., Marini, O., Tecchio, C. & Cassatella, M. A. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol. Rev.* **273**, 48–60 (2016).
55. Mougiakakos, D., Johansson, C. C. & Kiessling, R. Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death. *Blood* **113**, 3542–3545 (2009).
56. Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G. & Ochoa, A. C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* **109**, 1568–1573 (2007).
57. Rodriguez, P. C. *et al.* Regulation of T Cell Receptor CD3 $\zeta$  Chain Expression by L-Arginine. *J. Biol. Chem.* **277**, 21123–21129 (2002).
58. Feldmeyer, N. *et al.* Arginine deficiency leads to impaired cofilin dephosphorylation in activated human T lymphocytes. *Int. Immunol.* **24**, 303–313 (2012).
59. Klemke, M. *et al.* Oxidation of Cofilin Mediates T Cell Hyporesponsiveness under Oxidative Stress Conditions. *Immunity* **29**, 404–413 (2008).
60. Bowers, N. L. *et al.* Immune Suppression by Neutrophils in HIV-1 Infection: Role of PD-L1/PD-1 Pathway. *PLoS Pathog.* **10**, e1003993 (2014).
61. Hong, C.-W. Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Netw.* **17**, 298–306 (2017).
62. Denny, M. F. *et al.* A Distinct Subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs. *J. Immunol.* **184**, 3284–3297 (2010).
63. Lood, C. *et al.* Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* **22**, 146–153 (2016).
64. Tsuda, Y. *et al.* An immunosuppressive subtype of neutrophils identified in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **51**, 204–212 (2012).
65. Pillay, J. *et al.* A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* **122**, 327–336 (2012).
66. Scapini, P., Calzetti, F. & Cassatella, M. A. On the detection of neutrophil-derived vascular endothelial growth factor (VEGF). *J. Immunol. Methods* **232**, 121–129 (1999).
67. Silvestre-Roig, C., Hidalgo, A. & Soehnlein, O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood* **127**, 2173–2181 (2016).
68. Naranbhai, V. *et al.* Genomic modulators of gene expression in human neutrophils. *Nat. Commun.* **6**, 7545 (2015).
69. Zimmermann, M. *et al.* Chromatin remodelling and autocrine TNF $\alpha$  are required for optimal interleukin-6 expression in activated human neutrophils. *Nat. Commun.* **6**, 6061 (2015).
70. Tecchio, C., Micheletti, A. & Cassatella, M. A. Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Front. Immunol.* **5**, 508 (2014).



71. Tecchio, C., Micheletti, A. & Cassatella, M. A. Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Front. Immunol.* **5**, 508 (2014).
72. Vono, M. *et al.* Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4 + T cells in vitro and ex vivo. *Blood* **129**, 1991–2001 (2017).
73. Beauvillain, C. *et al.* Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* **110**, 2965–2973 (2007).
74. Takashima, A. & Yao, Y. Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 489–496 (2015).
75. Tillack, K., Breiden, P., Martin, R. & Sospedra, M. T Lymphocyte Priming by Neutrophil Extracellular Traps Links Innate and Adaptive Immune Responses. *J. Immunol.* **188**, 3150–3159 (2012).
76. Walther, A., Riehemann, K. & Gerke, V. A Novel Ligand of the Formyl Peptide Receptor Annexin I Regulates Neutrophil Extravasation by Interacting with the FPR. *Mol. Cell* **5**, 831–840 (2000).
77. Perretti, M. & Dalli, J. Exploiting the Annexin A1 pathway for the development of novel anti-inflammatory therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 936–946 (2009).
78. Ariel, A. *et al.* Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat. Immunol.* **7**, ni1392 (2006).
79. Cauwe, B., Martens, E., Proost, P. & Opdenakker, G. Multidimensional degradomics identifies systemic autoantigens and intracellular matrix proteins as novel gelatinase B/MMP-9 substrates. *Integr. Biol.* **1**, 404–426 (2009).
80. Buckley, C. D. *et al.* Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 303–311 (2006).
81. Hamza, B. *et al.* Retrotaxis of human neutrophils during mechanical confinement inside microfluidic channels. *Integr. Biol.* **6**, 175–183 (2013).
82. Kay, A. B. Paul Ehrlich and the Early History of Granulocytes. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
83. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).
84. Goldmann, O. & Medina, E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front. Immunol.* **3**, 420 (2013).
85. Branzk, N. *et al.* Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* **15**, ni.2987 (2014).
86. Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**, 231–241 (2007).
87. Hakkim, A. *et al.* Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 75 (2011).
88. El Benna, J. E. *et al.* Activation of p38 in Stimulated Human Neutrophils: Phosphorylation of the Oxidase Component p47phox by p38 and ERK but Not by JNK. *Arch. Biochem. Biophys.* **334**, 395–400 (1996).
89. Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A. & Papayannopoulos, V. A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *Cell Rep.* **8**, 883–896 (2014).
90. Remijsen, Q. *et al.* Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* **21**, 290 (2011).
91. Neeli, I. & Radic, M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front. Immunol.* **4**, 38 (2013).
92. Neeli, I., Khan, S. N. & Radic, M. Histone Deimination As a Response to Inflammatory Stimuli in Neutrophils. *J. Immunol.* **180**, 1895–1902 (2008).
93. Urban, C. F. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **5**, e1000639 (2009).
94. Neumann, A. *et al.* The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *Biochem. J.* **464**, 3–11 (2014).



95. Behnen, M. *et al.* Immobilized Immune Complexes Induce Neutrophil Extracellular Trap Release by Human Neutrophil Granulocytes via Fc $\gamma$ RIIIB and Mac-1. *J. Immunol.* **193**, 1954–1965 (2014).
96. Pilszczek, F. H. *et al.* A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* **185**, 7413–7425 (2010).
97. Fraser, S. T., Isern, J. & Baron, M. H. Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell-surface antigen expression. *Blood* **109**, 343–352 (2007).
98. Yousefi, S., Mihalache, C., Kozłowski, E., Schmid, I. & Simon, H. U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* **16**, 1438 (2009).
99. Dąbrowska, D., Jabłońska, E., Garley, M., Ratajczak-Wrona, W. & Iwaniuk, A. New Aspects of the Biology of Neutrophil Extracellular Traps. *Scand. J. Immunol.* **84**, 317–322 (2016).
100. Menegazzi, R., Decleva, E. & Dri, P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood* **119**, 1214–1216 (2012).
101. Schauer, C. *et al.* Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* **20**, 511–517 (2014).
102. Branzk, N. & Papayannopoulos, V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin. Immunopathol.* **35**, 513–530 (2013).
103. Flannagan, R. S., Jaumouillé, V. & Grinstein, S. The Cell Biology of Phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **7**, 61–98 (2012).
104. Colucci-Guyon, E., Tinevez, J.-Y., Renshaw, S. A. & Herbomel, P. Strategies of professional phagocytes in vivo: unlike macrophages, neutrophils engulf only surface-associated microbes. *J. Cell Sci.* **124**, 3053–3059 (2011).
105. Jönsson, F. & Daëron, M. Mast Cells and Company. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
106. Allen, J. & Seed, B. Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs. *Science* **243**, 378–381 (1989).
107. Brown, G. D. & Gordon, S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**, 36–37 (2001).
108. Nordenfelt, P. & Tapper, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **90**, 271–284 (2011).
109. Rosales, C. Fc $\gamma$  Receptor Heterogeneity in Leukocyte Functional Responses. *Front. Immunol.* **8**, 280 (2017).
110. Bruhns, P. *et al.* Specificity and affinity of human Fc $\gamma$  receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* **113**, 3716–3725 (2009).
111. Minakami, R. *et al.* Membrane phospholipid metabolism during phagocytosis in human neutrophils. *Genes Cells* **15**, 409–424 (2010).
112. Bohdanowicz, M. & Grinstein, S. Role of Phospholipids in Endocytosis, Phagocytosis, and Macropinocytosis. *Physiol. Rev.* **93**, 69–106 (2013).
113. Koppel, D. E., Sheetz, M. P. & Schindler, M. Matrix control of protein diffusion in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 3576–3580 (1981).
114. Jaumouillé, V. & Grinstein, S. Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 22–29 (2011).
115. Goodridge, H. S. *et al.* Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a ‘phagocytic synapse’. *Nature* **472**, 471–475 (2011).
116. Trimble, W. S. & Grinstein, S. Barriers to the free diffusion of proteins and lipids in the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **208**, 259–271 (2015).
117. Golebiewska, U. *et al.* Evidence for a fence that impedes the diffusion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate out of the forming phagosomes of macrophages. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3498–3507 (2011).
118. Freiberg, B. A. *et al.* Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat. Immunol.* **3**, 911–917 (2002).
119. Freeman, S. A. *et al.* Integrins Form an Expanding Diffusional Barrier that Coordinates Phagocytosis. *Cell* **164**, 128–140 (2016).



120. Delon, J., Kaibuchi, K. & Germain, R. N. Exclusion of CD43 from the Immunological Synapse Is Mediated by Phosphorylation-Regulated Relocation of the Cytoskeletal Adaptor Moesin. *Immunity* **15**, 691–701 (2001).
121. Jaumouillé, V. *et al.* Actin Cytoskeleton Reorganization by Syk Regulates Fc $\gamma$  Receptor Responsiveness by Increasing Its Lateral Mobility and Clustering. *Dev. Cell* **29**, 534–546 (2014).
122. Masters, T. A., Pontes, B., Viasnoff, V., Li, Y. & Gauthier, N. C. Plasma membrane tension orchestrates membrane trafficking, cytoskeletal remodeling, and biochemical signaling during phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 11875–11880 (2013).
123. Jaumouillé, V. & Grinstein, S. Molecular Mechanisms of Phagosome Formation. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
124. Jumaa, M. A. A., Dewitt, S. & Hallett, M. B. Topographical interrogation of the living cell surface reveals its role in rapid cell shape changes during phagocytosis and spreading. *Sci. Rep.* **7**, 9790 (2017).
125. Herant, M. Mechanics of neutrophil phagocytosis: experiments and quantitative models. *J. Cell Sci.* **119**, 1903–1913 (2006).
126. Fossati, G., Moots, R. J., Bucknall, R. C. & Edwards, S. W. Differential role of neutrophil Fc $\gamma$  receptor IIIb (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes. *Arthritis Rheum.* **46**, 1351–1361 (2002).
127. Rivas-Fuentes, S., García-García, E., Nieto-Castañeda, G. & Rosales, C. Fc $\gamma$  receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. *Cell. Immunol.* **263**, 114–121 (2010).
128. Rotty, J. D. *et al.* Arp2/3 Complex Is Required for Macrophage Integrin Functions but Is Dispensable for FcR Phagocytosis and In Vivo Motility. *Dev. Cell* **42**, 498–513.e6 (2017).
129. Deschamps, C., Echard, A. & Niedergang, F. Phagocytose et cytocinèse: Des thèmes communs et des différences. *médecine/sciences* **29**, 1004–1009 (2013).
130. Niedergang, F. & Grinstein, S. How to build a phagosome: new concepts for an old process. *Curr. Opin. Cell Biol.* **50**, 57–63 (2018).
131. Marie-Anaïs, F., Mazzolini, J., Herit, F. & Niedergang, F. Dynamin-Actin Cross Talk Contributes to Phagosome Formation and Closure: Role of Dynamin in Phagosome Formation and Closure. *Traffic* **17**, 487–499 (2016).
132. Niedergang, F., Colucci-Guyon, E., Dubois, T., Raposo, G. & Chavrier, P. ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J. Cell Biol.* **161**, 1143–1150 (2003).
133. Swanson, J. A. & Hoppe, A. D. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 1093–1103 (2004).
134. Montel, L., Pinon, L. & Fattaccioli, J. A Multiparametric and High-Throughput Assay to Quantify the Influence of Target Size on Phagocytosis. *Biophys. J.* **117**, 408–419 (2019).
135. Dusi, S., Donini, M., Della Bianca, V. & Rossi, F. Tyrosine Phosphorylation of Phospholipase C-Y2 Is Involved In The Activation Of Phosphoinositide Hydrolysis by Fc $\gamma$ -Receptors In Human Neutrophils. *Biochem. Res. Biophys. Res. Commun.* **201**, 1100–1108 (1994).
136. Raeder, E. M. *et al.* Sphingosine blocks human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis through inhibition of mitogen-activated protein kinase activation. *Blood* **93**, 686–93 (1999).
137. García-García, E., Nieto-Castañeda, G., Ruiz-Saldaña, M., Mora, N. & Rosales, C. Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIB Mediate Nuclear Factor Activation through Separate Signaling Pathways in Human Neutrophils. *J. Immunol.* **182**, 4547–4556 (2009).
138. Serrander, L. *et al.* Selective Inhibition of IgG-Mediated Phagocytosis in Gelsolin-Deficient Murine Neutrophils. *J. Immunol.* **165**, 2451–2457 (2000).
139. Lee, W. L., Harrison, R. E. & Grinstein, S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* **5**, 1299–1306 (2003).
140. Bengtsson, T. *et al.* Actin dynamics in human neutrophils during adhesion and phagocytosis is controlled by changes in intracellular free calcium. *Eur. J. Cell Biol.* **62**, 49–58 (1993).
141. Lacy, P. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2**, 98 (2006).





142. Uriarte, S. M. *et al.* Granule Exocytosis Contributes to Priming and Activation of the Human Neutrophil Respiratory Burst. *J. Immunol.* **187**, 391–400 (2011).
143. Tapper, H., Furuya, W. & Grinstein, S. Localized Exocytosis of Primary (Lysosomal) Granules During Phagocytosis: Role of Ca<sup>2+</sup>-Dependent Tyrosine Phosphorylation and Microtubules. *J. Immunol.* **168**, 5287–5296 (2002).
144. Tapper, H. & Grinstein, S. Fc receptor-triggered insertion of secretory granules into the plasma membrane of human neutrophils: selective retrieval during phagocytosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **159**, 409–18 (1997).
145. Burlak, C., Whitney, A. R., Mead, D. J., Hackstadt, T. & DeLeo, F. R. Maturation of Human Neutrophil Phagosomes Includes Incorporation of Molecular Chaperones and Endoplasmic Reticulum Quality Control Machinery. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 620–634 (2006).
146. Dewitt, S. Localised PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> or PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> at the phagocytic cup is required for both phagosome closure and Ca<sup>2+</sup> signalling in HL60 neutrophils. *J. Cell Sci.* **119**, 443–451 (2006).
147. Allen, L.-A. H. Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. *Microbes Infect.* **5**, 1329–1335 (2003).
148. Forsberg, M., Druid, P., Zheng, L., Stendahl, O. & Särndahl, E. Activation of Rac2 and Cdc42 on Fc and complement receptor ligation in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 611–619 (2003).
149. Inupakutika, M. A., Sengupta, S., Devireddy, A. R., Azad, R. K. & Mittler, R. The evolution of reactive oxygen species metabolism. *J. Exp. Bot.* **67**, 5933–5943 (2016).
150. Hajjar, C. *et al.* The NOX Family of Proteins Is Also Present in Bacteria. *mBio* **8**, e01487–17 (2017).
151. Lacaze, I., Lalucque, H., Siegmund, U., Silar, P. & Brun, S. Identification of NoxD/Pro41 as the homologue of the p22phox NADPH oxidase subunit in fungi. *Mol. Microbiol.* **95**, 1006–1024 (2015).
152. Nauseef, W. M. Biological Roles for the NOX Family NADPH Oxidases. *J. Biol. Chem.* **283**, 16961–16965 (2008).
153. Lambeth, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, nri1312 (2004).
154. Dupré-Crochet, S., Erard, M. & Nüße, O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J. Leukoc. Biol.* **94**, 657–670 (2013).
155. Paclét, M.-H., Henderson, L. M., Campion, Y., Morel, F. & Dagher, M.-C. Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. *Biochem. J.* **382**, 981–986 (2004).
156. Campion, Y. *et al.* New insights into the membrane topology of the phagocyte NADPH oxidase: Characterization of an anti-gp91-phox conformational monoclonal antibody. *Biochimie* **89**, 1145–1158 (2007).
157. Roos, D., Bruggen, R. van & Meischl, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* **5**, 1307–1315 (2003).
158. Magnani, F. *et al.* Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201702293 (2017) doi:10.1073/pnas.1702293114.
159. Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., Meir, E. G. V. & Lambeth, J. D. Homologs of gp91 phox : cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* **269**, 131–140 (2001).
160. Biberstine-Kinkade, K. J. *et al.* Heme-ligating Histidines in Flavocytochrome *b*<sub>558</sub>: IDENTIFICATION OF SPECIFIC HISTIDINES IN gp91<sup>phox</sup>. *J. Biol. Chem.* **276**, 31105–31112 (2001).
161. DeLeo, F. R. *et al.* Processing and Maturation of Flavocytochrome *b*<sub>558</sub> Include Incorporation of Heme as a Prerequisite for Heterodimer Assembly. *J. Biol. Chem.* **275**, 13986–13993 (2000).
162. Laurindo, F. R. M., Araujo, T. L. S. & Abrahão, T. B. Nox NADPH Oxidases and the Endoplasmic Reticulum. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 2755–2775 (2014).
163. Beaumel, S., Grunwald, D., Fieschi, F. & Stasia, M. J. Identification of NOX2 regions for normal biosynthesis of cytochrome *b*<sub>558</sub> in phagocytes highlighting essential residues for p22<sup>phox</sup> binding. *Biochem. J.* **464**, 425–437 (2014).



164. Kiyohara, T. *et al.* Differential cell surface recruitment of the superoxide-producing NADPH oxidases Nox1, Nox2 and Nox5: The role of the small GTPase Sar1. *Genes Cells* **23**, 480–493 (2018).
165. Borregaard, N. Subcellular localization and dynamics of components of the respiratory burst oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **20**, 637–651 (1988).
166. Lamb, F. S. *et al.* Endotoxin Priming of Neutrophils Requires Endocytosis and NADPH Oxidase-dependent Endosomal Reactive Oxygen Species. *J. Biol. Chem.* **287**, 12395–12404 (2012).
167. Nunes, P., Demarex, N. & Dinauer, M. C. Regulation of the NADPH Oxidase and Associated Ion Fluxes During Phagocytosis. *Traffic* **14**, 1118–1131 (2013).
168. Brown, M. D. & Sacks, D. B. IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends Cell Biol.* **16**, 242–249 (2006).
169. Jacquemet, G. & Humphries, M. J. IQGAP1 is a key node within the small GTPase network. *Small GTPases* **4**, 199–207 (2013).
170. Hedman, A. C., Smith, J. M. & Sacks, D. B. The biology of IQGAP proteins: beyond the cytoskeleton. *EMBO Rep.* **16**, 427–446 (2015).
171. Choi, S. & Anderson, R. A. IQGAP1 is a phosphoinositide effector and kinase scaffold. *Adv. Biol. Regul.* **60**, 29–35 (2016).
172. Brandt, D. T. *et al.* Dia1 and IQGAP1 interact in cell migration and phagocytic cup formation. *J. Cell Biol.* **178**, 193–200 (2007).
173. Okada, M. *et al.* DGK $\zeta$  is involved in LPS-activated phagocytosis through IQGAP1/Rac1 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **420**, 479–484 (2012).
174. Lominadze, G. *et al.* Proteomic Analysis of Human Neutrophil Granules. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1503–1521 (2005).
175. Ikeda, S. *et al.* IQGAP1 Regulates Reactive Oxygen Species-Dependent Endothelial Cell Migration Through Interacting With Nox2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2295–2300 (2005).
176. McLaughlin, L. M. *et al.* The Salmonella SPI2 Effector SseI Mediates Long-Term Systemic Infection by Modulating Host Cell Migration. *PLoS Pathog.* **5**, e1000671 (2009).
177. Gallois, A., Klein, J. R., Allen, L.-A. H., Jones, B. D. & Nauseef, W. M. Salmonella Pathogenicity Island 2-Encoded Type III Secretion System Mediates Exclusion of NADPH Oxidase Assembly from the Phagosomal Membrane. *J. Immunol.* **166**, 5741–5748 (2001).
178. Sumimoto, H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* **275**, 3249–3277 (2008).
179. Ziegler, C. S. *et al.* 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 (2019).
180. Tlili, A. *et al.* Stable accumulation of p67phox at the phagosomal membrane and ROS production within the phagosome. *J. Leukoc. Biol.* **91**, 83–95 (2012).
181. Tamura, M., Kai, T., Tsunawaki, S., Lambeth, J. D. & Kameda, K. Direct Interaction of Actin with p47phox of Neutrophil NADPH Oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 1186–1190 (2000).
182. Zhan, Y., He, D., Newburger, P. E. & Zhou, G. W. p47phox PX domain of NADPH oxidase targets cell membrane via moesin-mediated association with the actin cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.* **92**, 795–809 (2004).
183. Allen, L. A. *et al.* Transient association of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunits p47phox and p67phox with phagosomes in neutrophils from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* **93**, 3521–30 (1999).
184. Leusen, J. H. *et al.* 156Pro $\rightarrow$ Gln substitution in the light chain of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase (p22-phox) leads to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. *J. Exp. Med.* **180**, (1994).
185. Faure, M. C. *et al.* The recruitment of p47phox and Rac2G12V at the phagosome is transient and phosphatidyserine dependent. *Biol. Cell* **105**, 501–518 (2013).



186. Sumimoto, H. *et al.* Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 5345–5349 (1994).
187. Raad, H. *et al.* Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91<sup>phox</sup>/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67<sup>phox</sup>, and p47<sup>phox</sup>. *FASEB J.* **23**, 1011–1022 (2009).
188. Song, Z. M. *et al.* Phosphoinositol 3-phosphate acts as a timer for reactive oxygen species production in the phagosome. *J. Leukoc. Biol.* **101**, 1155–1168 (2017).
189. Morgan, D. *et al.* Voltage-gated proton channels maintain pH in human neutrophils during phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 18022–18027 (2009).
190. Jankowski, A., Scott, C. C. & Grinstein, S. Determinants of the Phagosomal pH in Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **277**, 6059–6066 (2002).
191. Grinstein, S., Furuya, W. & Biggar, W. D. Cytoplasmic pH regulation in normal and abnormal neutrophils. Role of superoxide generation and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *J. Biol. Chem.* **261**, 512–514 (1986).
192. Paclet, M.-H., Berthier, S., Kuhn, L., Garin, J. & Morel, F. Regulation of phagocyte NADPH oxidase activity: identification of two cytochrome *b*<sub>558</sub> activation states. *FASEB J.* **21**, 1244–1255 (2007).
193. Berthier, S. *et al.* Molecular Interface of S100A8 with Cytochrome b558 and NADPH Oxidase Activation. *PLoS ONE* **7**, e40277 (2012).
194. Roos, D. Chronic Granulomatous Disease. in *NADPH Oxidases* 531–542 (Humana, 2019).
195. Arnold, D. E. & Heimall, J. R. A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Adv. Ther.* **34**, 2543–2557 (2017).
196. Bianchi, M. *et al.* Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* **114**, 2619–2622 (2009).
197. O’Neill, S., Brault, J., Stasia, M.-J. & Knaus, U. G. Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *Redox Biol.* **6**, 135–156 (2015).
198. Matute, J. D. *et al.* A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood* **114**, 3309–3315 (2009).
199. van de Geer, A. *et al.* Inherited p40phox deficiency differs from classic chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* **128**, 3957–3975 (2018).
200. Bouma, G., Ancliff, P. J., Thrasher, A. J. & Burns, S. O. Recent advances in the understanding of genetic defects of neutrophil number and function. *Br. J. Haematol.* **151**, 312–326 (2010).
201. Nguyen, G. T., Green, E. R. & Mecsas, J. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 373 (2017).
202. Taylor, D. N. & Blaser, M. J. The Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Epidemiol. Rev.* **13**, 42–59 (1991).
203. Allen, L. H. & McCaffrey, R. L. To activate or not to activate: distinct strategies used by *Helicobacter pylori* and *Francisella tularensis* to modulate the NADPH oxidase and survive in human neutrophils. *Immunol. Rev.* **219**, 103–117 (2007).
204. Dennis, D. T. *et al.* Tularemia as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management. *JAMA* **285**, 2763–2773 (2001).
205. McCaffrey, R. L. & Allen, L. H. *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 1224–1230 (2006).
206. Monceaux, V. *et al.* Anoxia and glucose supplementation preserve neutrophil viability and function. *Blood* **128**, 993–1002 (2016).
207. Prudovsky, I. A. *et al.* The control of DNA replication in hybrids between neutrophils and fibroblasts. *Cell Prolif.* **26**, 221–233 (1993).
208. Wang, G. G. *et al.* Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8. *Nat. Methods* **3**, nmeth865 (2006).



209. Tucker, K. A., Lilly, M. B., Heck, L. & Rado, T. A. Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood* **70**, 372–8 (1987).
210. Rincón, E., Rocha-Gregg, B. L. & Collins, S. R. A map of gene expression in neutrophil-like cell lines. *BMC Genomics* **19**, 573 (2018).
211. Drexler, H. G., Dirks, W. G., Matsuo, Y. & MacLeod, R. A. F. False leukemia–lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. *Leukemia* **17**, 2402799 (2003).
212. Ear, T. & McDonald, P. P. Cytokine generation, promoter activation, and oxidant-independent NF- $\kappa$ B activation in a transfectable human neutrophilic cellular model. *BMC Immunol.* **9**, 14 (2008).
213. Pedruzzi, E., Fay, M., Elbim, C. & Gougerot-Pocidallo, M. Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte–macrophage colony-stimulating factor. *Br. J. Haematol.* **117**, 719–726 (2002).
214. Pivot-Pajot, C., Chouinard, F. C., Azreq, M. A. E., Harbour, D. & Bourgoin, S. G. Characterisation of degranulation and phagocytic capacity of a human neutrophilic cellular model, PLB-985 cells. *Immunobiology* **215**, 38–52 (2010).
215. Trump, L. R. *et al.* Neutrophils Derived from Genetically Modified Human Induced Pluripotent Stem Cells Circulate and Phagocytose Bacteria In Vivo. *STEM CELLS Transl. Med.* (2019) doi:10.1002/sctm.18-0255.
216. Morishima, T. *et al.* Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J. Cell. Physiol.* **226**, 1283–1291 (2011).
217. Brault, J. *et al.* Optimized Generation of Functional Neutrophils and Macrophages from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells: Ex Vivo Models of X0-Linked, AR220- and AR470-Chronic Granulomatous Diseases. *BioResearch Open Access* **3**, 311–326 (2014).
218. Ma, H. *et al.* Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* **511**, 177–183 (2014).
219. Zhen, L. *et al.* 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.* **90**, 9832–9836 (1993).
220. Ambasta, R. K. *et al.* Direct Interaction of the Novel Nox Proteins with p22phox Is Required for the Formation of a Functionally Active NADPH Oxidase. *J. Biol. Chem.* **279**, 45935–45941 (2004).
221. Murillo, I. & Henderson, L. M. Expression of gp91phox/Nox2 in COS-7 cells: cellular localization of the protein and the detection of outward proton currents. *Biochem. J.* **385**, 649–657 (2005).
222. Manen, H.-J. van *et al.* Refractive Index Sensing of Green Fluorescent Proteins in Living Cells Using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Biophys. J.* **94**, L67–L69 (2008).
223. Casbon, A.-J., Allen, L.-A. H., Dunn, K. W. & Dinauer, M. C. Macrophage NADPH Oxidase Flavocytochrome b Localizes to the Plasma Membrane and Rab11-Positive Recycling Endosomes. *J. Immunol.* **182**, 2325–2339 (2009).
224. Das, V. *et al.* Activation-Induced Polarized Recycling Targets T Cell Antigen Receptors to the Immunological Synapse Involvement of SNARE Complexes. *Immunity* **20**, 577–588 (2004).
225. Wülfing, C. & Davis, M. M. A Receptor/Cytoskeletal Movement Triggered by Costimulation During T Cell Activation. *Science* **282**, 2266–2269 (1998).
226. Kupfer, A., Mosmann, T. R. & Kupfer, H. Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 775–779 (1991).
227. Niedergang, F., Bartolo, V. D. & Alcover, A. Comparative Anatomy of Phagocytic and Immunological Synapses. *Front. Immunol.* **7**, 18 (2016).
228. Yokosuka, T. *et al.* Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat. Immunol.* **6**, ni1272 (2005).
229. Wientjes, F. B., Segal, A. W. & Hartwig, J. H. Immunoelectron microscopy shows a clustered distribution of NADPH oxidase components in the human neutrophil plasma membrane. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 303–312 (1997).





230. Loike, J. D. & Silverstein, S. C. A fluorescence quenching technique using trypan blue to differentiate between attached and ingested glutaraldehyde-fixed red blood cells in phagocytosing murine macrophages. *J. Immunol. Methods* **57**, 373–379 (1983).
231. Hartl, D. *et al.* Dysregulation of innate immune receptors on neutrophils in chronic granulomatous disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 375–382.e9 (2008).
232. Chen, X., Zaro, J. L. & Shen, W.-C. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1357–1369 (2013).
233. Fialkow, L., Wang, Y. & Downey, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 153–164 (2007).
234. Gresham, H. D., McGarr, J. A., Shackelford, P. G. & Brown, E. J. Studies on the molecular mechanisms of human Fc receptor-mediated phagocytosis. Amplification of ingestion is dependent on the generation of reactive oxygen metabolites and is deficient in polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* **82**, 1192–1201 (1988).
235. Dingjan, I. *et al.* VAMP8-mediated NOX2 recruitment to endosomes is necessary for antigen release. *Eur. J. Cell Biol.* **96**, 705–714 (2017).
236. Lamb, F. S. *et al.* Endotoxin Priming of Neutrophils Requires Endocytosis and NADPH Oxidase-dependent Endosomal Reactive Oxygen Species. *J. Biol. Chem.* **287**, 12395–12404 (2012).
237. McLaughlin, N. J. D. *et al.* Platelet-Activating Factor-Mediated Endosome Formation Causes Membrane Translocation of p67<sup>phox</sup> and p40<sup>phox</sup> That Requires Recruitment and Activation of p38 MAPK, Rab5a, and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Human Neutrophils. *J. Immunol.* **180**, 8192–8203 (2008).
238. Buckle, A. M. & Hogg, N. The effect of IFN-gamma and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **143**, 2295–301 (1989).
239. Ellison, M. A., Gearheart, C. M., Porter, C. C. & Ambruso, D. R. IFN- $\gamma$  alters the expression of diverse immunity related genes in a cell culture model designed to represent maturing neutrophils. *PLOS ONE* **12**, e0185956 (2017).
240. Ellison, M. A. *et al.* INF- $\gamma$  Enhances Nox2 Activity by Upregulating phox Proteins When Applied to Differentiating PLB-985 Cells but Does Not Induce Nox2 Activity by Itself. *PLOS ONE* **10**, e0136766 (2015).
241. Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *EMBO J.* **30**, 3481–3500 (2011).
242. Li, L. *et al.* The effect of the size of fluorescent dextran on its endocytic pathway: Size-based endocytic entry for fluid cargoes. *Cell Biol. Int.* **39**, 531–539 (2015).
243. Ejlerskov, P. *et al.* NADPH Oxidase Is Internalized by Clathrin-coated Pits and Localizes to a Rab27A/B GTPase-regulated Secretory Compartment in Activated Macrophages. *J. Biol. Chem.* **287**, 4835–4852 (2012).
244. Samson, E. B. *et al.* The coordinating role of IQGAP1 in the regulation of local, endosome-specific actin networks. *Biol. Open* **6**, 785–799 (2017).
245. Neel, N. F. *et al.* IQGAP1 Is a Novel CXCR2-Interacting Protein and Essential Component of the “Chemosynapse”. *PLoS ONE* **6**, e23813 (2011).
246. Ren, J.-G., Li, Z., Crimmins, D. L. & Sacks, D. B. Self-association of IQGAP1: CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL SEQUELAE. *J. Biol. Chem.* **280**, 34548–34557 (2005).
247. Paclet, M.-H., Coleman, A. W., Vergnaud, S. & Morel, F. P67-phox-Mediated NADPH Oxidase Assembly: Imaging of Cytochrome *b*<sub>558</sub> Liposomes by Atomic Force Microscopy<sup>†</sup>. *Biochemistry* **39**, 9302–9310 (2000).
248. Trautmann, A. & Valitutti, S. The diversity of immunological synapses. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 249–254 (2003).
249. Ellis, J. A., Mayer, S. J. & Jones, O. T. The effect of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium on aerobic and anaerobic microbicidal activities of human neutrophils. *Biochem. J.* **251**, 887–891 (1988).



250. Hellebrekers, P., Hietbrink, F., Vriskoop, N., Leenen, L. P. H. & Koenderman, L. Neutrophil Functional Heterogeneity: Identification of Competitive Phagocytosis. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
251. Magnani, F. & Mattevi, A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **59**, 91–97 (2019).
252. Chuong Nguyen, M. V. *et al.* Les NADPH oxydases, Nox: Une nouvelle famille d'isoenzymes. *médecine/sciences* **31**, 43–52 (2015).
253. von Lohneysen, K., Noack, D., Wood, M. R., Friedman, J. S. & Knaus, U. G. Structural Insights into Nox4 and Nox2: Motifs Involved in Function and Cellular Localization. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 961–975 (2010).
254. Tlili, A., Dupré-Crochet, S., Erard, M. & Nüße, O. Kinetic analysis of phagosomal production of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 438–447 (2011).
255. Czarniecki, C. W. & Sonnenfeld, G. Interferon-gamma and resistance to bacterial infections. *APMIS* **101**, 1–17 (1993).
256. Souza-Fonseca-Guimaraes, F. *et al.* Toll-like receptors expression and interferon- $\gamma$  production by NK cells in human sepsis. *Crit. Care* **16**, R206 (2012).
257. Huang, K.-J. *et al.* An interferon- $\gamma$ -related cytokine storm in SARS patients. *J. Med. Virol.* **75**, 185–194 (2005).
258. Razaghi, A., Owens, L. & Heimann, K. Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: Impacts of production platforms and glycosylation. *J. Biotechnol.* **240**, 48–60 (2016).
259. Borregaard, N. Subcellular localization and dynamics of components of the respiratory burst oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **20**, 637–651 (1988).
260. Prinz, N. *et al.* Antiphospholipid antibodies induce translocation of TLR7 and TLR8 to the endosome in human monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **118**, 2322–2332 (2011).
261. Casbon, A.-J., Long, M. E., Dunn, K. W., Allen, L.-A. H. & Dinauer, M. C. Effects of IFN- $\gamma$  on intracellular trafficking and activity of macrophage NADPH oxidase flavocytochrome b<sub>558</sub>. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 869–882 (2012).
262. Perskvist, N., Roberg, K., Kulyté, A. & Stendahl, O. Rab5a GTPase regulates fusion between pathogen containing phagosomes and cytoplasmic organelles in human neutrophils. *J. Cell Sci.* **115**, 1321–1330 (2002).
263. Minakami, R. *et al.* Membrane phospholipid metabolism during phagocytosis in human neutrophils. *Genes Cells* **15**, 409–424 (2010).
264. Li, Q. *et al.* Nox2 and Rac1 Regulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dependent Recruitment of TRAF6 to Endosomal Interleukin-1 Receptor Complexes. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 140–154 (2006).
265. Theart, R. P., Loos, B. & Niesler, T. R. Virtual reality assisted microscopy data visualization and colocalization analysis. *BMC Bioinformatics* **18**, (2017).
266. Pierini, L. M., Lawson, M. A., Eddy, R. J., Hendey, B. & Maxfield, F. R. Oriented endocytic recycling of  $\alpha_5\beta_1$  in motile neutrophils. *Blood* **95**, 12 (2000).
267. Bolte, S. & Cordelières, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **224**, 213–232 (2006).
268. Dingjan, I. *et al.* Oxidized phagosomal NOX2 complex is replenished from lysosomes. *J. Cell Sci.* **130**, 1285–1298 (2017).
269. Uriarte, S. M. *et al.* Granule Exocytosis Contributes to Priming and Activation of the Human Neutrophil Respiratory Burst. *J. Immunol.* **187**, 391–400 (2011).
270. Guermonprez, P. *et al.* ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**, 397–402 (2003).
271. Wahe, A. *et al.* Golgi-to-phagosome transport of acid sphingomyelinase and prosaposin is mediated by sortilin. *J. Cell Sci.* **123**, 2502–2511 (2010).



272. Hanes, C. M. *et al.* Golgi-Associated Protein Kinase C- $\epsilon$  Is Delivered to Phagocytic Cups: Role of Phosphatidylinositol 4-Phosphate. *J. Immunol.* **199**, 271–277 (2017).
273. Sakaue-Sawano, A. *et al.* Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell* **132**, 487–498 (2008).
274. Shen, Y., Chen, Y., Wu, J., Shaner, N. C. & Campbell, R. E. Engineering of mCherry variants with long Stokes shift, red-shifted fluorescence, and low cytotoxicity. *PLOS ONE* **12**, e0171257 (2017).
275. Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* **2**, 905–909 (2005).
276. Damiani, M. T. *et al.* Rab Coupling Protein Associates with Phagosomes and Regulates Recycling from the Phagosomal Compartment: Rab Coupling Protein Regulates Recycling from Phagosomes. *Traffic* **5**, 785–797 (2004).
277. Pitt, A., Mayorga, V. L. S. & Schwartz, A. L. Transport of Phagosomal Components to an Endosomal Compartment. *J. Biol. Chem.* **267**, 126–132 (1992).
278. Zhang, M. *et al.* Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent proteins. *Nat. Methods* **9**, 727–729 (2012).
279. Paez Segala, M. G. *et al.* Fixation-resistant photoactivatable fluorescent proteins for correlative light and electron microscopy. *Nat. Methods* **12**, 215–218 (2015).
280. Bouma, G., Ancliff, P. J., Thrasher, A. J. & Burns, S. O. Recent advances in the understanding of genetic defects of neutrophil number and function. *Br. J. Haematol.* **151**, 312–326 (2010).
281. Briggs, M. W. & Sacks, D. B. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep.* **4**, 571–574 (2003).
282. Granger, E., McNee, G., Allan, V. & Woodman, P. The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* **31**, 20–29 (2014).
283. Jausoro, I., Mestres, I., Remedi, M., Sanchez, M. & Cáceres, A. IQGAP1: A microtubule-microfilament scaffolding protein with multiple roles in nerve cell development and synaptic plasticity. *Histol. Histopathol.* 1385–1394 (2012) doi:10.14670/HH-27.1385.
284. Mathias, B. *et al.* LPS Stimulation of Cord Blood Reveals a Newborn-Specific Neutrophil Transcriptomic Response and Cytokine Production: *SHOCK* **47**, 606–614 (2017).
285. Dustin, M. L. Signaling at neuro/immune synapses. *J. Clin. Invest.* **122**, 1149–1155 (2012).
286. Griffiths, G. M., Tsun, A. & Stinchcombe, J. C. The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis. *J. Cell Biol.* **189**, 399–406 (2010).
287. Marshall, M. R. *et al.* VAMP8-dependent fusion of recycling endosomes with the plasma membrane facilitates T lymphocyte cytotoxicity. *J. Cell Biol.* **210**, 135–151 (2015).
288. Pillay, J. *et al.* A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* **122**, 327–336 (2012).
289. Garcia-Parajo, M. F., Cambi, A., Torreno-Pina, J. A., Thompson, N. & Jacobson, K. Nanoclustering as a dominant feature of plasma membrane organization. *J. Cell Sci.* **127**, 4995–5005 (2014).
290. Paeon, S. V. *et al.* Functional role of T-cell receptor nanoclusters in signal initiation and antigen discrimination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E5454–E5463 (2016).
291. Wu, W.-S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* **25**, 695–705 (2007).
292. Taddei, M. L. *et al.* Integrin-Mediated Cell Adhesion and Spreading Engage Different Sources of Reactive Oxygen Species. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 469–481 (2007).
293. Seo, J. H., Ahn, Y., Lee, S.-R., Yeo, C. Y. & Hur, K. C. The Major Target of the Endogenously Generated Reactive Oxygen Species in Response to Insulin Stimulation Is Phosphatase and Tensin Homolog and Not Phosphoinositide-3 Kinase (PI-3 Kinase) in the PI-3 Kinase/Akt Pathway. *Mol. Biol. Cell* **16**, 10 (2005).
294. Chieregatti, E. & Meldolesi, J. Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 181–187 (2005).
295. Grant, B. D. & Donaldson, J. G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 597–608 (2009).



296. Patino-Lopez, G. *et al.* Rab35 and Its GAP EPI64C in T Cells Regulate Receptor Recycling and Immunological Synapse Formation. *J. Biol. Chem.* **283**, 18323–18330 (2008).
297. Ray, P. D., Huang, B.-W. & Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* **24**, 981–990 (2012).
298. Robertson, S. E. *et al.* Extracellular Signal-regulated Kinase Regulates Clathrin-independent Endosomal Trafficking. *Mol. Biol. Cell* **17**, 13 (2006).
299. Chesneau, L. *et al.* An ARF6/Rab35 GTPase Cascade for Endocytic Recycling and Successful Cytokinesis. *Curr. Biol.* **22**, 147–153 (2012).
300. Hsu, C. *et al.* Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J. Cell Biol.* **189**, 223–232 (2010).
301. Ruckstuhl, T. & Verdes, D. Supercritical angle fluorescence (SAF) microscopy. *Opt. Express* **12**, 4246 (2004).
302. Marsh, R. J. *et al.* Artifact-free high-density localization microscopy analysis. *Nat. Methods* **15**, 689–692 (2018).
303. Sage, D. *et al.* Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy. *Nat. Methods* **12**, 717–724 (2015).
304. Ovesný, M., Křížek, P., Borkovec, J., Švindrych, Z. & Hagen, G. M. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics* **30**, 2389–2390 (2014).
305. Mazouchi, A. & Milstein, J. N. Fast Optimized Cluster Algorithm for Localizations (FOCAL): a spatial cluster analysis for super-resolved microscopy. *Bioinformatics* **32**, 747–754 (2016).
306. Levet, F. *et al.* SR-Tesseler: a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. *Nat. Methods* **12**, 1065–1071 (2015).
307. Benna, J. E. *et al.* Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Subunit p67<sup>phox</sup> during Human Neutrophil Activation: REGULATION BY PROTEIN KINASE C-DEPENDENT AND INDEPENDENT PATHWAYS. *J. Biol. Chem.* **272**, 17204–17208 (1997).
308. Wrona, D., Siler, U. & Reichenbach, J. CRISPR/Cas9-generated p47phox-deficient cell line for Chronic Granulomatous Disease gene therapy vector development. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
309. van Manen, H.-J. *et al.* Refractive Index Sensing of Green Fluorescent Proteins in Living Cells Using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Biophys. J.* **94**, L67–L69 (2008).
310. Dupré-Crochet, S., Erard, M. & Nüsse, O. Kinetic Analysis of Phagosomal ROS Generation. in *NADPH Oxidases* 301–312 (Humana, 2019).
311. Bates, M., Jones, S. A. & Zhuang, X. Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM): A Method for Superresolution Fluorescence Imaging. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2013**, pdb.top075143 (2013).
312. Bardell, D. The Invention of the Microscope. *Bios* **75**, 78–84 (2004).
313. Tam, J. & Merino, D. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) in comparison with stimulated emission depletion (STED) and other imaging methods. *J. Neurochem.* **135**, 643–658 (2015).
314. Endesfelder, U. & Heilemann, M. Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (dSTORM). in *Advanced Fluorescence Microscopy* 263–276 (Humana, 2015).
315. Poulter, N. S., Pitkeathly, W. T. E., Smith, P. J. & Rappoport, J. Z. The Physical Basis of Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy and Its Cellular Applications. in *Advanced Fluorescence Microscopy* 1–23 (Humana, 2015).
316. Tokunaga, M., Imamoto, N. & Sakata-Sogawa, K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat. Methods* **5**, 159–161 (2008).
317. Geissbuehler, S., Dellagiacomma, C. & Lasser, T. Comparison between SOFI and STORM. *Biomed. Opt. Express* **2**, 408 (2011).
318. Huang, B., Jones, S. A., Brandenburg, B. & Zhuang, X. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nat. Methods* **5**, 1047–1052 (2008).





319. Dempsey, G. T., Vaughan, J. C., Chen, K. H., Bates, M. & Zhuang, X. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat. Methods* **8**, 1027–1036 (2011).
320. Dunn, K. W., Kamocka, M. M. & McDonald, J. H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **300**, C723–C742 (2011).
321. Xu, J., Ma, H. & Liu, Y. Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM): Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). in *Current Protocols in Cytometry* (eds. Robinson, J. P. et al.) 12.46.1-12.46.27 (John Wiley & Sons, Inc., 2017). doi:10.1002/cpcy.23.



**Titre :** Dynamique de la protéine Nox2 lors de la phagocytose

**Mots clés :** Neutrophile, Phagocytose, NADPH oxydase, Trafic cellulaire, Imagerie, Super-résolution

**Résumé :** Les neutrophiles sont les leucocytes les plus nombreux et les premières cellules à arriver au site de l'infection où elles internalisent les pathogènes par phagocytose. Dès le début du processus, la NADPH oxydase s'assemble au phagosome où elle permet la production de formes réactives de l'oxygène contribuant ainsi à la destruction du pathogène. La sous-unité catalytique membranaire de la NADPH oxydase, Nox2, est donc présente à la coupe phagocytaire puis au phagosome. Le dessein de cette étude était de déterminer quelles sont les sources subcellulaires de la protéine Nox2, de savoir si la protéine s'accumule au phagosome et le cas échéant selon quelle cinétique. Dans le but de comprendre la dynamique de la protéine Nox2, la protéine d'échafaudage IQGAP1 qui est associée au cytosquelette a également été étudiée. Enfin l'étude de l'organisation spatiale de la protéine Nox2 à la synapse phagocytaire a également été abordé.

En utilisant des cellules *neutrophil-like* (PLB-985) ainsi que des neutrophiles humains, notre étude a montré par immunofluorescence la présence de la protéine Nox2 dans des endosomes de recyclage ou dans des endosomes précoces. Lors de la phagocytose ils avoisinent le phagosome suggérant leur implication dans l'apport de la protéine Nox2 à la membrane de ce dernier. L'utilisation de cellules PLB-985 pour lesquelles l'expression de Nox2 a été supprimée puis réintroduite avec un transgène codant pour la protéine GFP-Nox2 montre que la sous-unité Nox2 s'accumule au phagosome pendant les vingt minutes suivant sa fermeture. Dans notre étude, la protéine IQGAP1 ne semble pas avoir d'effet sur la phagocytose ou sur la production de FRO par la NADPH oxydase. Enfin, grâce à une technique de microscopie super-résolution (le dSTORM) l'évolution du pattern de Nox2 dans la membrane a été évalué au cours du temps en phagocytose frustrée. En dix minutes, le nombre de clusters de protéine Nox2 augmente mais leur taille reste inchangée.

**Title :** Protein Nox2 Dynamics during phagocytosis

**Keywords :** Neutrophil, Phagocytosis, NADPH oxidase, Cellular trafficking, Imaging, Super-resolution

**Abstract :** Neutrophils are the most numerous leukocytes and the first cells to arrive at the site of infection where they internalize pathogens by phagocytosis. From the beginning of the process, the NADPH oxidase is assembled at the phagosome, where it allows the production of reactive oxygen species (ROS), thus contributing to the destruction of the pathogen. The membrane bound catalytic subunit of the NADPH oxidase, Nox2, is therefore recruited at the phagocytic cup and then at the phagosome. The purpose of this study was to determine, which are the subcellular sources of the Nox2 protein, whether the protein accumulates at the phagosome and if so, according to which kinetics. In order to modify the dynamics of the Nox2 protein, the scaffold protein IQGAP1 that is associated with the cytoskeleton was also studied. Finally, the spatial organization of the Nox2 protein in the phagocytic synapse was also investigated.

Using neutrophil-like cells (PLB-985) as well as human neutrophils, our study showed by immunofluorescence the presence of the Nox2 protein in recycled or early endosomes. During phagocytosis, they are close to the phagosome, suggesting their involvement in the contribution of the Nox2 protein to the phagosome membrane. The use of PLB-985 for which Nox2 expression has been suppressed and then reintroduced with a transgene encoding the GFP-Nox2 protein shows that the Nox2 subunit accumulates at the phagosome during the first twenty minutes after its closure. In our study, the protein IQGAP1 does not appear to have any effect on phagocytosis or on the production of ROS by NADPH oxidase. Finally, using super resolution microscopy (dSTORM) the evolution of the Nox2 pattern in the membrane has been evaluated over time in frustrated phagocytosis. Within ten minutes, the number of Nox2 protein clusters increases but their size remains unchanged.