

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2

THÈSE

Présentée par : **Belambri Sahra Amel**

Pour obtenir le diplôme de **Doctorat en Sciences**

Option : Biochimie

THÈME

**Etude du mécanisme d'activation de la NADPH oxydase
phagocytaire : Analyse de la dynamique de phosphorylation de la
p47phox dans le neutrophile activé.**

Soutenue publiquement le

DEVANT LE JURY

PRESIDENT : **Pr Bouriche Hamama**

Pr. UFA Sétif 1.

RAPPORTEUR : **Pr Senator Abderrahmane**

Pr. UFA Sétif 1.

CO-RAPPORTEUR: **Dr El Benna Jamel**

PhD. HDR au CNRS, Paris.

EXAMINATEUR : **Pr Djerdjouri Bahia**

Pr. USTBH Alger.

EXAMINATEUR : **Dr Belaaloui Ghania**

MCA. UHL Batna.

Année universitaire 2013/2014

Remerciements

*Je remercie infiniment le Professeur **Abderrahmane Senator** qui n'a jamais failli à sa mission de me conduire et de me diriger vers la réussite et ce depuis mon magister. Il a su se montrer patient avec moi et d'un esprit scientifique incomparable.*

*Nul mot ne pourra exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude envers le **Docteur Jamel El Benna** qui m'a accueillie dans son équipe de recherche à l'INSERM U773 dans le centre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon à Paris. Son expertise dans le domaine des PN et des NOXs, sa disponibilité incomparable et sa générosité infinie font du **Dr Jamel El Benna** un directeur de recherche " par excellence". Je suis tombée amoureuse du neutrophile quand j'ai commencé à travailler avec le **Pr Laid Selloum** et cet amour a grandi encore plus au sein de votre équipe **Jamel**, ce fut un honneur pour moi de travailler avec vous.*

*Je remercie Le Professeur **Hamama Bouriche**, Le Professeur **Bahia Djerdjouri** et le Docteur **Ghania Belaaloui** qui m'ont honorée en acceptant de juger et d'examiner mon travail.*

*Je tiens également à remercier tous les autres chercheurs et membres de l'équipe « Phagocytes, Cellules épithéliales et NADPH oxydases » de l'U773, particulièrement le Professeur **Marie-Anne Gougerot-Pocidallo**, le Docteur **Pham MY-Chan Dang**, Le Docteur **Jean-Claud Marie** et le Docteur **Axel Perianin**.*

***Loïc, Michèle, Soum, Ness, Riad, Karama, Pia, Margarita, Maya et Tarek, MERCI** pour ce que vous avez été pour moi, une équipe de rêve qui en a fait des envieux mais aussi mon unique famille de Paris.*

*Merci à mon équipe de recherche «**Stress Oxydatif et Inflammation**» et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail : **Hamama, Chahra, Abdelali, Dalila, Asma, Hichem** et **Ayoub**, ainsi que mon amie de toujours **Kaouthar** et mon meilleur ennemi **Yacine**, qui ont tous su m'encourager à aller de l'avant durant les moments les plus difficiles.*

*Je dois aussi un **MERCI** particulier au Docteur **Boussouar Fayçal** qui m'a offert la toute première opportunité de partir en France et d'intégrer l'équipe du Docteur **El Benna**.*

*Je remercie le **Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique** qui m'a accordé la bourse d'étude PNE dans le cadre de laquelle j'ai pu réaliser ce travail au sein de l'équipe du Dr **Jamel EL Benna**.*

Dédicaces

*Je dédie ce travail à la mémoire de ma chère et tant regrettée défunte grand-mère «**Yaïci Baya, MAMAAZIZOU** pour ceux qui la chérissaient » sans qui je ne serais arrivée nulle part. Les plus belles années de ma vie sont celles que j'ai passées à ses côtés. Qu'ALLAH dans sa grande miséricorde ait pitié de son âme et lui alloue une place de choix dans son paradis céleste.*

***A mes chers parents** : Au-delà des mots et des phrases, aucune parole ni aucune dédicace ne saurait exprimer mon profond amour, mon éternel attachement, ma perpétuelle affection et l'infinie gratitude que je vous dois. Vous êtes tous pour moi et je vous dois tout. Puissiez-vous trouver dans ce travail fierté et satisfaction .*

***A mes chers compagnons de vie** : **Sabrina, Karim, Lynda, Mohamed, Sihem, Fayçal, Islma, Yahia et Ilyess**, qui ont toujours répondu présents pour moi et ont su me soutenir et m'encourager jusqu'à la fin.*

Résumé

La phosphorylation de la p47phox sur ses différents résidus sérines situés dans sa partie C-terminale constitue une étape décisive et indispensable à l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire ou NOX2. Dans cette étude, des anticorps spécifiques de 8 sites (Ser304, 315, 320, 328, 345, 359, 370, 379) de phosphorylation de la p47phox du neutrophile humain ont été développés. Leur utilisation a permis une analyse précise et rigoureuse et a révélé de nouvelles données au sujet de ce processus de phosphorylation de la p47phox dans le neutrophile activé par le fMLF ou le PMA. Les sérines 304, 315, 320 et 328 de la p47phox sont phosphorylées de manière temps et dose dépendante du fMLF et du PMA, alors que ces deux stimulants n'ont pas d'effet sur la phosphorylation de la sérine 345. La phosphorylation très rapide et transitoire induite par le fMLF sur ces 4 sérines est inhibée par la wortmannin, le GF109203X et la génistéine. Alors que le PMA induit une phosphorylation plus lente et continue de ces mêmes sérines et qui n'est inhibée que par le GF109302X. Par ailleurs, la p47phox présente déjà une phosphorylation sur les résidus sérines 359, 370 et 379 dans les neutrophiles au repos qui n'est modifiée ni par les stimulants ni par les inhibiteurs utilisés. Les p47phox phosphorylées sur tous les résidus sérines sont présentes dans le cytosol des neutrophiles fMLF et PMA-stimulés. Alors que dans les membranes et les granules des neutrophiles fMLF stimulés, la p47phox est phosphorylée sur les résidus sérines 315, 320, 328 et 370 avec la sérine 304 qui était faiblement phosphorylée seulement dans les granules. Alors qu'au niveau des membranes et des granules des neutrophiles PMA-stimulés, la p47phox est phosphorylée sur les sérines 304, 315, 320, 328 et 345. Les protéines phosphorylées sur les sérines 359 et 379 sont absentes des membranes et des granules des neutrophiles stimulés par le fMLF ou le PMA. La p47phox est également phosphorylée sur les sérines 304, 315, 320, 328 et 345 dans les lymphocytes B transformés à l'EBV stimulés par la pansorbine ou le PMA et cette phosphorylation est inhibée par le GF109203X. La mutation de tous les résidus sérines de la p47phox en alanine S(303-379)A abolit la production des ROS dans ces cellules. Dans les cellules HL60 en cours de différenciation en neutrophiles, la phosphorylation basale de la p47phox, en cours d'expression, sur les résidus sérines 359 et 370 apparaît à partir du 3 jour de différenciation puis augmente jusqu'au dernier jour alors que la phosphorylation de la sérine 379 apparaît dès le premier jour et reste stable. En fin, l'analyse *in vivo* de la phosphorylation de la p47phox dans le modèle de la pleurésie induite chez le rat par le λ -carrageenane a montré que la p47phox est phosphorylée transitoirement sur les sérines 304, 320 et 328 alors que la phosphorylation de la sérine 315 est plus stable et continue. Ainsi, l'utilisation des anticorps antiphospho-sérines développés a permis de capturer pour la première fois la dynamique spatio-temporelle de phosphorylation de la p47phox sur ces différents résidus sérines et d'investiguer le processus *in vivo*. La phosphorylation de la sérine 315 pourrait être utilisée comme marqueur de la phosphorylation *in vivo* de la p47phox dans différentes conditions physiologiques.

Mots clés : Inflammation, Neutrophile, NOX2, p47phox, phospho-sérine, explosion oxydative.

Summary

Activation of the phagocytic NADPH oxidase is known to require absolutely phosphorylation of its subunit, p47phox on several serine residues (Ser303-379) in its C-terminus. We developed in this study specific antibodies raised against 8 major phosphorylated human p47phox sites (Ser304, Ser315, Ser320, Ser328, Ser345, Ser359, Ser370 and Ser379) to stringently study this process during activation. The use of these antibodies reveals new findings about p47phox phosphorylation in fMLF and PMA-stimulated neutrophils and allowed us to monitor, for the first time, this process *in vivo*. p47phox is phosphorylated on Ser304, 315, 320 and 328 in a time and dose-dependent manner in fMLF and PMA-stimulated human neutrophils, but Ser345 is not. fMLF-induced phosphorylation on all of these sites is very rapid and transient and is inhibited by genistein, wortmannin and GF109203X. Whereas PMA-induced phosphorylation on these sites is more sustained and is inhibited only by GF109203X. p47phox shows a phosphorylation on serine 359, 370 and 379 in non-stimulated cells which is not modified by any activator or inhibitor used. Proteins phosphorylated on serine 304, 315, 320, 328, 345, 359, 370 and 379 are present in the cytosol of fMLF and PMA-stimulated neutrophils. Whereas p47phox present in membranes and granules of fMLF-stimulated neutrophils is phosphorylated on serine 315, 320, 328 and 370 with serine 304 being slightly phosphorylated in granules. In membranes and granules of PMA-stimulated neutrophils, p47phox is phosphorylated on serine 304, 315, 320, 328 and 345. p47phox is also phosphorylated at least on serine 304, 315, 320, 328 and 345 in EBV-transformed B-lymphocytes stimulated by phorbol or PMA. Mutation of p47phox phosphorylation sites to alanine S(303-370)A abolishes ROS production by these cells. During differentiation of HL60 cells, basal phosphorylation of the expressing p47phox on serine 359 and 370 starts on the 3rd day than increases until the last day of cell differentiation, whereas phosphorylation of serine 379 appears on the first day and is more stable. *In vivo* studies in a carrageenan-induced pleurisy rat model show that Ser304, 320 and 328 are transiently phosphorylated, while Ser315 phosphorylation is sustained. Thus, these antibodies allowed to capture the spatial and temporal phosphorylation of p47phox and to monitor this process *in vivo*. Phosphorylation of Ser315 may be a good marker to monitor p47phox phosphorylation *in vivo* under a variety of physiological conditions.

Key words: Inflammation, neutrophils, NOX2, p47phox, phosphor-serines, respiratory burst.

الملخص:

تشكل فسفرة p47phox على مختلف جزئيات سيرين، المتواجدة في النهاية الكربونية، مرحلة حاسمة وأساسية لتنشيط انزيم NADPH oxydase للخلايا البالعة أو NOX2 خلال هذه الدراسة، تم تطوير أجسام مضادة موجهة ضد 8 مواقع فسفرة (سيرين 304، 315، 320، 328، 345، 359، 370، 379) ل p47phox المتواجدة على الخلايا المتعادلة للإنسان. استعمال هذه الأجسام المضادة سمح بإجراء تحليل جد دقيق و كشف عن معطيات جديدة في ما يخص آليات فسفرة p47phox في الخلايا المتعادلة المنشطة ب fMLF أو PMA جزئيات سيرين 304، 315، 320 و 328 على p47phox مفسفرة بصورة تابعة للوقت و لجرعات fMLF و PMA، في حين أن هذين المنشطين ليس لهما تأثير على فسفرة سيرين 345. الفسفرة السريعة جدا و المؤقتة لجزئيات السيرين الأربعة التي يسببها fMLF تم تثبيطها ب wortmannin ، GF109203 و génistéine. في حين أن PMA يسبب فسفرة أكثر بطئا و استمرارا لنفس جزئيات السيرين الأربعة و التي لا تثبط إلا ب GF109302X. من جهة أخرى، تحتوي p47phox مسبقا على جزئيات سيرين 359، 370 و 379 مفسفرة في الخلايا المتعادلة في حالة الاستراحة، هذه الفسفرة لم تتغير رغم استعمال مختلف المنشطات و المثبطات. p47phox المتواجدة في هيولى الخلايا المتعادلة المنشطة ب fMLF و PMA مفسفرة على جميع جزئيات السيرين. في حين أنه على مستوى الغشاء الخلوي و الحبيبات للخلايا المتعادلة المنشطة ب fMLF، p47phox مفسفرة على جزئيات السيرين 315، 320، 328 و 370، مع فسفرة ضعيفة لسيرين 304 فقط على مستوى الحبيبات. من جهة أخرى، على مستوى الغشاء الخلوي و الحبيبات للخلايا المتعادلة المنشطة ب PMA، p47phox مفسفرة على جزئيات السيرين 304، 315، 320، 328 و 345 البروتينات المفسفرة على سيرين 359 و 379 غائبة في الغشاء الخلوي و الحبيبات للخلايا المتعادلة المنشطة ب fMLF و PMA. p47phox هي أيضا مفسفرة على جزئيات السيرين 304، 315، 320، 328 و 345 في الخلايا اللمفاوية البائية المحولة بفيروس EBV، المنشطة ب pansorbine أو PMA. هذه الفسفرة تم تثبيطها ب GF109203X. الخلايا الحاملة لطفرة على مستوى جميع جزئيات السيرين ل p47phox من خلال تحويلها إلى ألانين A(303-379) غير قادرة تماما على إنتاج الأنواع الأكسجينية النشطة (ROS). في الخلايا HL60 في طور التمايز، الفسفرة القاعدية ل p47phox، خلال التعبير، على مستوى جزئيات السيرين 359 و 370، تبدأ بالظهور في اليوم الثالث من التمايز، ثم تبدأ بالارتفاع حتى آخر يوم، في حين أن فسفرة السيرين 379 تظهر ابتداء من اليوم الأول و تبقى مستقرة. و في الأخير، أظهرت دراسة فسفرة p47phox في الكائن الحي (*in vivo*) باستعمال نموذج التهاب الجنب (pleurésie) عند الجرذ الموسببة ب λ -carrageenane، أن p47phox مفسفرة مؤقتا على جزئيات السيرين 304، 320 و 328، في حين أن فسفرة السيرين 315 أكثر استقرارا و استمرارا. و هكذا، فإن استعمال الأجسام المضادة المطورة ضد السيرين المفسفرة سمح، و لأول مرة، بتتقي أثر زمني-مكاني لفسفرة p47phox على مختلف جزئيات السيرين، و بالتحري عنها في الجسم الحي. و يمكن استعمال فسفرة السيرين 315 كعلامة فسفرة ل p47phox في الجسم الحي مع مختلف المنشطات الفزيولوجية.

الكلمات المفاتيح: الإلتهاب، الخلايا المتعادلة، NOX2، p47phox، فسفرة السيرين، الإنفجار التأكسدي، الأنواع الأكسجينية النشطة.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AD:	Activating Domain.
AIR :	Autoinhibitin Region.
BCIP/NBT :	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium.
CGD :	Chronic Granulomatous Disease.
CKII :	Caseine Kinase II.
DAG :	Diacyl Glycerol.
DFP :	Diisopropyl Fluorophosphate.
DMSO:	Dimethyl Sulfoxyde.
DTT :	Dithiothreitol.
DUOX :	Dual oxydase
EBV :	Epstein Barr Virus.
ERK :	Extracellular signal-Regulated Kinases.
GAR-AP :	Goat anti-rabbit Alkaline Phosphate.
GAR-HRPO :	Goat anti-rabbit Horsch Radish Peroxydase
G-CSF :	Granulocyte Colony Stimulating Factor.
GDI :	GDP Dissociation Inhibitor.
GEFs :	Guanosine Exchange Factors.
GM-CSF :	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor.
GST:	Glutathion Sulfo Transferase.
HBSS:	Hanks Blanced Salt Solution.
HEPES :	Acide 4-(2-Hydroxyéthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique.
HPP-CFC :	High Proliferative Potential-Colony Forming Cell.
IP3 :	Inositol Triphosphate.
LFA-1 :	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen 1.</i>
LPS :	Lipopolysaccharide.
LTB4 :	Leucotriene B4.
Mac-1 :	Macrophage-1 Antigen.
MAP kinases :	Mitogen Activated Protein kinases.
MPO :	Myeloperoxydase.
NCF :	Neutrophil Cytosolic Factor.
NETs :	Neutrophil Extracellular Traps.
NOX :	NADPH oxydase.

PAF :	Platelet Activating Factor.
PAK :	P21-activated kinase.
PB1 :	Phox-Bem1.
PBMC :	Peripheral Blood Mononuclear Cells.
PECAM-1 :	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule1.
PI3kinase:	Phosphoinositide 3 kinase.
PIP2 :	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate.
PKA :	Protein Kinase A.
PKC :	Protein Kinase C.
PLA2:	Phospholipase A2.
PLC:	Phospholipase C.
PLD:	Phospholipase D.
PMA :	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate.
PMSF :	Phenylmethylsulfonyl Fluoride.
PN :	Polyncléaire neutrophile.
PP1/2A :	Phosphatase 1/2A.
PRR :	Proline Rich Region
PX :	Phox Homology.
RAGE :	Receptor for Advanced Glycation End-products.
RB :	Relaxation Buffer.
RLU :	Relative Luminescence Unit.
ROS :	Reactive Oxygen Species.
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute medium.
SDS-PAGE :	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
SEM :	Standard Error of the Mean.
SGD :	Specific Granule Deficiency.
SH3 :	Src Homology 3
SOD :	Superoxyde Dismutase.
SVF :	Sérum de Veau Fœtal.
TBS :	Tris Buffered Saline.
TGF-β :	Transforming Growth Factor- β .
TLRs :	Toll Like Receptor.
TNF- α :	Tumor Necrosis Factor- α .
TPR :	Tetratricopeptide Repeat.

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

FIGURES

- Figure 1.** Photographie prise au microscope électronique à transmission montrant un neutrophile au repos.
- Figure 2.** Principales étapes de l'extravasation du PMN et de sa migration vers le site inflammatoire.
- Figure 3.** Modèle SNARE proposé pour expliquer la libération des granules du neutrophile.
- Figure 4.** Photographie au microscope électronique représentant des Salmonelles piégées dans les NETs de neutrophiles humains.
- Figure 5.** Activation du système NADPH oxydase dans les neutrophiles.
- Figure 6.** Modèle proposé représentant la structure du cytochrome b558 de la NADPH oxydase phagocytaire.
- Figure 7.** Représentation schématique de la structure et des domaines d'interaction des sous-unités de NOX2.
- Figure 8.** Aperçue schématique des étapes d'activation du neutrophile.
- Figure 9.** Représentation schématique de la conformation d'autoinhibition de la p47phox.
- Figure 10.** Modèle des différentes conformations de la p47phox dans le neutrophile au repos, primé et activé.
- Figure 11.** Structure des domaines de la p47phox.
- Figure 12.** Représentation schématique de du mécanisme d'activation de la p47phox.
- Figure 13.** Caractérisation des anticorps phospho-spécifiques qui reconnaissent les phospho-sites de la p47phox.
- Figure 14.** Spécificité des anticorps phospho-spécifiques qui reconnaissent les phospho-sites de la p47phox.
- Figure 15.** Cinétique de la phosphorylation de la p47phox induite par le fMLF.
- Figure 16.** Quantification de la phosphorylation en cinétique de la p47phox induite par le fMLF.
- Figure 17.** Effet dose du fMLF sur la phosphorylation de la p47phox.
- Figure 18.** Effet dose du fMLF sur la phosphorylation de la p47phox.

- Figure 19.** Cinétique de la phosphorylation de la p47phox induite par le PMA.
- Figure 20.** Quantification de la phosphorylation en cinétique de la p47phox induite par le PMA.
- Figure 21.** Effet dose du PMA sur la phosphorylation de la p47phox.
- Figure 22.** Quantification de la phosphorylation en effet dose de la p47phox induite par PMA sur la phosphorylation de la p47phox.
- Figure 23.** Effet des inhibiteurs de kinases sur la phosphorylation de la p47phox induite par le fMLF.
- Figure 24.** Effet des inhibiteurs de kinases sur la phosphorylation de la p47phox induite par le PMA.
- Figure 25.** Localisation subcellulaire de la p47phox au sein du neutrophile stimulé par le fMLF.
- Figure 26.** Localisation subcellulaire de la p47phox au sein du neutrophile stimulé par le PMA.
- Figure 27.** Cinétique d'expression (A) et de phosphorylation (B) de la p47phox au sein des HL60 différenciées.
- Figure 28.** Cinétique de production de l'anion superoxyde par les cellules HL60 en cours de différenciation induite par le fMLF ou le PMA.
- Figure 29.** Production des ROS par les lymphocytes B transformés à l'EBV stimulés par la pansorbine ou le PMA.
- Figure 30.** Effet du GF109203X et de la Wortmannin sur la production des ROS par les lymphocytes B transformés à l'EBV et stimulés par la pansorbine.
- Figure 31.** Phosphorylation de la p47phox induite par la pansorbine et le PMA.
- Figure 32.** Production des ROS dans les lymphocytes B transformés à l'EBV exprimant la p47phox sauvage (WT) ou mutante S(303-379)A.
- Figure 33.** Nombre de neutrophiles récupérés de la cavité pleurale de rats atteints de pleurésie.
- Figure 34.** Cinétique de phosphorylation de la p47phox dans les neutrophiles récupérés de la cavité pleurale de rats atteints de pleurésie.

TABLEAUX

- Tableau 1.** Constituants des granules et des vésicules sécrétoires du neutrophile.
- Tableau 2.** Agents primants et activateurs de la NADPH oxydase du neutrophile.
- Tableau 3.** Séquences des peptides utilisés pour immuniser les lapins.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN RELATION AVEC LES TRAVAUX DE THESE

PUBLICATIONS :

1. Hurtado-Nedelec M, Csillag-Grange MJ, Boussetta T, **Belambri SA**, Fay M, Cassinat B, Gougerot-Pocidal MA, Dang PM, El-Benna J (2013). Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation. *Haematologica*, **98(10)**, 1517-1524.
2. **Belambri SA**, Hurtado-Nedelec M, Senator A, Makni-Maalej K, Fay M, Gougerot-Pocidal MA, Marie JC, Dang PM, El-Benna J (2012). Phosphorylation of p47phox is required for receptor-mediated NADPH oxidase/NOX2 activation in Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *Am J Blood Res*, **2(3)**, 187-193.
3. Makni-Maalej K, Boussetta T, Hurtado-Nedelec M, **Belambri SA**, Gougerot-Pocidal MA, El-Benna J (2012). The TLR7/8 agonist CL097 primes N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated NADPH oxidase activation in human neutrophils: critical role of p47phox phosphorylation and the proline isomerase Pin1. *J Immunol*, **189(9)**, 4657-4665.
4. Dang PM, Raad H, Derkawi RA, Boussetta T, Paclet MH, **Belambri SA**, Makni-Maalej K, Kroviarski Y, Morel F, Gougerot-Pocidal MA, El-Benna J (2011). The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochem Pharmacol*, **82(9)**, 1145-1152.

COMMUNICATIONS :

1. **Sahra Amel Belambri**, Silvia Ciapelloni, Tarek Boussetta, Michèle Fay, Abderrahmane Senator, Marie-Anne Gougerot-Pocidal, Pham My-Chan Dang et Jamel El Benna. Etude de la phosphorylation de la p47phox dans les neutrophiles humains en utilisant des anticorps anti-phospho-sérines spécifiques (Communication orale). 8^{ème} CLUB OXYDASE, LES NADPH OXYDASES NOX ET DUOX : Du fondamental à la physiologie, 30-31 Mai 2013, Paris, France.
2. Karama Makni-Maalej, Tarek Boussetta, Margarita Hurtado-Nedelec, **Sahra Amel Belambri**, Marie-Anne Gougerot-Pocidal et Jamel El Benna. Le Cl097, un agoniste des TLR 7 et 8 induit le priming de la NADPH oxydase dans les neutrophiles humains par une voie dépendante de la

phosphorylation de la p47phox et de la proline isomérase Pin1 (Communication affichée). 8ème CLUB OXYDASE, LES NADPH OXYDASES NOX ET DUOX : Du fondamental à la physiologie, 30-31 Mai 2013, Paris, France.

3. **Sahra Amel Belambri**, Karam Makni-Maalej, Silvia Ciapelloni, Marie-Anne Gougerot-Pocidalò, Pham My-Chan Dang et Jamel El Benna. Etude des sites de phosphorylation de la p47phox dans les neutrophiles humains en utilisant des anticorps spécifiques (Communication affichée). 7ème CLUB OXYDASE, LES NADPH OXYDASE NOX-DUOX : Du moléculaire au cellulaire, 26-27 Mai 2011, Grenoble, France.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE	1
1. 1. Description.....	1
1. 2. Production des polynucléaires neutrophiles	2
1. 3. Granulations cytoplasmiques du neutrophile	3
1. 3. 1. Granules azurophiles ou primaires.....	4
1. 3. 2. Granules spécifiques ou secondaire	5
1. 3. 3. Granules à gélatinase ou tertiaires.....	6
1. 3. 4. Vésicules sécrétoires.....	7
1. 4. Fonctions des polynucléaires neutrophiles.....	8
1. 4. 1. Extravasation et migration des neutrophiles vers le site inflammatoire	9
1. 4. 2. Phagocytose de l'agent pathogène	11
1. 4. 3. Processus de dégranulation.....	12
1. 4. 4. Production des ROS par le neutrophile	14
1. 4. 5. Les NETs (Neutrophil extracellular traps).....	15
1. 5. Apoptose du neutrophile et résolution de l'inflammation.....	17
II. LE COMPLEXE NADPH OXYDASE PHAGOCYTAIRE NOX2	18
2.1. Structure et composants de NOX2	19
2. 1. 1. Le Flavocytochrome b558 : Composant membranaire de NOX2.....	20
a. La gp91phox ou NOX2.....	20
b. La p22phox.....	21
2. 1. 2. Les Composants cytosoliques de NOX2.....	22
a. La p47phox	22
b. La p67phox.....	23
c. La p40phox	24
d. La petite protéine G Rac2.....	24
2. 2. Activation du complexe NADPH oxydase NOX2	25
2. 2. 1. La NADPH oxydase au sein du neutrophile au repos	26
2. 2. 2. Priming de la NADPH oxydase au sein du neutrophile au repos.....	27
2. 2. 3. Activation de la NADPH oxydase du neutrophile stimulé.....	29

1. Phosphorylation de la p47phox.....	30
2. Phosphorylation de la p67phox.....	33
3. Phosphorylation de la p40phox.....	33
4. Phosphorylation de la p22phox.....	34
5. Phosphorylation de NOX2 (gp91phox).....	34
6. Assemblage des composants de la NOX2.....	34
2. 3. Implication de la NADPH oxydase dans les pathologies inflammatoires.....	35
2. 3. 1. Polyarthrite rhumatoïde.....	36
2. 3. 1. Polyarthrite rhumatoïde.....	36
2. 4. Les NOXs non phagocytaires.....	37
II. MATERIELS ET METHODES.....	38
2. 1. Milieux et réactifs.....	38
2. 2. Préparation des anticorps anti-phosphosérine.....	38
2. 2. 1. Analyse de la spécificité des anticorps obtenus.....	38
2. 2. 2. Phosphorylation <i>in vitro</i> de la p47phox recombinante.....	40
2. 3. Isolement des neutrophiles humains.....	40
2. 4. Etude de la phosphorylation de la p47phox des neutrophiles.....	41
2. 4. 1. Etude de la cinétique de phosphorylation de la p47phox.....	41
2. 4. 2. Etude de la phosphorylation de la p47phox en effet dose.....	42
2. 4. 3. Etude de l'effet des inhibiteurs des kinases sur la phosphorylation de la p47phox.....	42
2. 5. Etude de phosphorylation de la p47phox au sein des différentes fractions subcellulaires du neutrophile.....	42
2. 6. Culture et différenciation des HL60.....	43
2. 6. 1. Mesure de la production de l'anion superoxyde par les cellules HL60 au cours de leur différenciation en neutrophiles.....	44
2. 6. 2. Analyse de l'expression et de la phosphorylation de la p47phox dans les cellules HL60 au cours de leur différenciation en neutrophile.....	44
2. 7. Etude de l'activation de la NADPH oxydase au sein des lymphocytes B transformés.....	44
2. 7. 1. Culture et immortalisation des Lymphocytes B.....	45
2. 7. 2. Transfection des lymphocytes B immortalisés.....	45
2. 7. 3. Etude de la production des ROS par les Lymphocytes B transformés.....	46

2. 7. 4. Etude de la phosphorylation de la p47phox dans les lymphocytes B transformés.....	46
2. 8. Etude de la phosphorylation de la p47phox <i>in vivo</i> : induction de la pleurésie chez le rat.....	46
2. 9. SDS-PAGE et Western Blot.....	47
2. 10. Analyses statistiques.....	47
III. RESULTATS.....	48
1. Caractérisation des anticorps anti-phosphosérines.....	48
2. Phosphorylation de la p47phox au sein du neutrophile stimulé par le fMLF.....	51
3. Phosphorylation de la p47phox au sein du neutrophile stimulé par le PMA.....	55
4. Effet des inhibiteurs de kinases sur la phosphorylation de la 47phox induite par le fMLF et le PMA.....	59
5. Localisation subcellulaire de la p47phox phosphorylée dans le neutrophile stimulés par le fMLF et le PMA.....	63
6. Cinétique d'expression de la p47phox et de production de l'anion superoxyde au cours de la différenciation des HL60.....	64
7. Cinétique de phosphorylation de la p47phox au cours de la différenciation des HL60.....	65
8. Etude de l'activité NADPH oxydase au sein des lymphocytes B transformés par l'EBV.....	68
8. 1. Production des ROS par les lymphocytes B transformés par l'EBV.....	68
8. 2. Effet de l'inhibition des PKC et de la PI3 kinase sur la production des ROS par les lymphocytes B transformés par l'EBV.....	70
8. 3. Effet de la pansorbine sur la phosphorylation des la p47phox au sein des lymphocytes B transformés par l'EBV.....	71
8. 4. La phosphorylation de la p47phox est nécessaire pour l'activation de la NADPH oxydase par la pansorbine au sein des lymphocytes B transformés à l'EBV.....	72
9. Etude de la phosphorylation de la p47phox <i>in vivo</i> dans un modèle de pleurésie expérimentale chez le rat.....	73
IV. DISCUSSION.....	76
1. Caractérisation des anticorps anti-phosphosérine.....	77
2. Phosphorylation de la p47phox au sein du neutrophile activé.....	77

3. Phosphorylation de la p47phox dans les fractions subcellulaires du neutrophile activé.....	82
4. Phosphorylation de la p47phox au cours de la différenciation des cellules HL60.....	83
5. Etude de la phosphorylation de la p47phox <i>in vivo</i>	84
6. Phosphorylation de la p47phox dans les lymphocytes B transformés à l'EBV.....	86
V. CONCLUSION	88
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	90

Introduction

Les phagocytes professionnels tels que les neutrophiles et les monocytes sont un des pivots de l'immunité innée et constituent un puissant système de défense contre les agents pathogènes qui franchissent la barrière cutanéomuqueuse de l'organisme. Les neutrophiles sont les premières cellules à rejoindre le foyer infectieux ou inflammatoire pour éliminer les agents agresseurs par phagocytose. La destruction de l'élément internalisé dans le phagosome dépend alors de l'exécution de deux mécanismes intriqués au sein du neutrophile à savoir la libération d'enzyme protéolytiques et de protéines microbicides ainsi que la production rapide de grandes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette production des ROS qui a lieu au cours du processus appelé explosion oxydative est indispensable à la défense antimicrobienne, tel qu'il est illustré par la granulomatose septique chronique, une immunodéficiences génétique dans laquelle les phagocytes ne peuvent pas produire de ROS et ne peuvent donc pas tuer les pathogènes phagocytés.

Dans les cellules phagocytaires, le système producteur des ROS est un complexe multiprotéique appelé NADPH oxydase ou NOX2. Ce complexe comprend le composant membranaire : le cytochrome b558 (constitué de l'association de la gp91phox et de la p22phox) et les composants cytosoliques (p47phox, p67phox, p40phox et Rac1/2). Dans les cellules au repos les composants cytosoliques et membranaires sont dissociés et la NADPH oxydase est inactive. Suite à une stimulation appropriée du phagocyte, les composants cytosoliques transloquent à la membrane pour s'associer au cytochrome b558 et former l'oxydase active. Cette activation est accompagnée de la phosphorylation de la p47phox, p67phox, p40phox, p22phox et de la gp91phox ainsi que de l'activation de Rac1/2. Le système alors actif catalyse la production de l'anion superoxyde initiant par cela la génération de grandes quantités de ROS. En considérant le niveau élevé des ROS produit par les phagocytes comme le neutrophile, l'étroite régulation du processus d'activation de la NOX2 paraît d'une importance primordiale. En effet, toute dérégulation de ce processus peut conduire à l'activation prolongée du système NADPH oxydase et à la production de quantités exagérées de ROS dans des lieux inappropriés. Ceci conduit alors à la formation de lésions tissulaires qui sont à l'origine de nombreuses pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde. Un des mécanismes de régulation du système NADPH oxydase consiste en la régulation de la phosphorylation de la p47phox, l'élément organisateur de la NOX2. Dans les neutrophiles au repos, la p47phox se trouve au cytosol sous forme inactive et n'est pas sensée être phosphorylée. La stimulation du neutrophile par des peptides chimioattractants comme le fMLF ou encore par les activateurs des PKC comme le PMA induit l'activation de la NOX2

et la phosphorylation de la p47phox sur différents résidus sérines situés dans sa partie C-terminale (S303-379). La phosphorylation de ces sérines constitue une étape décisive et indispensable à l'activation de la NOX2.

L'analyse de la phosphorylation de la p47phox a jusque là nécessité un travail fastidieux et de longues manipulations impliquant l'utilisation de grandes quantités d'acide orthophosphorique radioactif et un nombre élevé de cellules. Outre le fait que ces inconvénients limitent la précision de ces techniques, ils constituent également un obstacle qui limite l'étude de la phosphorylation de la p47phox, particulièrement l'étude *in vivo*. Afin de dépasser ces problèmes techniques, des anticorps anti-phospho-p47phox spécifiques de la forme phosphorylée de chaque résidu sérine ont été générés dans cette étude. L'utilisation de ces anticorps a permis d'employer des techniques relativement simples et rapides afin de contribuer à l'étude du mécanisme d'activation de la NOX2 et d'apporter de nouvelles données et ce, en réalisant les travaux suivants :

- * Etude de la dynamique de phosphorylation de la p47phox dans les homogénats totaux et les fractions subcellulaires des neutrophiles humains stimulés par le fMLF ou le PMA.
- * Etude de l'activation de la NADPH oxydase et l'analyse de la phosphorylation de la p47phox dans les cellules HL60 différenciées en neutrophiles et stimulées par le fMLF ou le PMA.
- * Etude de l'activation de la NADPH oxydase et l'analyse de la phosphorylation de la p47phox dans les lymphocytes B transformés à l'EBV et stimulés par le fMLF ou le PMA.
- * Analyse de la phosphorylation de la p47phox dans les neutrophiles activés *in vivo* lors de la pleurésie induite chez le rat par la λ -carrageenane.

Revue
Bibliographique

I. LE POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE

1. 1. Description

Les polynucléaires neutrophiles (PN), encore appelés leucocytes polymorphonucléaires (PMN) sont de véritables phagocytes professionnels, caractérisés par un noyau polylobé et un cytoplasme riches en granulations (Borregaard et Cowland, 1997). Ils sont générés en grand nombre par la moelle osseuse à partir d'un progéniteur commun aux cellules mononucléaires et granulocytaires. En effet, ils représentent la population la plus abondante des leucocytes circulants (70%) et constituent près de 95% des granulocytes (Abbas et al., 2012). Un individu adulte peut produire 10^{11} neutrophiles par jour qui circulent dans le sang durant seulement 6 heures sous forme d'une cellule mature sphérique de 12 à 15 μM de diamètre et dépourvue de potentiel prolifératif (Galli et al., 2011). En l'absence de stimulation, les neutrophiles entrent en apoptose et sont phagocytés par les macrophages résidants dans le foie ou la rate. Par contre, suite à l'agression de l'organisme par divers agents pathogènes ayant réussi à franchir les barrières cutanéomuqueuses, les neutrophiles sont les premières cellules à quitter la circulation sanguine pour rejoindre le tissu où se trouve le site de l'agression afin d'exercer leurs fonctions microbicides et cytotoxiques pour débarrasser l'organisme des agents envahisseurs (Caruso et al., 2012). Ces fonctions du neutrophile en font un pivot de l'immunité innée et un puissant système de défense de l'organisme contre les agents pathogènes (Gougerot-Pocidalò, 2012). Le cytoplasme du neutrophile contient une myriade de substances protéolytiques et microbicides préformées durant sa maturation et stockées dans différents types de granules (figure 1), à savoir les granules primaires ou azurophiles, les granules secondaires ou spécifiques, les granules tertiaires ou à gélatinase ainsi que les vésicules sécrétoires. Ainsi, l'activité microbicide et cytotoxique du neutrophile dépend de la libération d'enzymes protéolytiques et de substances antimicrobiennes, mais aussi de la production rapide d'espèces réactives de l'oxygène qui concourent à la destruction de l'agent pathogène phagocyté. En fait, on a longtemps pensé que la fonction du neutrophile se résumait à phagocyter et à tuer les agents envahisseurs, mais il est clairement établi à présent que le neutrophile joue un rôle beaucoup plus complexe, prenant part à l'engagement et à la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives ainsi qu'à l'homéostasie tissulaire (Gougerot-Pocidalò, 2012).

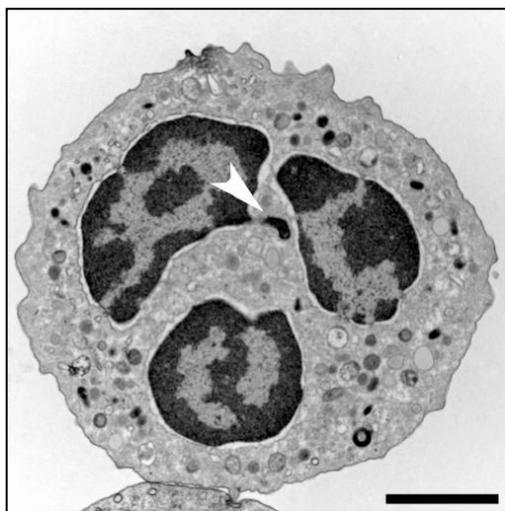


Figure 1. Photographie prise au microscope électronique à transmission montrant un neutrophile au repos. Cette cellule contient divers types de granules visibles dans le cytoplasme ainsi qu'un noyau polylobé (Brinkmann et Zychlinsky, 2012).

1. 2. Production des polynucléaires neutrophiles

La production des polynucléaires neutrophiles (PN) connue sous le nom de granulopoïèse est quantitativement l'activité majeure de la moelle osseuse, où approximativement deux tiers de l'hématopoïèse sont consacrés à la production des cellules myéloïdes (Borregaard, 2010). Comme toutes les cellules sanguines, les PN dérivent d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente nommée HPP-CFC (High Proliferative Potential-Colony Forming Cell) pourvue d'une forte capacité d'auto-prolifération et de différenciation. Sous l'action de différentes cytokines et de facteurs de différenciation la HPP-CFC donne naissance à une cellule souches myéloïde multipotente qui sous l'effet du GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) se différencie en un progéniteur commun des granulocytes et des monocytes (Abbas et al., 2012). Sous l'influence de différents facteurs de différenciation, comme le G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), les cellules orientées vers la voie granulocytaires suivent successivement le stade de myéloblaste, promyélocyte, métamyélocyte, granulocyte non segmenté puis neutrophile mature (Kantari et al., 2008). La production des granules semble suivre également la voie de différenciation du granulocyte (Borregaard et Cowland, 1997). Les granules azurophiles ou primaires émergent en premier lieu durant le stade de promyélocyte et comportent la myéloperoxydase, des sérine protéases ainsi que des protéines antibiotiques. Ils sont ainsi considérés comme le réel compartiment microbicide mobilisé lors de la phagocytose. Au stade de métamyélocyte apparaissent les granules spécifiques comportant la lactoferrine et la collagénase, suivi par les granules tertiaires riches en gélatinases. Les vésicules sécrétoires, le

quatrième type de granules du neutrophile apparaissent au stade de neutrophile mature (Kantari et al., 2008, Borregaard, 2010).

La production des neutrophiles est largement régulée par le taux des neutrophiles apoptotiques dans les tissus (Borregaard, 2010). Lorsque les macrophages et les cellules dendritiques phagocytent les neutrophiles apoptotiques dans les tissus, leur production en IL-23 diminue (von Vietinghoff et Ley, 2009). L'IL-23 stimule la production de l'IL-17A par les cellules T spécialisées désignées collectivement sous le nom de Cellules T régulatrices du neutrophile, largement localisées dans les ganglions lymphatique mésentériques (Ley et al., 2006), il se trouve que l'IL-17A est un important stimulateur de la production du G-CSF (Schwarzenberger et al., 2000). Ainsi la production du G-CSF est réduite lorsque le nombre de neutrophiles dans les tissus augmente (Borregaard, 2010).

1. 3. Granulations cytoplasmiques du neutrophile

La plupart des étapes d'activation et d'exécution des fonctions cytotoxiques du neutrophile impliquent la mobilisation des différentes populations de granulations cytoplasmiques. Les différentes granulations du neutrophile constituent un véritable réservoir, non seulement en protéines microbicides, en protéases et en composants du complexe NADPH oxydase qui produit les formes réactives de l'oxygène, mais aussi en divers récepteurs membranaires, molécules d'adhésion, protéines de matrice extracellulaire ainsi que de médiateurs solubles de l'inflammation (Faurischou et Borregard, 2003). Le déploiement de ces granulations au cours des différentes étapes d'activation du neutrophile s'effectue d'une manière hautement hiérarchisée de telle sorte que les granulations comportant les différents récepteurs membranaires et ligands nécessaires à l'adhérence du neutrophile circulant ainsi qu'à son recrutement soient mobilisés en premier. Tandis que les granules comportant les protéines microbicides et les enzymes protéolytiques seront déployées en dernier lieu lors de la phagocytose évitant ainsi les dommages tissulaires inutiles (Witko-Sarsat et al., 2000). Les granules du neutrophile sont classées en 4 types distincts en se basant sur la présence de protéines caractéristiques : les granules azurophiles ou primaires (riches en myéloperoxydase : MPO), les granules spécifiques ou secondaires (riches en lactoferrine), les granules tertiaires (riches gélatinases) et les vésicules sécrétoires (riches en albumine). Cette distinction reflète non seulement des différences dans le contenu des granules mais aussi des différences dans l'ordre de leur mobilisation avec les derniers granules formés qui sont mobilisés en premier lieu, créant cette hiérarchisation de leur exocytose. En fait, cette hétérogénéité des granules du neutrophile est mieux assimilée en sachant que ces granules

sont formés constitutivement au sein du neutrophile en cours de sa différenciation à partir du stade précoce de promyélocyte jusqu'au stade de granulocyte segmenté. De plus, l'empaquetage des protéines dans ces granules ne s'effectue pas au hasard, mais ces granules sont remplis par des protéines synthétisées simultanément (Gullberg et al., 1999 ; Borregaard, 2010). Il semblerait que les protéines synthétisées après la libération des neutrophiles de la moelle osseuse ne soient pas empaquetées dans les granules (Theilgaard-Mönch et al., 2005). Les vésicules sécrétoires sont des vésicules exocytiques qui apparaissent au stade de granulocyte segmenté et qui comportent des protéines plasmiques leur suggérant une origine endocytaire (Faurischou et Borregaard, 2003).

1. 3. 1. Granules azurophiles ou primaires

Les granules azurophiles (ainsi nommés car ils présentent une bonne affinité pour le colorant Azure A) ou primaires sont les premières granules à apparaître dès le stade précoce de promyélocyte jusqu'au stade de neutrophile mature (Segal, 2005). Ils comportent une large gamme de peptides et de protéines destinés à la destruction et à la digestion des agents phagocytés. Les granules azurophiles sont considérés comme des granules sécrétoires régulés plutôt que des lysosomes spécialisés car ils n'expriment pas les protéines LAMP1 et LAMP2 (Lysosomal-Associated Membrane Protein) et ne nécessitent pas la présence de récepteurs mannose 6-phosphate (Faurischou et Borregaard, 2003). Les granules azurophiles peuvent être subdivisés en deux sous-populations : Les granules azurophiles précoces (pauvres en défensine) qui apparaissent au début du stade de promyélocytaire et les tardifs (riches en défensine) qui se forment durant la transition promyélocyte/myélocyte (Arnljots et al., 1998).

Les granules azurophiles sont caractérisés par la présence de la MPO qui est une hémoprotéine microbicide qui utilise le H_2O_2 comme substrat pour donner naissance à d'autres dérivés pro-oxydants encore plus toxiques. Trois sérines protéases neutres appelées Ser-procidine (la protéinase-3, la cathepsine G et l'élastase) font aussi partie des protéines matricielles des granules azurophiles et présentent une forte activité microbicide (Sinha et al., 1987 ; Campanelli et al., 1990). Les α -défensines, constituants majeurs des granules azurophiles tardifs sont de petits peptides cationiques antimicrobien et cytotoxique qui représentent au moins 5% du contenu protéique du neutrophile. Elles sont aussi mitotiques pour les fibroblaste, suggérant qu'elles interviennent dans la régulation de la réparation tissulaire (Witko-Sarsat et al., 2000). Un autre peptide antimicrobien potentiel des granules azurophiles est la protéine BPI pour *Bactericidal/Permeability Increasing protein* qui se lie aux résidus négatifs des LPS (lipopolysaccharide) de la membrane des bactéries Gram négatif

(-) pour induire un réarrangement lipidique et l'endommager ainsi (Borregaard et al., 2007). Environ un tiers du lysozyme retrouvé au sein des 4 populations de granules du neutrophile se trouve séquestré dans les granules azurophiles. Le tableau 1 résume la liste des contenus dans les granules azurophiles comparés aux autres granules.

Beaucoup des protéines des granules azurophiles sont synthétisées sous une forme inactive. Ce n'est qu'après clivage d'un pro-peptide amino-terminal, que ces protéines sont stockées dans les granules azurophiles sous forme active. Ce système de pro-peptides permettrait de prévenir les repliements, l'autotoxicité ou encore la rétention des protéines matures lors de leur passage à travers la machinerie de biosynthèse de la cellule (Faurischou et Borregaard, 2003).

Les granules azurophiles subissent une exocytose limitée en réponse aux stimulations du neutrophile (Sengelov et al., 1993), et il semblerait que ces granules contribuent principalement à la destruction et à la dégradation du microorganisme qui a lieu au niveau du phagolysosome (Joiner et al., 1989).

1. 3. 2. Granules spécifiques ou secondaire

Les granules spécifiques constituent, avec les granules à gélatinase le groupe des granules peroxydase-négatifs (pour l'absence de la MPO). Les constituants connus des granules spécifiques incluent plusieurs protéines et peptides antimicrobiens potentiels dont la lactoferrine qui fait partie de la famille des transferrines et exerce son pouvoir microbicide envers un large spectre de bactéries Gram (+) et (-) en séquestrant le Fer nécessaire à la croissance bactérienne et en se liant aux membranes des cellules bactériennes pour y induire des lésions irréversibles conduisant à la lyse cellulaire (Segal, 2005). La lipocaline NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) est une protéine antimicrobienne des granules spécifiques qui joue un rôle important dans la stratégie de l'immunité innée par déplétion des ions Fer (Friedl et al., 1999 ; Borregaard et al., 2007), tout comme hCAP-18 (Human Cathelicidin Antimicrobial Protein) qui possède un pouvoir antibactérien envers les bactéries Gram + et - (Turner et al., 1998). Le lysozyme est aussi un peptide antimicrobien cationique qui se trouve dans les 4 types de granules du neutrophile avec une concentration maximale dans les granules spécifiques (Lollike et al., 1995). Le lysozyme est capable de couper le peptidoglycane de la paroi bactérienne et peut se lier aux LPS et réduire la production des cytokines ainsi que la mortalité causée lors des chocs septiques tels qu'il a été montré dans un modèle murin (Takada et al., 1994). Les granules spécifiques comprennent également dans leur matrice des métalloprotéinases (tableau 1) nommées MMP (Matrix Metalloproteinase)

comme la collagénase ou MMP-8 et les leukolysines ou MMP-25 (Borregaard, 2007). Ces métalloprotéinases sont séquestrées dans les granules spécifiques sous forme inactive et subissent une activation protéolytique après exocytose. Ces protéases sont capables de dégrader la majorité des constituants de la matrice extracellulaire comme les collagènes, les fibronectines et les laminines. Elles joueraient donc un rôle essentiel dans la dégradation de la membrane basale de la paroi vasculaire ainsi que des structures interstitielles lors de l'extravasation et la migration du neutrophile. Les granules spécifiques comportent également des molécules d'adhésion comme les β 2-intégrines (CD11b/CD18), des récepteurs pour les éléments de la matrice extracellulaire (Fibronectin-R, Laminin-R, vitronectin-R), des récepteurs pour les chimioattractants comme le récepteur au peptide bactérien formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF) appelé FPR ainsi que le cytochrome b_{558} , le composant membranaire du complexe NADPH oxydase générateur des espèces réactives de l'oxygène lors de la phagocytose (Fauschou et Borregaard, 2003).

1. 3. 3. Granules à gélatinase ou tertiaires

Les granules peroxydase-négatifs qui sont dépourvus de lactoferrine et riches en gélatinases constituent la population des granules à gélatinase ou granules tertiaires. Ces granules apparaissent au stade métamyélocyte et sont plus petits que les granules spécifiques. Ils sont considérés comme un réservoir d'enzymes dégradant les éléments de la matrice extracellulaire et de récepteurs membranaires facilitant l'extravasation et la migration interstitielle du neutrophile activé (Fauschou et Borregaard, 2003). En effet, le collagène de type IV, constituant majeur de la membrane basale de la paroi vasculaire, ainsi que le collagène de type V du tissu interstitiel sont des substrats de la gélatinase (Borregaard et Cowland, 1997). De plus, la protéinase leukolysine est majoritairement distribuée (40%) dans la membrane des granules à gélatinase. Ensemble, ces métalloprotéinases aideraient donc le neutrophile à se frayer un chemin vers le site inflammatoire (Borregaard, 2010). Les granules à gélatinase comportent également des protéines antimicrobiennes comme le lysozyme ou encore la protéine Nrp1 (Natural resistance-associated macrophage protein 1). Après dégranulation, Nrp1 transloque au niveau de la membrane du phagosome où elle contribue à la privation du microorganisme phagocyté d'ions tels que les ions Fe^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} (Fauschou et Borregaard, 2003). Comme les granules spécifiques, les granules à gélatinase renferment également dans leurs membranes des molécules d'adhésion comme les β 2-intégrines (CD11b/CD18), des récepteurs pour les chimioattractants comme le FPR ainsi que le cytochrome b_{558} (Fauschou et Borregaard, 2003).

Tableau 1. Constituants des granules et des vésicules sécrétoires du neutrophile (Fauschou et Borreggard, 2003).

Granules azurophiles	Granules spécifiques	Granules à gélatinases	Vésicules sécrétoires
Membrane CD63 CD68 Presiniline 1 Stomatine H ⁺ -ATPase de type V	CD11b/CD18 CD15 CD66 CD67 Cytochrome b558 fMLF-R Fibronectine-R Sous-unités de la protéine G Laminine-R Leucolysine Antigène NB1 Protéine de 19kDa Protéine de 155kDa Rap-1, Rap-2 SCAMP SNAP-23, 25 Stomatine Thrombospondine-R TNF-R uPA-R VAMP-2 Vitronectine-R	CD11b/CD18 Cytochrome b558 DAG désacétylase fMLF-R Leucolysine NRAMP-1 SCAMP SNAP-23, 25 uPA-R VAMP-2 H ⁺ -ATPase de type	Alkaline phosphatase CD10 CD11b/CD18 CD13 CD14 CD16 CD45 CR1 C1q-R Cytochrome b558 DAF fMLF-R Leucolysine VAMP-2 H ⁺ -ATPase de type
Matrice A. β -glycérophosphatase A. mucopolysaccharidique α_1 -antitrypsine α -mannosidase Azurocidine BPI B-Glycerphosphaatase B-glucuronidase Cathepsines Défensines Elastase Lysozyme MPO N-acétyl- β -glucosaminidase Protéinase-3 Sialidase Ubiquitine	β_2 -microglobuline Collagénase bCAP-18 Histamine Heparanase Lactoferrine Lysozyme NGAL uPA Sialidase TRanscobalamine-1	Acétyltranferase β_2 -microglobuline CRISP-3 Gélatinase Lysozyme	Protéines plasmatiques

R : récepteur, CRISP : cystein-rich secretory protein, SGP-28 : specific granule of 28kDa, uPA: urokinase-type plasminogen activator.

1. 3. 4. Vésicules sécrétoires

Les vésicules sécrétoires sont des vésicules endocytiques constituant un réservoir de récepteurs membranaires nécessaires à l'exécution des fonctions du neutrophile durant les phases précoces de la réponse inflammatoire (Witko-Sarsat et al., 2000). Ces vésicules qui

comportent des protéines plasmatiques (Borregaard, 2010) sont les derniers granules à être formés lors de la granulopoïèse mais les premiers mobilisés lors de l'activation du neutrophile (Häger et al., 2010). En effet, extrêmement sensibles aux stimulations, les vésicules sécrétoires sont très facilement exocytées en réponse à une vaste gamme de stimuli impliqués dans l'interaction du neutrophile avec l'endothélium activé comme les sélectines et leurs ligands ou par les chimiokines comme l'IL-8 ou encore par le fMLF. La membrane de ces vésicules est riche en β 2-intégrine (Sengelov et al., 1993), en récepteurs du complément (CR1) (Sengelov et al., 1994), en récepteurs FPR (Sengelov et al., 1995), en récepteurs des LPS/acide lipoteichoïque (Detmers et al., 1995), en Fc γ IIIR (Detmers et al., 1995) ainsi qu'en leukolysine (Kang et al., 2001). De cette manière, la mobilisation des vésicules sécrétoires fournit au neutrophile une surface membranaire avec des récepteurs et des protéines fonctionnelles nécessaires à sa transmigration et ce, sans libération des substances nocives susceptibles de causer des dommages tissulaires inutiles. Selon Borregaard, les constituants de ces vésicules (tableau 1) n'ont pas encore été répertoriés en totalité (Borregaard, 2010).

1. 4. Fonctions des polynucléaires neutrophiles

Les PN jouent un rôle crucial dans l'immunité innée et la défense de l'organisme contre les agents pathogènes. En effet, les neutrophiles sont les principaux effecteurs cellulaires des phases précoces de la réponse immunitaire. Le rôle pertinent des neutrophiles dans la défense antimicrobienne est clairement illustré par les infections bactériennes et fongiques récurrentes et mortelles observées lors des conditions de neutropénie ou dans de rares pathologies affectant la structure ou la quantité de protéines des neutrophiles, telle que la granulomatose septique chronique (ou Chronic Granulomatous Disease : CGD), le déficit d'adhésion leucocytaire (ou Leucocyte Adhesion Deficiency : LAD) ou encore la déficience en granules spécifiques (ou Specific Granule Deficiency : SGD) (Häger et al., 2010).

La réponse du neutrophile peut être considérée comme un processus à plusieurs étapes impliquant l'adhésion des neutrophiles circulants à l'endothélium vasculaire activé, leur diapédèse et extravasion subséquentes vers le milieu interstitiel suivie par leur migration vers le site inflammatoire puis l'élimination *in situ* de l'agent à l'origine de l'inflammation par phagocytose. Celle-ci est caractérisée par la libération du contenu microbicide des granules cytoplasmique (dégranulation) et génération des ROS par le complexe NADPH oxydase, un processus appelé flambée respiratoire ou explosion oxydative (Faurischou et Borregaard, 2003). En 2004, une autre activité antimicrobienne des neutrophiles a été décrite et qui consiste à émettre un maillage fait de fibres de chromatine entourées de protéines

antimicrobiennes dérivées de leurs granules comme la MPO ou les cathépsine G. Ces structures appelées NETs (Neutrophil Extracellular Traps) seraient une stratégie de défense post-mortem déployée par le neutrophile (Kaplan et Radic, 2012). En effet, le retour à un état d'homéostasie et la protection des tissus implique une phase de résolution qui se traduit par la diminution du recrutement des neutrophiles vers le site inflammatoire ainsi que l'induction de leur apoptose et leur élimination par les macrophages (Gougerot-Pocidalò, 2012).

1. 4. 1. Extravasation et migration des neutrophiles vers le site inflammatoire

A l'état physiologique et en absence de toute stimulation, les neutrophiles circulent au centre du flux sanguin et n'interagissent que peu avec l'endothélium vasculaire (Kantari et al., 2008). Le rôle des neutrophiles dans l'immuno-surveillance et l'élimination *in situ* des microorganismes implique leur passage rapide de la circulation sanguine vers le milieu extravasculaire et leur migration vers leur cible finale au sein du tissu (Witko-Sarsat et al., 2000). Cette transmigration s'effectue principalement au niveau des veinules post-capillaire, où la paroi vasculaire est la plus fine et le diamètre des vaisseaux est le plus petit permettant ainsi au neutrophile d'interagir avec l'endothélium vasculaire (Borregaard, 2010). Elle se déroule en plusieurs étapes dictées par l'expression séquentielles de molécules d'adhésion aussi bien sur les neutrophiles que sur les cellules endothéliales de la paroi vasculaire. L'initiation de la migration du neutrophile commence avec son adhésion réversible à l'endothélium vasculaire de telle sorte à ce qu'il paraisse entrain de rouler le long de la paroi vasculaire, d'où le nom d'adhésion de roulement (Wagner et Roth, 2000). Cette adhésion faible est déterminée par l'intervention des L-sélectines (figure 2) (constitutivement exprimées à la surface des leucocytes) et des P- et E-sélectines, nouvellement exprimées par les cellules de l'endothélium vasculaire activées pendant l'inflammation. Ainsi, les P- et E-sélectines réagissent avec le PSGL1 (P-selectin Glycoprotein Ligand 1) à la surface du leucocyte (Borregaard. 2010) pour créer avec les L-sélectines une adhésion faible du neutrophile à la paroi vasculaire si bien qu'elle ne résiste pas à la force du flux sanguin qui finit par détacher le neutrophile (Wagner et Roth, 2000).

Les P-sélectines apparaissent durant les minutes qui suivent l'exposition de l'endothélium à des stimuli tels que l'histamine, la thrombine ou les ROS (Kantari et al., 2008). Leur intervention permet de ralentir le roulement du neutrophile initié par les L-sélectines. Les E-sélectines qui apparaissent 1 à 2 heures après l'exposition à l'IL-1, le TNF- α ou aux LPS se lient également au ESL-1 (E-selectin Ligand 1) qui induit un roulement encore plus ralenti du neutrophile, le préparant à adhérer fermement à l'endothélium vasculaire

(Mitchell et al., 2000). En effet, cette interaction sélectine-dépendante avec l'endothélium vasculaire ainsi que des stimuli tels que l'IL-8, le C5a, le LTB4, le PAF ou encore le fMLF conduisent à l'adhésion ferme du neutrophile à la paroi endothéliale (Choi et al., 2010). A ce stade, ces stimulations induisent la mobilisation des vésicules sécrétoires et l'expression d'un autre type de molécules adhésives qui sont les intégrines (figure 2) qui permettent l'adhésion ferme du neutrophile à la paroi vasculaire (Zarbock et Ley, 2011). Cet arrêt du roulement du neutrophile s'effectue grâce à l'interaction des intégrines VLA-4 (Very Late Antigen-4 : $\alpha 4\beta 1$ intégrine), Mac-1 (Macrophage-1 Antigen : $\alpha M\beta 2$ intégrine) et LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1 : $\alpha L\beta 2$ intégrine) avec leurs ligands endothéliaux tels que ICAM-1, ICAM-2 (Intercellular Adhesion Molecule), VCAM-1 (Vascular Cell adhesion Molecule 1) ou RAGE : Receptor for Advanced Glycation End-products (Chavakis et al., 2003 ; Yonekawa et Harlan., 2005).

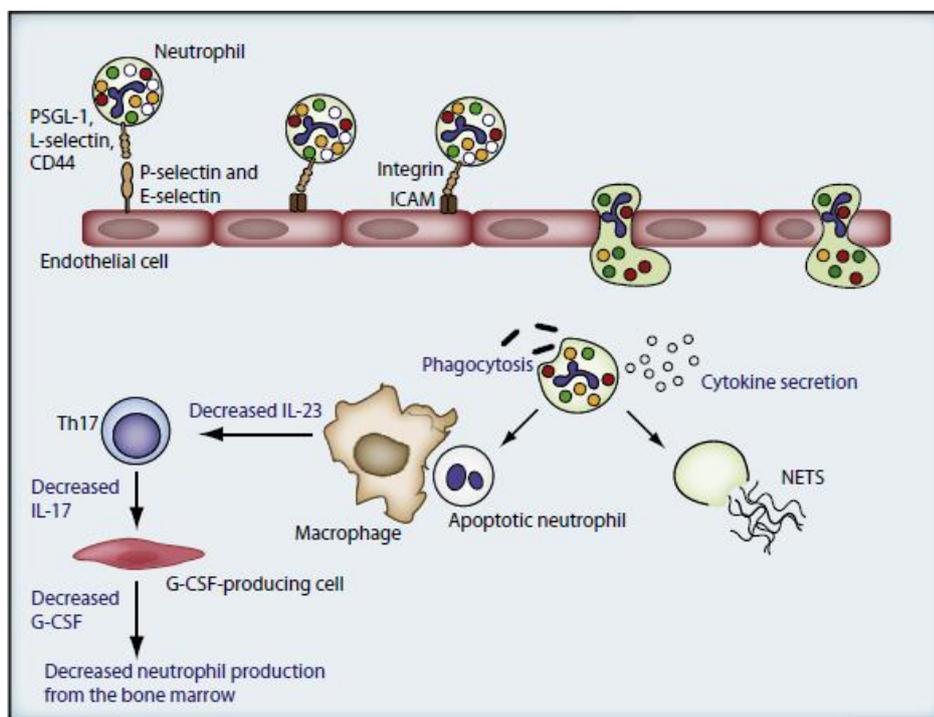


Figure 2. Principales étapes de l'extravasation du PMN et de sa migration vers le site inflammatoire. Cette migration implique des interactions entre les neutrophiles et les cellules endothéliales (Borregaard, 2010).

Après son adhésion ferme le neutrophile serait amené à ramper le long de la paroi vasculaire en utilisant les intégrines Mac-1 et LFA-1, à la recherche de la jonction intercellulaire la plus proche (Phillipson et al., 2006). Des études ont aussi montré que le neutrophile ainsi que d'autres leucocytes peuvent entrer dans l'espace extravasculaire d'une manière trans-cellulaire au lieu de paracellulaire, donc à travers la cellule endothéliale et non

entre les cellules adjacentes (Carman et Springer, 2004; Nourshargh et Marelli-Berg, 2006). Mais la voie paracellulaire reste la prédominante (Nourshargh et Marelli-Berg, 2006). La transmigration ou diapédèse des neutrophiles s'opère ainsi préférentiellement au niveau des jonctions intercellulaires de l'endothélium vasculaire et fait intervenir au moins deux types de molécules adhésives les PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule1) et les JAMs (JAM-A : junctional adhesion molecule-A) qui entretiennent des interactions homophiliques avec leur homologue à la surface du neutrophile pour l'amener à quitter la lumière vasculaire (Borregaard, 2010). Après avoir franchi la paroi endothéliale, le neutrophile doit se frayer un chemin à travers la membrane basale, chose pour laquelle il est hautement équipé. En effet, comme il a été mentionné plus loin, les granules du neutrophile sont chargés en protéases capables de dégrader les collagènes et les laminines de la membrane basale (Faurischou et Borregaard, 2003). La migration se fait par des mouvements amiboïdes du neutrophile qui se déplace selon un gradient de chimioattractants immobilisés, liés aux composants de la matrice extracellulaire (Rankin, 2004). Ces chimioattractants peuvent être des produits bactériens, des débris de cellules mortes ou d'une variété de cellules du stroma ou de l'épithélium du tissu enflammé (Witko-Sarsat et al., 2000). Le déplacement du neutrophile implique la formation continue de nouveaux contacts adhésifs à l'avant de la cellule, pendant que l'arrière se détache de ses substrats adhésifs, de façon à permettre l'avancée du neutrophile au sein du tissu (Jongstra-Bilen ; 2002). A fin d'y arriver, le neutrophile doit franchir le réseau de fibres constituant la matrice extracellulaire. Pour cela, il utilise les portions élastiques de ces fibres et se faufile à travers les ouvertures ainsi générées, sans dégradation protéolytique, pour atteindre enfin sa cible au sein du tissu (witko-sarsat et al., 2000).

1. 4. 2. Phagocytose de l'agent pathogène

Après avoir quitté la circulation sanguine et traversé le tissu interstitiel, le neutrophile arrive au niveau du site inflammatoire où se situe sa cible finale qu'il doit éliminer par phagocytose. La première étape de ce processus est la reconnaissance et l'adhérence du neutrophile au pathogène qui s'effectuent via différents types de récepteurs présents à la surface du neutrophile (Witko-Sarsat et al., 2000). Ces récepteurs, comme les TLRs (Toll Like Receptor) peuvent reconnaître des motifs conservés présents à la surface de la plupart des pathogène, ou encore les récepteurs des opsonines qui reconnaissent l'agent pathogène, comme le récepteur du fragment Fc des immunoglobulines (FcγIIRA) et les récepteurs des éléments du complément (CR3). Une fois le contact établi, un remodelage du cytosquelette du

neutrophile génère la force et les structures nécessaires à l'invagination de la membrane du neutrophile pour entourer la particule progressivement et finir par l'internaliser dans le phagosome. Cependant, cette étape dépend de la taille et de la forme du pathogène ainsi que de l'orientation des particules à sa surface qui pourraient affecter l'efficacité de la phagocytose (Sarantis et Grinstein, 2012). Une fois internalisé dans le phagosome, le pathogène se retrouve dans un environnement hautement toxique grâce à la libération du contenu microbicide et protéolytique des granules cytoplasmiques (dégranulation) d'une part et à la production des ROS d'autre part. Outre ces deux mécanismes de cytotoxicité, le neutrophile utilise aussi les NETs (Neutrophil extracellular traps) pour capturer et tuer les microorganismes dans l'espace extracellulaire (Nauseef, 2007 ; Kantari et al., 2008).

1. 4. 3. Processus de dégranulation

Au cours de l'activation des PMNs, les différentes granules fusionnent avec le phagosome naissant pour déverser leur contenu soit dans le phagosome, soit dans l'espace extracellulaire. L'exocytose des granules leucocytaires conduit à la libération des protéines stockées et à la translocation de protéines transmembranaires vers la membrane plasmique telles que les β 2-intégrines, le cytochrome b558, le récepteur des peptides formylés ainsi que les protéines SCAMP (Secretory Carrier Membrane Protein) et VAMP-2 (Vesicular-Associated Membrane Protein-2) (Nauseef, 2007). Cette mobilisation des granules du neutrophile semble s'effectuer d'une manière ordonnée et hiérarchisée avec les vésicules sécrétoires qui présentent la plus grande prédisposition à l'exocytose suivies par les granules à gélatinases et spécifiques puis les granules azurophiles qui sont mobilisés en dernier lieu (Faurischou et Borregaard, 2003). Ainsi, la stimulation des neutrophiles avec des concentrations de l'ordre du nanomolaire en médiateurs inflammatoires comme, le fMLF induit la libération quasi-totale des vésicules sécrétoires sans pour autant provoquer la libération des autres populations de granules (Sengelov, 1993). Alors que la stimulation avec des agonistes plus puissants comme le PMA induit une libération exhaustive des granules à gélatinase, une libération modérée des granules spécifiques et une faible exocytose des granules azurophiles (Faurischou et al., 2002).

L'élévation de la concentration du Ca^{2+} cytosolique joue un rôle important dans l'induction de l'exocytose des granules dans une variété de cellules (Sengelov *et al.*, 1993). La dégranulation en réponse au calcium semble, par ailleurs, être biphasique: la première phase de haute affinité au calcium (faible concentration du Ca^{2+}) correspond à l'exocytose des granules spécifiques et à gélatinase. La seconde phase de faible affinité (forte concentration

du Ca^{2+}) correspond la sécrétion des granules azurophiles (Sengelov *et al*, 1993). Cette différence de sensibilité des diverses populations des granules au Ca^{2+} peut être liée aux variations de régulation des annexines (I, II,...XI), un groupe de protéines régulées par le Ca^{2+} et qui interviennent dans l'agrégation et la fusion des vésicules avec la membrane plasmique (Borregaard *et* Cowland, 1997; Ligeti *et* Mócsai, 1999). En outre, le calcium pourrait favoriser la dégranulation du neutrophile en agissant sur les interactions entre les SNAP (*Soluble NSF attachment protein*) et les SNARE (*SNAP receptor proteins*). Les SNAREs sont des protéines ubiquitaires et hautement conservées constituant une machinerie d'accostage et de fusion de vésicules (Fauschou *et* Borregaard, 2003). Chaque vésicule de transport exprime sur sa membrane un v-SNARE (SNARE) qui reconnaît et interagit spécifiquement avec un seul type de t-SNARE (*target SNARE*) présent sur la membrane plasmique (figure 3). L'intervention du calcium renforce l'interaction v-SNARE – t-SNARE et facilite la fusion des deux membranes. Par la suite, il se produit le recrutement de SNAP et d'une ATPase cytosolique, NSF (*N-ethylmaleimide Sensitif Factor*) qui permet l'hydrolyse de l'ATP entraînant la dissociation du complexe et l'incorporation de la membrane du granule dans la membrane de la cellule (Chen *et* Scheller, 2001).

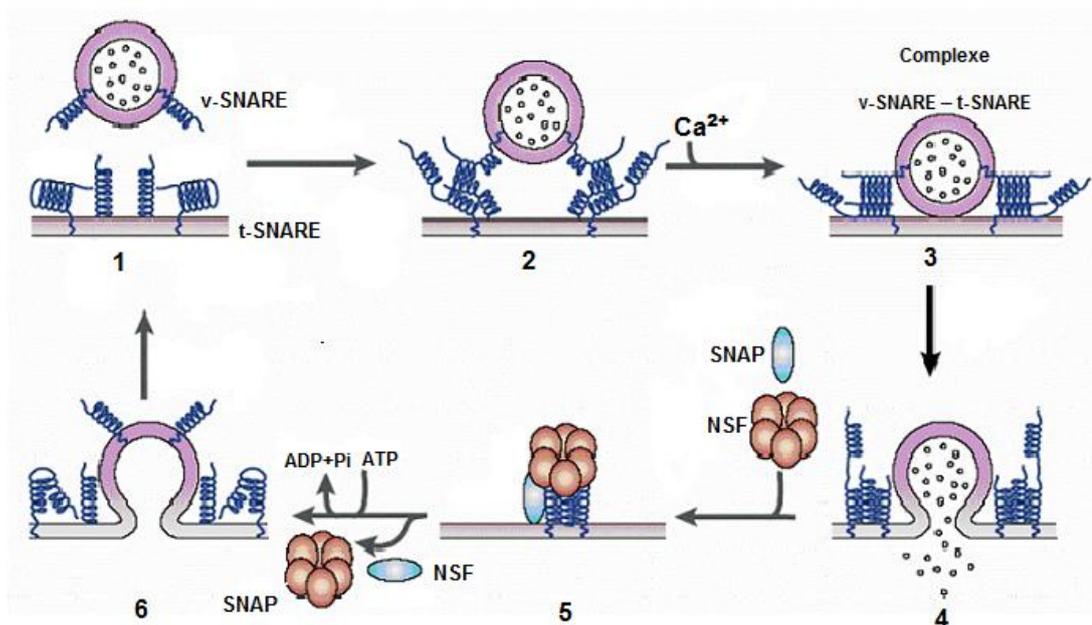


Figure 3. Modèle SNARE proposé pour expliquer la libération des granules du neutrophile. (1) Le v-SNARE reconnaît spécifiquement un t-SNARE présent sur la membrane plasmique. (2) L'assemblage des SNAREs permettrait (3) l'ancrage de la vésicule à la membrane puis (4) la fusion des deux membranes et la libération du contenu granulaire. (5) La liaison de SNAP permet la fixation de NSF. (6) l'hydrolyse de l'ATP par NSF permettrait la dissociation des SNAREs (Adapté de Chen *et* Scheller, 2001).

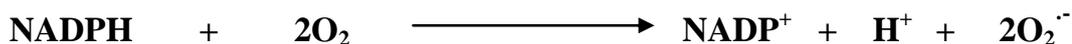
Dans le neutrophile, les protéines t-SNAREs, syntaxine-4 et -6 sont détectées exclusivement dans la membrane plasmique; alors que les v-SNAREs, VAMP-2 et SCAMP sont présentes au niveau de la membrane des vésicules sécrétoires, les granules à gélatinase et les granules spécifiques. Les SNAP-23 et -25 (*Synaptosome Associated Protein 23 et 25*) sont trouvés principalement au niveau des membranes des granules peroxydase-négatives (Fauschou *et* Borregaard, 2003).

Une fois le neutrophile stimulé, les granules déversent leur contenu dans le phagosome ou dans le compartiment extracellulaire, alors que leurs membranes s'incorporent dans la membrane plasmique. La libération des différentes populations de granules est d'une grande importance pour l'activité défensive du neutrophile (Ligeti *et* Mócsai, 1999). Dès les premiers roulements du neutrophile sur l'endothélium, les vésicules sécrétoires sont mobilisées grâce à la présence de la β 2-intégrine sur leurs membranes qui permet au neutrophile activé d'établir des interactions fermes avec l'endothélium. Quant aux granules à gélatinase, elles facilitent au neutrophile le franchissement de la membrane basale grâce aux différentes métalloprotéinases qu'elles renferment. Tandis que les granules spécifiques et azurophiles sont chargés de l'élimination du microorganisme enfermé dans les phagosomes. Les granules spécifiques assurent également la disponibilité du cytochrome *b*₅₅₈, constituant majeur de la NADPH oxydase et les granules azurophiles disposent d'un arsenal microbicide très puissant. Ainsi, la sécrétion de la myéloperoxydase couplée à la NADPH oxydase activée entraîne la production des ROS responsables de l'activité bactéricide oxygène-dépendante des PMNs (Borregaard, 2010).

1. 4. 4. Production des ROS par le neutrophile

La production des ROS au cours de la phagocytose est indispensable à la destruction de l'élément internalisé dans le phagosome du neutrophile. En effet, dès la fusion des granules avec le phagosome naissant, le complexe NADPH oxydase est activé pour générer l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui donnera ensuite naissance aux espèces réactives de l'oxygène qui concourent à la destruction du microorganisme (Groemping *et* Rittinger, 2005). Ce processus connu sous le nom de flambée respiratoire ou explosion oxydative, a lieu au sein du neutrophile lors de la phagocytose ou en réponse à des stimuli pro-inflammatoires et est caractérisé par une rapide augmentation de la consommation de l'oxygène et du glucose (El Benna *et al.*, 2010). L'anion superoxyde, le précurseur des autres ROS, est ainsi produit par le complexe multi-protéique NADPH oxydase par réduction mono-électronique de l'oxygène

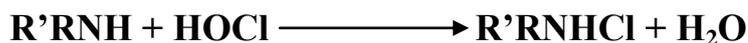
moléculaire en utilisant le NADPH cellulaire comme donneur d'électrons selon la réaction suivante (Babior et al., 2002) :



L'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot -}$ formé est instable, à pH acide dans le phagosome, il est rapidement et spontanément dismuté en peroxyde d'hydrogène. Dans le cytosol, en présence de faible concentration de H^+ , l'anion superoxyde est dismuté par la SOD (superoxyde dismutase) en peroxyde d'hydrogène. Le H_2O_2 ainsi formé peut ensuite donner d'autres molécules à pouvoir pro-oxydant encore plus puissant grâce à la myéloperoxydase (MPO) qui, libérée dans le phagosome à partir des granulations azurophiles catalyse le système peroxyde d'hydrogène/halogéne:



En présence de chlorure (Cl^-), il y a formation de l'acide hypochloreux (HOCl), un puissant agent antimicrobien qui lui-même transforme les amines en N-chloramines qui ont aussi des propriétés microbicides :



La réaction entre l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène en présence des ions Fe^{2+} ou Cu^{2+} génère le radical hydroxyle (OH^{\cdot}). Le radical hydroxyle ainsi formé est extrêmement toxique et réagit avec la plupart des molécules biologiques. Enfin, la réaction entre le OCl^- et le H_2O_2 peut conduire également à la production de l'oxygène singulet qui attaque les liaisons insaturées (Babior et al., 2002). Il est donc évident que la production de grandes quantités de ces substances pro-oxydantes génère un environnement létal pour n'importe quel microorganisme qui leur est exposé, mais aussi très destructif pour le tissu environnant (Babior et al., 2002). En effet, l'hyperproduction des ROS par les neutrophiles serait impliquées dans plusieurs pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, le syndrome de détresse respiratoire où encore les maladies neurodégénératives (El Benna et al., 2010). Ce qui rend logique le fait que l'activité du complexe NADPH oxydase doit être finement régulée aussi bien spatialement que temporellement afin que ses produits dangereux ne soient produits que dans les circonstances adéquates (Babior et al., 2002). Au contraire, un défaut dans la fonction du complexe NADPH oxydase résulte en une immunodéficience sévère, observée chez les individus atteints de CGD, une maladie génétique rare causée par une mutation du gène de l'un des composants de la NADPH oxydase. Ces patients sont atteints d'infection microbiennes récurrentes et parfois mortelles dues à l'absence de l'activité

NADPH oxydase et donc de la production des ROS au sein de leurs neutrophiles (El Benna et al., 2010).

1. 4. 5. Les NETs (Neutrophil extracellular traps)

Les blessures infectées contiennent du pus comportant des neutrophiles morts des bactéries ainsi que de l'ADN. On a longtemps pensé que cet ADN était juste accidentellement libéré lors de la mort des neutrophiles et des bactéries (Hasenberg et al., 2011). Cependant, la découverte de Brinkmann et ses collaborateurs en 2004 a permis d'attribuer à cet ADN extracellulaire du neutrophile mort, un rôle défensif « post-mortem » contre les agents pathogènes et qu'ils ont appelé NETs (Neutrophil Extracellular Traps) pour pièges extracellulaires du neutrophiles (Gardiner et Andrews, 2012). Les Nets, résistants aux protéases et sensibles aux nucléases, sont constitués essentiellement d'ADN et d'histones (H1, H2A, H2B, H3, H4) (Hasenberg et al., 2012). Ces filets de chromatines contiennent des structures globulaires (figure 4) constituées de protéines issues des granules cytoplasmiques du neutrophile et qui, à priori, sont des protéines cationiques (donc qui peuvent se lier à l'ADN) comme notamment les défensines, l'élastase, la cathepsine G, la lactoferrine et la MPO, alors que les composants cytoplasmiques seraient plus rares (Brinkmann et Zychlinsky, 2012 ; Gardiner et Andrews, 2012). Ces structures libérées par le neutrophile constituent une importante stratégie pour tuer et immobiliser les microorganismes pathogènes (figure 4) et prévenir ainsi la dissémination de l'infection. En effet, les NETs sont très adhésifs et peuvent fixer sur place les pathogènes qui entrent en contact avec eux et exercer en extracellulaire leur une activité microbicide (Hasenberg et al., 2012 ; Kaplan et Radic, 2012). De plus, les NETs peuvent aussi inactiver des protéines microbiennes appelées facteurs de virulence qui modifient les fonctions des cellules hôtes (Binkmann et Zychlinsky, 2012).

Les NETs sont en fait le résultat d'une forme unique de mort cellulaire qui est morphologiquement caractérisée par la perte des membranes intracellulaires avant que l'intégrité de la membrane plasmique ne soit compromise. Cette mort cellulaire du neutrophile qui conduit à la libération des NETs est considérée comme une forme alternative à l'apoptose et à la nécrose et a été appelée NETose (Brinkmann et Zychlinsky, 2012). La formation des NETs requière une signalisation cellulaire impliquant vraisemblablement la voie Raf-MEK-ERK kinases (Gardiner et Andrews, 2011). Différents stimuli peuvent conduire à la NETose du neutrophile et à la libération subséquente des NETs, tels que les microorganismes, les LPS et l'acide lipoteicoïque, les plaquettes activées, les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-8), les peptides bactériens comme le fMLF ainsi que le PMA (Cui et al., 2012, Kaplan et

Radic, 2012). La production des Nets semble nécessiter la présence des ROS tel qu'il a été montré avec les neutrophiles des patients CGD qui étaient incapables de former des NETs en réponse à des stimuli appropriés, alors que cette capacité est rétablie en exposant ces neutrophile au H₂O₂ (Brinkmann et Zychlinsky, 2012).

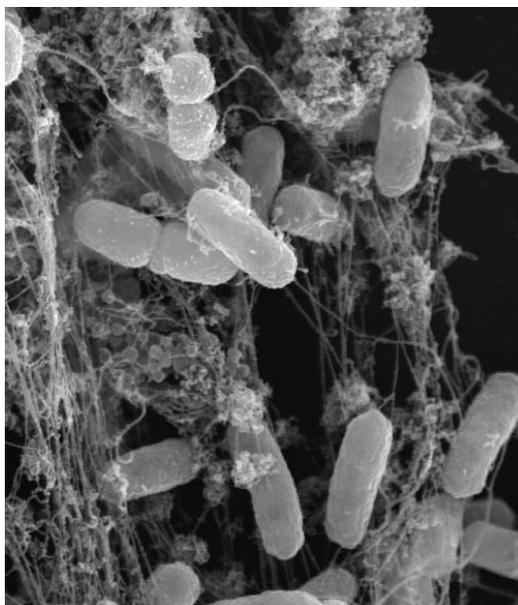


Figure 4. Photographie au microscope électronique représentant des Salmonelles piégées dans les NETs de neutrophiles humains (Binkmann et Zychlinsky, 2012).

1. 5. Apoptose du neutrophile et résolution de l'inflammation

La plupart des réponses inflammatoires s'autolimitent et se résolvent spontanément grâce à un programme interne hautement intégré qui arrête l'inflammation et limite les destructions des tissus de l'hôte. Ceci implique l'élimination de l'agent agresseur, le passage des médiateurs pro-inflammatoires aux médiateurs anti-inflammatoires, la régression du recrutement des leucocytes vers le site inflammatoire, leur apoptose et leur élimination subséquente par les macrophages ainsi que la réparation tissulaire (Kantari et al., 2008). L'arrêt du recrutement des neutrophiles au sein du tissu enflammé ainsi que l'élimination des neutrophiles émigrants au niveau du site inflammatoire constituent un des événements déterminants dans la résolution de l'inflammation. Une fois l'agent causal de l'inflammation éliminé, les neutrophiles peuvent entreprendre une nécrose, une apoptose, une NETose (Brinkmann et Zychlinsky, 2012) ou encore une autophagie (Remijsen et al., 2011).

La mort *in situ* du neutrophile a plusieurs actions résolutive. Outre leur insensibilité aux agonistes et leur arrêt de production des médiateurs inflammatoires, les neutrophiles apoptotiques peuvent séquestrer les cytokines pro-inflammatoires (Ren et al., 2008). De plus,

leur phagocytose par les macrophages induit la polarisation de ces derniers de la forme pro-inflammatoire (M1) à la forme pro-résolutive (M2) (El Kebir et Filep, 2013). Les macrophages M2 sécrètent des médiateurs comme l'IL-10, l'IL-13 et le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) qui induisent l'extinction de l'inflammation et la réparation tissulaire (Kantari et al, 2008 ; El Kebir et Filep, 2013). Des études ont montré qu'il se produit également un changement du métabolisme lipidique qui passe de la production de médiateurs pro-inflammatoires comme les prostaglandines E2 (PGE2) et les leucotriènes à celui des lipoxines, médiateurs lipidiques anti-inflammatoires retardant le recrutement des neutrophiles au niveau du site inflammatoire par inhibition de leur adhésion et leur transmigration à travers l'endothélium vasculaire, tout comme les protéctines et les résolvines, médiateurs lipidiques dérivant des acide gras polyinsaturés ω -3 qui induisent en plus l'apoptose des neutrophiles. En effet, l'apoptose du neutrophile est un point critique pour la réussite de la résolution de l'inflammation. Elle est hautement régulée par un processus qui fait intervenir des facteurs de mort cellulaire comme le ligand de Fas (FasL), le TNF- α , les caspases, la famille des Bcl-2 (B-cell leukemia protein-2), les ROS, les calpaines ainsi que le pathogène. Lorsque les neutrophiles entrent en apoptose, leurs fonctions sont négativement régulées. Ils perdent notamment leur capacité à synthétiser les chimiokines, à répondre aux peptides chimioattractants, à phagocyter ainsi qu'à entreprendre l'explosion oxydative et la dégranulation. La membrane des PMNs apoptotiques est aussi altérée avec la désensibilisation de différents récepteur tout comme l'intégrité du cytosquelette (Kantari et al., 2008). La balance entre la mort et la survie des neutrophiles doit être donc finement régulée vue qu'une prolongation de la durée de vie des neutrophiles ou une augmentation de leur mort est impliquée dans plusieurs pathologies inflammatoires et immunitaires (Ottonello et al., 2002).

II. LE COMPLEXE NADPH OXYDASE PHAGOCYTAIRE NOX2

Les NADPH oxydases (NOXs) sont des enzymes membranaires qui catalysent le transfert d'un électron du NADPH cytosolique vers l'oxygène moléculaire aboutissant à la production de l'anion superoxyde, précurseur des autres ROS (Babior, 1999). Initialement, la NADPH oxydase semblait être spécifique des phagocytes professionnels (neutrophiles, éosinophiles, monocytes/macrophages) dans lesquels elle produit de très grandes quantités d'anion superoxyde et dont l'unité catalytique est la gp91phox (phox pour phagocyte oxydase). Après l'identification de NOX1, un homologue de la gp91phox dans les cellules non phagocytaires, toute une famille de sept membres (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5,

DUOX1 et DUOX2) a été identifiée. Dès lors, la NADPH oxydase phagocytaire et la gp91phox ont été renommées NOX2 (Ago et al., 2011). Si le rôle des ROS produits en grandes quantités à la suite de l'activation de NOX2 est bien connu, celui des ROS produits en très faible quantités dans les cellules non phagocytaires l'est beaucoup moins et seraient plutôt générés à des fins de signalisation cellulaire (Babior, 2004).

L'anion superoxyde produit par NOX2 sert à la production de puissants agents pro-oxydants comme les halogènes oxydés, les radicaux libres et l'oxygène singulet que le phagocyte utilise pour tuer le microorganisme ingéré à l'intérieur du phagosome. L'importance de ces ROS produits dans la défense de l'organisme contre ces agents pathogènes est illustrée par un désordre génétique chez l'humain appelé granulomatose septique chronique. Cette pathologie est caractérisée par l'absence de l'activité NADPH oxydase et donc de ROS et est associée à des infections microbiennes récurrentes et létales (El Benna et al., 2010). Cependant, ces ROS produits par les phagocytes professionnels causent aussi d'importants dommages collatéraux aux tissus avoisinants, si bien que leur production doit être finement régulée pour qu'ils soient produits au bon endroit et au bon moment. Cette régulation de l'activité NADPH oxydase est régie par deux mécanismes : la séparation des composés de l'oxydase en deux localisations subcellulaires différentes au sein du phagocyte au repos (cytosolique et membranaire) et la modulation des interactions réversibles protéine-protéine ou protéine-lipide ainsi que de la phosphorylation de ses sous-unités (Groemping et Rittinger, 2005, El Benna et al., 2009).

2.1. Structure et composants de NOX2

Le système NADPH oxydase phagocytaire est constitué de 6 protéines, qui dans les cellules au repos, se trouvent distribuées entre les membranes et le cytosol (figure 5). Les deux protéines membranaires gp91phox et p22phox forment le flavocytochrome b558 hétérodimérique constituant le noyau catalytique de l'oxydase. Les sous-unités régulatrices p67phox, p47phox, p40phox et Rac se trouvent dans cytosol au repos, les trois sous-unités p67phox, p47phox et p40phox interagissant pour former un complexe cytosolique (figure 5). Suite à une stimulation appropriée, 10 à 20% de ces protéines migrent vers la membrane pour s'assembler avec cytochrome b558 et former l'oxydase active (El Benna et al., 2005).

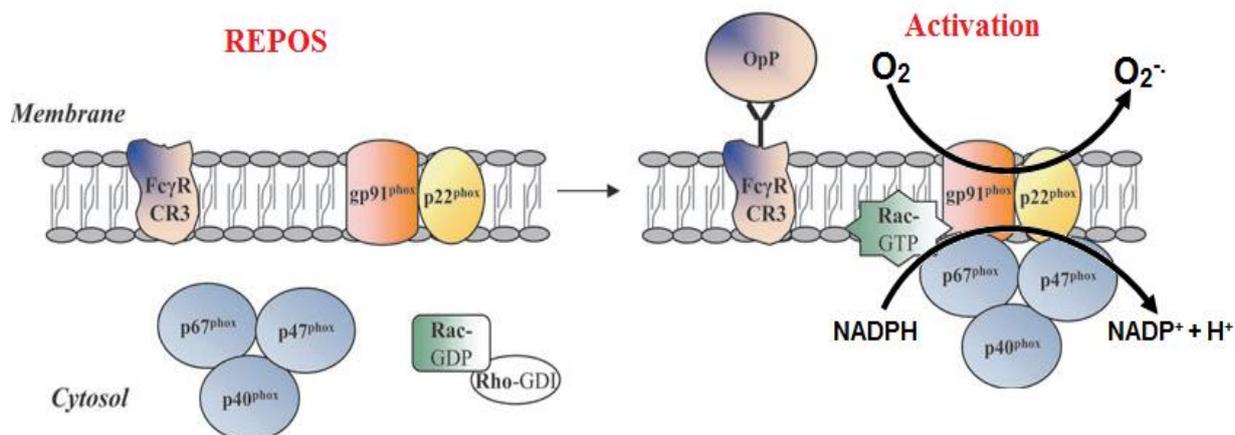


Figure 5. Activation du système NADPH oxydase dans les neutrophiles. Dans les cellules au repos, les composants cytosoliques (la p67phox, la p47phox, la p40phox et Rac-GDP) et membranaires (la gp91phox et la p22phox qui forment le cytochrome b₅₅₈) sont dissociés et la NADPH oxydase est inactive. Après stimulation des récepteurs, le trimère cytosolique p67phox-p47phox-p40phox migre vers la membrane pour s'associer au cytochrome b₅₅₈, simultanément Rac échange le GDP contre le GTP et le rejoint à la membrane pour former le complexe NADPH oxydase actif qui catalyse la formation de l'anion superoxyde dans la cellule à partir de l'oxygène moléculaire (Bréchar et al., 2013).

2. 1. 1. Le Flavocytochrome b558 : Composant membranaire de NOX2

Le flavocytochrome b558 est le noyau catalytique de la NADPH oxydase phagocytaire vu qu'il contient tous les cofacteurs requis pour le transfert des électrons et peut produire l'anion superoxyde en absence des composés cytosoliques (Raad et al., 2009). Il est caractérisé par un pic d'absorption à 558 nm d'où son appellation. Il est constitué d'une sous-unité glycosylée de 91 kDa (gp91phox) et d'une sous-unité non glycosylée de 22 kDa (p22phox) formant un complexe équimoléculaire (1 : 1) (El Benna et al., 2005). Lors de l'activation du phagocyte, le cytochrome b558 constitue le point d'ancrage des composés cytosoliques notamment la p67phox, la p47phox et Rac1 ou Rac2 (Raad et al., 2009).

a. La gp91phox ou NOX2

La sous-unité gp91phox (sous-unité β du cytochrome) ou NOX2 est constituée de 570 acides aminés ayant un poids moléculaire de 65.3 kDa mais qui migre sous une forme de smear ou trainée aux environs de 91 kDa sur un gel de SDS-PAGE qui est dû à des glycosylations hétérogènes sur trois de ses résidus asparagine (Asn¹³², Asn¹⁴⁹ et Asn²⁴⁰) (Groeming et Rittinger, 2005). Au repos, 60 à 70% de NOX2 est localisé dans la membrane des granules spécifiques, 20 à 25% se situe dans la membrane des granules à gélatinases et le reste est distribué entre la membrane plasmique et des vésicules sécrétoires (El Benna., 2008). La partie N-terminale (300 acides aminés) de la protéine forme 6 segments transmembranaires (figure 6) disposés en hélices α au sein desquels sont localisés deux

groupements hémiques, alors que la partie C-terminale constitue un domaine cytoplasmique comportant des sites de liaison du FAD et du NADPH (Babior, 2004). Ceci fait de NOX2 l'élément essentiel de la NADPH oxydase. En effet, la production de l'anion superoxyde est régie par NOX2 et semble se faire en deux étapes. Lors de la première étape catalytique appelée diaphorase, la partie cytosolique de NOX2 lie le NADPH et transfère les électrons aux groupements hémiques via la flavine FAD, puis durant la seconde étape, les électrons sont transférés à l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxyde (Raad et al., 2009). Notre équipe a démontré en 2009 que cette activité diaphorase est augmentée par la phosphorylation de la partie cytosolique de NOX2 par des sérine/thréonine kinases comme la PKC (Raad et al., 2009). Cette phosphorylation semble également augmenter la liaison de NOX2 aux composés cytosoliques Rac2, p67phox et p47phox, en retour cette interaction augmente encore plus l'activité diaphorase de NOX2 (Raad et al., 2009).

b. La p22phox

La p22phox (sous-unité α) comprends 195 acide aminés constituant une protéine non glycosylée de 21 kDa. Elle est associée à NOX2 et forme un complexe équimoléculaire (Groemping et Rittinger, 2005). Elle est considérée comme une protéine ubiquitaire et à l'exception de NOX5 et DUOX1/2, elle est requise pour l'activation et la stabilisation de toutes les autres NOXs (Petry et al., 2010). La partie N-terminale de la protéine comporterait trois hélices α transmembranaires (figure 6) alors que la partie C-terminale cytoplasmique contient un domaine riche en proline appelé PRR (Proline-Rich Region) comportant un motif consensus **PxxP** (Pro-Xaa-Xaa-Pro). Il est connu que ce motif lie les domaines SH3 (Src Homology 3) de la p47phox lors de sa translocation (El Benna et al., 2009). Il a été montré que la p22phox est phosphorylée durant l'activation du neutrophile, notamment par la PKC ou une protéine kinase activée par la phospholipase D (PLD). De plus, le taux de cette phosphorylation de la p22phox serait en corrélation avec l'activation de la NADPH oxydase (Regier et al., 2000).

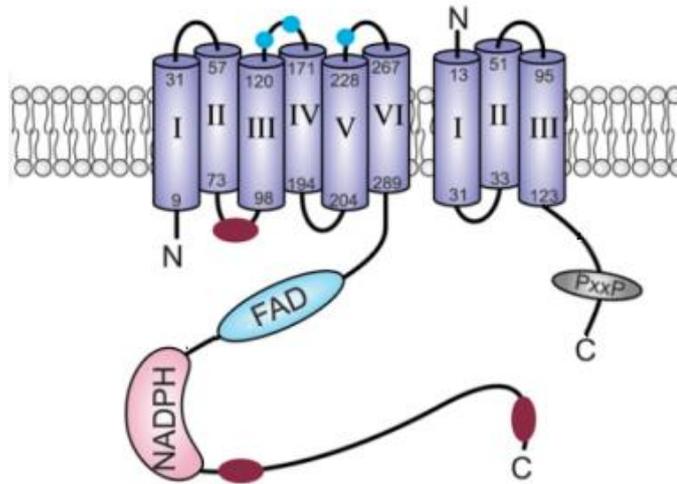


Figure 6. Modèle proposé représentant la structure du cytochrome b558 de la NADPH oxydase phagocytaire, avec la structure à gauche représentant la gp91phox/NOX2 et à droite la p22phox. Les sites de glycosylation de NOX2 sont représentés par les points bleus et les sites de liaison au FAD et au NADPH sont représentés en bleu et en rose respectivement (Groemping et Rittinger, 2005).

2. 1. 2. Les Composants cytosoliques de NOX2

L'activité de la NADPH oxydase phagocytaire est finement régulée par les composants cytosoliques la p47phox, la p67phox, la p40phox et la petite protéine G Rac1 dans les monocytes et Rac2 dans les neutrophiles. Dans les neutrophiles au repos, la p47phox, la p67phox et la p40phox forment un complexe de 250-300kDa (Lapouge, 2002). L'activation de l'oxydase est initiée par des phosphorylations qui induiraient des changements conformationnels intra- et intermoléculaire au sein du complexe p40-p47-p67phox et qui culminent vers la translocation du complexe vers la membrane et son association à Rac et au cytochrome b558 pour former l'oxydase active (Groemping et Rittinger, 2005).

a. La p47phox

La sous-unité p47phox est une protéine monomérique de 44.7 kDa constituée de 390 acides aminés. Cette protéine, présente dans le cytosol du neutrophile à une concentration de 100-150 ng/10⁶ cellules, contient différents domaines fonctionnels qui lui permettent d'interagir avec la membrane et les autres composés de l'oxydase (figure 7). En effet, la partie N-terminale de la protéine comporte un domaine PX (Phox Homology, aa : 4-121), un tandem SH3 (SH3A, aa : 159-214 et SH3B, aa : 229-284) suivi de la région d'auto-inhibition AIR (Autoinhibitory Region, aa : 292-340). La partie C-terminale de la protéine est très basique et est riche en résidus sérines et arginines et comporte le domaine PRR (Proline Rich Region, aa : 363-369) qui permet l'interaction de la p47phox avec un domaine SH3 de la p67phox

dans le cytosol du neutrophile au repos (El Benna et al., 2009 ; Yang et al., 2011). La p47phox est phosphorylée sur plusieurs résidus sérine situés dans la région AIR durant l'activation de la NADPH oxydase (El Benna et al., 1994 ; Taura et al., 2009) et constitue la sous-unité responsable du transport du complexe cytosolique p40-p47-p67phox vers la membrane lors de l'activation de l'oxydase et de l'organisation des autres sous-unités de la NADPH oxydase (El Benna et al., 2010).

b. La p67phox

La p67phox est une protéine de 526 acides aminés ayant un poids moléculaire de 59.8 kDa qui se trouve complexée à la p47phox dans le cytosol du neutrophile au repos (Lapouge et al., 2002). Les domaines fonctionnels de la p67phox (figure 7) consistent en 4 motifs TPR (Tetratricopeptide Repeat), un domaine activateur (AD), un domaine PB1 (Phox-Bem1) et un tandem SH3 en C-terminal (Yang et al., 2011). Le recrutement membranaire de la p67phox est totalement dépendant de la p47phox. L'association p67-p47phox s'effectue via l'interaction entre le domaine PRR de la p47phox et SH3 de la p67phox. Une fois à la membrane, la p67phox s'associe à Rac et le complexe p67phox-Rac induit un changement conformationnel de NOX2 permettant le transfert des électrons du NADPH à l'oxygène moléculaire (Taura et al., 2009).

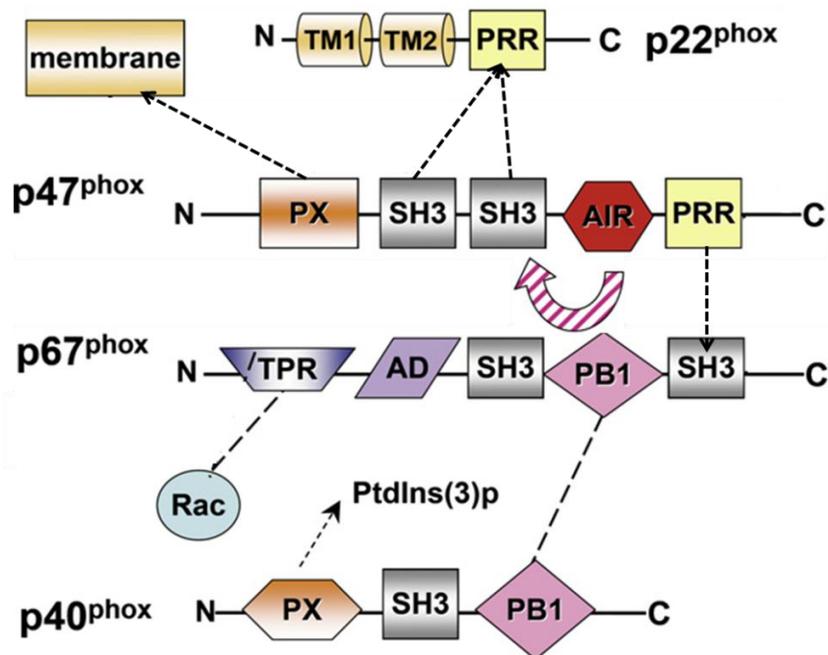


Figure 7. Représentation schématique de la structure et des domaines d'interaction des sous-unités de NOX2. La p47phox, se lie à la membrane via son domaine PX qui lie les phospholipides membranaires et avec ses domaines SH3 qui lient le domaine PRR de la p22phox. La p67phox possède le domaine d'activation de NOX2 (AD) et interagit avec Rac via le domaine en N-terminal TPR. Le domaine PB1 de la p40phox entreprend des interactions homophiliques avec le domaine PB1 de la p67phox et son domaine PX présente une plus grande affinité aux phosphoinositides membranaires que celui de la p47phox (Yang et al., 2011).

c. La p40phox

La sous-unité cytosolique p40phox est le dernier composant de la NADPH oxydase à avoir été identifié par co-immunoprécipitation avec la p67phox et la p47phox (Someya et al., 1993). Il s'agit d'une protéine de 39 kDa et de 339 acides aminés comportant un domaine SH3, un domaine PX et un domaine PB1 (El Benna et al., 2005, Groemping et Rittinger, 2005). Elle interagit avec la p67phox via son domaine PB1 (figure 7) alors que son domaine SH3 semblerait interagir mais faiblement avec le domaine PRR de la p47phox (Fuchs et al., 1995). Tandis que le domaine PX de la p40phox se lie spécifiquement aux phosphoinositides triphosphate membranaires qui s'accumulent dans la membrane phagosomale, ce qui pourrait contribuer à faciliter l'assemblage de l'oxydase à cet endroit de la cellule. S'il est connu que la p40phox est un partenaire obligatoire de la p67phox, son rôle dans l'activation de la NOX2 l'est beaucoup moins. Cependant, la découverte récente d'un patient atteint de CGD exprimant une p40phox mutante a permis d'attribuer à celle-ci un rôle dans l'activation de la NADPH oxydase en réponse à des agonistes physiologiques, en particulier durant l'assemblage de l'oxydase au niveau du phagosome (Matute et al., 2009 ; Chessa et al., 2010). De plus, curieusement, l'absence de la p40phox entraîne une diminution de l'expression de la p67phox de près de 55% (Ellson et al., 2006). Alors que l'absence des sous-unités NOX2, p47phox, p67phox ou p22phox est associée à une perte de l'activité génératrice de l'anion superoxyde de l'enzyme aussi bien dans les membranes plasmiques que phagosomale des neutrophiles de patients CGD, l'absence de la p40phox ne semble affecter que l'activité enzymatique de l'oxydase de la membrane phagosomale (Bissonnette et al., 2008). Des données récentes ont montré également à l'issue de l'étude d'un cas de CGD de p40phox que cette sous-unité est requise pour l'activation de la NADPH oxydase en réponse à certaines particules fongiques (Bagaitkar et al., 2012).

d. La petite protéine G Rac2

La présence des petites GTPases Rac est essentielle à l'activation du complexe NADPH oxydase (El Benna et al., 2005). Rac2 est l'isoforme prédominante dans le neutrophile humain qui présente 92% d'homologie séquentielle avec Rac1. Rac2 est une protéine monomérique de 21 kDa comportant 192 acides aminés et appartenant à la sous-famille des Rho GTPases (Werner, 2004). Ces petites GTPases sont des régulateurs clés d'une large variété de voies de signalisations cellulaires comme le réarrangement du cytosquelette et le chimiotactisme, l'adhésion cellulaire, la phagocytose et la survie cellulaire (Etienne-Manneville et Hall, 2002). Elles agissent comme des commutateurs moléculaires et passent d'un état d'activité à un autre en fonction du guanine nucléotide qui leur est associé, avec le

GDP qui maintient la protéine dans un état inactif et le GTP qui induit son activation (Werner, 2004). Ce passage d'un état d'activation à un autre est finement régulé par les GEFs (Guanosine Exchange Factors) qui permettent l'échange du GDP contre le GTP ainsi que les GAPs (GTPase Activating Proteins) qui augmentent fortement l'hydrolyse du GTP (Bourne et al., 1991). La protéine Rac2, tout comme la Rac1 sont géranylgeranylées dans leur partie C-terminale ce qui facilite son recrutement membranaire. Cependant, dans le neutrophile au repos, Rac2 et Rac1 sont retenues dans le cytosol dans un état inactif, liées au GDP et à leur inhibiteur Rho-GDI (GDP Dissociation Inhibitor) qui masque le motif géranylgeranyl de la GTPase (Werner, 2004). Une stimulation appropriée induit la dissociation de Rho-GDI de Rac permettant sa translocation vers la membrane et ce d'une manière indépendante du trimère p40-p47-p67phox (Groemping et Rittinger, 2005). Différents GEFs présents dans le neutrophile permettent la localisation membranaire de Rac comme P-Rex1, activé par les phosphoinositides 3' et la protéine G hétérotrimérique, et Vav, activé par des tyrosines kinases (Werner, 2004). Une fois à la membrane, Rac2 s'associe à la p67phox et à NOX2 induisant un changement conformationnel de NOX2 permettant ainsi le transfert des électrons (Taura et al., 2009).

2. 2. Activation du complexe NADPH oxydase NOX2

Lors de la phase de recrutement des neutrophiles, le système NADPH oxydase passe graduellement d'un état de repos à un état activé (El Benna et al., 2008). En effet, durant ce passage, le neutrophile exhibe essentiellement trois phénotypes déterminés par les stimuli externes présents (figure 8). Le premier phénotype connu est celui du neutrophile quiescent circulant librement dans le sang et présentant une morphologie arrondie avec très peu de protubérances. Lors d'un épisode inflammatoire, la production de stimuli pro-inflammatoires et de chimiokines (TNF α , GM-CSF, IL-8, LPS...) induit le passage du neutrophile d'un état de quiescence et de non adhérence à un état d'adhérence à l'endothélium vasculaire. Le neutrophile entreprend d'abord des interactions de roulement sélectines-dépendantes avec la paroi vasculaire durant lesquelles il subit une pré-activation ou « priming ». Ce priming induit non seulement un changement de la forme du neutrophile et son adhésion à l'endothélium vasculaire, mais le prépare et le rend plus réactifs et plus susceptible à une activation par des stimuli secondaires. Ainsi, le priming du neutrophile fait en sorte que son exposition à des médiateurs comme le fMLF induit une réponse plus rapide et plus intense que celle induite par le même stimulus chez le neutrophile au repos (El Benna et al., 2008). Vient ensuite la diapédèse du neutrophile adhérent et sa migration par chimiotactisme en réponse à un gradient

de médiateurs chimioattractants qui le mènent directement au niveau du foyer infectieux. Le neutrophile phagocyte alors les microorganismes qui s'y présentent avec l'assemblage et l'activation subséquente de la NADPH oxydase au sein du phagolysosome (Sheppard et al., 2005). Enfin, l'inactivation de la NADPH oxydase a lieu au niveau du site inflammatoire afin de limiter la production de ROS (El Benna et al., 2008).

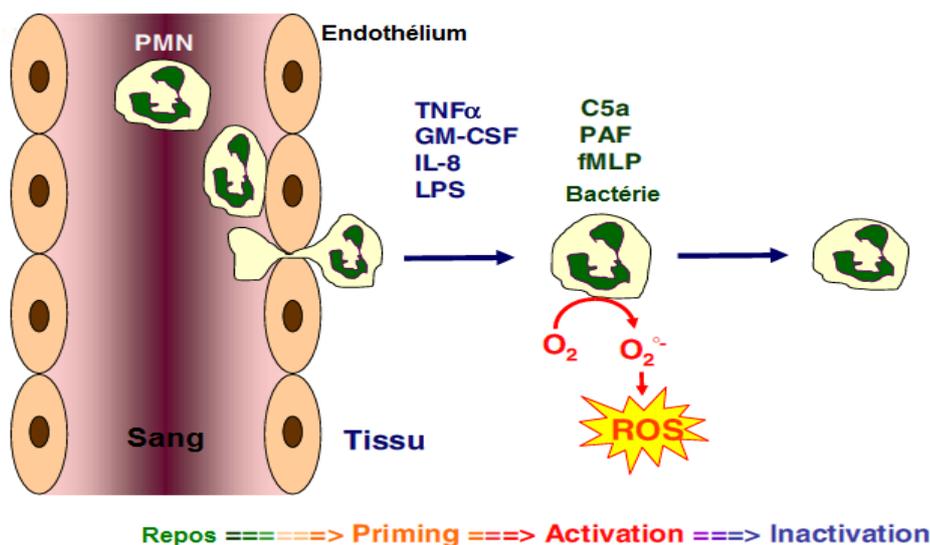


Figure 8. Aperçue schématique des étapes d'activation du neutrophile. En l'absence de stimulation, le neutrophile circule librement dans le sang dans un état de quiescence. Suite à une infection ou une inflammation, les médiateurs pro-inflammatoires produits, induisent des interactions de roulement du neutrophile et son priming. Une fois au niveau du site inflammatoire, le neutrophile primé (pré-activé) est activé par le pathogène lui-même, les peptides formylés (fMLF), le C5a ou le PAF. Ceci culmine vers la production des ROS (O₂⁻, H₂O₂, OH⁻, HOCl...) et la libération de protéines microbicides et des hydrolases qui concourent à la destruction du pathogène. L'inactivation de la NADPH oxydase participe à la résolution de l'inflammation (El Benna et al., 2008).

2. 2. 1. La NADPH oxydase au sein du neutrophile au repos

Au sein du neutrophile au repos, les composants cytosoliques et membranaires de la NADPH oxydase sont dissociés permettant de la maintenir dans un état inactif. La membrane plasmique du neutrophile au repos comporte très peu de NOX2 dont la majorité (60 à 70%) est localisée dans la membrane des granules spécifiques (El Benna et al., 2008). Les sous-unités cytosoliques, p40phox, p47phox et p67phox forment un complexe trimoléculaire p40-p47-p67phox dans lequel la p67phox joue le rôle d'adaptateur et de pont entre la p40phox et la p47phox avec une stœchiométrie de 1 : 1 : 1 (Groemping et al., 2003). En effet, la p67phox se lie via son domaine SH3 au domaine PRR de la p47phox d'une part, et via son domaine PB1 au domaine PB1 de la p40phox d'autre part (figure 7). Au repos, la p47phox existe également dans le cytosol sous forme monomérique ou complexée à la p67phox formant un

dimère équimoléculaire (Dang et al., 2001 ; 2003). En l'absence de stimulation, la p47phox n'est pas phosphorylée et se trouve dans le cytosol au repos sous une conformation d'autoinhibition (figure 9). Dans cette conformation, le tandem SH3 (SH3A et SH3B) interagit avec le domaine d'autoinhibition AIR évitant ainsi la liaison des domaines SH3 de la p47phox au domaine PRR de la p22phox. D'autre part, le domaine SH3A de la p47phox interagit aussi avec le domaine PX prévenant sa liaison aux composants de la membrane et donc le recrutement membranaire de la p47phox qui reste ainsi au cytosol empêchant l'activation inadéquate de la NAPH oxydase (Marcoux et al., 2010).

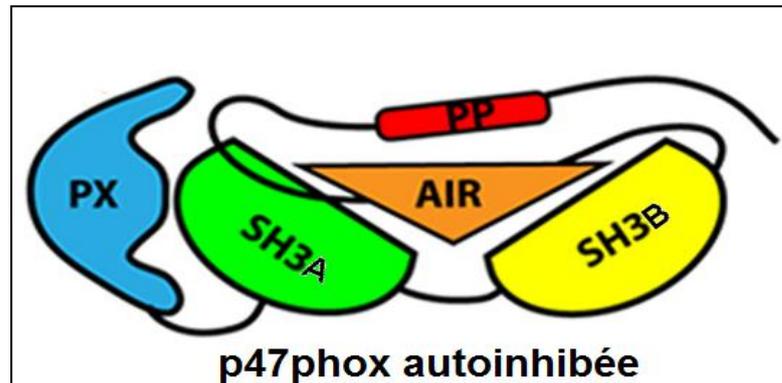


Figure 9. Représentation schématique de la conformation d'autoinhibition de la p47phox (Marcoux et al., 2010).

2. 2. 2. Priming de la NADPH oxydase au sein du neutrophile au repos

Le terme de « priming » désigne la potentialisation de la réponse du neutrophile par exposition à un agent qui ne l'active pas directement mais le rend plus susceptible à une activation secondaire. L'état de réactivité potentialisée du neutrophile « primé » se manifeste par sa capacité à entreprendre une activation plus robuste et plus intense de la NADPH oxydase en réponse à des concentrations sub-optimales en agonistes connus comme le peptide d'origine bactérienne (fMLF) ou à des agents qui ne sont pas agonistes en eux même (El Benna et al., 2008). Le priming et l'activation de la NADPH oxydase du neutrophile peuvent être réalisés par une large gamme d'agents (tableau 2). Les agents pro-inflammatoires physiologiques tels que le fMLF, le C5a, le LTB4 ou le PAF libérés par les agents infectieux et les cellules lésées exercent leur effet sur la NADPH oxydase d'une manière dose-dépendante. En effet, ils exercent un effet primant à basses concentrations et activent la production des ROS à des concentrations élevées (Walker et Ward, 1992). L'adhésion du neutrophile à l'endothélium vasculaire et à la matrice extracellulaire durant sa migration peut primer la NADPH oxydase (Sareila et al., 2011).

Tableau 2. Agents primants et activateurs de la NADPH oxydase du neutrophile. (-) : pas d'effet primant, (+) : faible effet, (++) : effet modéré, (+++) : effet très fort, (?) : données contradictoires sur l'effet (El Benna et al., 2008).

Agents	Priming	Activation
Cytokines		
TNF α	+++	+?
GM-CSF	+++	-
IL-1 β	++	-
IL-8	++	+?
IL-15	+	-
IL-18	++	-
TLR agonists		
LPS	+++	-?
LAMs	++	-
Lipopeptide	++	-
Flagellin	++	-
R848	++	-
Zymosan	++	+?
Chemoattractants		
fMLF	++	++
C5a	+	++
LTB4	++	+
PAF	++	+
Chemical agents		
PMA	+	+++
A23187	++	+
Cyto B	++	-
Others		
Peroxynitrite	++	-
Proteases	++	-
Adhesion	++	-
Fibronectin	+	-
Substance P	++	-

Les mécanismes impliqués dans la potentialisation de la production des ROS dans le neutrophile sont encore mal connus. Différents mécanismes ont été proposés dans ce sens, par exemple, il a été montré que le priming du neutrophile par le TNF- α ou le GM-CSF induit une augmentation de l'expression du récepteur du fMLF au niveau de la membrane plasmique ainsi que l'activation ou le réarrangement de la protéine G hétérotrimérique (McColl et al., 1990 ; Keil et al., 2003). D'autres études ont également rapporté l'augmentation de l'expression du cytochrome b558 suite au priming du neutrophile par le LPS et le GM-CSF (DeLeo et al., 1998 ; Mansfield et al., 2002). De plus, le LPS induit également la translocation de la p47phox vers la membrane plasmique avec la p67phox et Rac2 qui restent au cytosol. Par contre, une addition subséquent de fMLF induit une forte et rapide translocation des composants cytosoliques de la NADPH oxydase vers la membrane où le cytochrome b558 est déjà mobilisé (DeLeo et al., 1998). La potentialisation de l'activation de la NADPH oxydase du neutrophile a lieu également via des modifications de ses composants comme notamment leur phosphorylation (El Benna et al., 2008). En effet, Dang et ses collaborateurs ont montré en 2006 que des agents primants tels que le TNF- α ou le GM-CSF induisent une

phosphorylation partielle de la p47phox et ce précisément sur la Sérine 345 qui est alors désignée comme « site de priming » de la NADPH oxydase du neutrophile. La Ser345 est située dans une séquence consensus (-PXSP-) reconnue et phosphorylée par les MAP kinases, en l'occurrence les p42/44 MAP kinases et les p38MAP kinases (DeLeo et al., 1998 ; Brown et al., 2004, Dang et al. 2006). Par la suite, Boussetta et al., 2010, ont montré que la Ser345 phosphorylée de la p47phox dans le neutrophile traité par le TNF- α constitue un site de liaison pour Pin1, une *cis-trans* prolyl isomérase. La Ser345 est située dans le domaine PRR, riche en proline de la p47phox, où la proline peut être en configuration *cis* ou *trans*. Pin1 reconnaît et se lie spécifiquement aux sérines ou aux thréonines phosphorylées situées immédiatement en N-terminale d'une proline (--PX-phosphoSP--) pour catalyser l'isomérisation de la liaison peptidique (Boussetta et al., 2010). Cette isomérisation conduit alors à un changement conformationnel de la p47phox facilitant sa phosphorylation sur d'autres sérines du domaine AIR de la protéine suite à l'activation du neutrophile par des agonistes secondaires et par conséquent l'exposition des tandems SH3 et du domaine PX (figure 10).

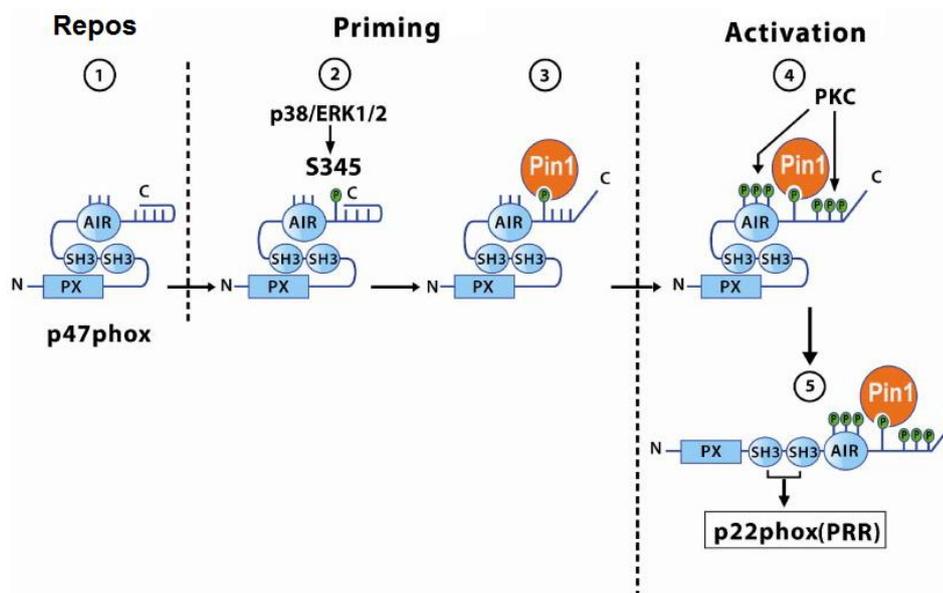


Figure 10. Modèle des différentes conformations de la p47phox dans le neutrophile au repos, primé et activé, rôle de Pin1 et de la phosphorylation (Boussetta et al., 2010).

2. 2. 3. Activation de la NADPH oxydase du neutrophile stimulé

L'activation de la NADPH oxydase peut être induite par une multitude de facteurs solubles ou particuliers, tels que les bactéries opsonisées, le zymosan opsonisé, les particules en latex, le fragment du complément C5a, les peptides formylés (fMLF), le LTB4, le PAF, le DAG, les calcium ionophores (inomycine) ainsi que les activateurs des PKC comme les esters

de phorpol tel que le PMA (El Benna et al., 2005). Ces agents stimulent l'explosion oxydative au sein du neutrophile en activant différentes voies de signalisation dépendantes ou non des récepteurs membranaires. Toutes ces voies de signalisation culminent vers deux évènements importants : la phosphorylation des composants de la NOX2 ainsi que la translocation des sous-unités cytosoliques vers la membrane et l'assemblage complet de la NADPH oxydase (Groemping et Rittinger, 2005 ; Sheppard et al., 2005). Dans les conditions physiologiques, cette activation est induite par liaison d'un stimulus à son récepteur spécifique à la surface du neutrophile qui conduit à l'activation des protéines G hétérotrimériques ($G\alpha\beta\gamma$) qui lui est associées. Les protéines G de la classe $G\alpha_i$ (sensibles à la toxine pertussique) sont les plus abondantes au sein du neutrophile et contrôlent la plupart des effets pro-inflammatoires des agents chimioattractants, à l'exception du PAF (Zarbock et Ley, 2011). Une fois activée, la protéine G active va activer son tour de multiples voies de signalisation intracellulaires impliquant des interactions protéines-protéines ou protéine-lipides réversibles qui conduisent à l'activation de phospholipases et de protéine/lipide kinases (Bréchar d et al., 2013). Par exemple, des enzymes membranaires telles que la phospholipase C (PLC) la phospholipase A2 (PLA2) et la PLD activées par la protéine G, conduisent à la libération de seconds messagers intracellulaires. En effet, la PLC clive le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate membranaire (PIP2) en DAG et inositol triphosphate (IP3). L'IP3 induit la libération du calcium intracellulaire des réserves non mitochondriales et le DAG active les isoformes Ca^{2+} dépendantes et indépendantes des PKC. La PLD libère l'acide phosphatidique à partir des phosphatidylcholine. Alors que la PLA2 conduit à la production de l'acide arachidonique utilisé ensuite comme substrat pour la synthèse des leucotriènes et des prostaglandines. Différentes protéines et lipide kinases sont aussi activées comme notamment les tyrosine kinases, les MAP kinases, les PKC, PKA, PI3kinases qui en retour phosphorylent directement ou conduisent à la phosphorylation de nombreuses protéines y compris les composants de la NADPH oxydase (El Benna et al., 2005 ; Bréchar d et al., 2013).

1. Phosphorylation de la p47phox

La plupart des composants de la NOX2 (p47phox, p67phox, p40phox, p22phox et gp91phox) sont plus ou moins phosphorylés durant le processus d'activation (Groemping et Rittinger, 2005, Seraila et al., 2011). La p47phox est la protéine dont la phosphorylation a été de loin la plus étudiée et la mieux connue. Durant le processus d'activation de la NADPH oxydase, la p47phox devient fortement phosphorylée, d'ailleurs elle a été identifiée pour la première fois comme une phosphoprotéine absente chez certains patients CGD (El Benna et al., 2008). Dans les cellules au repos, la p47phox est très basique (avec un point isoélectrique

pI>9) et elle n'est pas phosphorylée (Okamura et al., 1988). Suite à sa phosphorylation, son pI diminue fortement donnant naissance à différentes isoformes correspondants aux différents états de phosphorylation de la protéine. Cette phosphorylation a lieu sur différents résidus sérines (figure 11) situés dans la partie C-terminale de la protéine et dont la plupart se trouvent dans la région AIR (Ser303, 304, 315, 320, 328, 345, 348, 359, 370, 379) (El Benna et al., 1994; 1996). En fonction de la nature de l'agoniste rencontré par le neutrophile, une combinaison de différentes kinases peut prendre part à la phosphorylation de la p47phox (El Benna et al., 2009). Ainsi la PKC ζ (Dang et al., 2001), PKC β (Dekker et al., 2000 ; Korchak et Kilpatrick, 2001), PKC δ (Bey et al., 2004 ; Cheng et al., 2007), PAK (P21-activated kinase) (Martyn et al., 2005) ; ERK1/2 (Dewas et al., 2000) ainsi que AKT (Chen et al., 2003) réguleraient positivement l'activité de la NADPH oxydase. Alors que la protéine kinase A (PKA) ou encore la CKII (Caséine Kinase II) auraient un effet régulateur négatif (Bengis-Garber et Gruener, 1996 ; Park et al., 2001).

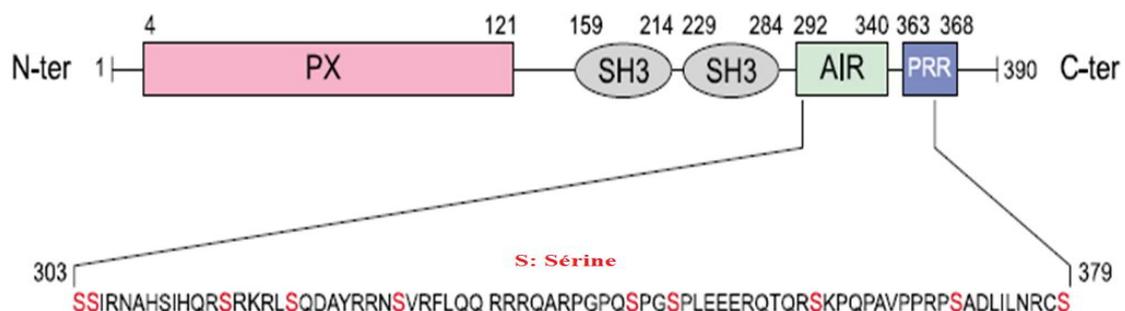


Figure 11. Structure des domaines de la p47phox. La protéine est composée d'un domaine PX, deux domaines SH3, un domaine AIR et d'un domaine PRR. La partie C-terminale comporte plusieurs sérines (en rouge) phosphorylables (El Benna et al., 2008).

Toutefois, il n'est pas encore clair, si toutes ces sérines sont phosphorylées lorsque la protéine est encore dans cytosol ou si elles le deviennent après translocation de la p47phox à la membrane. De plus, l'ordre et la séquence des évènements de phosphorylation de ces sérines restent encore mal connus. Par contre, il est clairement établi que ces phosphorylations sont nécessaires à l'activation de la NADPH oxydase (Faust et al., 1995 ; Inanami et al., 1998). Les sérines 303, 304, 315, 320 et 328 sont localisées dans la région AIR de la p47phox (figure 11) (Shiose et Sumimoto., 2000). Au repos, la p47phox se trouve repliée (figure 12) de façon à ce que le domaine PX se lie au domaine SH3A et que la région AIR se lie aux deux domaines SH3 pour les masquer et empêcher la liaison de la protéine à la p22phox et aux phosphoinositides membranaires (Marcoux et al., 2010). Cette conformation maintient alors la p47phox au cytosol et donc la NADPH oxydase inactive (Groemping et Rittinger, 2005).

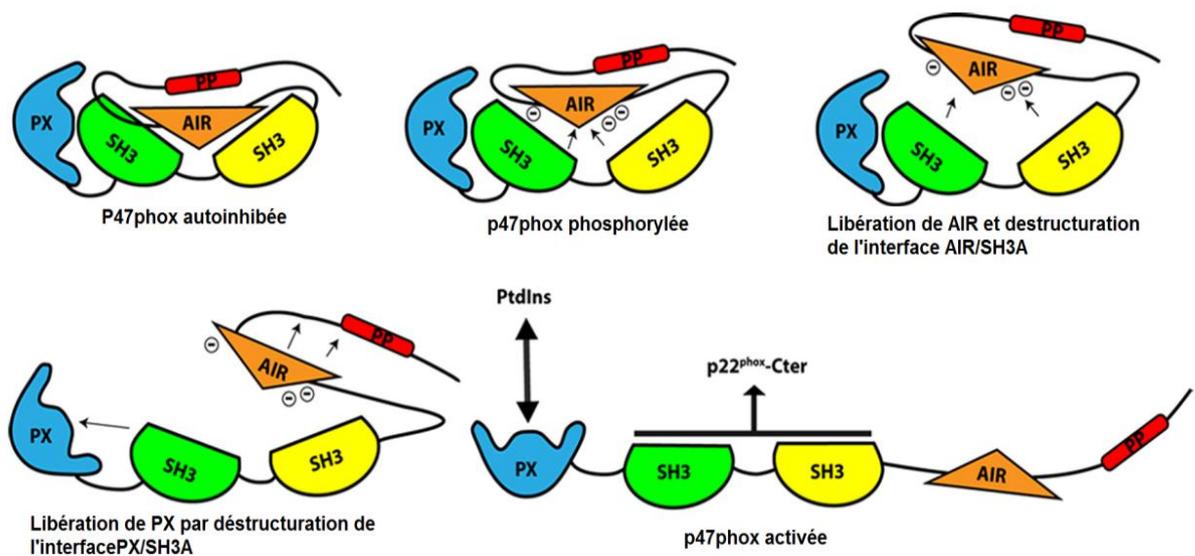


Figure 12. Représentation schématique du mécanisme d'activation de la p47phox montrant comment la phosphorylation du domaine AIR conduit à la libération des domaines PX et SH3 (Marcoux et al., 2010).

Il a été montré par mutagenèse dirigée que la phosphorylation des résidus sérine 303, 304 et 328 est particulièrement importante à l'activation de la NADPH oxydase (El Benna et al., 1994 ; Ago et al., 1999 ; 2003). En effet, cette phosphorylation permettrait le détachement de la région AIR des deux domaines SH3 d'une part et le domaine PX du domaine SH3A d'autre part, permettant alors leur liaison au domaine PRR de la p22phox et le domaine PX aux phosphoinositides membranaires (figure 12). Les résidus sérine 345 et 348 sont localisés dans des séquences consensus reconnues par les MAPK et sont également phosphorylées durant l'activation de la NOX2 (El Benna et al., 1994). Par contre, le rôle de la phosphorylation sur ces sites n'est pas encore connu. Leur mutation en alanine n'a aucun effet sur l'activation de la NADPH oxydase (Faust et al., 1995 ; El Benna et al., 1996). Cependant, en 2006 notre équipe a identifié la sérine 345 comme un site de priming de la NOX2. En effet, la phosphorylation de cette sérine serait nécessaire au priming de l'explosion oxydative induite par des cytokines comme le GM-CSF et le TNF- α (Dang et al., 2006). Outre la phosphorylation des résidus sérines situés au sein de la région polybasique de la p47phox, trois sites de phosphorylation importants (sérine 359, 370 et 379) sont identifiés dans les régions entourant le domaine PRR (domaine de liaison avec la p67phox-SH3B). En effet, la mutation de la sérine 359 ou 370 en alanine réduit grandement la phosphorylation des autres résidus sérines, inhibe la translocation de la p47phox à la membrane et réduit sévèrement la production des ROS. La phosphorylation et la translocation de la p47phox sont rétablies chez ces mutants en introduisant un résidu glutamate pour mimer l'effet d'une phosphosérine, par

contre l'activité NADPH oxydase demeure sévèrement réduite. Un modèle a été alors proposé selon lequel la phosphorylation des sérines 359 et 370 initie l'activation de la NOX2 et précèdent la phosphorylation des autres résidus sérines (Johnson et al., 1998). Cependant, il ne paraît pas évident comment la phosphorylation de ces résidus pourrait initier l'activation vu qu'ils sont situés au sein de la région PRR responsable de la liaison à la p67phox et qu'ils sont éloignés de la région AIR responsable de l'autoinhibition. La sérine 379 aurait un rôle controversé dans l'activation de la NADPH oxydase. En effet, il a été rapporté que la mutation de la sérine 379 en alanine (résidu non phosphorylable) prévient la translocation de la p47phox à la membrane et inhibe complètement l'activité NADPH oxydase (Faust et al., 1995). D'autre part, d'autres résultats montrent que la phosphorylation de la sérine 379 lors de la stimulation du neutrophile déstabiliserait l'interaction p47phox-p67phox en atténuant alors l'activation de la NADPH oxydase (Mizuki et al., 2005).

2. Phosphorylation de la p67phox

On a longtemps cru que les phosphorylations protéiques impliquées dans l'activation de la NADPH oxydase se résument exclusivement à la phosphorylation de la p47phox. Cependant, de nombreuses études ont apporté la preuve de la phosphorylation de la p67phox lors de l'activation de la NOX2 (Dusi et Rossi, 1993 ; EL Benna et al., 1997 ; Forbes et al., 1999). Par contre, la signification et le rôle de ces phosphorylations demeurent encore mal connus (Bokoch et al., 2009). Le fait est qu'il a été montré que la stimulation des neutrophiles par le PMA, fMLF ou encore le zymosan opsonisé induit l'augmentation de la phosphorylation de la p67phox de deux à trois fois et il semblerait que cette phosphorylation a lieu principalement sur le résidu thréonine 233 (El Benna et al., 1997 ; Forbes et al., 1999). La phosphorylation de la p67phox serait PKC dépendante et impliquerait également ERK2 et P38MAPK (Dang et al., 2003). Cependant, la même équipe a montré plus tard que la p67phox entreprenait des cycles de phosphorylation et de déphosphorylation au sein du neutrophile au repos impliquant les tyrosine kinases et MEK1/2 ainsi que les phosphatases de type 1 et 2A (PP1/2A) qui pourraient ainsi jouer un rôle dans la régulation de la production des ROS par les neutrophiles au niveau du site inflammatoire (Dang et al., 2011).

3. Phosphorylation de la p40phox

La phosphorylation de la p40phox a été rapportée par plusieurs études (Fuchs et al., 1997 ; Bouin et al., 1998 ; Someya et al., 1999). Cette sous-unité présente des homologies avec la p47phox ainsi que des sites potentiels de phosphorylation par la PKC et la caséine kinase II (Someya et al., 1999). Les sites concernés par la phosphorylation seraient au moins

la thréonine 154 et la sérine 315 (Bouin et al., 1998). Cependant, il a été montré plus récemment que la phosphorylation de la thréonine 154 mais pas celle de la sérine 315 était requise à l'activation de l'oxydase au sein des neutrophiles de souris chimères et que cette phosphorylation effectuée par la PKC δ était nécessaire à la translocation de la p47phox vers le phagosome (Chessa et al., 2010).

4. Phosphorylation de la p22phox

La phosphorylation de la sous-unité membranaire p22phox a été rapportée avec différents agonistes à savoir le fMLF, le PMA ainsi que le zymosan opsonisé. Cette phosphorylation concernerait un ou plusieurs résidus thréonine et impliquerait notamment la voie des PKC, la PLD et la protéine kinase activée par l'acide phosphatidique (PAAK) (Regier et al., 2000). Ces phosphorylations seraient nécessaires à l'activation de la NADPH oxydase notamment la phosphorylation du résidu thréonine 147. En effet, la mutation de ce résidu en alanine inhibe la production des ROS de 70% et bloque également l'interaction p22phox-p47phox. L'introduction d'un résidu aspartate pour mimer la phosphorylation restaure l'activité NADPH oxydase ainsi que l'interaction p22phox-p47phox (Lewis et al., 2010).

5. Phosphorylation de NOX2 (gp91phox)

Peu d'études ont été menées sur la phosphorylation de la gp91phox durant l'activation de la NADPH oxydase. En 2009, notre équipe a montré que NOX2 était phosphorylée au sein du neutrophile stimulé par le PMA, le fMLF ainsi que par le zymosan opsonisé. Cette phosphorylation est PKC dépendante et concernerait le domaine C-terminal cytosolique de la protéine. Cette phosphorylation augmente l'activité diaphorase de la NOX2 et ce, probablement en induisant un changement conformationnel qui faciliterait le transfert des électrons ou l'alignement avec les autres composants de la NOX comme le NADPH ou le FAD. De plus, il s'est avéré que la phosphorylation de la gp91phox augmente la liaison à rac2, la p67phox et la p47phox. Ceci peut suggérer le fait que la phosphorylation de gp91phox/NOX2 pourrait réguler l'assemblage du complexe et son activité catalytique (Raad et al., 2009).

6. Assemblage des composants de la NOX2

Pendant l'activation de l'oxydase, la p47phox est phosphorylée sur plusieurs résidus sérine ; elle change alors de conformation et ses domaines SH3 en tandem se dévoilent pour interagir avec le domaine riche en proline de la p22phox (Hata et al., 1998 ; Huang et Kleinberg, 1999 ; Groemping et al., 2003). Le domaine SH3 en C-terminal de la p67phox

interagit alors à la fois avec la région riche en proline PRR (a.a. 360-369) et une région flanquée en C-terminal de la p47phox (Mizuki et al., 2005). De plus, le domaine PX de la p47phox interagit avec des phospholipides comme les phosphatidylinositols, pour contribuer en partie à l'accrochage de l'enzyme à la membrane plasmique. Le domaine PX n'est accessible aux phosphatidylinositols qu'au moment de l'activation et assure un rôle crucial dans l'assemblage d'une oxydase fonctionnelle (Ago et al., 2003). Outre ces interactions, DeLeo et ses collaborateurs ont montré la présence de deux régions d'interaction entre la p47phox et la p67phox à savoir, les résidus 323-332 et les résidus 361-370 du domaine d'interaction SH3 de la p47phox comme sites d'interaction de la p47phox avec la p67phox (DeLeo et al., 1996). Il a été montré que cette même région (323-332) est un site d'interaction pour le flavocytochrome b558 (DeLeo et al., 1995). De plus, il a été montré que la p67phox et le cytochrome b₅₅₈ entrent en compétition pour interagir avec cette région, ce qui suggère qu'il y a une sorte d'échange d'interaction entre les deux protéines pour cette même région en fonction des étapes d'activation de la NADPH oxydase et que cette région assure un rôle important dans la régulation des interactions entre les deux protéines. De plus, un domaine situé dans la région N-terminale de la p67phox dit «domaine d'activation» (a.a. 199-210) interagit avec le cytochrome b₅₅₈ en particulier avec la gp91phox pour réguler l'étape 1 du transfert d'électrons (du NADPH au FAD) (Nisimoto et al., 1998). Ensuite, les motifs TRR de la p67phox s'engagent avec Rac-GTP pour former alors l'oxydase active (Koga et al., 1999).

2. 3. Implication de la NADPH oxydase dans les pathologies inflammatoires

L'activation de la NOX2 est finement régulée, principalement par des interactions protéines-protéines et protéines-lipides ainsi que des phosphorylations qui font en sorte que la génération des ROS ne se produise que si nécessaire. Toute dérégulation de ces mécanismes finement orchestrés peut conduire à une activation prolongée de la NOX2 et à la production de quantités massives de ROS dans des lieux inappropriés induisant alors des lésions tissulaires et participant à la physiopathologie de différentes maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde (Gougerot-Pocidallo, 2012). Au contraire, une production insuffisante de ROS ou l'incapacité des phagocytes à entreprendre l'explosion oxydative entraîne une immunodéficiences sévère connue sous le nom de CGD (Häger et al., 2010).

2. 3. 1. Polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie systémique inflammatoire dont la manifestation clinique s'exprime le plus souvent au niveau articulaire (Gougerot-Pocidalò, 2012). La physiopathologie de la PR implique une production dérégulée de cytokines et l'accumulation de neutrophiles au niveau du liquide synovial (Firestin, 2004). Or les neutrophiles ne sont pas des cellules résidentes normales de l'articulation. Ces neutrophiles ainsi accumulés au niveau de la jonction pannus/cartilage contribuent à la destruction du cartilage par l'action de leurs protéases et par la production des ROS (Gougerot-Pocidalò, 2012). L'activité de la NADPH oxydase et la phosphorylation de la p47phox sont hautement élevés dans les neutrophiles des patients arthritiques (Dang et al., 2006). Cette régulation positive pourrait être due à l'action de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , trouvé en grandes concentrations dans les liquides synoviaux de ces patients (El Benna et al., 2009). Ces cytokines induisent alors un priming de la NADPH oxydase phagocytaire qui sera hyperactivée en réponse à d'autres stimuli tels que le LTB₄, le C5a ou encore les peptides formylés. Cette hyperactivation se traduit par une hyperproduction de ROS, en partie responsables des dommages articulaires (Dang et al., 2006 ; El Benna et al., 2008). En effet, il a été montré que les ROS produits par la NADPH phagocytaire déterminent la mort des chondrocytes (Van Lent et al., 2005).

2. 3. 2. Granulomatose septique chronique

La granulomatose septique chronique ou CGD est une maladie génétique rare causant une immunodéficiencè dans laquelle les phagocytes humains sont incapables de produire des ROS lors de la phagocytose (Kuijpers et Lutter, 2012). Cette incapacité est due à la déficiencè en l'un des composants de la NADPH oxydase qui est alors défectueuse (Babior, 2004). Ceci se traduit par une incapacité des phagocytes à éliminer les agents pathogènes. Les organes affectés sont le plus souvent les poumons, la peau, le tractus gastro-intestinal, les ganglions lymphatiques ainsi que le foie (Segal et al., 2000 ; Van den Berg et al., 2009). La formation de granulome est une caractéristique principale de la maladie d'où son appellation. Ces structures sont considérées comme un moyen de contenir les micro-organismes persistants et de les isoler du système immunitaire de l'hôte (Kuijpers et Lutter, 2012).

Environ 65 à 70% des cas de CGD sont dus à une mutation récessive liée au sexe et qui concerne le gène de la gp91phox nommé CYBB (Xp21). Le reste des cas sont dus à des mutations autosomales dont la plus fréquente (25% des cas) concerne le gène NCF1 (Neutrophil Cytsolic Factor 1 : 7q11) codant pour la p47phox (Kanengiesser et al., 2008)

suiwi par les mutations des gènes CYBA (16q24) qui code pour la p22phox (<5%) et NCF2 (1q25) qui code pour la p67phox (<5%) (Roos et al., 1996). Un cas de mutation du gène NCF4 codant pour la p40phox a été décrit en 2009 et engendre une CGD partielle où seule l'activité de la NADPH oxydase phagosomale était affectée (Matute et al., 2009).

Les études menées sur les patients atteints de CGD ont fourni d'importantes informations au sujet du système NADPH oxydase. Les leucocytes des patients CGD constituent un bon outil d'étude vue qu'ils permettent la reconstitution de l'oxydase et la construction de différents mutants qui pourraient servir à étudier et à comprendre le mécanisme d'activation et de régulation de la NADPH oxydase et de ses composants.

2. 4. Les NOXs non phagocytaires

La production des ROS par les cellules non phagocytaires a été décrite depuis longtemps bien que l'origine et la fonction de ces ROS n'étaient pas claires (El Benna et al., 2005). Leur production a d'abord été attribuée à la respiration mitochondriale mais l'utilisation d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire et des flavoenzymes a prouvé qu'une flavoprotéine similaire à NOX2 en était responsable. Par la suite, 30 ans après la découverte de la gp91phox, plusieurs homologues de cette sous-unité catalytique ont été décrits dans différents types de tissus humains, tels que les poumons, les reins et différents types cellulaires comme les cellules épithéliales, endothéliales ou encore les cellules musculaires lisses (Lambeth et al., 2004). La première enzyme homologue à NOX2 a ainsi été décrite en 1999 (Suh et al., 1999). Ces enzymes sont définies par leur homologie avec la gp91phox. Actuellement, 6 enzymes homologues de NOX2 ont été découvertes et répertoriées dans deux sous-familles : NOX 1-5 pour "NADPH oxydase" et DUOX 1-2 pour "Dual oxydase" (Bedard et Krause, 2007).

D'après leur séquence, tous les membres de la famille NOX (NOX 1, 2, 3, 4, 5) possèderaient six hélices transmembranaires avec les quatre résidus histidines en coordination avec les deux hèmes, et une région C-terminale cytosolique contenant les sites de fixation hautement conservés du FAD et du NADPH. NOX 1, 3 et 4 ont presque la même taille que NOX 2 (respectivement 564, 568 et 578 acides aminés). NOX1 et NOX3 présentent 60 % d'homologie de séquence avec NOX2 alors que NOX4 n'en possède que 39 %. NOX5 et les DUOX diffèrent beaucoup plus de NOX2. NOX5 possède une extension N-terminale supplémentaire contenant quatre motifs EF-hand, sites de liaison pour une molécule de calcium. La production des ROS par NOX5 est calcium-dépendante via ces motifs EF-hand (Banfi et al., 2001).

Deux homologues de grande taille ont aussi été identifiés dans la thyroïde : il s'agit de la DUOX1 et de la DUOX2. Seul le rôle de DUOX2 dans la synthèse des hormones thyroïdiennes a été clairement établi dans ce tissu (Dupuy et al., 1999; De Deken et al., 2000). Ces homologues présentent une double homologie, avec la gp91phox et la myeloperoxydase (MPO), d'où l'appellation de DUOX pour «Dual-oxydase». L'expression des DUOXs n'est cependant pas restreinte à la thyroïde. Ainsi, DUOX1 est exprimée dans l'épithélium du poumon (Geiszt et al., 2003) et DUOX2 le long du tractus digestif (El Hassani et al., 2005) ce qui laisse suggérer que les DUOXs pourraient aussi être impliquées dans la défense anti-infectieuse de l'hôte au niveau de la muqueuse.

Matériel et Méthodes

II. MATERIELS ET METHODES

2. 1. Réactifs et animaux

La pansorbine est achetée chez Calbiochem-Millipore (Molsheim, France). Le luminol, les inhibiteurs des protéines et lipides kinases, les inhibiteurs de protéases et de phosphatases, les tampons stérils HBSS (Hanks Balance Salt Solution) et PBS (Phosphate Buffered Saline), le fMLF et le PMA sont achetés chez Sigma Chemical Co (Saint Louis, MO, USA). Le RPMI, les antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine) sont fournis par Gibco (Carlsbad, CA, USA). Les réactifs utilisés pour les SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) et les Western Blots sont produits par Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Les kits ECL utilisés sont commercialisés par Santa Cruz (USA). Les anticorps anti-p47phox et anti-p67phox ont été offerts par le Pr Bernard Babior (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Les anticorps de lapin dirigés contre les phosphosérines de la p47phox sont préparés comme décrit ci-après.

L'étude *in vivo* est réalisée sur des rats Albinos Wistar femelles pesant entre 210 et 270g (Institut Pasteur Alger). Ces rats sont utilisés après une période d'adaptation de 15 jours, durant laquelle ils sont gardés dans des cages en polypropylène et ont accès libre à l'eau et à l'alimentation.

2. 2. Préparation des anticorps anti-phosphosérine

Les anticorps anti-phosphosérine de la p47phox utilisés dans la présente étude ont été produits en immunisant des lapins par des peptides phosphorylés synthétiques. Chaque peptide comporte une douzaine d'acides aminés et correspond à la séquence de la partie c-terminale de la p47phox qui comprend l'une des 8 sérines étudiées sous forme phosphorylée (tableau 3). Ces peptides ont été couplés à l'ovalbumine et injectés aux lapins et les sérums ont été récupérés avant immunisation, 15 jours, 30 jours et 60 jours après l'immunisation.

2. 2. 1. Analyse de la spécificité des anticorps obtenus

Les anticorps polyclonaux obtenus ont été testés par analyse en Western blot, pour vérifier leur spécificité envers chaque phosphosérine correspondante. Pour ce faire, l'équivalent de 1µg de chacun des peptides ayant servi à l'immunisation ainsi que la p47phox recombinante (non phosphorylée) ont été soumis à une séparation électrophorétique sur un gel de polyacrylamide 16% suivi d'un transfert sur une membrane de nitrocellulose. Les

membranes ainsi obtenues sont alors incubées avec les différents anticorps comme il sera décrit plus loin.

2. 2. 2. Phosphorylation *in vitro* de la p47phox recombinante

La p47phox recombinante sauvage et les différentes formes mutantes utilisées sont obtenues en transfectant des bactéries *E. coli* par le plasmide pGex-6P1 comportant le cDNA codant pour la GST-p47phox sauvage ou les différents mutants (comportant l'une des sérines à analyser mutée en Alanine). Les protéines recombinantes obtenues sont ensuite soumises à une phosphorylation par la PKC en système acellulaire comme il a été précédemment décrit (Raad et al., 2009). Brièvement, le mélange réactionnel comporte 1µg de la protéine recombinante, 25ng de la PKC dans 40 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothréitol (DTT), 5µg/ml de diacyl-glycérol (DAG), 150 µg/ml phosphatidylsérine (PS) et 3 mM CaCl₂. La réaction est initiée par addition de l'ATP (50 µM) au mélange équilibré à 30°C et arrêtée après 30min par dénaturation par le tampon d'échantillon Laemmli (62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 5% 2-β-mercaptoethanol, 8,75% glycérol, 5mM Na₃VO₄, 2.5mM paranitrophenylphosphate, 10mM NaF, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 20 µg/mL leupeptine, 20 µg/mL pepstatine, 20 µg/mL aprotinin, 0,01% bleu de bromophénol (Laemmli, 1975)) à 100°C pendant 3 min. Les échantillons obtenus sont ensuite soumis à des SDS-PAGE et Western blot en utilisant les anticorps développés afin d'évaluer leur spécificité.

Tableau 3. Séquences des peptides utilisés pour immuniser les lapins (les sites soulignés correspondent aux serines phosphorylées).

S304	GAPPRR <u>S</u> IRNA
S315	HSIHQR <u>S</u> RKRLS
S320	RSRKRL <u>S</u> QDAYR
S328	DAYRRN <u>S</u> VRFLQ
S345	GPQSPG <u>S</u> PLEEE
S359	ERQTQR <u>S</u> KPQPA
S370	AVPPRP <u>S</u> ADLIL
S379	LILNRC <u>S</u> ESTKR

2. 3. Isolement des neutrophiles humains

Les neutrophiles sont isolés de sang frais de donneur sains fourni par l'Etablissement Français du Sang (Hôpital Necker-Cabanel, Paris 15^{ème} et Hôpital Bichat-Claude Bernard-

Paris 18^{ème}). L'isolement est réalisé dans des conditions d'asepsie totale sur un gradient Ficoll-Hypaque selon la méthode décrite précédemment (El Benna et al., 1994). Brièvement, la sédimentation des hématies est accélérée par dilution du sang au demi avec du dextran T500 à 2% (Pharmacia ou GE Healthcare) préparé dans du NaCl 0,9% stérile. Au bout de 30 min d'incubation à température ambiante, le surnageant est récupéré pour être centrifugé à 400 g pendant 10 min à 20°C. Les culots sont suspendus dans du PBS puis déposés goutte à goutte sur du Ficoll (Ge Healthcare) à raison de deux volumes de surnageant pour un volume de Ficoll. Les surnageants sont alors centrifugés en gradient de densité à 400g à température ambiante. Après 30 min de centrifugation, les cellules mononuclées (lymphocytes et monocytes) ou PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) forment un anneau supérieur se trouvant entre la couche du PBS et celle du Ficoll en dessous. Celle-ci est récupérée délicatement pour les mettre en culture en vue d'immortaliser et d'étudier les lymphocytes B comme il sera décrit plus loin. Alors que les neutrophiles et hématies résiduels sont récupérés dans les culots. Les neutrophiles sont débarrassés des hématies par une brève lyse osmotique de 30 sec réalisée par addition d'un volume d'eau distillée, l'isotonicité est ensuite rétablie par addition d'un même volume de NaCl 1,8%. Après une dernière centrifugation de 8 min, les culots de neutrophiles sont resuspendus dans du PBS et soumis à un comptage cellulaire à l'aide d'une cellule de malassez.

2. 4. Etude de la phosphorylation de la p47phox des neutrophiles

Les cellules ainsi isolées sont soumises à un traitement anti-protéasique par addition de 2.7 mM de DFP (Diisopropyl Fluorophosphate, Merk). Après 20 min d'incubation dans la glace, le traitement est arrêté en ajoutant un excès de PBS glacé suivi d'une centrifugation à 400 g pendant 8 min à 4°C. Les neutrophiles sont ensuite resuspendus dans du tampon HBSS à la concentration appropriée et sont alors prêts pour les tests décrits ci-dessous.

2. 4. 1. Etude de la cinétique de phosphorylation de la p47phox

Afin d'étudier la phosphorylation de la p47phox en fonction du temps de stimulation, les cellules suspendues dans du HBSS (15×10^6 cellules) sont préincubées pendant 10 min à 37°C puis stimulées ou non par du fMLF (10^{-6} M) ou du PMA (200 ng/ml). Après les différents temps d'incubation (5, 10, 15, 30, 45, 60 et 90s pour le fMLF et 1, 2, 4, 6, 8, 10 et 12 min pour le PMA) la stimulation est arrêtée par addition de tampon Laemmli 5 fois concentré supplémenté par des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Les mélanges sont

vigoureusement vortexés et immédiatement dénaturés à 100°C pendant 2min, les échantillons sont ensuite stockés à - 80°C pour être ultérieurement analysés en SDS-PAGE et Western blot.

2. 4. 2. Etude de la phosphorylation de la p47phox en effet dose

Après 10 min de préincubation à 37°C, les cellules (15×10^6 cellules) sont stimulées ou non par des concentrations croissantes de fMLF (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} M) pendant 15 sec ou de PMA (10, 50, 100, 200, 400 ng/ml) pendant 8 min. La stimulation est ensuite arrêtée comme décrit précédemment, et les échantillons sont stockés à -80°C pour être analysés ultérieurement en SDS-PAGE et western blot.

2. 4. 3. Etude de l'effet des inhibiteurs des kinases sur la phosphorylation de la p47phox

Afin d'étudier l'implication des voies de signalisation dans la phosphorylation de la p47phox, les cellules (15×10^6 cellules) sont incubées en présence ou non de Wortmannine, un inhibiteur des PI3kinases (100nM), de génistéine, un inhibiteur des tyrosines kinases (50µM), de GF109203X, un inhibiteur des PKC (50µM), de SB203580 un inhibiteur des P38MAPkinases (10µM), de UO126 un inhibiteur des P42/44 MAP kinases (10µM) ou de SP600125, un inhibiteur des JNKs (50µM). Après 20 min d'incubation à 37°C, les cellules sont stimulées ou non par du fMLF (10^{-6} M) pendant 15 sec ou du PMA (200 ng/ml) pendant 8 min. L'arrêt de la stimulation est réalisé à l'aide du tampon Laemmli chaud comme décrit précédemment, et les échantillons sont stockés à -80°C pour être analysés ultérieurement en SDS-PAGE et western blot.

2. 5. Etude de phosphorylation de la p47phox au sein des différentes fractions subcellulaires du neutrophile

Pour étudier le profil de phosphorylation de la p47phox au sein des différentes fractions subcellulaires du neutrophile, les cellules isolées sont traitées au DFP comme décrit précédemment puis suspendues (50×10^6 cellules/ml) dans du tampon HBSS supplémenté par 0.05 % de BSA, 10 mM d'Hepes et 1 mM de NaN_3 . Les suspensions cellulaires sont alors préchauffées à 37°C en présence ou non de cytochalasine B (5 µg/ml). Après 10 min d'incubation, les cellules sont stimulées ou non par du fMLF (10^{-6} M) pendant 15 sec ou du PMA (200ng/ml) pendant 8min. L'arrêt de la stimulation est réalisé par l'addition de PBS

glacé en excès, contenant 1 mM de DFP et 50 nM de calyculine A (inhibiteur de Phosphatases PP1/2 A) suivi immédiatement d'une centrifugation à 400 g pendant 8 min à 4°C. Les culots cellulaires sont ensuite resuspendus (50×10^6 cellules/ml) dans du tampon de relaxation glacé (RB : relaxation buffer : Pipes pH 7,3 10 mM, NaCl 3 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 3,5 mM, KCl 100 mM) additionné de 1mM EGTA, 1 mM d'ATP, 52 nM de calyculine A, 5 µg/mL d'aprotinine, leupeptine et pepstatine, inhibiteurs des protéases, et 0,5mM PMSF, inhibiteur de serine protéases, 1 mg/ml de NaF et 0,5 mg/mL de β-Glycerophosphate). Les cellules sont ensuite soumises à 3 cycles de sonication de 10 sec dans un bain de glace à 50% de 50W. La suspension est ensuite centrifugée à 400g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants comportant les cellules cassées sont récupérés et déposés sur un gradient discontinu de deux couches de sucrose 15%-35% puis soumis à une ultracentrifugation à 100 000 g pendant 50 min à 4°C. A la fin de l'ultracentrifugation, la fraction cytosolique est récupérée au dessus de la couche de sucrose de 15% puis dénaturée dans le tampon Laemmli. La fraction membranaire forme un anneau entre les deux couches de sucrose alors que la fraction particulaire (granulaire) forme un culot au fond du tube. Le culot de la fraction particulaire est prudemment rincé avec du RB puis resuspendu dans du sucrose 15% pour être dénaturée dans le tampon Laemmli. La fraction membranaire récupérée est lavée par addition d'un volume de RB puis soumise à une deuxième ultracentrifugation dans les mêmes conditions. Les membranes sont alors récupérées dans le culot qui est resuspendu dans du sucrose 15% puis dénaturé dans le tampon Laemmli. Les échantillons dénaturés sont ensuite stockés à -80°C pour être analysés ultérieurement en SDS-PAGE et western Blot.

2. 6. Culture et différenciation des HL60

Les cellules HL60 (Human promyelocytic leukemia cells) proviennent d'une lignée cellulaire leucémique et il est possible de les maintenir en culture et de les différencier en neutrophiles selon les besoins (Colins, 1987). De ce fait, il est possible de suivre l'expression et la phosphorylation de la p47phox ainsi que l'activation de la NADPH oxydase au sein de ces cellules durant les 6 jours de différenciation, à rapprocher de la différenciation de la lignée granulocytaire durant l'hématopoïèse. Pour cela, les cellules sont cultivées en suspension dans un milieu RPMI complétement avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco), 100 U/ml de Pénicilline et 100 µg/ml Streptomycine à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂. Quand le nombre cellulaire est assez suffisant, la différenciation des cellules (6×10^5 cellules/ml) est induite par addition de DMSO à 1.25% final. Par la suite, un nombre suffisant de cellules est prélevé toutes les 24h afin de suivre et d'analyser l'expression et la

phosphorylation de la p47phox ainsi que pour mesurer l'activation de la NADPH oxydase au sein des cellules durant les différents temps de différenciation (J1, J2, J3, J4, J5 et J6). Juste avant l'induction de la différenciation (J0), un prélèvement cellulaire est effectué pour réaliser les mêmes analyses au sein des cellules natives. Les cellules ainsi prélevées sont lavées par addition d'un volume de PBS suivi d'une centrifugation à 400g pendant 10 min à température ambiante. Le culot de cellules est ensuite resuspendu dans du HBSS pour être immédiatement utilisées dans les tests décrits ci-dessous.

2. 6. 1. Mesure de la production de l'anion superoxyde par les cellules HL60 au cours de leur différenciation en neutrophiles

La production de l'anion superoxyde par les HL60 est mesurée aux différents stades de différenciation à l'aide de la technique de réduction du cytochrome c. Brièvement, les cellules (1×10^6 cellules/ml) sont incubées à 37°C dans du tampon HBSS contenant 2 mg/ml de cytochrome c pendant 30 min. Les cellules sont ensuite stimulées ou non par du fMLF (10^{-6} M) ou du PMA (200 ng/ml), la production de l'anion superoxyde est alors mesurée en continu durant 15 min à l'aide d'un spectrophotomètre à 550nm.

2. 6. 2. Analyse de l'expression et de la phosphorylation de la p47phox dans les cellules HL60 au cours de leur différenciation en neutrophile

Les cellules HL60 (15×10^6 cellules) suspendues dans le HBSS sont préchauffées pendant 10 min à 37°C pour être ensuite stimulées ou pas par le fMLF (10^{-6} M) pendant 15 sec ou par le PMA (200 ng/ml) pendant 8 min. L'arrêt de la stimulation est réalisé par l'addition d'un volume du tampon Laemmli concentré 5 fois pour 4 volumes de cellules, suivi de la dénaturation immédiate à 100°C pendant 2min. Les échantillons sont ensuite gardés à -80°C avant d'analyser l'expression de la p47phox (dans les cellules non stimulées) ainsi que sa phosphorylation par SDS-PAGE et western blot.

2. 7. Etude de l'activation de la NADPH oxydase au sein des lymphocytes B transformés

Les neutrophiles ont une durée de vie très courte et sont résistants aux transfections et il n'est donc pas possible de les transfecter avec des formes mutantes des composants de la NOX2 pour étudier le mécanisme de son activation. C'est pour quoi nous avons utilisé dans notre étude les lymphocytes B transformés à l'EBV (Epstein Barr Virus) qui constituent un

modèle très pratique pour l'étude de la NADPH oxydase notamment les lymphocytes B isolés de patients CGD qui sont utilisés pour la reconstitution du système NADPH oxydase et l'étude de la phosphorylation de la p47phox (Chanock et al., 1992 ; Maly et al., 1993).

2. 7. 1. Culture et immortalisation des Lymphocytes B

Les lymphocytes B transformés par le virus EBV sont préparés à partir des PBMC issus du fractionnement du sang de donneurs sains ou de patients CGD dépourvus de p47phox. Les lymphocytes isolés des patients CGD sont très utiles car il est possible d'y induire l'expression de la p47phox sauvage ou de la p47phox portant différentes mutations au niveau des sites étudiés. Pour cela, l'anneau des PBMC obtenu précédemment lors de l'isolement des neutrophiles du sang humain est soumis à un lavage dans du PBS suivi par une centrifugation à 400g pendant 10 min à température ambiante. Les cellules (10^7 cellules/ml) sont alors suspendues dans 2 ml de surnageant de culture des cellules B95-8E (cellules de marmouset chroniquement infectées), lignée cellulaire lymphoblastique productrice du virus EBV. La suspension ainsi obtenue est incubée pendant 1h30 à 37 °C. Les cellules sont ensuite diluées à 10^6 cellule/ml en ajoutant du milieu RPMI complet supplémenté de 10% de SVF et de 0.2 µg/ml de cyclosporine A. Les cellules sont alors laissées en culture telles quelles pendant 2 à 4 semaines. Quand les amas de cellules transformées apparaissent au fond des flacons de culture, le milieu est aspiré délicatement pour le remplacer par du milieu frais. La culture est ensuite poursuivie jusqu'à obtention du nombre cellulaire désiré. Ainsi, l'infection des lymphocytes B primaires humains par l'EBV résulte en la production et l'immortalisation d'une lignée de cellules B lymphoblastiques non néoplasiques qui peut être maintenue en culture ou congelée à -80°C jusqu'à utilisation.

2. 7. 2. Transfection des lymphocytes B immortalisés

Les lymphocytes B immortalisés (20×10^6) à transfecter sont lavés dans du tampon de transfection (20 mM Hépès pH 7,10, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄ et 6 mM de D-Glucose) puis incubées pendant 15 min à température ambiante dans 350µl du même tampon contenant 5 µg d'ADN SV40 et 20 µg de plasmide (EBOpLPP-p47phox sauvage ou EBOpLPP-p47phox mutante sur les Ser(303-379) en Ala). Les cellules sont ensuite électroporées à 210 volts dans des cuves de 0.4 cm suivi d'une autre incubation à température ambiante. Après 15 min les cellules sont centrifugées à 400 g pendant 10 min à température ambiante pour être suspendues ensuite dans 5 ml de RPMI supplémenté de 10% de SVF puis mises en culture. Après 24h l'antibiotique de sélection (Hygromycine 200 µg/ml) est ajouté

pour maintenir la culture pendant 2 semaines avant de tester les cellules pour la présence de la p47phox et l'activité de la NADPH oxydase.

2. 7. 3. Etude de la production des ROS par les Lymphocytes B transformés

La production des ROS par les lymphocytes B transformés est mesurée par chimioluminescence amplifiée par le luminol en présence de peroxydase de reifort. La chimioluminescence est une technique particulièrement sensible qui permet entre autre de mesurer l'activité NADPH oxydase des cellules entières. Elle repose sur le principe de dissipation de l'énergie par émission de lumière par un composé lorsqu'il retourne d'un état excité à son état basal. La luminescence émise dans cet essai est le résultat d'une réaction d'oxydoréduction du luminol (5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phtahlazinedione) par les ROS produits par les cellules étudiées. Cette luminescence est proportionnelle à l'activité de la NADPH oxydase des cellules qui est alors quantifiée par le luminomètre.

Les lymphocytes B transformés (2×10^6 cellules/ml) suspendus dans du HBSS contenant $10 \mu\text{M}$ de luminol sont préchauffés à 37°C dans la chambre thermostatée du luminomètre (Biolumat LB937; Berthold), la luminescence enregistrée serait alors due à l'activation spontanée de la NADPH oxydase des cellules. Après 20 min de préincubation, les cellules sont stimulées par addition de différentes concentrations de pansorbine (0.25-4 mg/ml) ou de PMA (10-400 ng/ml). L'émission de luminescence est ensuite enregistrée pendant 30 min et exprimée en unité relative de luminescence (RLU).

2. 7. 4. Etude de la phosphorylation de la p47phox dans les lymphocytes B transformés

Les lymphocytes B transformés isolés à partir des PBMC des sujets sains sont suspendus dans du HBSS (4×10^6 cellules/ml) puis préincubés pendant 10 min à 37°C avant d'être stimulés ou non par la pansorbine (2 mg/ml) ou le PMA (200 ng/ml) durant les temps indiqués. La stimulation est arrêtée par addition du tampon Laemmli modifié concentré 5 fois suivi immédiatement de dénaturation à 100°C pendant 2 min. Les échantillons sont ensuite congelés à -80°C pour être analysés ultérieurement par SDS-PAGE et Western blot.

2. 8. Etude de la phosphorylation de la p47phox *in vivo* : induction de la pleurésie chez le rat

Afin d'analyser la phosphorylation de la p47phox au sein du neutrophile activé lors d'une réponse inflammatoire de l'organisme, nous avons eu recours à la pleurésie induite chez le rat comme modèle d'inflammation expérimentale. Pour ce faire, des groupes de 6 rats (Albinos wistar) dont le poids varie de 150 à 200g sont formés. La pleurésie est induite selon la méthode de Cuzzocrea et ses collaborateurs (2002) à laquelle quelques modifications ont été apportées. Brièvement, l'animal légèrement anesthésié par de l'isoflurane est soumis à une incision dermique au niveau du sixième espace intercostal droit, 0.2 ml de λ -carrageennane 1% ou de NaCl 0.9% stérile (groupe contrôle) sont en suite injectés dans la cavité pleurale. L'incision est refermée par des points de sutures et l'animal est réanimé. Les animaux sont ensuite sacrifiés 1h, 2h, 3h ou 4h après l'injection. Leur cage thoracique est prudemment ouverte, la cavité pleurale est en suite rincée par 2 ml de PBS stérile contenant 1mM de DFP et 50nM de calyculine A, afin de récupérer l'exsudat comportant les neutrophiles ayant migré vers la cavité pleurale de chaque rat. Les exsudats avec la solution de lavage récupérés sont alors soumis à une centrifugation à 400 g pendant 10 min à 4°C. Le culot des neutrophiles est resuspendu dans du PBS et soumis à un comptage cellulaire avant d'ajouter un volume approprié de tampon Laemmli 5x suivi immédiatement de dénaturation à 100°C pendant 3 min. Les échantillons cellulaires sont ensuite gardés à -80°C avant de les analyser en SDS-PAGE et western blot.

2. 9. SDS-PAGE et Western Blot

La phosphorylation de la p47phox dans les différents échantillons cellulaires préparés précédemment est analysée par gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) suivi d'un western blot. Brièvement, les échantillons sont soniqués durant 10 sec pour les fluidifier en cassant l'ADN avant de les soumettre à une séparation sur un gel de 10% d'acrylamide en utilisant un tampon de migration contenant 0.025M de Tris-Base, 0.192M de Glycine et 0.1% de SDS. Les protéines ainsi séparées sont transférées en milieu liquide (0.05M de Tris-Base, 0.095 M de Glycine, 0.08 % de SDS et 20% de Méthanol) sur une membrane de nitrocellulose de 0.4 μ M de diamètre (Millipore) pendant 1h30 à 250 mA.

Après le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose, les sites non spécifiques de celle-ci sont saturés pendant 1h dans du lait 5% préparé dans du TBS-tween20 (Tris-HCl 25mM pH7.5, NaCl 150mM, tween 20 0.05%). Les membranes sont ensuite incubées pendant une heure à température ambiante ou sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires appropriés, à savoir les anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les différents

phosphosites étudiés de la p47phox : les antiphospho-sérine304, 315, 320 et 328 utilisés à une dilution de 1:2000, l'antiphospho-sérine345 (1 :10000), l'antiphospho-sérine359, 370 et sérine379 utilisés à une dilution de 1 :1000, et l'anti-p47phox totale dilué au 1/10000^{ème}, l'anti-p67phox dilué au 1/2000^{ème} ou l'anti-p22phox dilué au 1/6000^{ème}. Après trois lavages au TBS-T, la révélation des complexes protéines-anticorps est réalisée en incubant les membranes pendant 45min à température ambiante avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin marqué à la peroxydase l'HRPO (GAR-HRPO : Goat anti-rabbit Horse Radish Peroxydase). La révélation des protéines est réalisée à l'aide du Kit ECL (Enhanced Chemiluminescence) où les signaux sont détectés par une caméra (Fusion Fx7). Dans certains essais, la révélation est réalisée à l'aide d'un anticorps secondaire marqué à la phosphatase Alcaline (GAR-AP : Goat anti-rabbit Alkaline Phosphatase), la détection des protéines est alors faite en ajoutant le substrat BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium) qui permet une révélation colorimétrique de l'activité phosphatase alcaline. Les différents signaux obtenus sont quantifiés à l'aide du logiciel ImageJ.

2. 10. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne arithmétique (M) des n valeurs obtenues \pm l'écart moyen (SEM) [M \pm SEM]. Le test t de Student est utilisé pour évaluer la signification des effets des différentes substances testées. La différence est considérée statistiquement significative au risque de 5% ($p < 0.05$).

Résultats

III. RESULTATS

1. Caractérisation des anticorps anti-phosphosérines

Il est bien établi que l'activation de la NADPH oxydase du neutrophile implique la phosphorylation de la p47phox sur différents résidus sérine situés pour la plupart dans sa partie C-terminale (El Benna et al, 2008). Afin d'étudier la phosphorylation de chaque site de la p47phox au sein du neutrophile stimulé, des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée de chacune des 8 sérines investiguées (S304, 315, 320, 328, 345, 359, 370 et S379) ont été développés comme décrits précédemment. La vérification de la spécificité de ces anticorps a révélé qu'en effet, chacun de ces anticorps développés utilisés à la concentration indiquée reconnaît seulement le peptide phosphorylé qui a servi à sa production et n'est pas capable de reconnaître les autres séquences utilisées pour la production des autres anticorps comme le montre le blot de la figure 13.

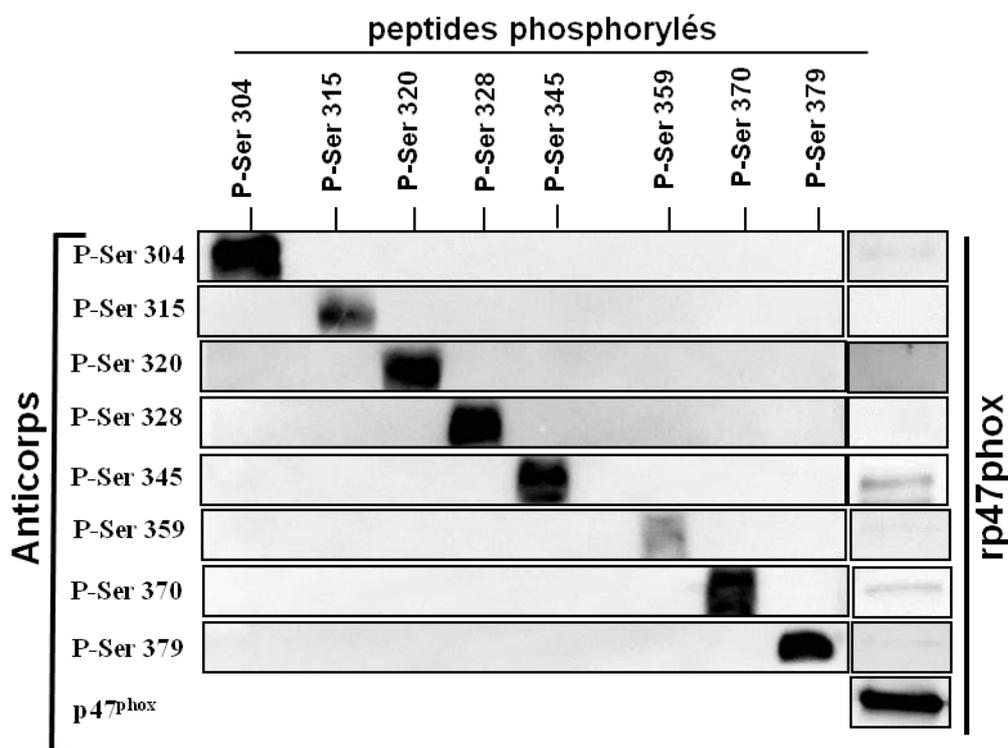


Figure 13. Caractérisation des anticorps phospho-spécifiques qui reconnaissent les phospho-sites de la p47phox mais pas la p47phox recombinante non phosphorylée (rp47phox). Les peptides phosphorylés (1µg) et la rp47phox (1µg) sont analysés par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphoSer indiqués.

Il était également important de s'assurer que ces anticorps ne soient pas en mesure de reconnaître la forme non phosphorylée de la sérine d'intérêt, chose qui a été vérifiée avec la p47phox recombinante (rp47phox) qui n'est pas sensée être phosphorylée. En effet, sur les blots des figures 13 et 14, il est possible de constater qu'en l'absence de phosphorylation, les anti-phosphoSer304, 315, 320, S328, 345, 359, 370 et 379 ne se lient pas à la rp47phox, donc ne reconnaissent pas la forme non phosphorylée des sérines correspondantes. Par contre, ces anticorps se lient à la p47phox phosphorylée *in vitro* par la PKC (Ser304, 315, 320 et 328). De plus, il était intéressant de constater que ces anticorps en question n'étaient pas capables de se lier à la p47phox quand le résidu sérine qui leur est spécifique est muté en alanine (figure 14). L'anti-phosphoSer345 ne reconnaît la rp47phox que si elle est phosphorylée par ERK2 *in vitro* et la mutation de la Ser345 en Ala bloque la liaison de l'anticorps en question. Les anticorps spécifiques anti-phosphoSer sont alors utilisés pour étudier la phosphorylation de la p47phox du neutrophile simulé par le fMLF ou le PMA.

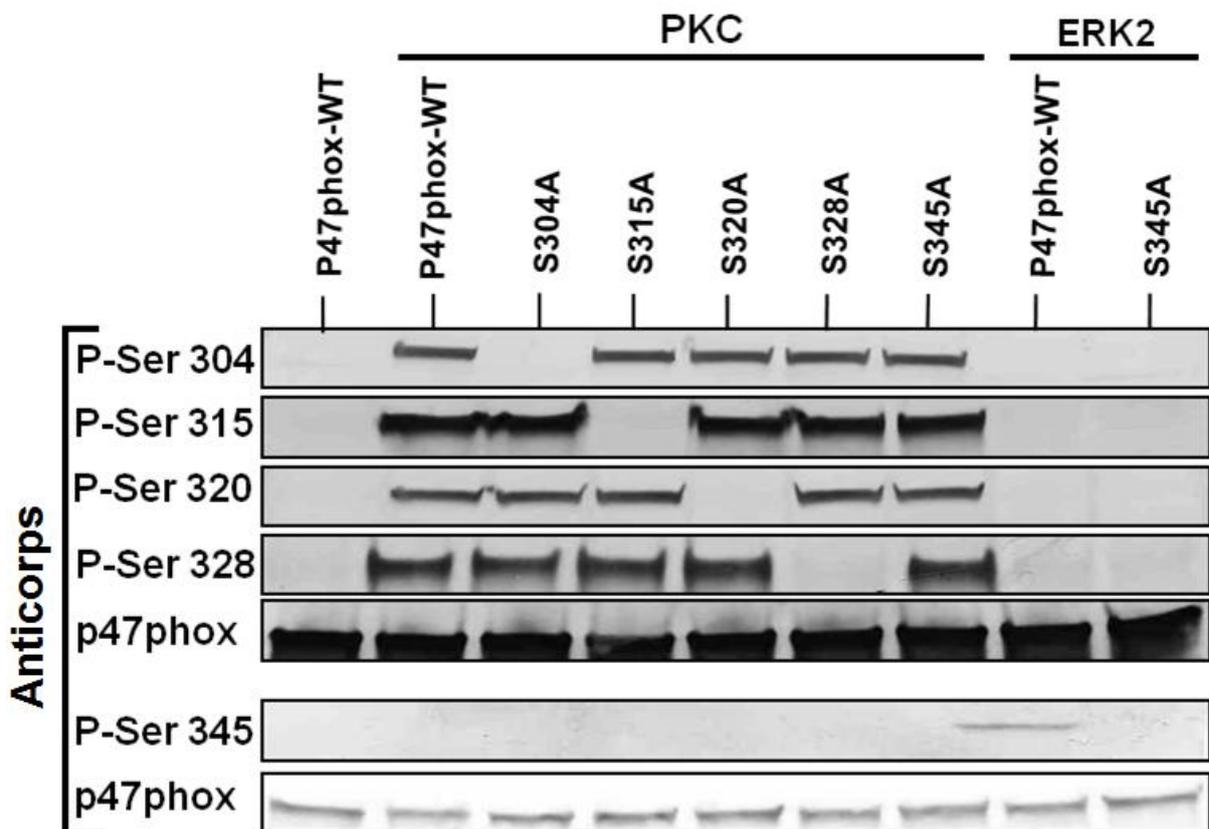


Figure 14. Spécificité des anticorps phospho-spécifiques qui reconnaissent les phospho-sites de la p47phox. La p47phox recombinante sauvage (WT 0.25µg) et les différentes p47phox mutantes sont phosphorylées *in vitro* par un mélange d'isoformes de PKC ou par ERK2, puis analysées par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps phospho-spécifiques indiqués ou l'anti-p47phox.

Les anticorps anti-phosphoSer359, 370 et 379 n'ont pas été testés car nous ne disposons pas de p47phox mutée sur ces Ser individuellement. La production des ces mutants est en cours dans le laboratoire.

2. Phosphorylation de la p47phox au sein du neutrophile stimulé par le fMLF

La stimulation du neutrophile par le fMLF induit, via ses récepteurs membranaires différents évènements de signalisation qui aboutissent à la phosphorylation de la p47phox sur différents résidus sérine dans sa partie C-terminale (El Benna et al., 1994). Cependant, l'effet spécifique du fMLF sur la phosphorylation de chacun des ces résidus sérines de la p47phox n'est pas encore connu. Dans cette étude, les neutrophiles sont stimulés par 1 μ M de fMLF pendant 5, 10, 15, 30, 45, 60 et 90 secondes. Puis analysés par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphoSer développés. Vu les temps de stimulation très courts, il était important de s'assurer qu'à la fin de la stimulation, les évènements de phosphorylation et de déphosphorylation induits par le fMLF sont arrêtés. Pour ce faire, l'arrêt de la stimulation est réalisé par addition de tampon Laemmli renforcé par des anti-protéases et des anti-phosphatases suivi immédiatement de dénaturation à 100°C. Les résultats obtenus montrent que le fMLF induit la phosphorylation de la Ser303, 315, 320 et 328 (Figure 15). Cette phosphorylation est très rapide car détectée dès 5 secondes de stimulation qui est le temps d'incubation le plus court qu'on ait pu réaliser.

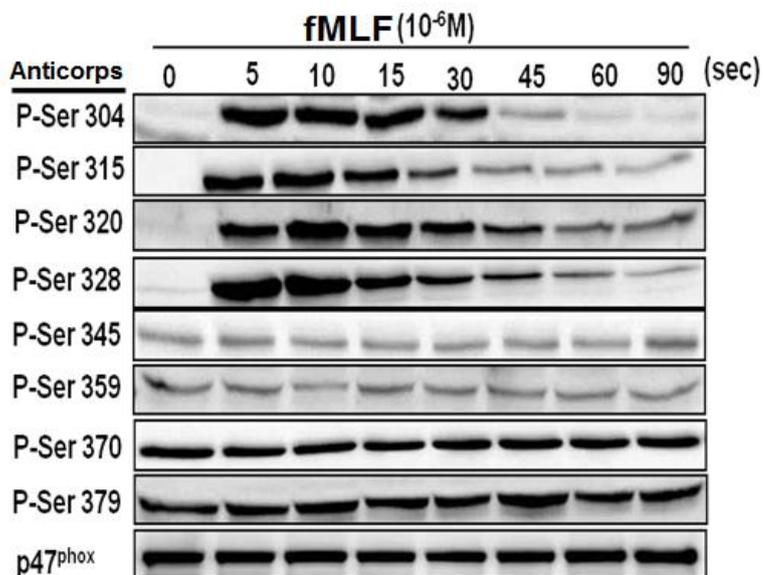


Figure 15. Cinétique de la phosphorylation de la p47phox induite par le fMLF. Les neutrophiles humains (15 x 10⁶ cellules/400 μ l) sont stimulés par 1 μ M de fMLF durant différents temps d'incubation. La stimulation est arrêtée par addition de 100 μ l de tampon Laemmli et dénaturation à 100°C. Les homogénats dénaturés sont analysés par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphosérines indiqués.

La quantification de la phosphorylation de la p47phox obtenue au terme de différents essais montre que le pic de phosphorylation de ces 4 sérines est atteint au bout de 10 secondes seulement (figure 16). Après 30 secondes la phosphorylation de ces sérines diminue pour disparaître complètement au bout de 90 secondes.

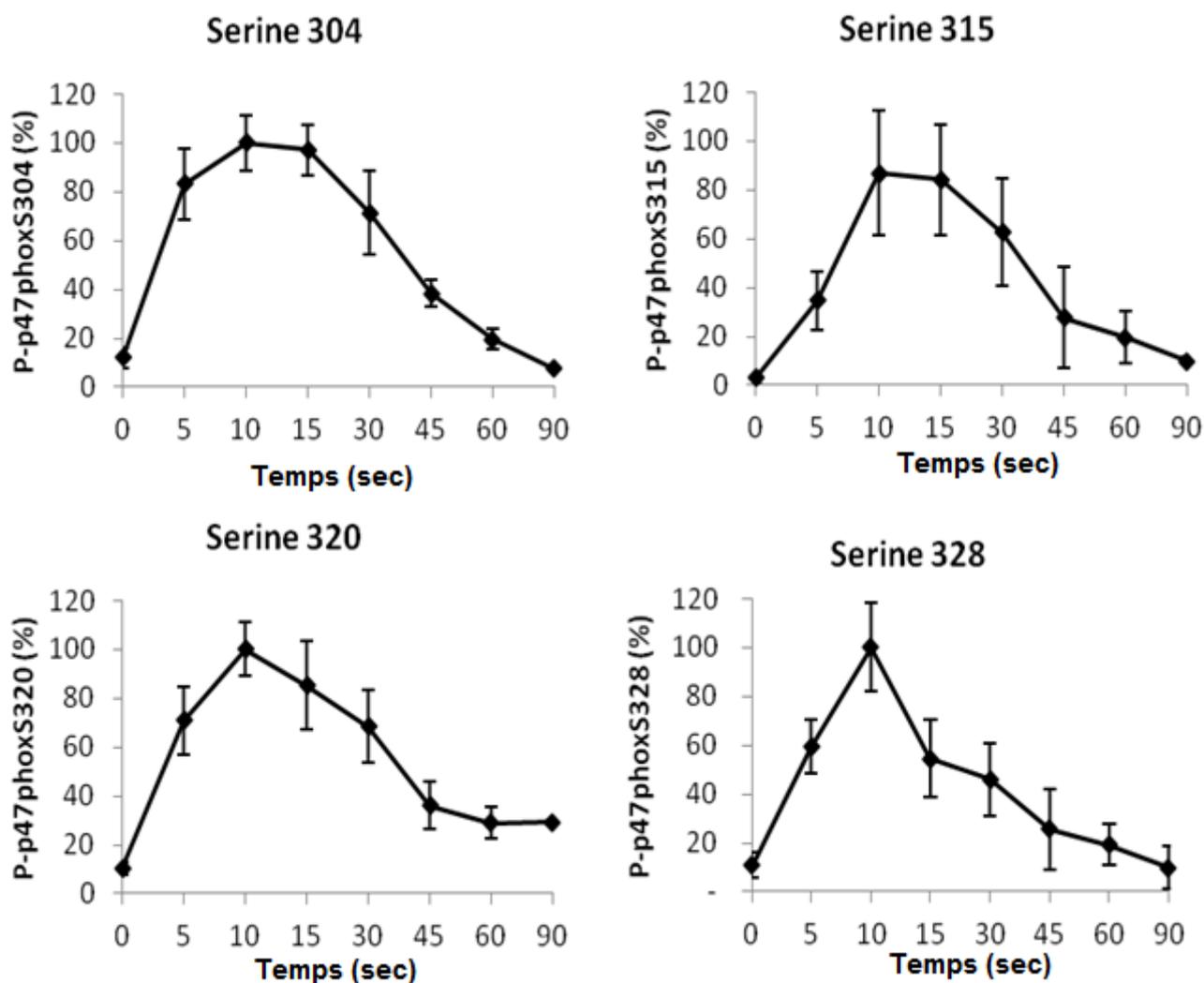


Figure 16. Quantification de la phosphorylation en cinétique de la p47phox induite par le fMLF. Les neutrophiles humains (15×10^6 cellules/400 μ l) sont stimulés par 1μ M de fMLF durant différents temps d'incubation. La stimulation est arrêtée par addition de 100 μ l de tampon Laemmli et dénaturation à 100°C . Les homogénats dénaturés sont analysés par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphosérines indiqués. La phosphorylation de la p47phox obtenue de 3 essais différents est quantifiée par densitométrie et corrigée par rapport à la quantité de la p47phox totale. Chaque point représente la moyenne de 3 essais indépendants \pm SEM, $n=3$.

Il été intéressant de constater que les Sérines 345, 359, 370 et 379 étaient phosphorylées en l'absence de stimulation et que cette phosphorylation n'était pas affectée par les différents temps d'incubation avec le fMLF (figure 15).

L'incubation des neutrophiles avec différentes concentrations de fMLF a montré que la phosphorylation des Ser304, 315, 320 et 328 était dose-dépendante. Alors que la phosphorylation de la Ser345 n'est pas significativement augmentée même en présence de 10^{-5} M de fMLF (concentration maximale utilisée). Les différentes concentrations du fMLF n'ont pas affecté non plus la phosphorylation basale des ser359, 370 et 379 (figure 17).

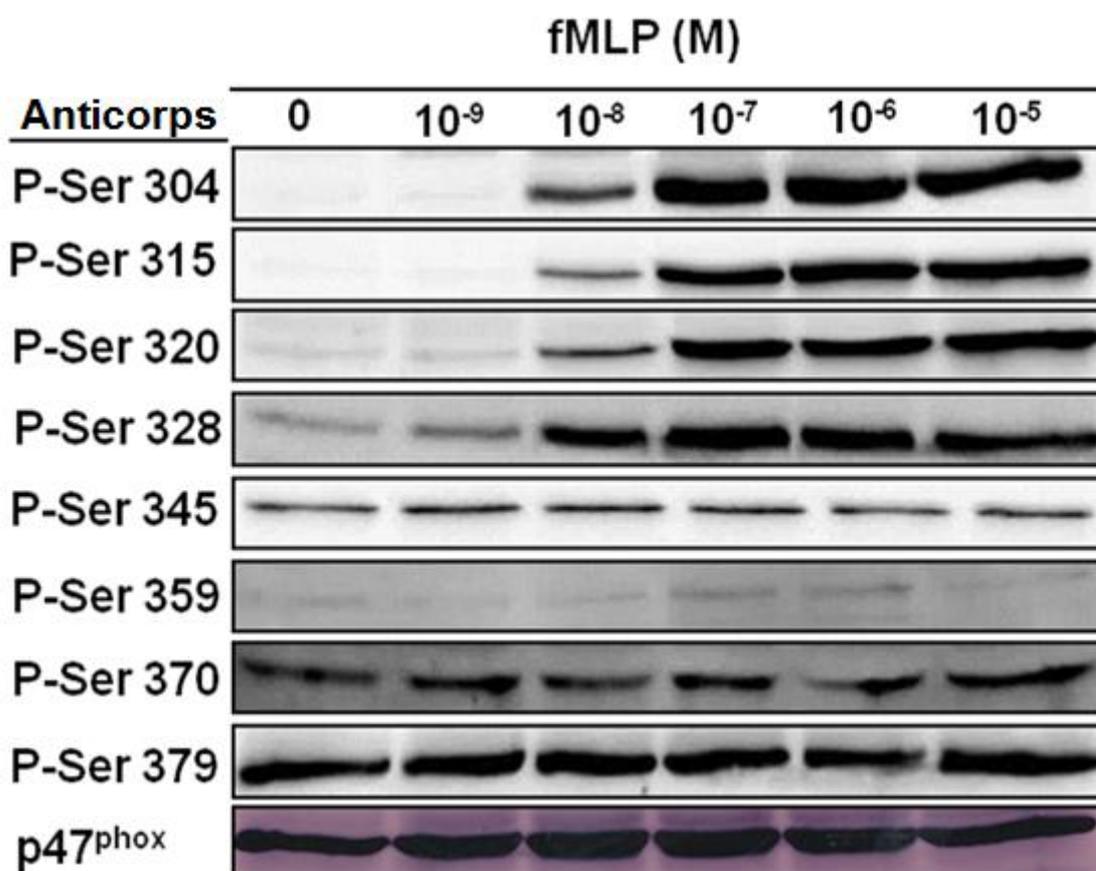


Figure 17. Effet dose du fMLF sur la phosphorylation de la p47^{phox}. Les neutrophiles humains (15×10^6 cellules/400 μ l) sont stimulés par différentes concentrations du fMLF durant 15 secondes. La stimulation est arrêtée par addition de 100 μ l de tampon Laemmli et dénaturation à 100°C. Les homogénats dénaturés sont analysés par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphosérines indiqués.

La quantification de la phosphorylation de la p47phox obtenue au terme de différents essais montre que la phosphorylation est détectable à partir de 10^{-8} M de fMLF et que le pic de phosphorylation de ces 4 sérines est atteint à 10^{-6} M de fMLF (figure 18).

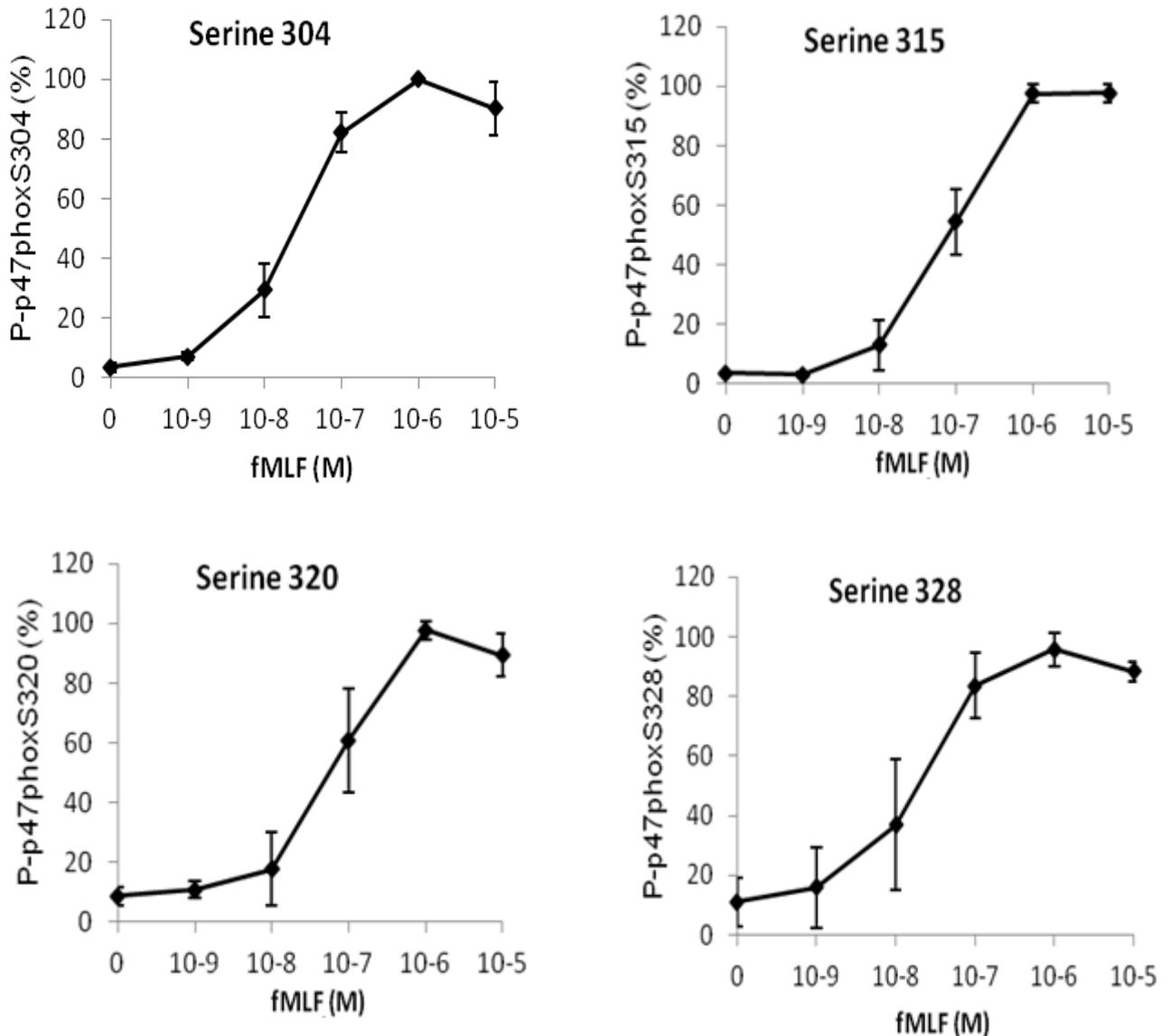


Figure 18. Effet dose du fMLF sur la phosphorylation de la p47phox. Les neutrophiles humains (15×10^6 cellules/400 μ l) sont stimulés par différentes concentrations du fMLF durant 15 secondes. La stimulation est arrêtée par addition de 100 μ l de tampon Laemmli et dénaturation à 100°C . Les homogénats dénaturés sont analysés par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphosérines indiqués. La phosphorylation de la p47phox obtenue de 3 essais différents est quantifiée par densitométrie et corrigée par rapport à la quantité de la p47phox totale. Chaque point représente la moyenne de 3 essais indépendants \pm SEM, n=3.

3. Phosphorylation de la p47phox au sein du neutrophile stimulé par le PMA

Le PMA, un activateur direct de certaines isoformes de la PKC, est connu pour être un puissant activateur du système NADPH oxydase du neutrophile (El Benna et al., 1994). Cette activation s'accompagne d'une forte phosphorylation de la p47phox. Par contre son effet sur la phosphorylation de chaque résidu sérine de la protéine est jusque là inconnu. Dans cette étude, il est montré que la stimulation des neutrophiles par le PMA induit la phosphorylation des Ser304, 315, 320 et 328 (figure 19).

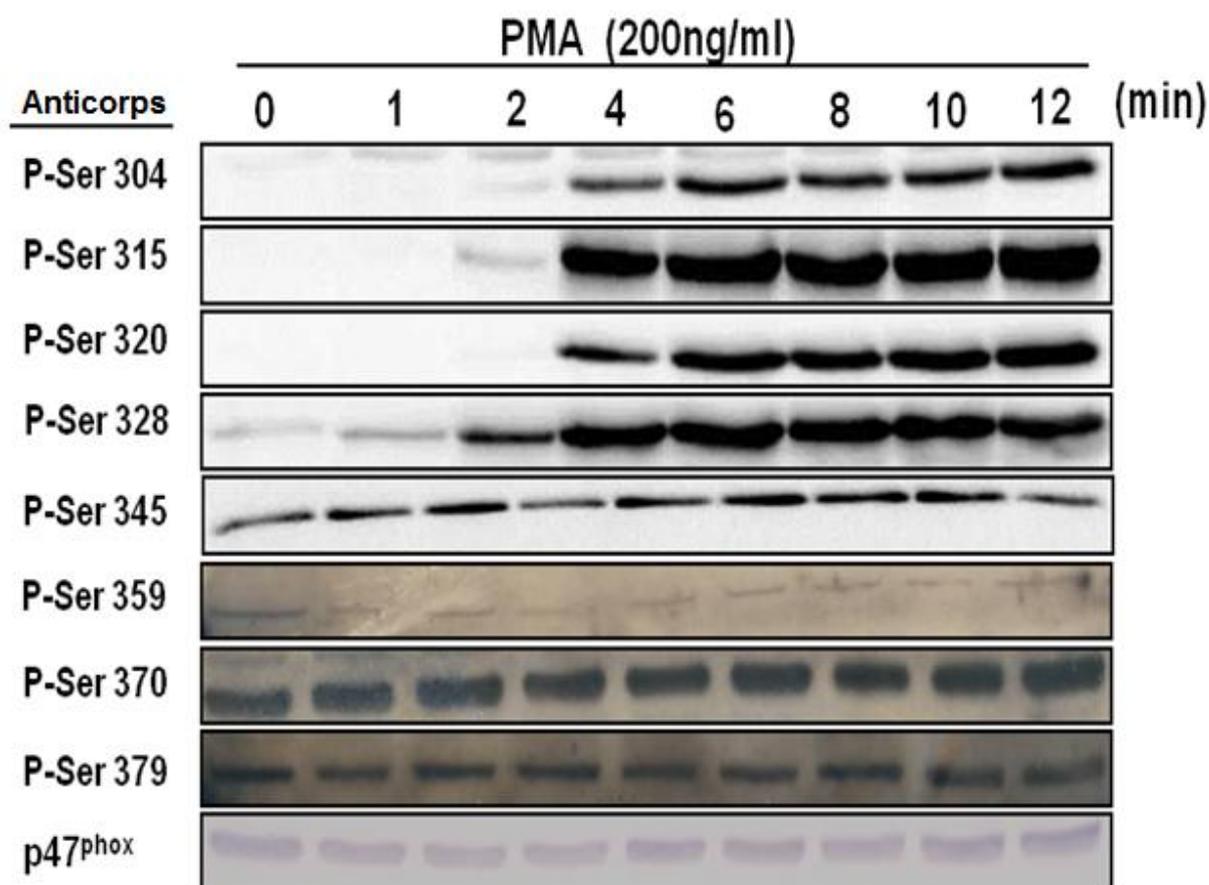


Figure 19. Cinétique de la phosphorylation de la p47phox induite par le PMA. Les neutrophiles humains (15×10^6 cellules/400ml) sont stimulés par 200 ng/ml de PMA durant les différents temps d'incubation. La stimulation est arrêtée par addition de 100 μ l de tampon Laemmli et dénaturation à 100°C. Les homogénats dénaturés sont soumis à une analyse par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphosérines indiqués.

La quantification de cette phosphorylation obtenue lors des différentes répétitions indique que cette phosphorylation apparaît après 2 min de stimulation puis augmente ou reste stable mais sans déphosphorylation comme dans la stimulation avec le fMLF (figure 20). Par contre, comme le fMLF, le PMA n'a pas induit une augmentation de la phosphorylation de la Ser345 et n'as pas affecté non plus la phosphorylation basale des Ser359, 370 et 379 (figure 19).

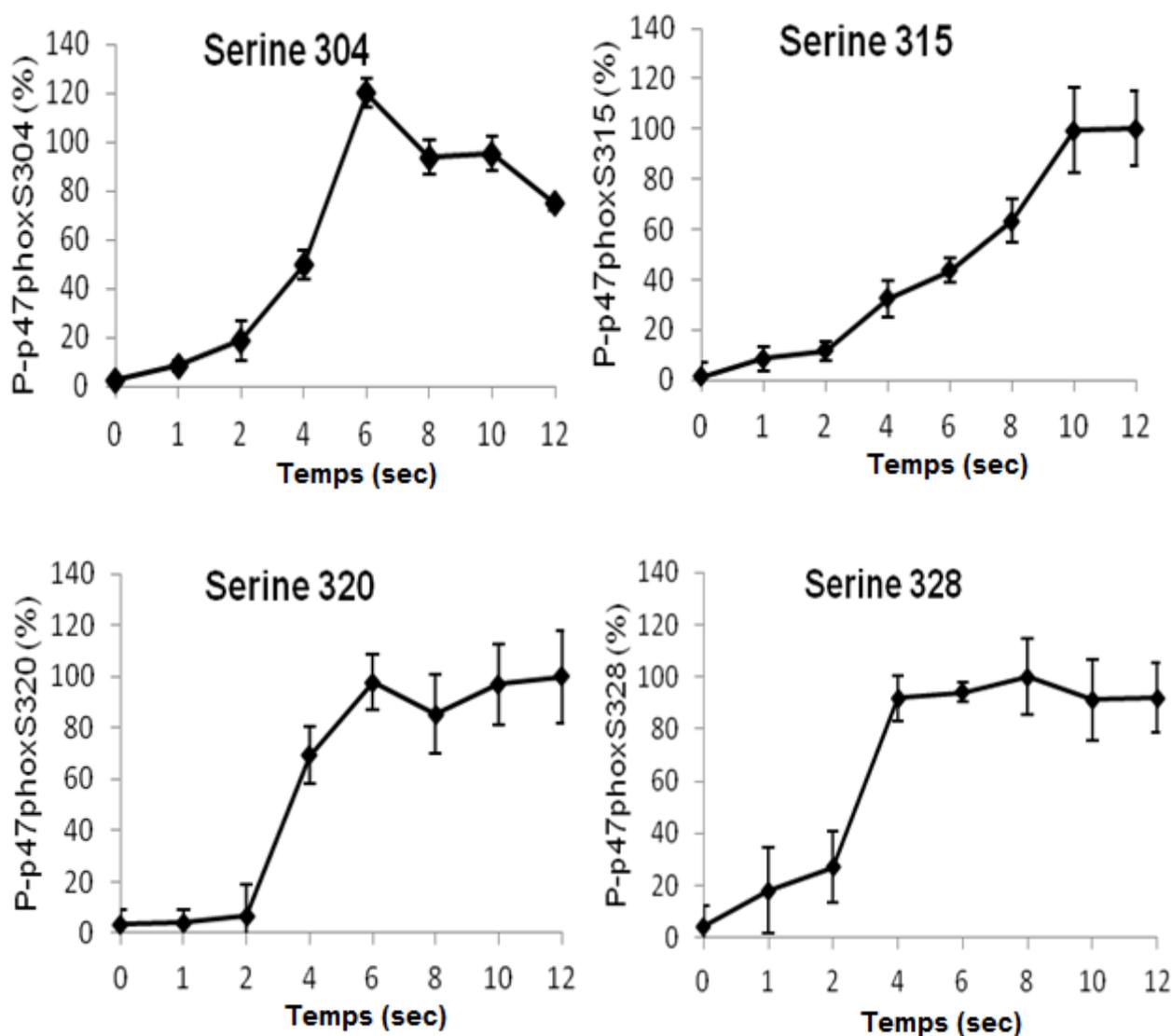


Figure 20. Quantification de la cinétique de la phosphorylation de la p47phox induite par le PMA. Les neutrophiles humains (15×10^6 cellules/400 μ l) sont stimulés par 200 ng/ml de PMA durant les différents temps d'incubation. La stimulation est arrêtée par addition de 100 μ l de tampon Laemmli et dénaturation à 100°C. Les homogénats dénaturés sont soumis à une analyse par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphosérines indiqués. La phosphorylation de la p47phox obtenue de 3 essais différents est quantifiée par densitométrie et corrigée par rapport à la quantité de la p47phox totale. Chaque point représente la moyenne de 3 essais indépendants \pm SEM, n=3.

La stimulation des neutrophiles par des concentrations croissantes de PMA a montré également que la phosphorylation des Ser304, 315, 320 et 328 est aussi dose-dépendante du PMA comme le montre clairement la figure 21.

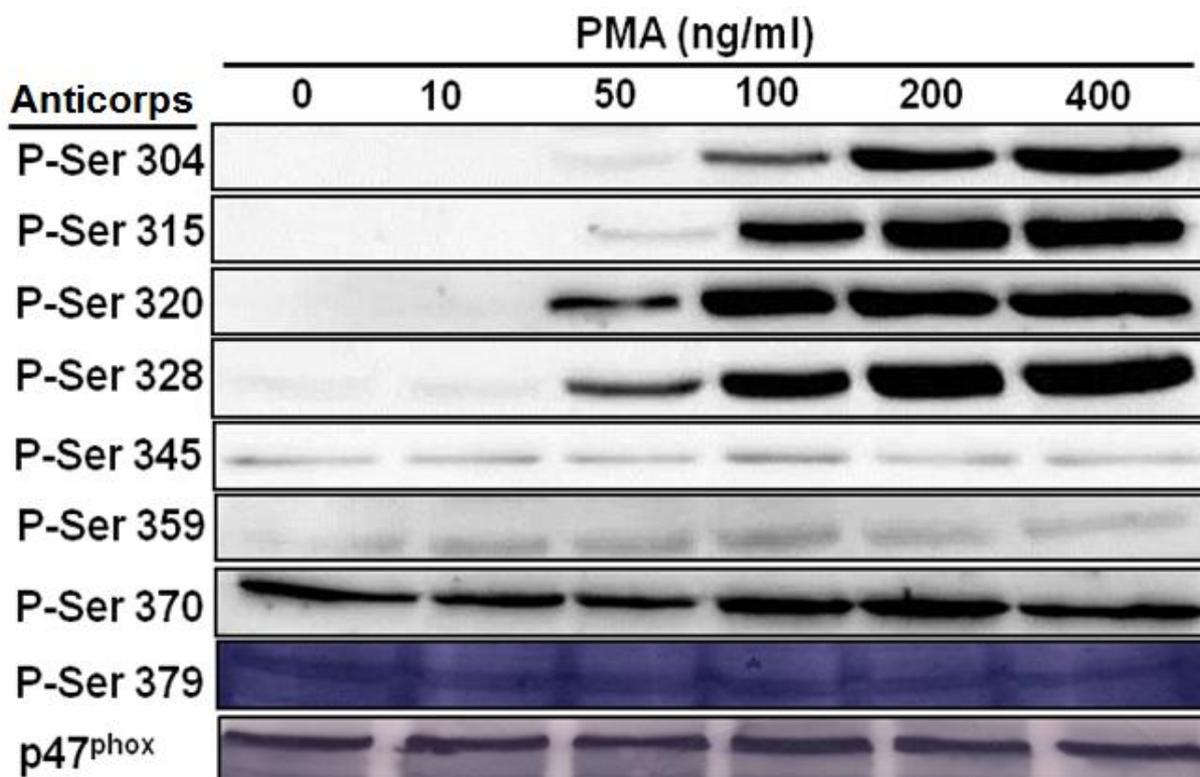


Figure 21. Effet dose du PMA sur la phosphorylation de la p47^{phox}. Les neutrophiles humains (15×10^6 cellules/400 μ l) sont stimulés par différentes concentrations du PMA durant 8 min. La stimulation est arrêtée par addition de 100 μ l de tampon Laemmli et dénaturation à 100°C. Les homogénats dénaturés sont soumis à une analyse SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphosérines indiqués ou l'anti-p47^{phox}.

Les phosphorylations des sérines 304, 315, 320 et 328 obtenues au bout de plusieurs essais ont été quantifiées pour montrer qu'elles sont décelées à partir de 50 ng/ml de PMA puis augmentent avec la concentration de celui-ci (figure 22). Alors qu'il n'était pas surprenant de constater que les différentes concentrations du PMA n'ont pas modifié la phosphorylation des Ser345, 359, 370 et 379 (figure 21).

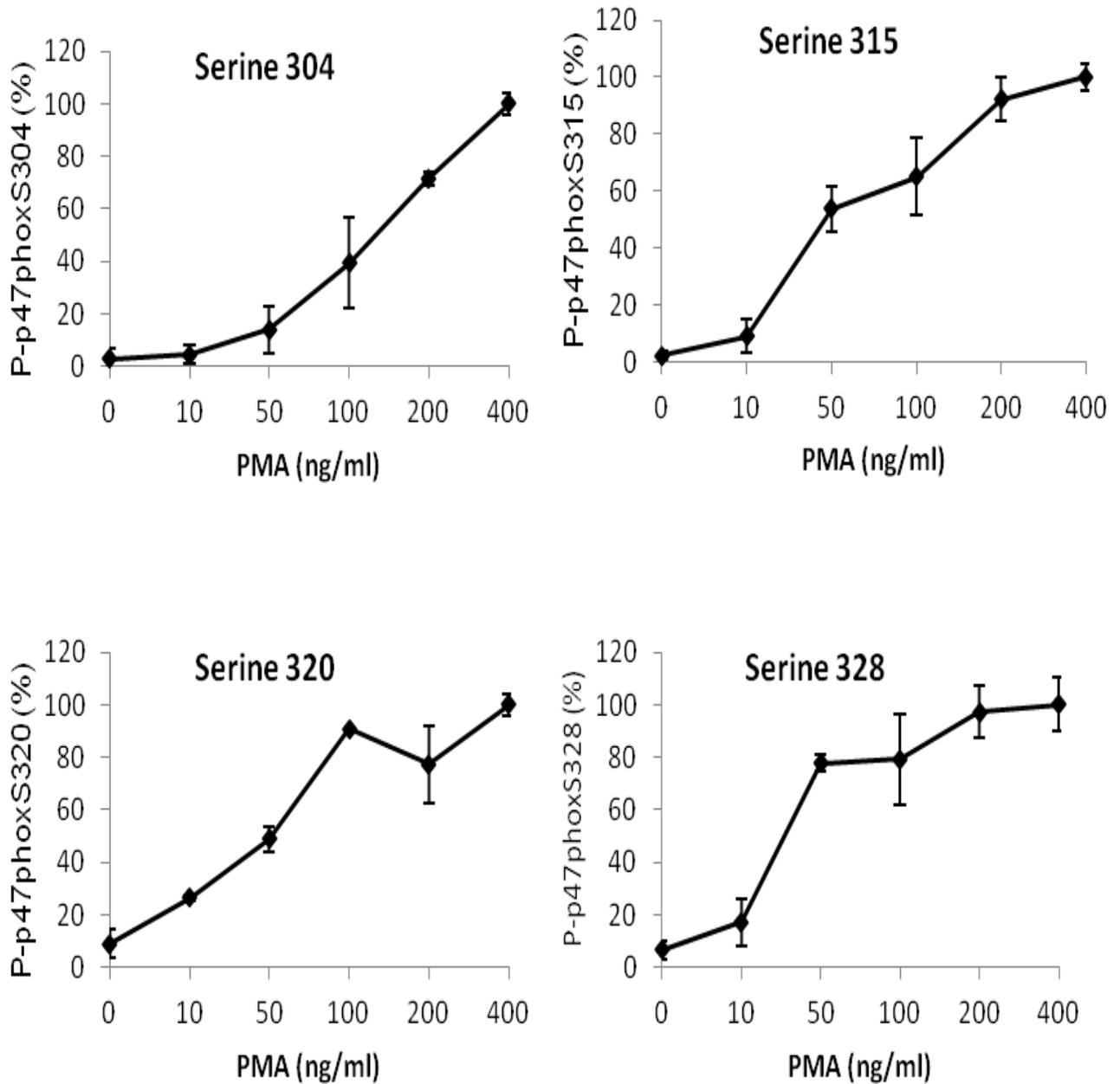
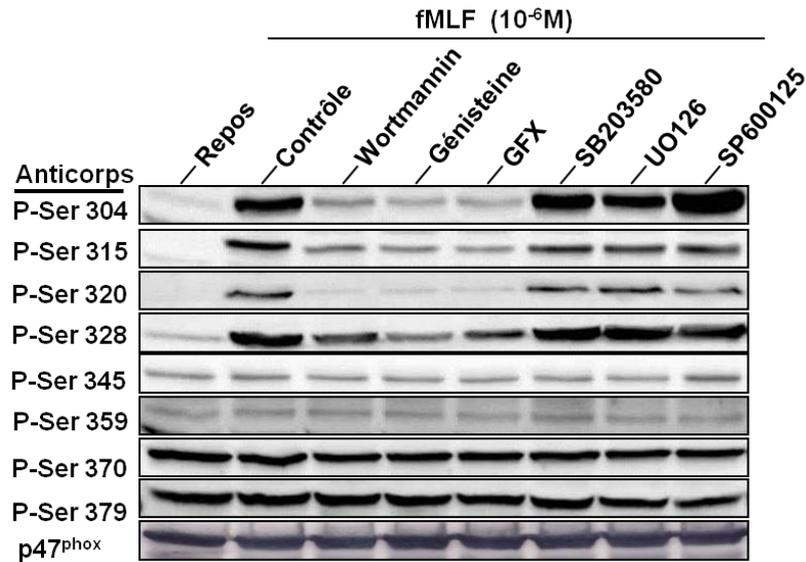


Figure 22. Quantification de la phosphorylation de la p47phox induite par différentes concentrations PMA. Les neutrophiles humains (15×10^6 cellules/400 μ l) sont stimulés par différentes concentrations du PMA durant 8 min. La stimulation est arrêtée par addition de 100 μ l de tampon Laemmli et dénaturation à 100°C. Les homogénats dénaturés sont soumis à une analyse par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphosérines indiqués. La phosphorylation de la p47phox obtenue de 3 essais différents est quantifiée par densitométrie et corrigée par rapport à la quantité de la p47phox totale. Chaque point représente la moyenne de 3 essais indépendants \pm SEM, n=3.

4. Effet des inhibiteurs de kinases sur la phosphorylation de la p47phox induite par le fMLF et le PMA

Afin de contribuer à l'identification des voies de signalisation impliquées dans la phosphorylation de la p47phox au sein du neutrophile stimulé par le fMLF, des inhibiteurs de certaines kinases ont été testés. La figure 23, montre que la phosphorylation des Ser304, 315, 320 et 328 est nettement réduite en présence du wortmannine (100 nM) inhibiteur des PI3kinases, de la génistéine (100 µM), inhibiteur des tyrosines kinases et du GF109203X (5 µM) inhibiteur des PKC. Par contre, le SB203580, le UO126 et le SP600125, inhibiteurs des p38MAPKinase, MEK1/2 et JNK respectivement, étaient sans effet significatif sur la phosphorylation de ces 4 sérines. Ces résultats permettent de suggérer que chacune des voies de la PI3kinases, des tyrosines kinases et des PKC seraient impliquées dans la signalisation induite par le fMLF qui conduit à la phosphorylation des Ser304, 315, 320 et 328 de la p47phox. Par contre, il n'était pas surprenant de constater que la phosphorylation des Ser345, 359, 370 et 379 n'étaient significativement affectées par aucun des inhibiteurs testés (figures 23 A).

A



B

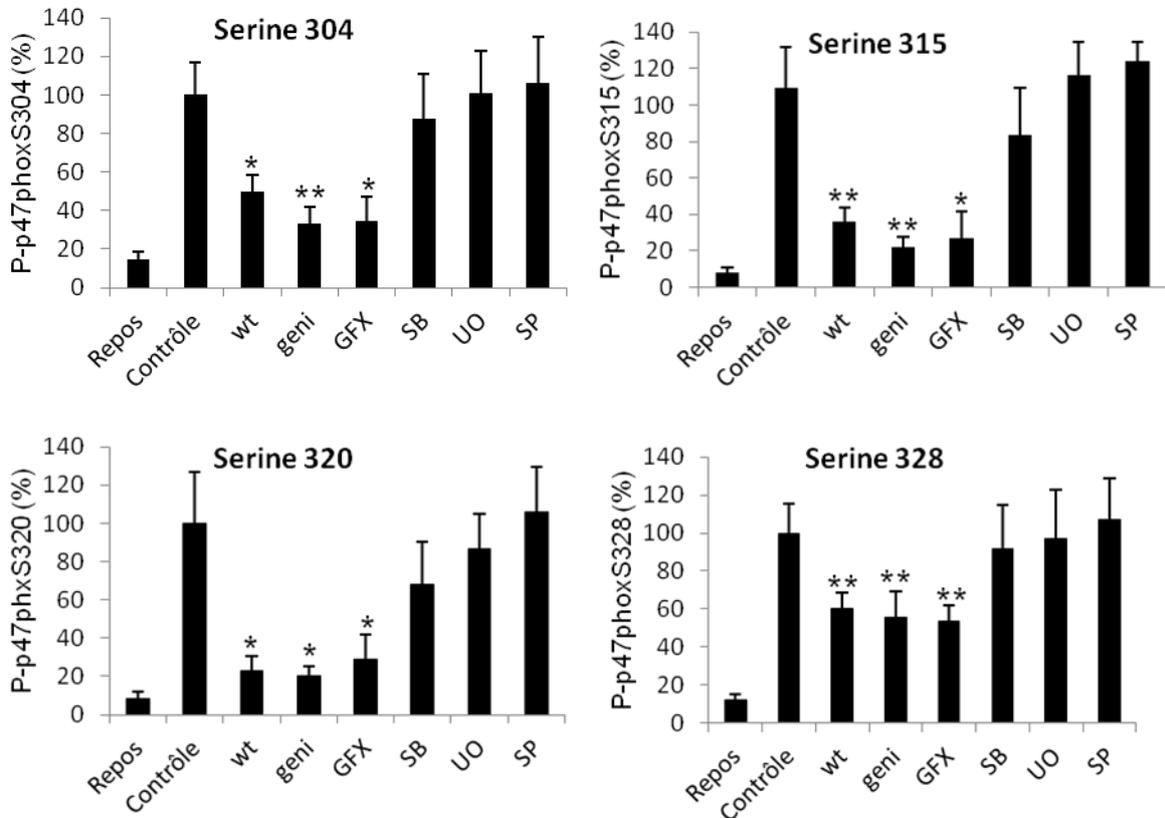


Figure 23. Effet des inhibiteurs de kinases sur la phosphorylation de la p47phox induite par le fMLF. (A) : Les neutrophiles humains (15×10^6 cellules/400 μ l) sont incubés pendant 20min à 37°C avec ou sans Wortmannin (100 nM), Génistéine (100 μ M) GF109203X (5 μ M), SB203580 (10 μ M), UO126 (10 μ M) ou SP600125 (50 μ M) puis stimulés par le fMLF (1 μ M) pendant 15 sec. La stimulation est arrêtée par addition de 100 μ l de tampon Laemmli et dénaturation à 100°C. Les homogénats dénaturés sont soumis à une analyse SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphosérines indiqués. (B) : La phosphorylation de la p47phox obtenue de 3 essais différents est quantifiée par densitométrie et corrigée par rapport à la quantité de la p47phox totale. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 essais indépendants \pm SEM, n=3. Control vs inhibiteur ; * p<0.05, **p<0.01 (teste t de Student).

L'effet des mêmes inhibiteurs a été également testé sur la phosphorylation de la p47phox induite par le PMA. La figure 25 montre que seul le GF109203X (5 μ M) était en mesure d'inhiber significativement la phosphorylation des Ser304, 315, 320 et 328 de la p47phox du neutrophile stimulé par le PMA. Ce résultat porte à croire que la PKC contrôlerait la phosphorylation des Ser304, 315, 320 et 328 de la p47phox induite par le PMA. La phosphorylation des autres sérines n'a été affectée par aucun des inhibiteurs testés (figure 24).

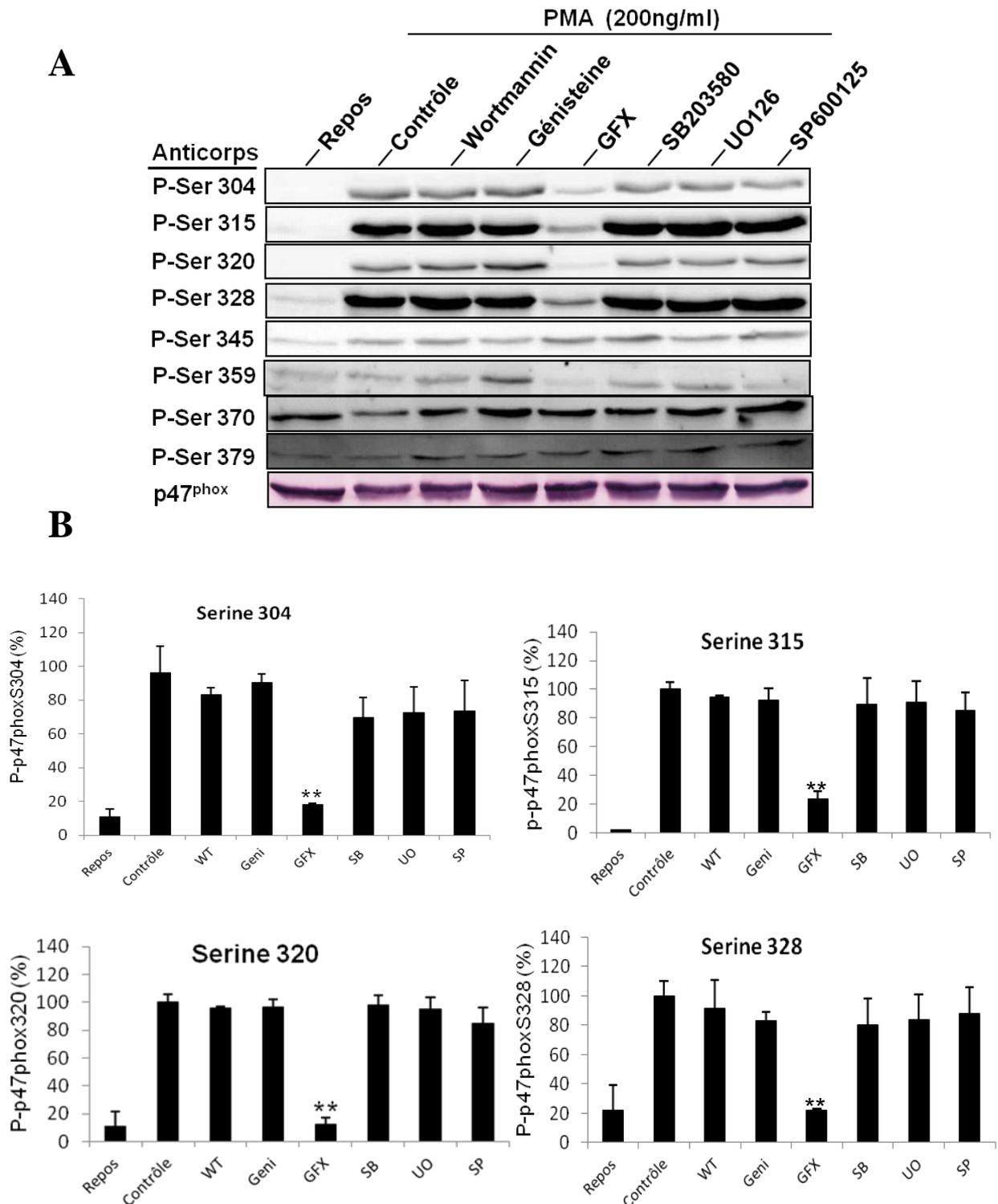


Figure 24. Effet des inhibiteurs de kinases sur la phosphorylation de la p47phox induite par le PMA. (A) : Les neutrophiles humains (15×10^6 cellules/400 μ l) sont incubés pendant 20min à 37°C avec ou sans Wortmannin (100 nM), Génistéine (100 μ M) GF109203X (5 μ M), SB203580 (10 μ M), UO126 (10 μ M) ou SP600125 (50 μ M) puis stimulés par le PMA (200 ng/ml) pendant 8min. La stimulation est arrêtée par addition de 100 μ l de tampon Laemli et dénaturation à 100°C. Les homogénats dénaturés sont soumis à une SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphosérines indiqués. (B) : La phosphorylation de la p47phox obtenue de 3 essais différents est quantifiée par densitométrie et corrigée par rapport à la quantité de la p47phox totale. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 essais indépendants \pm SEM, n=3. Control vs inhibiteur ; **p<0.01 (teste t de Student).

5. Localisation subcellulaire de la p47phox phosphorylée dans le neutrophile stimulés par le fMLF et le PMA

L'activation de la NADPH oxydase au sein du neutrophile stimulé implique la phosphorylation et la translocation de la p47phox du cytosol vers les granules et la membrane plasmique pour s'associer aux composants membranaires et activer le complexe (El Benna et al., 2009). Afin d'identifier les sérines phosphorylées dans ces fractions, les neutrophiles sont fractionnés après stimulation par le fMLF ou le PMA. Pour s'assurer que la translocation a bien eu lieu, il est important de contrôler la localisation de la p67phox, de la p47phox et de la p22phox dans les trois fractions subcellulaires préparées. En effet, comme le montre la figure 25, dans les neutrophile non stimulés (0 sec : au repos), la p47phox et la p67phox sont présentes dans le cytosol, alors que la p22phox, qui forme le cytochrome b558 est dans les membranes plasmatique et granulaires. Pendant la stimulation des neutrophiles, par le fMLF, la p67phox et la p47phox transloquent du cytosol vers les granules et les membranes, tandis que la p22phox reste dans les membranes des granules et des membranes plasmiques, donc pas dans le cytosol. Il était intéressant de constater que les Ser304, 315, 320, 328, 345, 359, 370 et 379 étaient phosphorylées sur la p47phox présente dans les fractions cytosoliques (figure 25).

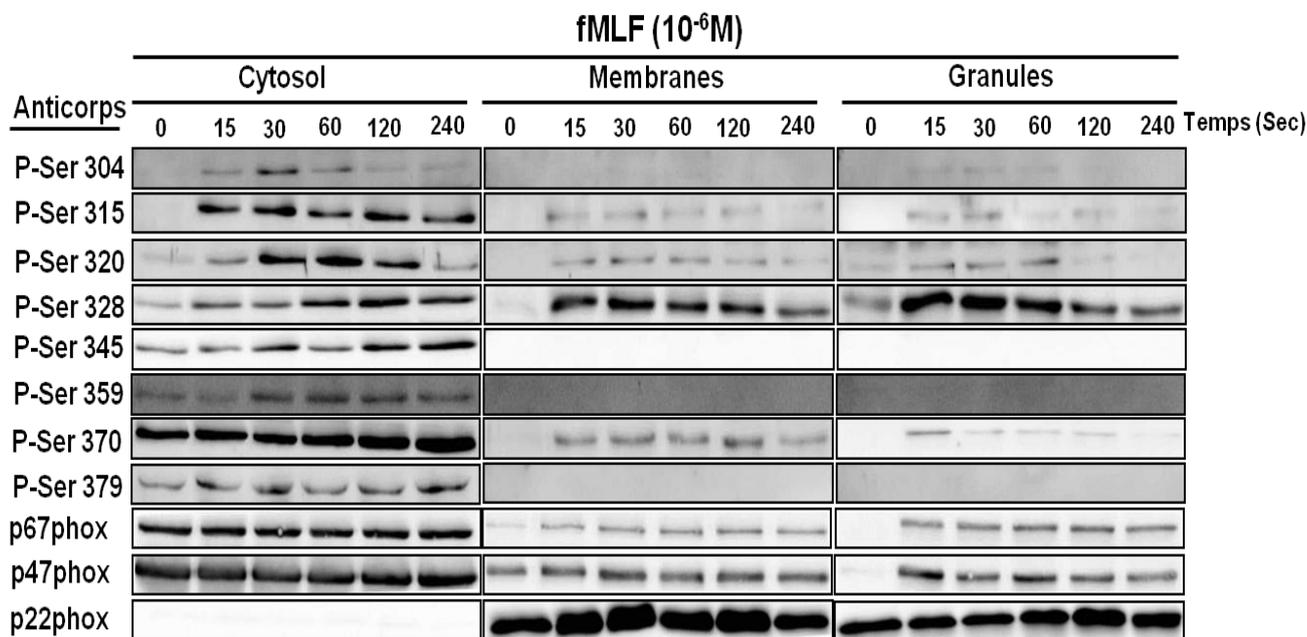


Figure 25. Localisation subcellulaire de la p47phox au sein du neutrophile stimulé par le fMLF. Les neutrophiles humains ($50 \times 10^6/ml$) sont stimulés par le fMLF durant différents temps d'incubation. La stimulation est arrêtée par addition de PBS glacé contenant du DFP et de la Calyculine A. Les cellules sont ensuite lysées et fractionnées à travers un gradient de sucrose. Les fractions cytosoliques, membranaires et particulaires sont dénaturées dans le tampon Laemmli et soumises à une séparation par SDS-PAGE et détection Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphoSer. Les résultats sont représentatifs d'au moins 3 essais différents.

Alors que dans les fractions membranaires se trouve la p47phox phosphorylée sur les Ser315, 320, 328 et 370. Dans les granules, seule la p47phox phosphorylée sur les Ser304, 315, 320, 328 et 370 peut être détectée.

Au sein des neutrophiles stimulés par le PMA, la p47phox phosphorylée sur les Ser304, 315, 320, 328, 345, 359, 370 et 379 se trouve dans la fraction cytosolique (Figure 26). Alors que celle phosphorylée sur les Ser304, 315, 320, 328, 345 et 370 se retrouve dans la fraction membranaire et particulaire (figure 26). La p47phox phosphorylée sur les Ser345 Ser359 et 379 n'est pas détectable dans les fractions membranaires et particulières.

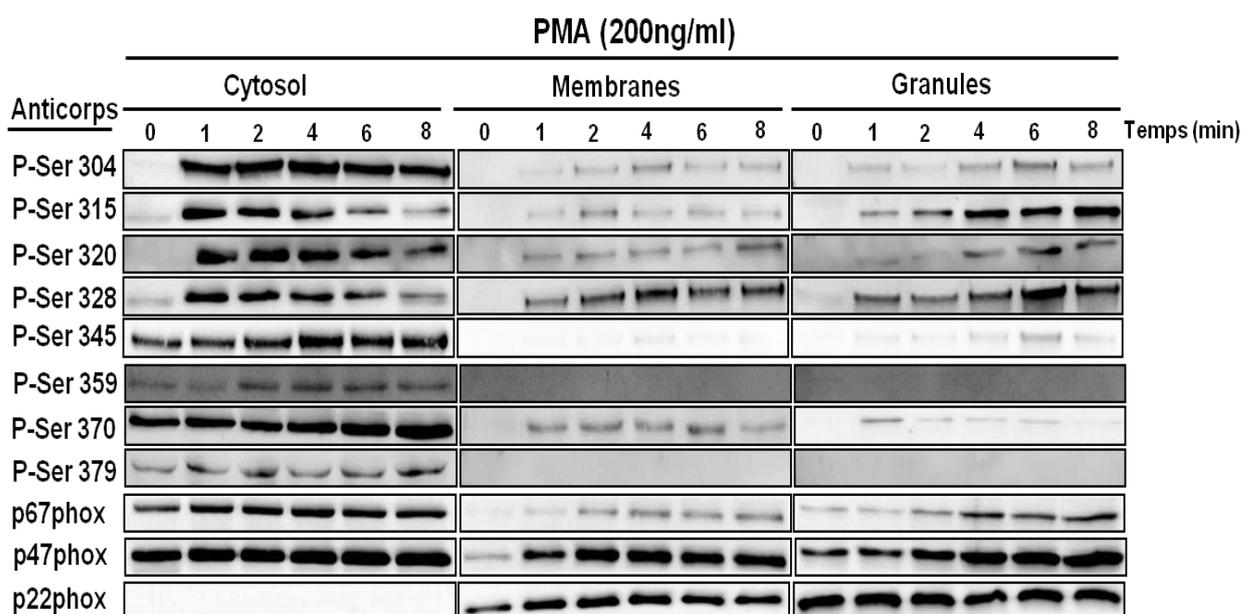


Figure 26. Localisation subcellulaire de la p47phox au sein du neutrophile stimulé par le PMA. Les neutrophiles humains ($50 \times 10^6/\text{ml}$) sont stimulés par le PMA durant différents temps d'incubation. La stimulation est arrêtée par addition de PBS glacé contenant du DFP et de la Calyculine A. Les cellules sont ensuite lysées et fractionnées à travers un gradient de sucrose. Les fractions cytosoliques, membranaires et particulières sont dénaturées dans le Laemmli et soumises à une analyse par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-phosphoSer. Les résultats sont représentatifs d'au moins 3 essais différents.

6. Cinétique d'expression de la p47phox et de la production de l'anion superoxyde au cours de la différenciation des HL60

L'analyse des résultats apportés par l'étude de la phosphorylation de la p47phox au sein du neutrophile stimulé par le fMLF ou le PMA suggère que les Ser359, 370 et 379 pourraient présenter une phosphorylation basale (en l'absence de stimulation). Ce qui est encore plus surprenant est que cette phosphorylation n'est affectée par aucun stimulants (fMLF ou PMA) ni inhibiteurs utilisés. La possibilité que ce résultat soit à un artefact dû à un

défaut de la spécificité de l'anticorps peut être écartée, car les antiSer359, 370 et 379 ne se lient pas à la p47phox non phosphorylée (figure 13). Nous avons alors supposé qu'il serait possible que ces sérines soient phosphorylées durant la maturation et la différenciation du neutrophile et puisque cette phosphorylation reste constante, elle pourrait être nécessaire à l'une des étapes d'activation du complexe NADPH oxydase ou à la stabilité de la p47phox elle-même au sein du complexe cytosolique. Afin de vérifier cette possibilité, des cellules HL60 sont mises en culture pour induire leur différenciation en neutrophiles. L'induction de la différenciation est réalisée par addition de DMSO 1,25% comme décrit précédemment. Un nombre suffisant de cellules est alors prélevé avant l'addition du DMSO puis toutes les 24h durant les 6 jours qui suivent l'induction. Ces cellules prélevées sont analysées pour contrôler l'expression de la p47phox ainsi que la production de l'anion superoxyde qui traduit la fonctionnalité du système NADPH oxydase au sein de ces cellules encours de différenciation. La figure 27A montre clairement que l'expression de la p47phox augmente au sein des HL60 durant les différents temps de leur différenciation. En effet, il est possible de déceler une augmentation de la quantité de p47phox exprimée dès le premier jour qui suit l'addition du DMSO, celle-ci se poursuit ensuite jusqu'au 6^{ème} jour où les cellules sont sensées avoir achevé leur différenciation (Colins, 1987). Les résultats obtenus montrent également que les cellules stimulées par le PMA commencent à produire de l'anion superoxyde d'une manière significativement plus importante par rapport au contrôle à partir du 2^{ème} jour seulement (figure 27B). La quantité du superoxyde produite par ces cellules stimulées continue à augmenter pour atteindre le maximum au bout du 5^{ème} jour de différenciation puis diminue de près de 30% au 6^{ème} jour. Alors que les cellules stimulées par le fMLF produisent une quantité de superoxyde significativement importante à partir du 3^{ème} jour, mais qui continue à augmenter jusqu'au dernier jour de différenciation.

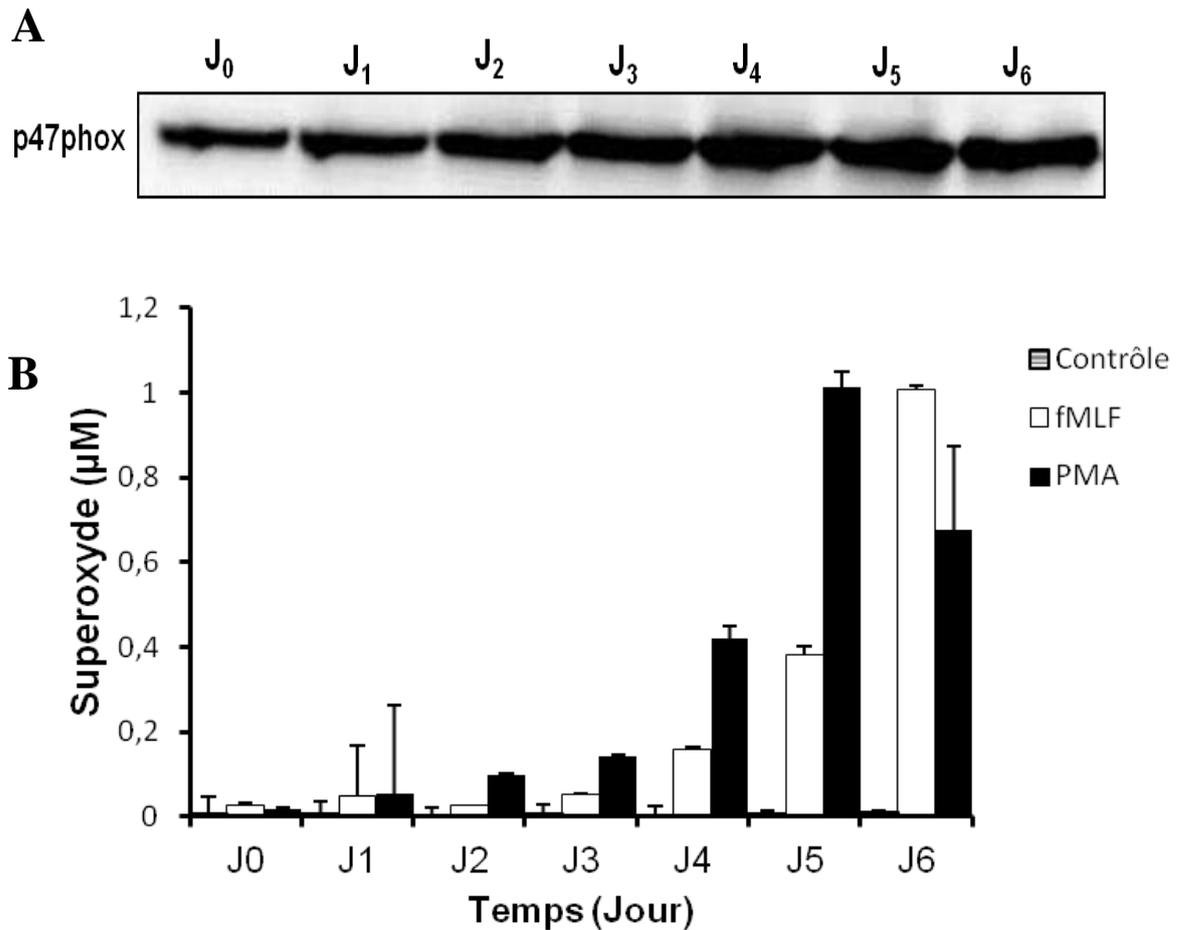


Figure 27. Cinétique d'expression de la p47phox et de la production de l'anion superoxyde au cours de la différenciation des HL60. La différenciation des HL60 en neutrophiles est induite par addition de 1.25% de DMSO, les cellules sont ensuite prélevées toutes les 24h après l'induction durant 6 jours. (A) : Les cellules prélevées ($15 \times 10^6/400\mu\text{l}$) sont stimulées par le fMLF (10^{-6}M) pendant 15 sec ou le PMA (200ng/ml) durant 8 min. La stimulation est arrêtée par addition de 100 μl de le tampon Laemmli et dénaturation à 100°C . Les homogénats cellulaires sont alors analysés par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant l'anticorps anti-p47phox. Les résultats sont représentatifs de deux essais indépendants. (B) : Les cellules (1×10^6) sont incubées à 37°C en présence de 2 mg/ml de cytochrome C pendant 20 min avant de les stimuler avec le fMLF (10^{-6}M) ou le PMA (200 ng/ml) et la production de l'anion superoxyde est mesurée par réduction du cytochrome c à 550 nm pendant 30 min. Chaque histogramme représente la moyenne de deux essais indépendants \pm SEM (n=2).

7. Cinétique de phosphorylation de la p47phox au cours de la différenciation des HL60

La stimulation des cellules HL60 en cours de différenciation par le fMLF ou le PMA induit également la phosphorylation de la p47phox sur les Ser304, 315, 320 et 328 (figure 28). La phosphorylation de ces résidus devient plus importante à partir du 3^{ème} jour de différenciation puis reste stable jusqu'au 6^{ème} jour qui est en corrélation avec la cinétique de production du superoxyde par ces cellules. Comme au sein des neutrophiles, le fMLF et le

PMA n'ont pas affecté la phosphorylation de la p47phox sur la Ser345 (figure 28). L'augmentation du signal observée à travers les 6 jours de différenciation peut être attribuée à l'augmentation de l'expression de la p47phox. La phosphorylation de la p47phox sur les Ser359 et 370 n'a pu être observée qu'à partir du 3^{ème} jour de différenciation, après quoi le signal augmente jusqu'au dernier jour (figure 28). De plus, comme chez le neutrophile, la stimulation par le fMLF ou le PMA n'a pas modifié cette phosphorylation. Par contre, il est possible de constater que la p47phox est phosphorylée sur la Ser379 dès le premier jour de différenciation. Comme pour les Ser359 et 370, la stimulation des cellules par le fMLF ou le PMA ne change pas la phosphorylation de la ser379.

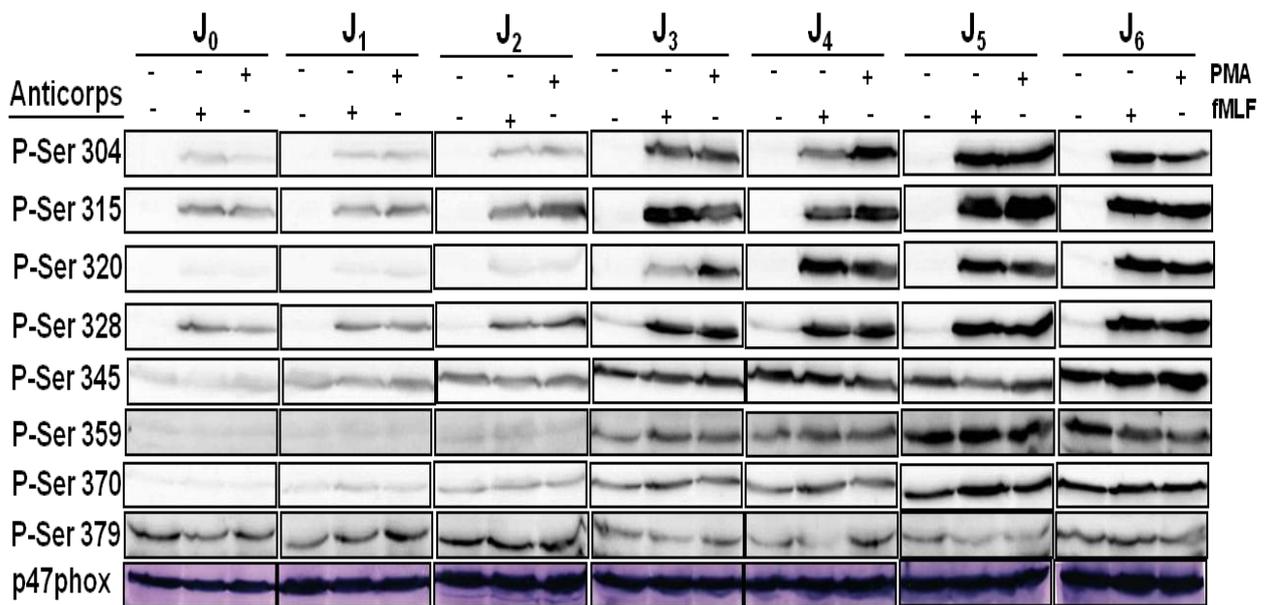


Figure 28. Cinétique de phosphorylation de la p47phox au cours de la différenciation des HL60. La différenciation des HL60 en neutrophiles est induite par addition de 1.25% de DMSO, les cellules sont ensuite prélevées toutes les 24h après l'induction durant 6 jours. Les cellules prélevées ($15 \times 10^6/400\mu\text{l}$) sont stimulées par le fMLF (10^{-6}M) pendant 15 sec ou le PMA (200 ng/ml) durant 8 min. La stimulation est arrêtée par addition de 100 μl de le tampon Laemmli et dénaturation à 100°C. Les homogénats cellulaires sont alors analysés par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps antiphospho-sérine développés ou l'anti-p47phox. Les résultats sont représentatifs de deux essais indépendants.

8. Etude de l'activité NADPH oxydase au sein des lymphocytes B transformés par l'EBV

La NOX2 est principalement exprimée dans les phagocytes, tels que les neutrophiles, les monocytes/macrophages, les éosinophiles ainsi que dans les cellules dendritiques (Babior, 1992). Les lymphocytes B circulants n'expriment pas de NOX2, cependant la transformation des lymphocytes B par l'EBV induit l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase mais qui reste plus faible par rapport aux phagocytes (Hancock et al., 1989). Etant donné que les neutrophiles ont une durée de vie très courte et qu'il n'est pas possible de les transfecter avec les différents composants de la NOX2, les lymphocytes B transformés à l'EBV constituent un modèle très pratique pour l'étude de la NADPH oxydase notamment les lymphocytes B isolés de patients CGD qui sont utilisés pour la reconstitution du système NADPH oxydase et l'étude de la phosphorylation de la p47phox (Chanock et al., 1992 ; Maly et al., 1993). Cependant, jusque là, dans la plupart des études, la NOX2 est activée par le PMA, activateur pharmacologique des PKC (Chanock et al., 1992). Le rôle de la p47phox dans l'activation de la NOX2 activée dans des conditions plus physiologiques telles que l'activation via des récepteurs membranaires reste à explorer. Dans cette étude nous avons utilisé les lymphocytes B transformés isolés de volontaires sains et de patients CGD stimulés par la pansorbine (protéine A dérivée des *S.aureus* inactivées) qui se lie aux IgG de surface des lymphocytes B, pour étudier le rôle des phosphorylations spécifiques de la p47phox sur certains de ses résidus sérine dans l'activation du système NADPH oxydase.

8. 1. Production des ROS par les lymphocytes B transformés par l'EBV

L'activation du système NADPH oxydase et la production des ROS au sein du lymphocyte B transformé par l'EBV a été étudiée en stimulant les cellules par différentes concentrations de la pansorbine ou du PMA. La production des ROS par ces cellules est alors mesurée par chimioluminescence amplifiée par le luminol en présence de la HRPO (les lymphocytes B étant dépourvus de MPO). Les résultats obtenus montrent que la pansorbine (0.25-4 mg/ml) induit une nette augmentation de la production des ROS par les lymphocytes B transformés à l'EBV (figure 29A). Cette production était dose dépendante avec un maximum (pique = 1.3×10^6 cpm) induit par une concentration de 2 mg/ml de pansorbine. La production des ROS induite par la pansorbine a lieu après un temps de latence qui était inversement proportionnel à la concentration de la pansorbine appliquée. Le PMA présente également un effet stimulateur dose-dépendant avec une réponse maximale (pique = 8×10^6

cpm) obtenue à 400 ng/ml de PMA (figure 29B). Après un temps de latence de 2 min, le PMA induit une augmentation progressive de la production des ROS jusqu'à atteindre un plateau qui est proportionnel à la concentration du PMA. Il est donc clair que la pansorbine induit l'activation du complexe NADPH oxydase dans des lymphocytes B transformés à l'EBV.

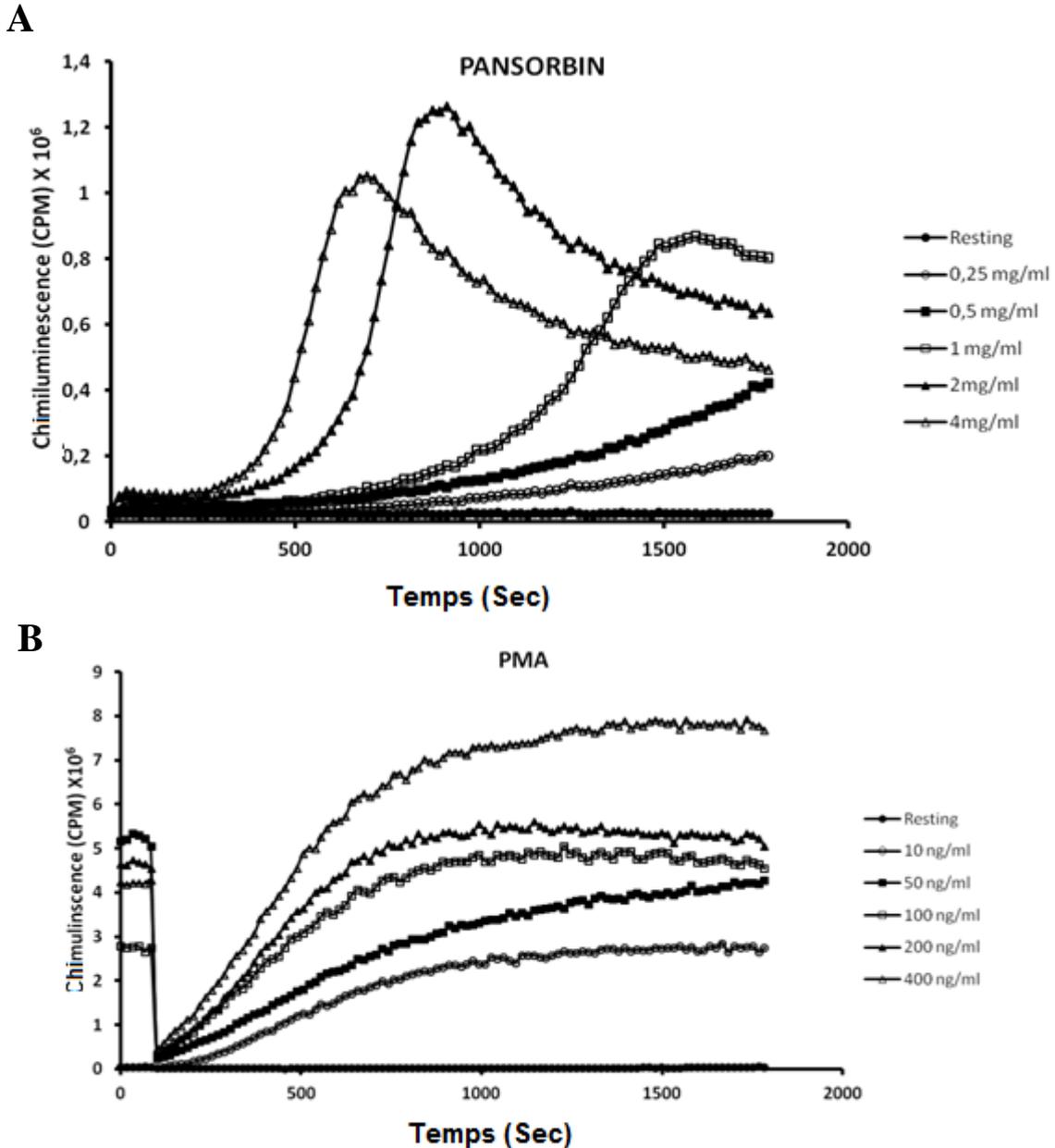


Figure 29. Production des ROS par les lymphocytes B transformés à l'EBV stimulés par la pansorbine ou le PMA. Les cellules (2×10^6) sont préincubées dans 500 μ l de HBSS contenant 10 μ M de luminol et 10 U de HRPO à 37°C pendant 10 min. la pansorbine (A) ou le PMA (B) sont ajoutés et la chimiluminescence du luminol amplifiée par l'HRPO est mesurée durant 30 min. Les résultats sont représentatifs de 3 essais indépendants.

8. 2. Effet de l'inhibition des PKC et de la PI3 kinase sur la production des ROS par les lymphocytes B transformés par l'EBV

Il est connu que l'activation de la NADPH oxydase par le PMA implique l'activation des PKC qui se traduit entre autre par la phosphorylation de la p47phox (El Benna et al., 2009). Nous avons alors voulu vérifier si la production des ROS par les lymphocytes B transformés induite par la pansorbine impliquait également la voie des PKC. Pour cela, les cellules ont été traitées par l'inhibiteur des PKC, GF109203X et la production des ROS a été mesurée. Les résultats montrent que le GF109203X utilisé à une concentration (5 μ M) connue pour inhiber les PKCs réduit de près de 60% la production des ROS des lymphocytes B transformés stimulés par la pansorbine (figure 30). La wortmannine, inhibiteur des PI3kinases inhibe également mais bien plus faiblement (près de 20%) la production des ROS par les lymphocytes B transformés stimulés par la pansorbine. Ces résultats permettent de suggérer que l'activation de la NADPH oxydase par la pansorbine au sein des lymphocytes B transformés à l'EBV stimulés pourrait impliquer au moins la voie des PKC et de la PI3kinase.

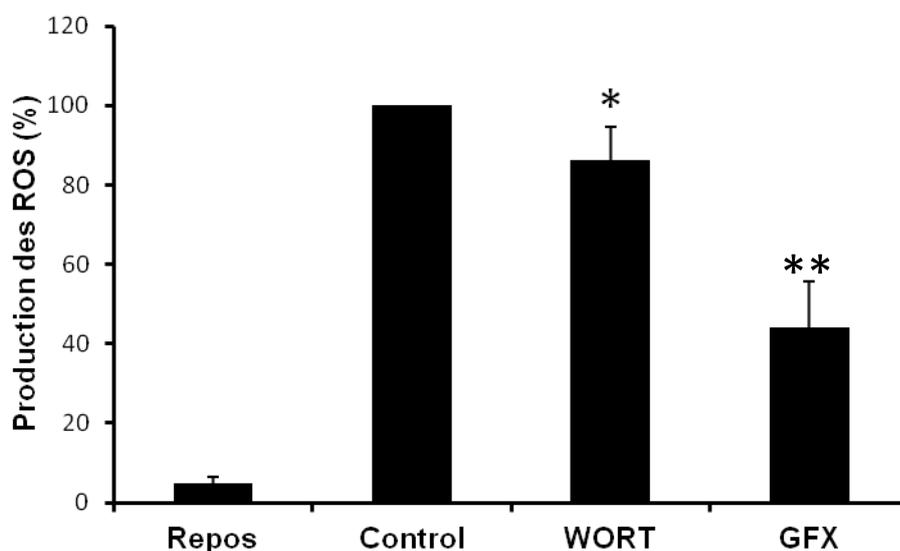


Figure 30. Effet du GF109203X et de la Wortmannin sur la production des ROS par les lymphocytes B transformés à l'EBV et stimulés par la pansorbine. Les cellules (4×10^6 cellules/ml) sont préincubées à 37°C pendant 20 min en présence ou en l'absence du GF109203X (5 μ M) ou de la Wortmannine (100 nM) puis stimulées par la pansorbine (2 mg/ml) et la chimioluminescence du luminol est mesurée en présence de l'HRPO. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM (n=3). Control vs Wortmannin ou GFX ; * p<0.05, **p<0.01 (teste t de Student).

8. 3. Effet de la pansorbine sur la phosphorylation des la p47phox au sein des lymphocytes B transformés à l'EBV

La stimulation des lymphocytes B transformés par le PMA est accompagnée de la phosphorylation de la p47phox sur les résidus sérine 304-379 de sa partie C-terminale (El Benna et al., 2009). Nous avons vérifié si la stimulation des lymphocytes B transformés par la pansorbine induirait la phosphorylation de la p47phox et ce en utilisant les anticorps anti-phosphoSer développés. Il était intéressant de constater que la pansorbine (2 mg/ml) induit la phosphorylation transitoire de la p47phox sur chacun des résidus Ser304, 315, 320, 328 et 345 (figure 31A). Il est à noter que la phosphorylation de la p47phox induite par la pansorbine précède la production des ROS. En effet, la phosphorylation de la p47phox apparaît après 30 sec de latence, alors que la production des ROS commence au bout de 6 min de latence (figure 31A). La stimulation de ces cellules par le PMA induit également la phosphorylation de la p47phox sur les mêmes résidus sérines (figure 31B). Après un temps de latence de 2 min, la phosphorylation induite par le PMA était dose-dépendante puis atteint un plateau et ce, d'une manière corrélée à la production des ROS (figure 31B). Ces résultats suggèrent donc que la pansorbine induit la phosphorylation de la p47phox, mais plus faiblement comparée au PMA.

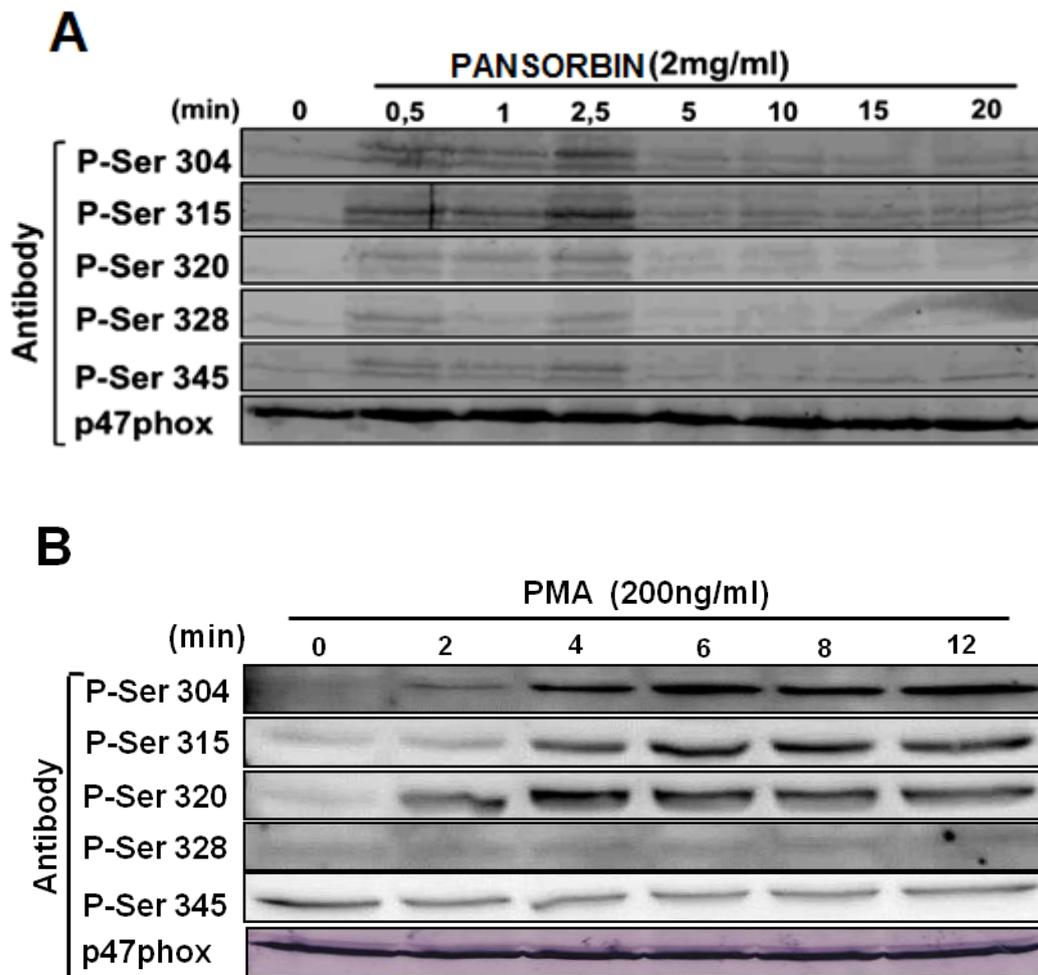


Figure 31. Phosphorylation de la p47phox induite par la pansorbine et le PMA. Les cellules (15×10^6) préincubées pendant 10 min à 37°C avant de les stimuler avec 2 mg/ml de pansorbine (A) ou de 200 ng/ml PMA (B) durant différents temps d'incubations. La stimulation est arrêtée par addition de tampon Laemmli concentré 5 fois (5X) suivi de dénaturation à 100°C pendant 2 min. Les homogénats obtenus sont soumis à une analyse par SDS-PAGE et Western blot en utilisant différents anticorps anti-phospho-p47phox (anti-phosphoSer304, anti-phosphoSer315, anti-phosphoSer320, anti-phosphoSer328 et anti-phosphoSer345) et l'anti-p47phox. Les résultats sont représentatifs de 3 essais indépendants.

8. 4. La phosphorylation de la p47phox est nécessaire pour l'activation de la NADPH oxydase par la pansorbine au sein des lymphocytes B transformés à l'EBV

Pour vérifier si la phosphorylation de la p47phox est requise pour l'activation de la NADPH oxydase induite par la pansorbine, nous avons utilisé des lymphocytes B déficients en p47phox isolés de patients CGD. Ces cellules ont été alors transfectées avec un plasmide codant une p47phox sauvage ou mutante dans laquelle tous les résidus sérines (303-379) ont été mutés en alanine (résidu non phosphorylable) Ser(303-379)A. Les résultats obtenus montrent que la transfection avec la p47phox sauvage puis la stimulation par la pansorbine ou

le PMA conduit à l'activation de la NOX2 et à la production de ROS (figure 32). Par contre, la transfection des lymphocytes B déficients en p47phox avec le plasmide codant pour la p47phox mutante Ser(303-379)A n'a pas pu rétablir l'activité NADPH oxydase et la production des ROS en présence de la pansorbine ou du PMA (figure 32). Il semblerait alors que la phosphorylation de la p47phox sur ces résidus sérines serait nécessaire à l'activation de NOX2 induite par la pansorbine ou le PMA dans les lymphocytes B transformés à l'EBV.

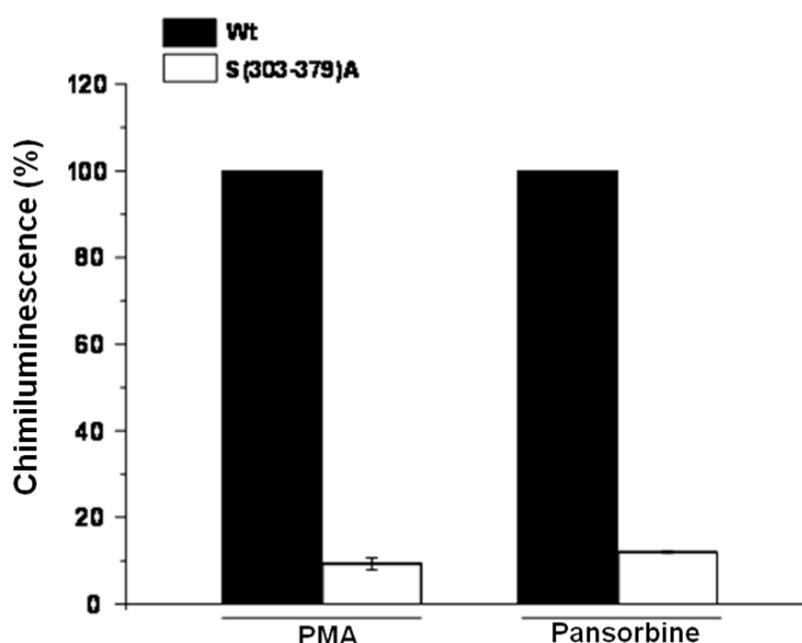


Figure 32. Production des ROS dans les lymphocytes B transformés à l'EBV exprimant la p47phox sauvage (WT) ou mutante S(303-379)A. Les cellules déficientes en p47phox sont transfectées avec le plasmide codant la p47phox WT ou mutante. La production des ROS induite par la pansorbine (2 mg/ml) ou le PMA (200 ng/ml) est mesurée par chimioluminescence amplifiée par le luminol en présence de l'HRPO. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM (n=3).

9. Etude de la phosphorylation de la p47phox *in vivo* dans un modèle de pleurésie expérimentale chez le rat

La phosphorylation de la p47phox dans les neutrophiles activés *in vitro* a été largement étudiée. Par contre, sa phosphorylation qui survient à la suite de l'activation du neutrophile au cours d'une réponse inflammatoire *in vivo* n'a été peu ou pas investiguée. Afin de contribuer à cette étude *in vivo*, nous avons eu recours à la pleurésie comme modèle d'inflammation expérimentale, que nous avons induite chez le rat par injection de 0.2 ml de λ -

carrageenane 1%. Après différentes périodes, les neutrophiles ayant migré vers la cavité pleurale de chaque rat sont récupérés après sacrifice de l'animal puis soumis à une analyse en SDS-PAGE et Western blot en utilisant les anticorps anti-phosphoSer développés. Des neutrophiles isolés du sang de rats non traités sont utilisés comme un contrôle de cellules au repos (non stimulées). Les résultats obtenus montrent que l'injection intrapleurale de la λ -carrageenane induit le recrutement des neutrophiles vers la cavité pleurale des rats (figure 33). Le nombre de neutrophiles attirés reste faible jusqu'à deux heures de temps après l'injection de la carrageenane où le nombre de cellules récupérées par animal ne dépasse pas 6×10^6 qui est pratiquement le même nombre obtenu avec les rats du groupe contrôle. Mais à la 3^{ème} heure le nombre de cellules passe à $31 \pm 7 \times 10^6$ pour ensuite atteindre son maximum au bout de 4 heures ($89 \pm 2 \times 10^6$ cellules).

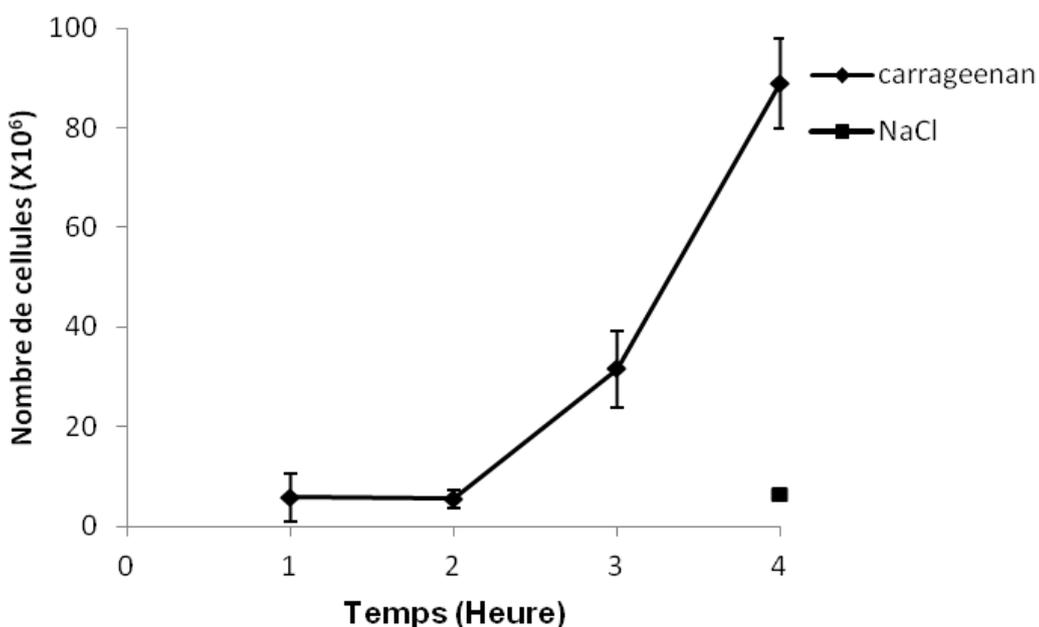


Figure 33. Nombre de neutrophiles récupérés de la cavité pleurale de rats atteints de pleurésie. Les rats reçoivent l'injection intrapleurale de 0.2 ml de λ -carrageenane ou de NaCl 0,9% stérile et le nombre de neutrophiles récupérés après les différentes périodes est déterminé par comptage des cellules sur une lame de Malassez. Chaque point représente la moyenne \pm SEM (n=6).

Le nombre de neutrophiles récupérés 1h après l'injection ainsi que ceux récupérés des rats du groupe contrôle est insuffisant pour être soumis à une analyse en SDS-PAGE et Western blot. Les neutrophiles isolés du sang des rats non traités sont utilisés comme un contrôle de cellules au repos (non stimulées). La figure 34 montre que lorsque la carrageenane est injectée dans la cavité pleurale des animaux, les neutrophiles recrutés présentent une p47phox phosphorylée sur chacune des sérines 304, 315, 320, 328, 345, 370 et 379 (figure

34). La phosphorylation des sérines 304, 320 et 328 est plus prononcée au bout de 3h après l'injection de la carrageenane. Alors que la sérine 315 est déjà phosphorylée au bout de 2h seulement et le reste même après 4h de temps après l'injection. Comme pour les neutrophiles humains, les sérines 345 et 370 présentent une phosphorylation basale au repos (figure 34). Alors que la sérine 379 ne montre pas de phosphorylation nette au repos comme dans les neutrophiles humains. Ces résultats montrent que ces anticorps sont capables de détecter la phosphorylation de la p47^{phox} sur ses différents résidus sérines dans le neutrophile activé *in vivo* chez le rat.

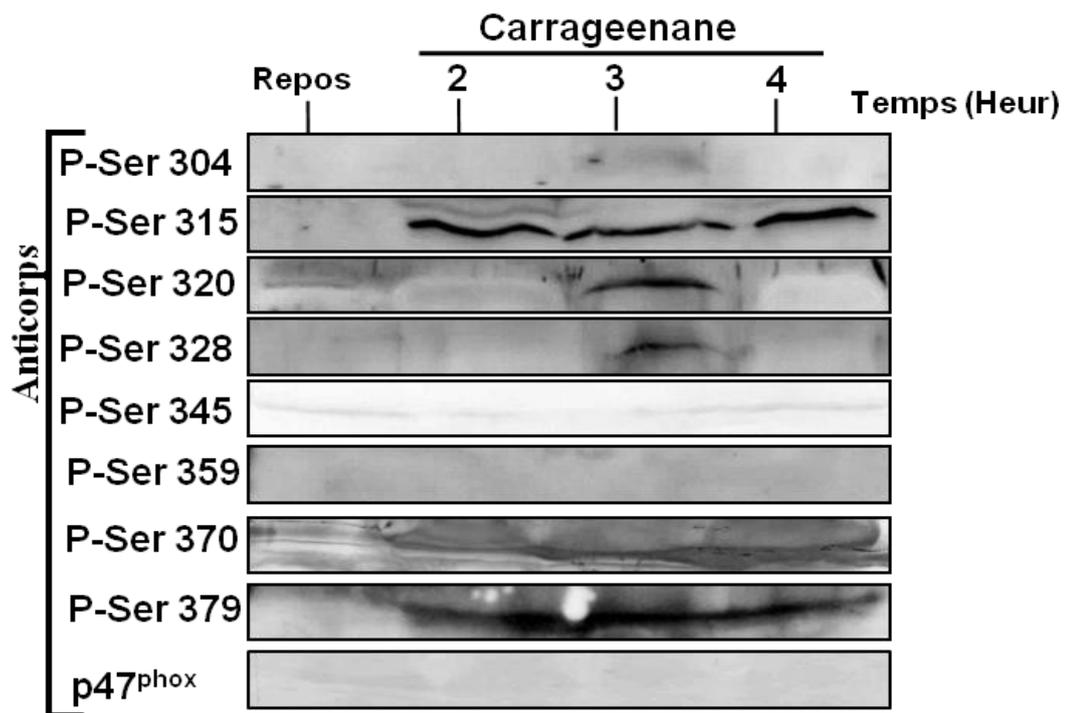


Figure 34. Cinétique de phosphorylation de la p47^{phox} dans les neutrophiles récupérés de la cavité pleurale de rats atteints de pleurésie. Les neutrophiles récupérés à différents temps après l'injection de la carrageenane, sont comptés sur une lame de Malassez puis dénaturés à 100°C dans du tampon Laemmli pendant 2 min. Le panel « repos » représente des neutrophiles isolés du sang de rats non traités. Ceux-ci sont incubés à 37°C dans du HBSS avant de les dénaturer dans du tampon Laemmli 5X. Les homogénats de neutrophiles sont analysés par SDS-PAGE et Western blot en utilisant les anticorps anti-phosphoSer développés et l'anti-p47^{phox}. Les résultats sont représentatifs d'au moins 3 essais indépendants.

Discussion et Conclusion

IV. DISCUSSION

Le mécanisme moléculaire de l'activation de la NADPH oxydase NOX2 a fait l'objet de nombreuses études durant ces dernières décennies. En considérant le niveau élevé de ROS qui peut être produit par ce système, son étroite régulation paraît être d'une importance primordiale. En effet, une augmentation anormale de l'activité NADPH oxydase conduit à de graves conséquences telles que celles observées lors des pathologies inflammatoires et neurodégénératives (Marcoux et al., 2010). Une meilleure compréhension du mécanisme d'activation hautement régulé de la NOX2 serait alors d'un bénéfice certain non seulement pour les connaissances fondamentales mais aussi pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques qui permettraient un meilleur contrôle des dérégulations pathologiques. Il est bien connu que l'activation du complexe multiprotéique responsable de la production des ROS au sein du neutrophile implique la translocation des éléments cytosoliques vers la membrane. La p47phox est l'unité responsable du transport et d'organisation du trimère cytosolique p47-p67-p40phox avec le cytochrome b558 pour former l'oxydase active. Il est aussi connu que la phosphorylation de la p47phox sur les résidus sérines (303-379) situés dans sa partie C-terminale constitue une étape décisive de ce processus d'activation (El Benna et al., 1994 ; Faust et al., 1995 ; Nisimoto et al., 1999 ; Dang et al., 2001 ; El Benna et al., 2009).

Si de nombreuses études ont contribué à l'identification des sites de phosphorylation de la p47phox, beaucoup reste à faire afin de déterminer la séquence et les compartiments subcellulaires de ces phosphorylations et surtout leurs rôles dans l'activation de la NOX2 au sein du neutrophile activé. L'étude de la phosphorylation de la p47phox est jusque-là réalisée en utilisant l'acide orthophosphorique marqué au ^{32}P . Cette technique, à la sensibilité limitée, nécessite un travail fastidieux, requiert l'utilisation de grandes quantités de matériel radioactif, un grand nombre de cellules et l'immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques. Dans la présente étude, nous avons développé une technique qui nous a permis d'analyser la phosphorylation de la p47phox dans des lysats cellulaires sans avoir recouru à la radioactivité ni à l'immunoprécipitation et ce, par simple SDS-PAGE et Western blot. Elle présente les avantages de ne nécessiter qu'un faible nombre de cellules, d'être simple, rapide et de permettre une étude précise des sites de phosphorylation de la p47phox.

1. Caractérisation des anticorps anti-phosphosérine

Sachant que la p47phox est phosphorylée sur les résidus sérine compris entre la Ser303 et la Ser379, nous avons tenté de produire des anticorps spécifiques de tous les sites

phosphorylés de la p47phox en utilisant différentes séquences peptidiques comportant chacune des sérines d'intérêt sous sa forme phosphorylée. Nous avons obtenu des résultats satisfaisants pour chacun des anti-phosphoSer 304, 315, 320, 328, 345, 359, 370 et 379. Les peptides phosphorylés correspondant à la Ser303 et 348 que nous avons utilisés n'étaient pas suffisamment immunogènes pour donner des anticorps spécifiques des phosphosérines en question. Les anticorps dirigés contre ces sites sont en cours de développement et de mise au point.

Avant d'utiliser les anticorps développés, il fallait d'abord vérifier leur spécificité. En effet, ces anticorps devaient reconnaître uniquement la phosphosérine correspondante mais pas la forme non phosphorylée. Ceci a été vérifié dans un premier temps en utilisant les peptides phosphorylés qui ont servi à la production des anticorps. Le fait que chaque anticorps ne reconnaisse que le peptide comportant la phosphosérine contre laquelle il est dirigé indique que réellement chacun de nos anticorps développés est spécifique de la phosphosérine correspondante. Par la suite, nous nous sommes assurés que nos anticorps ne sont pas en mesure de reconnaître la forme non phosphorylée de la sérine correspondante en montrant que chacun d'entre eux ne reconnaît la p47phox que lorsqu'elle est phosphorylée. De plus, nous avons apporté la preuve que quand la sérine d'intérêt est mutée en alanine les anticorps développés ne reconnaissent pas la protéine mutante phosphorylée ou non. Ainsi, en prenant en considération l'ensemble de ces résultats, il est possible de conclure que les anticorps développés constituent un outil pratique et sûr pour l'analyse de la phosphorylation de la p47phox.

2. Phosphorylation de la p47phox au sein du neutrophile activé

La stimulation des neutrophiles par le fMLF ou le PMA déclenche une cascade de signalisation qui culmine vers l'activation de la NADPH oxydase et la production des ROS (Sheppard et al., 2005). Il est connu que le fMLF ainsi que le PMA induisent aussi la phosphorylation de la p47phox (El Benna et al., 2009), cependant, l'effet spécifique de chacun d'entre eux sur la phosphorylation individuelle de chaque résidu sérine était jusque-là inconnu. En utilisant les anticorps développés dans cette étude, il a été possible de capturer la dynamique de phosphorylation de la p47phox sur ses différentes sérines en C-terminal. Les résultats apportés par notre étude ont révélé que parmi les sérines analysées, seuls les résidus sérine 304, 315, 320 et 328 sont fortement phosphorylés suite à la stimulation par le fMLF ou le PMA. La sérine 345 n'est que faiblement phosphorylée, alors que les sérines 359, 370 et 379 présentent déjà une phosphorylation basale en l'absence de stimulation qui n'est modifiée

ni par le temps de stimulation ni par les différentes concentrations du fMLF ou du PMA. La cinétique de phosphorylation très transitoire des sérines 304, 315, 320 et 328 induite par le fMLF (détectée après 5 sec et disparaît après 90 sec de stimulation seulement) a pu être capturée non seulement par l'utilisation des anticorps développés mais aussi grâce à la méthode d'arrêt de stimulation employée dans cette étude. Cette méthode consiste à stopper les événements de phosphorylation et de déphosphorylation dans les cellules simplement en les dénaturant à 100°C dans le tampon Laemmli renforcé avec les anti-protéases et les anti-phosphatases. Le choix de cette méthode d'arrêt a été effectué après comparaison avec d'autres méthodes à savoir l'arrêt par addition de tampon glacé ou encore par précipitation à l'acide trichloracétique qui ont donné un résultat moins satisfaisant que celui apporté par le Laemmli chaud (résultats non présentés). Ceci est probablement dû au fait que dans les deux premières conditions, les kinases, les phosphatases et les protéases cellulaires peuvent avoir une activité résiduelle (même faible) et qui pourrait faire rater la cinétique et la dynamique de la phosphorylation de ces résidus sérines.

L'évidence de la phosphorylation de la p47phox a été apportée pour la première fois par Segal et ses collaborateurs en 1985 qui ont observé qu'une phosphoprotéine de 44 kDa était absente chez les patients atteints de CGD autosomale, déficients en p47phox. Par la suite, les sites de cette phosphorylation ont été suggérés par les résultats apportés par l'équipe d'El Benna et al., 1994 qui ont montré la présence de phosphorylations dans les fragments CNBr comportant les sérines 303, 304, 315, 320, 328, 345, 348 et au moins l'une des trois sérines 359, 370 et 379 de la p47phox immunopurifiée de neutrophiles marqués au ³²P activés par le fMLF ou le PMA. Le rôle de ces phosphorylations a été mis en évidence avec les lymphocytes B transformés à l'EBV isolés de patients CGD chez qui la mutation combinée de toutes les sérines de la partie C-terminale de la p47phox (303-379) en alanine a permis de montrer que la phosphorylation de ces sérines est absolument nécessaire à l'activation de la NADPH oxydase (Faust et al., 1995). Les mutations individuelles de chaque sérine ont montré que seule la mutation de la sérine 379 inhibait complètement l'activité NADPH oxydase. Alors que la mutation individuelle des sérines 303, 304, 328, 359 ou 370 ne réduit la production des ROS que de 50%. Par contre, la mutation de l'une des sérines 315, 320 ou 348 n'a aucun effet sur l'activation de NOX2 (Faust et al., 1995). Les mutations combinées ont révélé que deux paires de sérines phosphorylées sont nécessaires à l'activation de la NADPH oxydase à savoir les Ser303+304 et les Ser359+370 (Inanami et al., 1998 ; Johnson et al., 1998).

Dans cette étude, nous apportons la preuve que parmi les sérines étudiées, seuls les résidus 304, 315, 320 et 328 sont phosphorylés dès les premières secondes qui suivent la stimulation par le fMLF, alors que le PMA induit une phosphorylation beaucoup plus longue et plus stable de ces mêmes résidus. La cinétique de phosphorylation de ces sérines concorde avec celle de la production des ROS par les neutrophiles fMLF ou PMA-stimulés, mais leur rôle exact dans l'activation de l'oxydase reste à élucider. Ces 4 résidus sérines sont localisés au sein de la région polybasique de la p47phox et font donc partie du domaine AIR (Shiose et Sumimoto, 2000). Il a été montré que la phosphorylation des résidus 303, 304 et 328 serait particulièrement importante à l'activation de la NOX2. La triple mutation de ces résidus sérines en aspartate (résidu mimant une phosphorylation) suffit à elle seule à activer la NADPH oxydase en système acellulaire (Ago et al., 1999). Il a été suggéré alors que la phosphorylation de ces sérines permettrait au tandem SH3 de la p47phox de se détacher de la région AIR, évènement qui permettrait l'exposition des deux domaines SH3 et du domaine PX et donc le passage de la protéine de la conformation d'autoinhibition inactive à la conformation active. Ainsi, la p47phox se lie à la p22phox d'une part via son tandem SH3 et aux phosphoinositides membranaires d'autre part via son domaine PX (Ago et al., 1999 ; Marcoux et al., 2010). Ceci peut être facilement intégré en considérant la structure du domaine AIR de la p47phox. En effet, il est possible de constater que la sérine 303 forme une liaison hydrogène avec la chaîne latérale du résidu glutamate 241 du domaine SH3B de telle sorte que la phosphorylation de la sérine 303 conduise à une répulsion de charge négative (Groemping et Rittinger, 2005). De plus la proximité des sérines 303 et 304 des résidus arginine de la région polybasique et les interactions électrostatiques pourraient expliquer la façon par laquelle la région polybasique ferait glisser la région entourant les sérines 303 et 304 loin des domaines SH3 libérant ainsi le site de liaison pour la p22phox (Groemping et al., 2003). La sérine 328 serait requise pour des interactions hydrogènes avec la chaîne latérale de l'arginine 267 du domaine SH3B et l'introduction d'un groupement phosphate encombrant pourrait conduire aussi à la libération du domaine (Groemping et Rittinger, 2005 ; Autore et al., 2010).

Différentes kinases ont été impliquées dans la phosphorylation de la p47phox sur ses résidus sérines lors de l'activation des neutrophiles. Il semblerait que, selon la nature du stimulus activateur du neutrophile, une combinaison de kinases peut participer à la phosphorylation de la p47phox (El Benna et al., 2009). Dans notre étude, nous avons montré que la phosphorylation des sérines 304, 315, 320 et 328 induite par le fMLF impliquerait la voie des PKC, des tyrosine kinases ainsi que celle de la PI3kinase. Notre équipe a montré

auparavant en système acellulaire que différentes isoformes de la PKC phosphorylent directement la p47phox recombinante sur les sites PKC majeurs à savoir la sérine 303, 304, 315, 320, 328, 359, 370 et 379 (Fontayne et al., 2002). Alors que la PI3kinase et les tyrosines kinases interviendraient plutôt dans la régulation des sérine/thréonine kinases qui phosphoryleraient directement la p47phox. Ceci porte à croire que les PI3kinases et les tyrosine kinases seraient vraisemblablement en amont de la voie des PKC surtout en prenant en considération notre résultat qui montre que la phosphorylation des sérines 304, 315, 320 et 328 induite par le PMA (activation directe des PKC) n'a pas été affectée par l'inhibition des tyrosine kinase et de la PI3kinase. La PI3kinase a été largement impliquée dans la régulation positive de l'activation de la NADPH oxydase au sein du neutrophile activé de manière dépendante des récepteurs membranaires (Vlahos, 1995 ; Sasaki et al., 2000 ; Kettritz et al., 2002 ; Brécharde et al., 2013). Notre résultat permet de suggérer alors que la PI3kinase participe à cette signalisation dans le neutrophile au moins par la régulation de la phosphorylation de la p47phox sur les résidus sérine 304, 315, 320 et 328. Outre les PKC ζ et la PKC δ qui seraient des candidats potentiels à la phosphorylation de la p47phox car elles seraient justement sous le contrôle de la PI3kinase et des tyrosine kinases (Dang et al., 2001 ; Fontayne et al., 2002), la phosphorylation des sérines 304 et 328 a été également attribuée à la protéine kinase B ou Akt, effecteur directe de la PI3kinase (Royal et al., 2003). L'implication des tyrosines kinases dans la signalisation de la phosphorylation de la p47phox a été également rapportée par notre équipe et ce, dans les neutrophiles activés par le zymosan opsonisé (Makni-Maalej et al., 2012). Cependant, le rôle exact de ces kinases dans l'activation de la NADPH oxydase reste encore à élucider. Les résultats apportés par notre étude permettent au moins de suggérer que tout comme la PI3kinase, les tyrosines kinases prennent part à la régulation de la phosphorylation de la p47phox sur les résidus sérine 304, 315, 320 et 328.

Nos résultats montrent également que le fMLF ainsi que le PMA n'ont pas d'effet significatif sur l'état de phosphorylation de la sérine 345. De plus, aucun des inhibiteurs testés n'a pu affecter la phosphorylation de la p47phox sur cette sérine. Ce résultat ne semble pas être surprenant car notre équipe a montré que la p47phox est partiellement phosphorylée, précisément sur la sérine 345 lors du priming des neutrophiles par des agents primants comme le TNF- α ou le GM-CSF (Dewas et al., 2003 ; Dang et al., 2006). Les travaux de notre équipe a montré par la suite que ce résidu sérine 345, situé au sein d'une séquence consensus reconnue par les MAP kinases (-PXSP-) serait phosphorylée par celles-ci permettant d'initier un changement de conformation de la p47phox qui faciliterait la phosphorylation des autres

résidus sérines lors de l'activation des neutrophiles (Boussetta et al., 2010). Par ailleurs, la faible phosphorylation de la sérine 345 dans les neutrophiles au repos observée dans notre étude pourrait être due à une pré-activation ou priming des neutrophiles qui pourrait avoir lieu lors des différentes étapes de leur isolement. Une nouvelle mise au point de la technique d'isolement est en cours pour notamment éviter la sédimentation en présence du dextran susceptible d'activer les neutrophiles.

L'utilisation des anticorps développés dans notre étude a permis aussi de suggérer pour la première fois que la p47phox serait phosphorylée dans le neutrophile au repos. En effet, nous avons montré que la p47phox est phosphorylée sur les résidus sérines 359, 370 et 379 en l'absence de stimulation et que cette phosphorylation n'est modifiée par aucun des stimulants ni des inhibiteurs utilisés dans notre étude. La possibilité que ces phosphorylations soient un artefact dû à un défaut de spécificité des anticorps peut être écartée car nous avons montré que les anti-phosphoSer359, 370 et 379 étaient spécifiques. Le fait qu'une telle phosphorylation de la p47phox en l'absence de stimulation n'ait été rapportée par aucune étude auparavant pourrait être expliqué par les limites des techniques utilisées jusqu'ici. En effet, toutes les études menées sur la phosphorylation de la p47phox ont été réalisées en utilisant l'acide orthophosphorique marqué au ^{32}P . En admettant que la p47phox soit déjà phosphorylée sur les résidus 359, 370 et 379 dans les neutrophiles au repos et que cette phosphorylation ne soit pas modifiée par la stimulation, il est possible d'expliquer la raison pour laquelle aucun spot de radioactivité n'a été observé lors de la réalisation des cartes phospho-peptidiques des fragments CNBr de la p47phox immunopurifiée de neutrophiles non stimulés (Rotrosen et Leto, 1990). Dans ce cas, les groupements phosphates présents sur les sérines dont il est question ne s'échangeraient pas avec le phosphate radioactif ce qui pourrait être interprété comme une absence de phosphorylation au repos.

Le rôle et l'implication des phospho-sérines 359, 370 et 379 dans l'activation de la NADPH oxydase restent encore à expliquer. Les données disponibles indiquent que la double mutation sérine 359+370 inhibe la translocation de la p47phox et la production de l' O_2^- , mais ce qui était encore plus surprenant est que cette double mutation prévient aussi la phosphorylation des autres résidus sérines (Johnson et al., 1998 ; Fontayne et al., 2002). Le remplacement de ces deux sérines 359+370 par deux résidus aspartate a permis de restaurer la translocation membranaire de la p47phox et sa phosphorylation sur les autres résidus sérine mais pas l'activité NADPH oxydase qui restait très faible (Johnson et al., 1998). Il a été alors suggéré que les charges négatives en position 359 et 370 permettaient la phosphorylation des autres résidus sérines et la translocation de la p47phox mais que l'activation de la NADPH

oxydase nécessiterait absolument des hydroxyamino-acides phosphorylés (Johnson et al., 1998). De là, un modèle de phosphorylation de la p47phox a été suggéré selon lequel la phosphorylation des sérine 359 et 370 permettrait d'initier l'activation et précéderait celle des autres résidus sérines (Johnson et al., 1998). Nos résultats sont en accord avec ce modèle mais permettent aussi de suggérer une précision selon laquelle la p47phox serait phosphorylée sur les résidus 359 et 370 avant même l'activation du neutrophile. Par contre, le rôle de la phospho-sérine 379 dans l'activation de la NADPH oxydase est plus controversé. Il est vrai que la sérine 379 est la seule sérine dont la mutation en alanine prévient la translocation membranaire de la p47phox et inhibe complètement l'activation de la NADPH oxydase (Faust et al., 1995). Cependant, il a été aussi rapporté que la mutation de la sérine 379 en aspartate (mimant la phospho-sérine) atténue la liaison de la p47phox à la p67phox et réduit la production du superoxyde (Mizuki et al., 2005). Il est important de soulever le fait que les résidus sérines 359, 370 et 379 entourent la région PRR (aa 363-369) de la p47phox qui est le domaine de liaison à la p67phox. Des analyses en RMN ont révélé que le domaine SH3 de la p67phox établit non seulement des contacts directes avec les motifs PXXP de la région PRR de la p47phox mais aussi avec la région flanquée en C-terminal (Kami et al., 2002) dans laquelle se trouve notamment les résidus sérines 370 et 379. Ainsi, en prenant en considération ces données, il est possible de supposer que la phosphorylation de la sérine 379 observée dans notre étude concernerait peut être la p47phox libre mais pas celle couplée à la p67phox. Ceci nous amène à suggérer que la p47phox serait peut-être différemment phosphorylée selon qu'elle soit libre ou couplée à la p67phox. Une analyse de la phosphorylation de la p47phox immunoprécipitée avec la p67phox permettrait de vérifier cette possibilité.

3. Phosphorylation de la p47phox dans les fractions subcellulaires du neutrophile activé

Dans le neutrophile au repos, la p47phox présente un point isoélectrique pI (point isoélectrique) supérieur à 9. Suite à sa phosphorylation, son pI diminue fortement donnant lieu à différentes isoformes phosphorylées. Il a été montré que lorsque les neutrophiles sont stimulés par le fMLF ou le PMA, 8 à 9 états de phosphorylations de la p47phox sont observés dans le cytosol et les membranes avec les deux formes les plus acides donc les plus phosphorylées qui se trouvent à la membrane (Okamura et al., 1988 ; El Benna et al., 1994). Ces différents états de phosphorylation de la p47phox laissent penser qu'elle pourrait être phosphorylée d'une manière séquentielle entre le cytosol et les membranes. Nous avons alors

voulu savoir quelle isoforme de la p47phox (en fonction des sérines phosphorylées) serait présente dans le compartiment cytosolique, membranaire et particulaire. Pour ce faire, nous avons analysé la phosphorylation de la p47phox dans les différentes fractions subcellulaires des neutrophiles activés par le fMLF ou le PMA. Nos résultats permettent de suggérer pour la première fois que dans les neutrophiles stimulés par le fMLF, la p47phox présente dans le cytosol est phosphorylée sur les résidus sérine 304, 315, 320, 328, 345, 359, 370 et 379, alors qu'au niveau des membranes et des granules, la p47phox est phosphorylée sur les résidus sérine 315, 320, 328 et 370 mais seule la sérine 328 présente une phosphorylation plus intense à la membrane et au niveau des granules. Nous avons aussi montré que sous stimulation au PMA, la p47phox est phosphorylée au cytosol sur les sérines 304, 315, 320, 328, 345, 359, 370 et 379, puis les p47phox phosphorylées sur les résidus sérines 304, 315, 320, 328, 345 et 370 transloquent à la membrane et aux granules. Alors que la p47phox phosphorylée sur les sérines 359 et 379 ne se trouve pas au niveau de la membrane ni des granules dans les neutrophiles stimulés aussi bien par le fMLF que par le PMA. Ces résultats peuvent être interprétés de deux manières. Soit que les résidus sérines qui ne sont pas phosphorylés au niveau de la membrane et des granules peuvent avoir été déphosphorylés après que la p47phox ait transloqué. Soit qu'il y a différents pools de p47phox qui seraient différemment phosphorylés selon qu'elles soient libres ou dans le trimère cytosolique. L'analyse de la phosphorylation de la p47phox en microscopie confocale ainsi qu'après immunoprécipitation avec la p67phox ou la p22phox permettrait de confirmer et de comprendre la signification de ces différents états de phosphorylation de la p47phox dans les différents compartiments subcellulaires du neutrophile activé.

4. Phosphorylation de la p47phox au cours de la différenciation des cellules HL60

Nous avons montré dans cette étude que la p47phox pourrait être phosphorylée dans le neutrophile au repos, notamment sur les résidus sérine 359, 370 et 379. Le fait que ces phosphorylations ne soient pas modifiées par les stimulants ni par les inhibiteurs employés dans notre étude laisse penser que ces sérines pourraient être phosphorylées pendant la synthèse de la p47phox durant la différenciation du neutrophile. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'expression et la phosphorylation de la p47phox durant les 6 jours de différenciation des HL60 induite par le DMSO, à rapprocher de la maturation des neutrophiles dans la moelle osseuse durant la granulopoïèse. Dans un premier temps nous nous sommes assurés de l'expression de la p47phox dans ces cellules et les résultats obtenus

montrent que son expression augmente progressivement après l'addition du DMSO pour atteindre son maximum au bout du 6^{ème} jour de différenciation. Par la suite, l'analyse de la phosphorylation de la p47phox dans ces cellules durant les 6 jours de différenciation a montré que leur stimulation par le fMLF ou le PMA induit la phosphorylation des sérines 304, 315, 320 et 328. Cette phosphorylation commence à augmenter progressivement après le 3^{ème} jour selon une cinétique corrélée à celle de la production du superoxyde par ces cellules stimulées par le fMLF ou le PMA. Ceci pourrait refléter encore l'importance de la phosphorylation de la p47phox sur ces résidus sérine 304, 315, 320 et 328 dans l'activation de la NADPH oxydase et la production des ROS. Comme pour les neutrophiles, une phosphorylation de la p47phox sur les sérines 359 et 370 est observée aussi bien dans les cellules au repos que stimulées et ce à partir du 3^{ème} jour de différenciation également. Par contre, la p47phox présente une phosphorylation sur la sérine 379 dans les HL60 au repos et stimulées et ce dès les premiers jours de différenciation. Ces résultats obtenus chez les cellules HL60 différenciées vont dans le sens de notre hypothèse selon laquelle les sérines 359, 370 et 379 de la p47phox seraient phosphorylées durant la maturation du neutrophile. Ces phosphosérines présentes sur la p47phox dans le neutrophile au repos pourraient être nécessaires à la stabilité de la p47phox elle-même ou encore à son association à la p67phox. Cette possibilité mérite d'être envisagée et vérifiée par d'autres approches.

5. Etude de la phosphorylation de la p47phox *in vivo*

La majorité des études menées sur la phosphorylation de la p47phox ont été réalisées *in vitro* et très peu d'informations sont disponibles au sujet de cet évènement dans le neutrophile activé au cours d'une réponse inflammatoire. Afin de contribuer à l'étude *in vivo* du mécanisme d'activation de NOX2, nous avons induit la pleurésie chez le rat par injection de λ -carrageenane puis analysé la phosphorylation de la p47phox dans les neutrophiles récupérés de la cavité pleurale en utilisant les anticorps anti-phosphosérines développés. Nous avons choisi le rat comme modèle animal car les sites de phosphorylation de la p47phox sont identiques à ceux de la protéine humaine contrairement à ceux de la souris qui sont différents (Tanabe et al., 2005).

L'inflammation aiguë induite chez l'animal par l'injection de la λ -carrageenane est un modèle standard et pratique qui est en général utilisé pour l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires de différents agents (Cuzzocrea et al., 1998 ; Jilroy et al., 1999). Elle induit le processus inflammatoire en stimulant la libération de l'histamine et de la sérotonine par les mastocytes, initiant ainsi une cascade d'évènements qui produisent d'autres médiateurs qui

contribuent à l'établissement de la réaction inflammatoire aiguë (Cuzzocrea et al., 1998). En effet, la carrageenane induit au cours de la phase précoce de la réaction inflammatoire (1-2h), la production de facteurs tels que l'histamine, la sérotonine, les leucotriènes, le PAF et les prostanoïdes. Ces facteurs pro-inflammatoires provoquent des modifications vasculaires qui conduisent à l'exsudation plasmatique. Durant la phase tardive de ce processus inflammatoire (4-12h), ces facteurs induisent le recrutement des neutrophiles par chimiotactisme vers le site inflammatoire, où ils libèrent leur arsenal cytotoxique et d'autres médiateurs inflammatoires (Dawson et al., 1991 ; Cuzzocrea et al. ; 2000a, b).

Deux populations de cellules inflammatoires interviennent au cours de l'inflammation induite par la carrageenane. Les neutrophiles prédominent durant les 12 premières heures. Ils sont ensuite remplacés par les monocytes qui se différencient en macrophages tissulaires. Ces cellules mononucléaires dominent alors la réaction inflammatoire jusqu'à sa résolution après 48 heures (Jilroy et al., 1999). Il a été montré que la SOD et des inhibiteurs de la NADPH oxydase inhibaient la réaction inflammatoire induite par la carrageenane (Uzkeser et al., 2012) suggérant que les ROS produits par les phagocytes sont impliqués dans cette inflammation. Dans cette étude, nous avons exploité les neutrophiles activés et recrutés vers la cavité pleurale des rats durant les 4 premières heures qui ont suivi l'injection de la carrageenane pour étudier la phosphorylation de leur p47phox. En utilisant les anticorps développés nous avons montré que dans ces neutrophiles récupérés, la p47phox est phosphorylée sur les sérines 304, 315, 320, 328, 370 et 379. Il était intéressant de constater que la sérine 315 était phosphorylée à 2h, 3h et 4h après l'injection de la carrageenane, alors que la phosphorylation des sérines 304, 320 et 328 était transitoire et est détectée seulement à 3 heures après l'injection. Les phospho-sérines 370 et 379 sont aussi détectées aux trois temps étudiés mais dans le modèle utilisé il n'est possible de distinguer une phosphorylation dans les cellules au repos. Ces résultats indiquent que les anticorps développés sont capables de reconnaître la p47phox *in vivo* et permettent de suggérer aussi la phosphosérine 315 comme un marqueur de l'activation *in vivo* de la NADPH oxydase.

6. Phosphorylation de la p47phox dans les lymphocytes B transformés à l'EBV

Après les résultats obtenus dans cette étude, nous avons cherché à contribuer à la compréhension du rôle des sérines phosphorylées de la p47phox lors de l'activation de la NADPH oxydase. Pour cela, il fallait muter les résidus sérines d'intérêt en résidus non phosphorylables comme l'alanine et observer les conséquences sur l'activation de la NOX2.

Or, les neutrophiles présentent une durée de vie très courte et sont surtout résistants aux transfections. C'est pourquoi, pour réaliser notre étude nous avons eu recours aux lymphocytes B transformés à l'EBV isolés de personnes saines ou de patients atteints de CGD (dépourvus de p47phox) afin de reconstituer la NADPH oxydase au sein de ces cellules en les transfectant par des plasmides comportant la séquence codante pour p47phox sauvage (WT) ou mutée S(303-379)A.

Il est vrai que la NOX2 est principalement exprimée dans les phagocytes tels que les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (Babior, 1993 ; El Benna et al., 2009). Les lymphocytes B circulants n'expriment pas la NOX2, cependant, leur transformation par l'EBV induit l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase même si c'est à des niveaux inférieurs à ceux trouvés dans les phagocytes (Morel et al., 1993 ; Condino-Neto et Newburger, 1998).

Outre le PMA qui est largement utilisé pour stimuler les lymphocytes B transformés à produire les ROS (El Benna et al., 1994 ; 1996 ; Condino-Neto et Newburger, 1998), de nombreux autres stimuli peuvent activer ces cellules à savoir l'acide arachidonique, le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6 ainsi que différents antigènes agonistes des immunoglobulines de surface des lymphocytes B (Maly et al., 1988 ; Hancock et al., 1991 ; Leca et al., 1991). Dans notre étude, nous avons montré également la stimulation des lymphocytes B transformés par le PMA mais aussi par la pansorbine (staphylocoques tués par la chaleur) un ligand connu des IgG de surface des lymphocytes B. Le taux d'activation de la NOX2 obtenu dans les cellules stimulées par le PMA ou la pansorbine est plus faible par rapport à celui des neutrophiles ou encore des HL60. En effet, la quantité du superoxyde produite par les lymphocytes B transformés stimulés par le PMA ne dépasserait pas les 5% de celle produite par les neutrophiles (Chetty et al., 1995 ; Condino-Neto et Newburger, 1998). Le taux d'expression de la p47phox dans les lymphocytes B transformés est équivalent à celui des neutrophiles. Cette faible activité NADPH oxydase, principal inconvénient de ce modèle cellulaire est en réalité attribuée à la faible expression des autres sous-unités, en particulier de la p67phox, la gp91phox et de la p22phox (Condino-Neto et Newburger, 1998 ; Dusi et al., 1998).

La régulation et l'activation de la NADPH oxydase sont contrôlées par la phosphorylation de la p47phox sur ces différents résidus sérines (El Benna et al., 2009). Il est bien connu que la stimulation des neutrophiles par le fMLF ou le PMA induit la phosphorylation de la p47phox. Plusieurs études (Faust et al., 1995 ; El Benna et al., 1996), y compris la nôtre, montrent que le PMA induit également la phosphorylation de la p47phox dans les lymphocytes B transformés. Nous avons montré dans cette étude, que la stimulation

des lymphocytes B par le PMA ou la pansorbine induit la phosphorylation de la p47phox au moins sur les résidus sérine 304, 315, 320 et 328. La phosphorylation de la p47phox est nécessaire à l'activation de la NADPH oxydase tel qu'il est montré dans notre étude par la diminution sévère de la production du superoxyde par les lymphocytes B transfectés avec la p47phox mutante S(303-379)A. Par contre, les résultats de notre étude apportent pour la première fois la preuve de la phosphorylation de la p47phox dans les lymphocytes B transformés activés par la pansorbine, un stimulus physiologique, via des récepteurs membranaires en l'occurrence les IgG de surface. La perte de l'activité NADPH oxydase par les lymphocytes B mutants indique que cette phosphorylation induite par la pansorbine est nécessaire également à l'activation de la NOX2 dans ces cellules. L'inhibition de la production du superoxyde par le GF109203X (inhibiteur des PKC) dans les lymphocytes B stimulés par la pansorbine suggère l'implication de la voie de la PKC dans la régulation de l'activation de la NADPH oxydase dans ces cellules.

Ainsi, les résultats apportés par cette partie de notre étude montrent que la pansorbine, agoniste physiologique des IgG induit l'activation de la NADPH oxydase et la phosphorylation de la p47phox dans les lymphocytes B transformés à l'EBV. Comme ils montrent aussi que la PKC pourrait être impliquée dans ce processus et que la phosphorylation de la p47phox est nécessaire à la production des ROS induite par la pansorbine, le même cas est observé lors de la stimulation par le PMA.

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les anticorps anti-phosphosérines développés dans cette étude sont dirigés de manière spécifique contre la forme phosphorylée de chacune des sérines investiguées de la p47phox du neutrophile humain (sérine 304, 315, 320, 328, 345, 359, 370 et 379). Ils constituent un outil pratique et sûr qui permet d'étudier la phosphorylation de la p47phox lors de l'activation de la NOX2 sans avoir recours à la radioactivité et ce, en utilisant des techniques simples et rapides comme le SDS-PAGE et le Western blot.

L'utilisation de ces anticorps a permis de capturer pour la première fois la dynamique de la phosphorylation de la p47phox dans le neutrophile stimulé par le fMLF ou le PMA. Le fMLF induit une phosphorylation très rapide et transitoire des sérines 304, 315, 320 et 328 et qui semble impliquer au moins chacune des voies de la PKC, des tyrosine Kinase et de la PI3kinase dans sa régulation. Alors que le PMA induit une phosphorylation plus lente et continue sur les mêmes résidus sérines et qui impliquerait principalement la voie des PKC. L'activation *in vivo* des neutrophiles lors d'une réponse inflammatoire induit également la phosphorylation de la p47phox sur les sérines 304, 315, 320 et 328 et la phosphorylation de la sérine 315 pourrait constituer un marqueur de l'activation *in vivo* de la NADPH oxydase.

Dans les conditions de notre étude, la sérine 345 ne semble pas être phosphorylée dans les neutrophiles fMLF ou PMA- stimulés, confirmant le fait que cette sérine constituerait un site de priming qui serait phosphorylée dans les neutrophiles primés plutôt qu'activés. Alors que les résidus sérine 359, 370 et 379, situées au sein du domaine de liaison de la p47phox à la p67phox présentent une phosphorylation en l'absence de stimulants qui n'est pas affectée par l'activation des neutrophiles ni par les inhibiteurs testés. Elles seraient probablement phosphorylées pendant la synthèse de la p47phox durant la maturation du neutrophile et ces phosphosérines pourraient réguler la liaison de la p47phox à la p67phox. L'analyse de la phosphorylation de la p47phox libre ou couplée à la p67phox lors de leur co-immunoprécipitation permettra peut-être de vérifier cette possibilité et de mieux comprendre le rôle de ces phosphosérines.

Durant l'activation de la NADPH oxydase, la p47phox serait différemment phosphorylée selon qu'elle soit dans le cytosol, la membrane ou les granules des neutrophiles stimulés par le fMLF ou le PMA. Ceci laisse penser qu'elle serait différemment phosphorylée durant les différentes étapes de l'activation de la NOX2 ou que différentes isoformes (selon leur état de phosphorylation) de la p47phox pourraient intervenir durant ces étapes. Ces probabilités pourraient être vérifiées en examinant la phosphorylation de la p47phox lors de sa co-immunoprécipitation avec la p67phox ou la p22phox dans les différentes fractions

subcellulaires (cytosol, membranes et granules) du neutrophile activé. Plus d'informations à ce sujet pourraient aussi être apportées par l'analyse en microscopie confocale de la phosphorylation de la p47phox dans les neutrophiles activés lors du processus de phagocytose *in vitro*.

Cette phosphorylation de la p47phox est absolument nécessaire à l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire. Cependant, le rôle exact de chaque phosphosérine dans le processus d'activation reste encore à déterminer. Il serait intéressant de générer des lymphocytes B transformés avec des p47phox comportant des mutations uniques ou combinées de ses résidus sérine et de vérifier ensuite l'impact de ces mutations sur l'état de phosphorylation de la protéine (sur les autres résidus restants), sa liaison aux autres unités de la NOX2 ainsi que l'activité NADPH oxydase au sein de ces mutants.

Enfin, les kinases impliquées (directement ou non) dans la phosphorylation de chaque résidu sérine de la p47phox restent aussi à mettre en évidence. Pour cela, différentes approches peuvent être employées (pharmacologiques ou génétiques) tout en activant les neutrophiles par différents agonistes.

Références

Bibliographiques

- Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S (2012). Innate immunity in "*Cellular and molecular immunology*". Edit. Elsevier Saunders, USA. pp: 56-89.
- Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D and Sumimoto H (2003). Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci*, **100(8)**, 4474-4485.
- Ago T, Kuroda J, Kamouchi M, Sadoshima J and Kitazono T (2011). Pathophysiological Roles of NADPH Oxidase/Nox Family Proteins in the Vascular System: Review and perspective. *Circ J*, **75(8)**, 1791-1800.
- Ago T, Nunoi H, Ito T and Sumimoto H (1999). Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem*, **274(47)**, 33644-33653.
- Arnljots K, Sorensen O, Lollike K and Borregaard N (1998). Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia*, **12**, 1789-1795.
- Autore F, Pagano B, Fornili A, Rittinger K, Fraternali F (2010). In silico phosphorylation of the autoinhibited form of p47(phox): insights into the mechanism of activation. *Biophys J*, **99(11)**, 3716-3725
- Babior BM (1992). The respiratory burst oxidase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. **65**, 49-95.
- Babior BM (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*, **93(5)**, 1464-1476.
- Babior BM (2002). The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J*, **4(11)**, 342-344
- Babior BM (2004). NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*, **16**, 42-47.
- Bagaitkar J, Matute J D, Austin A, Arias AA and Dinauer MC (2012). Activation of neutrophil respiratory burst by fungal particules requires phosphatidylinositol 3-phosphate binding to p40phox in human but not in mice. *Blood*, **120**, 3385-3387.
- Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demarex N and Krause KH (2001). A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem*, **276(40)**, 37594-37601.
- Bedard K and Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* **87(1)**, 245-313.
- Bengis-Garber C and Gruener N (1996). Protein kinase A downregulates the phosphorylation of p47phox in human neutrophils. *Cell Signal*, **8**, 291-6.

- Bey EA, Bhattacharjee A, Oldfield CM, Zhao X, Li Q, Subbulakshmi V, Feldman GM, Wientjes FB and Cathcart MK (2004). Protein kinase delta is required for p47phox phosphorylation and translocation in activated human monocytes. *J Immunol*, **173**, 5730-5738.
- Bissonnette SA, Glazier CM, Stewart MQ, Brown GE, Ellson CD, Yaffe MB (2008). PtdIns(3)P- dependant and independent functions of p40phox in activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem*, **283**(4), 2108-2119.
- Bissonnette SA, Glazier CM, Stewart MQ, et al. Phosphatidylinositol 3-phosphate-dependent and -independent functions of p40phox in activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 2008;283(4):2108-2119.
- Bokoch GM, Diebold B, Kim JS and Gianni D (2009). Emerging evidence for the importance of phosphorylation in the regulation of NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal*, **10**, 2429-2441.
- Borregaard N (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, **33**, 657-670.
- Borregaard N and Cowland JB (1997). Granuls of neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, **89**, 3503-3521.
- Borregaard N, Sorensen and Theilgaard-Mönch (2007). Neutrophil granules : a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunol*, **28**(8), 340-345.
- Bouin AP, Grandvaux N, Vignais PV, and Fuchs A (1998). p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase: implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem*, **273**, 30097–30103.
- Bourne HR, Sanders DA and McCormick F (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117–127.
- Boussetta T, Gougerot-Pocidallo MA, Hayem G, Ciappelloni S, Raad H, Arabi Derkawi R, Bournier O, Kroviarski Y, Zhou XZ, Malter JS, Lu PK, Bartegi A, Dang PM, and El-Benna J (2010). The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood*, **116**(26), 5795-5802.
- Brécharard S, Plançon S and Tschirhart EJ (2013). New insight into the regulation of neutrophil NADPH oxidase activity in the phagosome: A focus on the role of lipid and Ca²⁺ signaling. *Antioxid and Redox Signaling*, **18**(6), 661-676.
- Brinkmann V and Zychlinsky (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*, **198**(5), 773-783.

- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y and Zychlinsky A (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, **303**, 1532–1535.
- Brown GE, Stewart M, Bissonnette SA, Elia AE, Wilker E and Yaffe MB (2004). Distinct ligand-dependant roles for p38MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* **279**, 27059-27068.
- Campanelli D, Melchior M, Fu Y, Nakata M, Shuman , Nathan C and Gabay JE (1990). Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils. *J Exp Med*, **172**, 1709–1715.
- Carman CV and Springer TA (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol*, **167**, 377–88.
- Caruso RA, Fedele F, Finocchiaro G and Venuti AA (2012). Neutrophil-tumor cell phagocytosis (Cannibalism) in human tumors: an update and literature review. *Exp Oncol*, **34(3)**, 303-311.
- Chanock SJ, Faust LR, Barrett D, Bizal C, Maly FE, Newburger PE, Ruedi JM, Smith RM, Babior BM (1992). O₂- production by B lymphocytes lacking the respiratory burst oxidase subunit p47phox after transfection with an expression vector containing a p47phox cDNA. *Proc Natl Acad Sci*, **89**, 10174-10177.
- Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT and Nawroth PP (2003). The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med*, **198**, 1507–1515.
- Chen Q, Powell DW, Rane MJ, Singh S, Butt W, Klein JB and McLeish KR (2003). Akt, phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J Immunol*, **170**, 5302-5308.
- Chen YA and Scheller H (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 98-106.
- Cheng N, Keaney JF, Tian J, Dinauer MC, Ye RD (2007). A critical role of protein kinase C delta activation loop phosphorylation in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced phosphorylation of p47phox and rapid activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *J Immunol*, **179**, 7720-7728.

- Chessa TAM, Anderson KE, Hu Y, XU Q, Rausch O and Stephens LR (2010). Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Blood*, **116**, 6027-6036.
- Chetty M, Thrasher AJ, Abo A and Casimir CM (1995). Low NADPH oxidase activity in Epstein-Barr-Virus-immortalized B-lymphocytes is due to a post-transcriptional block in expression of cytochrome b558. *Biochem J*, **306**, 141-145.
- Choi EY, Santos S and Chavakis T (2010). Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. *Front Biosci*, **14**, 1496-1605.
- Collins SJ (1987). *The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression.* *Blood*, **70(5)**, 1233-44.
- Cui BB, Tan CY, Schorn C, Tag HH, Liu Y and Zhao Y (2012). Neutrophil extracellular traps in sterile inflammation: The story after dying? *Autoimmunity*, **45(8)**, 593-596.
- Cuzzocrea S, Rossi A, Serraino I, Mazzon E, Di Paola R, Dugo L, Genovese T, Calabrò B, Caputi AP and Sautebin L (2003). 5-Lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *J Leukoc Biol.* **73(6)**, 739-746.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman AL and Szabo C (1998). Anti-inflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med*, **24(3)**, 450-459.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Calabro G, Dugo L, De Sabro A, Van de Loo FAJ and Caputi AP (2000a). Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *AM Respir Crit care Med*, **162**, 1859-1866.
- Cuzzocrea S, Santagati S, Sautebin L, Mazzon E, Calabro G, Serraino I, Caputi AP and Maggi A (2000b). 17 β -estradiol anti-inflammatory activity in carrageenan-induced pleurisy. *Endocrinol*, **141(4)**, 1455-1463.
- Dang P M, Cross AR and Babior BM (2001). Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67phox and cytochrome b558. *Proc. Natl Acad Sci*, **98**, 3001–3005.
- Dang P M, Cross AR, Quinn MT and Babior BM (2002). Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67phox and cytochrome b558 II. *Proc. Natl Acad Sci*, **99**, 4262–4265.
- Dang PM, Fontayne A, Hakim J, El Benna J, Périanin A (2001). Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox

- and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol* **166**(2), 1206-1213.
- Dang PM, Raad H, Derkawi RA, Boussetta T, Paclet MH, Belambri SA, Makni-Maalej K, Kroviarski Y, Morel F, Gougerot-Pocidal MA and El-Benna J (2011). The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochem Pharmacol*, **82**(9), 1145-1152.
- Dang PMC, Morel F, Gougerot-Pocidal MA and El Benna J (2003). Phosphorylation of the NADPH Oxidase Component p67PHOX by ERK2 and P38MAPK: Selectivity of Phosphorylated Sites and Existence of an Intramolecular Regulatory Domain in the Tetratricopeptide-Rich Region. *Biochem*, **42**, 4520-4526.
- Dang PMC, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidal MA, and El Benna J (2006). A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest*, **116**(7), 2033-2043.
- De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE and Miot F (2000). Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem*, **275**(30), 23227-23233.
- De Leo F, Ulman R, Davis AR, Jutila KL and Quinn MT (1996). Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67phox and flavocytochrome b to a common functional domain in p47phox. *J Biol Chem* , **271**(29): 17013-17020.
- Dekker LV, Leitges M, Altschuler G, Mistry N, McDermott A, Roes J and Segal AW (2000). Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem J*, **347**, 285-294.
- DeLeo FR, Nauseef WM, Jesaitis AJ, Burritt JB, Clark RA and Quinn MT (1995). A domain of p47phox that interacts with human neutrophil flavocytochrome b558. *J Biol Chem* **270**(44), 26246-26251.
- DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM. (1998). Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest*, **101**, 455-463.
- Detmers PA, Zhou D, Powell D, Lichtenstein H, Kelley and Pironkova R (1995). Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *J Immunol*, **155**, 2085-2095.

- Dewas C, Gougerot-Pocidal MA and El Benna J (2000). The mitogen-activated protein kinase extracellular regulated kinase1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol*, **165**, 5238-5244.
- Dewas C, Dang PMC, Gougerot-Pocidal MA and El Benna J (2003). TNF- α phosphorylation of p47phox in human neutrophils: Partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF- α and granulocytes-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*, **171**, 4392-4398.
- Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, Deme D and Virion A (1999). Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem*, **274(52)**, 37265-37269.
- Dusi S and Rossi F (1993). Activation of NADPH oxidase of human neutrophils involves the phosphorylation and the translocation of cytosolic p67phox. *Biochem J*, **296 (2)**, 367-371.
- El Benna J, Dang PMC and Gougerot-Pocidal MA (2008). Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of the p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol*, **30**, 279-289.
- El Benna J, Dang PMC and Périanin A (2010). Peptide-based inhibitors of phagocyte NADPH oxidase. *Biochem Pharmacol*, **80**, 778-785.
- El Benna J, Dang PMC, Gougerot-Pocidal MA and Elbim C (2005). Phagocyte NADPH oxidase a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp*, **53**, 199-206.
- El Benna J, Dang PMC, Gougerot-Pocidal MA, Marie JC and Braut-Boucher F (2009). P47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: Structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med*, **41**, 217-225.
- El Benna J, Faust LP, and Babior BM (1994). The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem*, **269(38)**, 23431-23436.
- El Benna J, Faust LP, Johnson JL, and B M Babior (1996). Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **271(11)**, 6374-6378.

- El Benna, J, Dang MCP, Gaudry M, Fay M, Morel F, Hakim J and Gougerot-Pocidal MA (1997). Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67phox during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. *J Biol Chem*, **272(27)**,17204-17208.
- El Hassani RA, Benfares N, Caillou B, Talbot M, Sabourin JC, Belotte V, Morand S, Gnidehou S, Agnandji D, Ohayon R, Kaniewski J, Noel-Hudson MS, Bidart JM, Schlumberger M, A Virion and Dupuy C (2005). Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **288(5)**, 933-942.
- El kebir D and Filep JG (2013). Modulation of neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation through β 2-integrins. *Front in mmunol*, **4**, 1-15.
- Ellson CD, Davidson K, Ferguson GJ, O'Connor R, Stephens LR and Hawkins PT(2006). Neutrophils from p40phox_/_ mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. *J Exp Med*, **203(8)**, 1927-1937.
- Etienne-Manneville S and Hall A (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**, 629–635.
- Faurschou M, Sorensen OE, Johnsen AH, Askaa J and Borregaard N (2002). Defensin-rich granules of human neutrophils: Characterization of secretory properties. *Biochim Biophys Acta*, **1591**, 29-35.
- Faurschou M and Borregaard N (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, **5**, 1317-1327.
- Faust LR, el Benna J, Babior BM, Chanock SJ (1995). The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest*, **96(3)**, 1499-1505.
- Firestein GS (2004). The T cell cometh: interplay between adaptive immunity and cytokine networks in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, **114(4)**, 471-475.
- Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA, El-Benna J (2002). Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochem*, **41(24)**, 7743-50.
- Forbes L, Truong O, Wientjes FB, Moss SJ and Segal AW (1999). The major phosphorylation site of the NADPH oxidase component p67phox is Thr233. *Biochem J*, **338**, 99-105.
- Friedl A, Stoesz SP, Buckley P and Gould MN(1999). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem J*, **31**, 433–441.

- Fuchs A, Bouin AP, Rabilloud T and Vignais PV (1997). The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells. *Eur J Biochem*, **249**(2), 531-540.
- Fuchs A, Dagher M C and Vignais PV (1995). Mapping the domains of interaction of p40phox with both p47phox and p67phox of the neutrophil oxidase complex using the two-hybrid system. *J Biol Chem*, **270**, 5695–5697.
- Galli SJ, Borregaard N and WynnTA (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*, **12**(11), 1035-1044.
- Gardiner EE and Andrews . RK (2012). Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection-related vacular dysfunction. *Blood Rev*, **26**, 255-259.
- Geiszt, M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K and Leto TL (2003). Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J* **17**(11), 1502-1504.
- Gougerot-Pocidallo MA (2012). The neutrophil and systemic inflammation. *Joint Bone Spine*, **79**(3), 209-211.
- Groemping Y, and K Rittinger (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J*, **386**,401-416.
- Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ and Rittinger K (2003). Molecular basis of phosphorylation-induced activation of NADPH oxidase. *Cell*, **113**, 343-355.
- Gullberg U, Bengtsson N, Bülow E, Garwicz D, Lindmark A and Olsson I (1999). Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *J Immunol Methods*, **232**, 201-210.
- Häger m, Cowland JB and Borregaard N (2010)0 Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med*, **268**, 25-34.
- Hancock JT, Maly FE and Jones OT (1989). Properties of the superoxide-generating oxidase of B lymphocyte cell lines. *Biochem J*, **262**, 373-375.
- Hata K, Ito T, Takeshige K and Sumimoto H (1998). Anionic amphiphile-independent activation of the phagocyte NADPH oxidase in a cell-free system by p47phox and p67phox, both in C terminally truncated forms. Implication for regulatory Src homology 3 domain-mediated interactions. *J Biol Chem*, **273**, 4232–4236.
- Huang J and Kleinberg ME (1999). Activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47phox. Phosphorylation controls SH3 domain-dependant binding to p22phox. *J Biol Chem*, **274**, 19731-19737.

- Inanami O, Johnson JL, MaAdara JK, El Benna J, Faust LP, Newburger PE and Babior BM (1998). Activation of leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation. *J Biol Chem*, **273**, 9539-9543.
- Jilroy DW, Colvillr-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ and Willoughby DA (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med*, **5(6)**, 698-701.
- Johnson JL, Park JW, El Benna J, Faust LP, Inanami O and Babior BM (1998). Activation of p47phox, a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase: phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation of other sites and required for activity. *J Biol Chem*, **273**, 35147-35152.
- Joiner KA, Ganz T, Albert J and Rotrosen D (1989). The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes, *J Cell Biol*, **109**, 2771–2782.
- Jongstra-Bilen J, Hayashi H, Harrison R, Chiu B, Chan JR, Ostergaard HL, Inman RD, Jongstra J and Cybulsky MI (2002). Modulation of Mac-1 (CD11b/Cd18)-mediated adhesion by the leukocyte-specific protein 1 key to its role in neutrophil polarisation and chemotaxis. *J Immunol*, **169**, 415-423.
- Kami , Takeya R, Sumimoto H, Takeshig K and Khda D (2002). Diverse recognition of non-PXXP peptide ligands by the H3 domains from p67phox, Grb2 and Pex3p. *Embo J*, **21**, 4268-4276.
- Kang T, Yi J, Guo A, Wang X, Overall CM, Jiang W, Elde R, Borregaard N and Pei D (2001) Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J Biol Chem*, **276**, 21960–21968.
- Kannengiesser C, Gérard B, El Benna J, Henri D, Kroviarski Y, Chollet-Martin S, Gougerot-Pocidal MA, Elbim C and Grandchamp B (2008). Molecular epidemiology of chronic granulomatous disease in a series of 80 kindreds: identification of 31 novel mutations. *Hum Mutat*, **29(9)**, 132-149.
- Kantari C, Pederzoli-Ribeil M and Witko-sarsat V (2008). The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Trends in Innate Immunity*, **15**, 118-146.
- Kaplan MJ and Radic M (2012). Neutrophil extracellular traps : Double-Edge Swords of innate immunity. *J Immunol*, **189**, 2689-2695.
- Keil ML, Solomon NL, Lodhi IJ, Stone KC, Jesaitis AJ, Chang PS, Linderman JJ and Omann GM (2003). Priming-induced localization of G(ialpha2) in high density membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun*, **301**, 862–872.

- Kettritz R, Choi M, Butt W, Rane M, Rolle S, Luft FC, Klein JB (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase controls antineutrophil cytoplasmic antibodies-induced respiratory burst in human neutrophils. *J Am Soc Nephrol*, **13**(7), 1740-1749.
- Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F and Sumimoto H (1999). Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*, **274**(35), 25051-25060.
- Korchak HM and Kilpatrick LE (2001). Roles for beta II-protein kinase C and RACK1 in positive and negative signaling for superoxide anion generation in differentiated LH60 cells. *J Biol Chem*, **276**, 8910-8917.
- Kuijpers T and Lutter R (2012). Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. *Cell Mol Life Sci*, **69**, 7-15.
- Lambeth JD (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*, **4**(3), 181-189.
- Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y, and Rittinger K (2002). Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem*, **277**(12), 10121-10129.
- Leca G, Benichou G, Bensussan A, Mitenne F, Galanaud P, Vazquez A. Respiratory burst in 193 Am J Blood Res 2012;2(3):187-193 human B lymphocytes. Triggering of surface Ig receptors induces modulation of chemiluminescence signal. *J Immunol* 1991; 146: 3542-3549.
- Lewis EM, Sergeant S Ledford B, Stull N, Dinauer MC and McPhail LC (2010). Phosphorylation of p22 phox on threonine 147 enhances NADPH oxidase activity by promoting p47phox binding. *J Biol Chem*, **285**, 2959-2967.
- Ley K, Smith E and Stark MA (2006). IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res*, **34**, 229–242.
- Ligeti E and Mocsai A (1999). Commentary: Exocytosis of Neutrophil Granulocytes. *Biochem Pharmacol*, **57**(11), 1209-1214.
- Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H and Borregaard N (1995). Lysozyme in human neutrophils and plasma. A parameter of myelopoietic activity. *Leukemia* **9**, 159–164.
- Makni-Maalej K, Chiandotto M, Hurtado-Nedelec M, Bedouhene S, Gougerot-Pocidal MA, Dang PM, El-Benna J (2012). Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of

- Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochem Pharmacol*, **85(1)**, 92-100.
- Maly FE, Cross AR, Jones OT, Wolf-Vorbeck G, Walker C, Dahinden CA, De Weck AL. The superoxide generating system of B cell lines. Structural homology with the phagocytic oxidase and triggering via surface Ig. *J Immunol* 1988; 140: 2334-2339.
- Maly FE, Nakamura M, Gauchat, JF, Urwyler A, Walker C, Dahinden CA, Cross AR, Jones OT, de Weck AL (1989). Superoxide-dependent nitroblue tetrazolium reduction and expression of cytochrome b-245 components by human tonsillar B lymphocytes and B cell lines. *J. Immunol.* **142**, 1260–1267.
- Maly FE, Schuerer-Maly CC, Quilliam L, Cochrane CG, Newburger PE, Curnutte JT, Gifford M, Dinauer MC(1993). Restitution of superoxide generation in autosomal cytochrome-negative chronic granulomatous disease (A22(0) CGD)-derived B lymphocyte cell lines by transfection with p22phox cDNA. *J Exp Med*, **178(6)**, 2047-2053.
- Mansfield PJ, Hinkovska-Galcheva V, Shayman JA and Boxer LA (2002). Granulocyte colony-stimulating factor primes NADPH oxidase in neutrophils through translocation of cytochrome b(558) by gelatinase-granule release. *J Lab Clin Med*, **140**, 9–16.
- Marcoux J, Man P, Petit-Haertlein I, Vivès C, Forest E and Fieschi F (2010). P47phox molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex. *J Biol Chem*, **285(37)**, 28980-28990.
- Martyne KD, Kim MJ, Quinn MT, Dinauer MC and Knaus UG (2005). P21-activated kinase (Pak) regulates NADPH oxidase activation in human neutrophils. *Blood*, **106(12)**, 3962-3969.
- Matute JD, Arias AA, Wright NA, Wrobel I, Waterhouse CC, Li XJ, Marchal CC, Stull ND, Lewis DB, Steele M, Kellner JD, Yu W, Meroueh SO, Nauseef WM and Dinauer MC. (2009). A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*, **114(15)**, 3309-3315.
- McColl SR, Beauseigle D, Gilbert C and Naccache PH (1990). Priming of the human neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor- alpha involves regulation at a post-cell surface receptor level. Enhancement of the effect of agents which directly activate G proteins. *J. Immunol*, **145**, 3047–3053.

- Mitchell DJ, Li P Reinhardt PH and Kubes P (2000). Importance of L-selectin-dependant leukocyte-leukocyte interactions in human whole blood. *Blood*, **95**, 2954-2959.
- Mizuki K, Takeya R, Kuribayashi F, Nobuhisa I, Kohda D, Nunoi H, Takeshige H and Sumimoto H (2005). A region C-terminal to the proline-rich core of p47phox regulates activation of the phagocyte NADPH oxidase by interacting with the C-terminal SH3 domain of p67phox. *Arch Biochem Biophys*, **444(2)**, 185-194.
- Morel F, Cohen Tanugi Cholley L, Brandolin G, Dianoux AC, Martel C, Champelovier P, Seigneurin JM, rancois P, Bost M and Vignais PV (1993). The O₂- generating oxidase of B lymphocytes: Epstein- Barr virus-immortalized B lymphocytes as a tool for the identification of defective components of the oxidase in chronic granulomatous disease. *Biochim Biophys Acta*, **1182**, 101-109.
- Nauseef WM (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view, *Immunol Rev*, **219**, 88-102.
- Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH and Lambeth JD (1999). The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem*, **274(33)**, 22999-23005.
- Nourshargh S andMarelli-Berg FM (2005). Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol*, **26**, 157–65.
- Okamura N, Curnutte JT, Roberts RL, and Babior BM (1988). Relationship of protein phosphorylation to the activation of the respiratory burst in human neutrophils. Defects in the phosphorylation of a group of closely related 47-kDa proteins in two forms of chronic granulomatous disease. *J Biol Chem*, **263(14)**, 6777-6782.
- Ottonello L, Cutolo M, Frumento G, Arduino N, Bertolotto M, Mancini M, Sottofattori E and Dallegri F (2002). Synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis inhibits neutrophil apoptosis: role of adenosine and proinflammatory cytokines. *Rheumatology Oxford J*, **41**, 1249–1260.
- Park HS, Lee SM, Lee HJ, Kim YS, Bae YS and Park JW (2001). Phosphorylation of the leukocyte NADPH oxidase subunit p47phox by casein kinase 2 : conformation-dependant phosphorylation and modulation of oxidase activity. *Biochem J*, **358(3)**, 783-792.
- Petry A, Weitnauer M and Görlach A (2010). Receptor Activation of NADPH oxidase. *Antioxidant and Redox Signaling*, **13(3)**, 467-487.

- Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P (2006). Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*, **203**, 2569–2575.
- Raad H, Paclet MH, Boussetta T, Kroviarski Y, Morel F, Quinn MT, Gougerot-Pocidallo MA, Dang PM, El-Benna J (2009). Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J*, **23(4)**1011-1022.
- Rankin JA (2004) Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues* **15**, 3-17.
- Regier DS, Greene DG, Sergeant S, Jesaitis AJ, and McPhail LC (2000). Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, **275**, 28406–28412.
- Remijnsen Q, Kuijpers TW, Wiraman E, Lippens S, Vandenabeele P and Berghe V (2011). Dying for a cause: Netosis, mechanism behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ*, **18**, 581-588.
- Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, Ahlin A, Nemet K, Hossle JP, Bernatowska-Matuszkiewicz E and Middleton-Price H (1996). Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood*, **87(5)**, 1663-1681.
- Rotrosen D and Leto TL (1990) Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events. *J Biol Chem*. **265**, 19910-19915.
- Sarantis H and Grinstein S (2012). Subversion of phagocytosis for pathogen survival. *Cell Host & Microbe*, **12**, 419-431.
- Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, Bagby G, Nelson S and Kolls JK (2000). Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J Immunol*, **164**, 4783–4789.
- Segal AW (2005). How Neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*, **23**, 197-223.
- Segal AW, Heyworth PG, Cockcroft S and Barrowman MM (1985). Stimulated neutrophils from patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease fail to phosphorylate a Mr-44,000 protein. *Nature*, **316**, 547-549.

- Sengelov H, Boulay F, Kjeldsen F and Borregaard N (1994). Subcellular localization and translocation of the receptor for *N*-formylmethionylleucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem J*, **299** (2), 473–479.
- Sengelov H, Kjeldsen L and Borregaard N (1993). Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*, **150**, 1535–1543.
- Sengelov H, Kjeldsen L and Borregaard N (1993). Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*, **150**, 1535–1543.
- Sengelov L, Kjeldsen W, Kroeze, Berger N and Borregaard N (1995). Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *J Immunol*, **153**, 804–810.
- Sereila O, Kelkka T, Pizzola A, Hultqvist M and Holmdahl R (2011). NOX2 complex-driven ROS as immune regulators. *Antioxid & Redox Signaling*, **15**(8), 2197-2208.
- Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJD, Banerjee A and Silliman CC (2005). Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leuko Biol*, **78**, 1025-1042.
- Shiose A and Sumimoto H (2000). Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*, **275**(18), 13793-13801.
- Sinha S, Watorek W, Karr S, Giles J, Bode W and Travis J (1987). Primary structure of human neutrophil elastase, *Proc Natl Acad Sci*, **84**, 2228–2232.
- Someya A, Nagaoka I and Yamashita T (1993). Purification of the 260 kDa cytosolic complex involved in the superoxide reduction of guinea pig neutrophils. *FEBS Lett*, **330**, 215–218.
- Someya A, Nunoi H, Hasebe T and Nagaoka I (1999). Phosphorylation of p40-phox during activation of neutrophil NADPH oxidase. *J Leukoc Biol*, **66**, 851-857.
- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK and Lambeth JD (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**(6748), 79-82.
- Takada K, Ohno N and Yadomae T (1994). Binding of lysozyme to lipopolysaccharide suppresses tumor necrosis factor production in vivo. *Infect Immun* **62**, 1171–1175.
- Tanabe M, Rådmark O, Watanabe T, Shiose A and Sumimoto H (2005). Cloning of rat p47phox and comparison with human p47phox. *DNA Seq*, **16**(1), 65-68.

- Taura M, Miyano K, Minakami R, Kamakura S, Takeya R and Sumimoto H (2009). A region N-terminal to the tandem SH3 domain of p47phox plays a crucial role in the activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochem J*, **419**, 329-338.
- Theilgaard-Mönch K, Jacobsen LC, Borup R, Rasmussen T, Bjerregaard MD, Nielsen FC, Cowland, JB and Borregaard N (2005). The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. *Blood*, **105**, 1785-796.
- Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ and Lehrer RI (1998). Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**, 2206–2214.
- Uzkeser H, Cadirci E, Halici Z, Odabasoglu F, Polat B, Yuksel TN, Ozaltin S and Atalay F (2012). Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of Salbutamol on Acute and Chronic Models of Inflammation in Rats: Involvement of an Antioxidant Mechanism. *Mediators Inflamm*, **2012**, 1-10.
- van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, Espanol T, Fischer A, Kurenko-Deptuch M, Mouy R, Petropoulou T, Roesler J, Seger R, Stasia MJ, Valerius NH, Weening RS, Wolach B, Roos D and Kuijpers TW (2009) Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One*, **4(4)**, 5234-5243.
- van Lent PL, Nabbe KC, Blom AB, Sloetjes A, Holthuysen AE, Kolls J, Van De Loo FA, Holland SM and Van Den Berg WB (2005). NADPH-oxidase-driven oxygen radical production determines chondrocyte death and partly regulates metalloproteinase-mediated cartilage matrix degradation during interferon-gamma-stimulated immune complex arthritis. *Arthritis Res Ther*, **7(4)**:885-895.
- Vlahos CJ (1995). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors and their effects on cell signaling pathways. *Drug Future*, **20**, 165-171.
- von Vietinghoff S and Ley K. (2009). IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice, *J Immunol*, **183**, 865–873.
- Wagner JG and Roth RA (2000) Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* **52**, 349-374.
- Walker BAM and Ward PA (1992). Priming and signal transduction in neutrophils. *Biol Signals* **1**, 237-249.
- Werner E (2004). GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci*, **117**, 143-153.

- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P and Halbwachs-Mecarelli L (2008). Neutrophils: Molecules, functions and pathological aspects. *Lab Invest*, 80, 617-653.
- Yang HC, Cheng ML, Ho HY and Chiu DTY (2011). The microbicidal and cytheregulatory roles of NADPH oxydases. *Microbes Infec*, **13**, 109-120.
- Yonekawa K and Harlan JM (2005). Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J Leukoc Biol*, **77**, 129–140.
- Zarbock A and ley K (2011). Protein tyrosine kinases in neutrophil activation and recruitment. *Arch Biochem Biophys*, **510**, 112-119.

Résumé

La phosphorylation de la p47phox sur ses différents résidus sérines situés dans sa partie C-terminale constitue une étape décisive et indispensable à l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire ou NOX2. Dans cette étude, des anticorps spécifiques de 8 sites (Ser304, 315, 320, 328, 345, 359, 370, 379) de phosphorylation de la p47phox du neutrophile humain ont été développés. Leur utilisation a permis une analyse précise et rigoureuse et a révélé de nouvelles données au sujet de ce processus de phosphorylation de la p47phox dans le neutrophile activé par le fMLF ou le PMA. Les sérines 304, 315, 320 et 328 de la p47phox sont phosphorylées de manière temps et dose dépendante du fMLF et du PMA, alors que ces deux stimulants n'ont pas d'effet sur la phosphorylation de la sérine 345. La phosphorylation très rapide et transitoire induite par le fMLF sur ces 4 sérines est inhibée par la wortmannin, le GF109203X et la génistéine. Alors que le PMA induit une phosphorylation plus lente et continue de ces mêmes sérines et qui n'est inhibée que par le GF109302X. Par ailleurs, la p47phox présente déjà une phosphorylation sur les résidus sérines 359, 370 et 379 dans les neutrophiles au repos qui n'est modifiée ni par les stimulants ni par les inhibiteurs utilisés. Les p47phox est différemment phosphorylée selon qu'elle soit dans le cytosol, la membrane ou les granules des neutrophiles fMLF et PMA-stimulés. La p47phox est également phosphorylée sur les sérines 304, 315, 320, 328 et 345 dans les lymphocytes B transformés à l'EBV stimulés par la pansorbine ou le PMA et cette phosphorylation est inhibée par le GF109203X. La mutation de tous les résidus sérines de la p47phox en alanine S(303-379)A abolit la production des ROS dans ces cellules. Dans les cellules HL60 en cours de différenciation, la phosphorylation basale de la p47phox, en cours d'expression, sur les résidus sérines 359 et 370 apparaît à partir du 3 jour de différenciation puis augmente jusqu'au dernier jour alors que la phosphorylation de la sérine 379 apparaît dès le premier jour et reste stable. En fin, l'analyse *in vivo* de la phosphorylation de la p47phox dans le modèle de la pleurésie induite chez le rat par le λ -carrageenane a montré que la p47phox est phosphorylée transitoirement sur les sérines 304, 320 et 328 alors que la phosphorylation de la sérine 315 est plus stable et continue. Ainsi, l'utilisation des anticorps antiphospho-sérines développés a permis de capturer pour la première fois la dynamique spatio-temporelle de phosphorylation de la p47phox sur ces différents résidus sérines et d'investiguer processus *in vivo*.

Mots clés : Inflammation, Neutrophile, NOX2, p47phox, phospho-sérine, explosion oxydative.

الملخص:

تشكل فسفرة الـ p47phox على مختلف جزئيات سيرين، المتواجدة في النهاية الكربونية، مرحلة حاسمة وأساسية لتنشيط انزيم NADPH oxydase الباعمي أو NOX2. خلال هذه الدراسة، تم تطوير أجسام مضادة موجهة ضد 8 مواقع فسفرة (سيرين 304، 315، 320، 328، 345، 359، 370، 379) للـ p47phox المتواجدة على الخلايا المتعادلة للإنسان. استعمال هذه الأجسام المضادة سمح بإجراء تحليل جد دقيق وكشف عن معطيات جديدة في ما يخص آليات فسفرة الـ p47phox في الخلايا المتعادلة المنشطة بـ fMLF أو PMA. جزئيات سيرين 304، 315، 320 و 328 على الـ p47phox مفسفرة بصورة تابعة للوقت وجرعات fMLF و PMA، في حين أن هذين المنشطين ليس لهما تأثير على فسفرة سيرين 345. الفسفرة السريعة جدا والمؤقتة لجزئيات السيرين الأربعة التي يسببها fMLF تم تثبيطها بـ wortmannin، GF109203 و génistéine. في حين أن PMA يسبب فسفرة أكثر بطئا واستمرارا لنفس جزئيات السيرين الأربعة والتي لا تثبط إلا بـ GF109302X. من جهة أخرى، تحتوي الـ p47phox مسبقا على جزئيات سيرين 359، 370 و 379 مفسفرة في الخلايا المتعادلة في حالة الاستراحة، هذه الفسفرة لم تتغير رغم استعمال مختلف المنشطات والتثبطات. الـ p47phox المتواجدة في هيولى الخلايا المتعادلة المنشطة بـ fMLF و PMA مفسفرة على جميع جزئيات السيرين. في حين أنه على مستوى الغشاء الخلوي و الحبيبات للخلايا المتعادلة المنشطة بـ fMLF و PMA، الـ p47phox مفسفرة على جزئيات السيرين 304، 315، 320، 328 و 379 غائبة في الغشاء الخلوي و الحبيبات للخلايا المتعادلة المنشطة بـ fMLF و PMA. الـ p47phox هي أيضا مفسفرة على جزئيات السيرين 304، 315، 320، 328 و 345 في الخلايا اللعناوية البائية المحولة بفيروس EBV، المنشطة بـ pansorbine أو PMA. هذه الفسفرة تم تثبيطها بـ GF109203X. الخلايا الحاملة لطفرة على مستوى جميع جزئيات السيرين للـ p47phox من خلال تحويلها إلى ألانين S(303-379)A غير قادرة تماما على إنتاج الأنواع الأوكسيجينية النشطة (ROS). في الخلايا HL60 في طور التمايز، الفسفرة القاعدية لـ p47phox، خلال التعبير، على مستوى جزئيات السيرين 359 و 370 و 379 تبدأ بالظهور في اليوم الثالث من التمايز، ثم تبدأ بالارتفاع حتى آخر يوم، في حين أن فسفرة السيرين 379 تظهر ابتداء من اليوم الأول و تبقى مستقرة. و في الأخير، أظهرت دراسة فسفرة الـ p47phox في الجسم الحي (*in vivo*) باستعمال نموذج ذات الجنب (pleurésie) عند الجرذ المسببة بـ λ -carrageenane، أن الـ p47phox مفسفرة مؤقتا على جزئيات السيرين 304، 320 و 328، في حين أن فسفرة السيرين 315 أكثر استقرارا و استمرارا. و هكذا، فإن استعمال الأجسام المضادة المطورة ضد السيرين المفسفرة سمح، و لأول مرة، بتقني أثر زمني-مكاني لفسفرة الـ p47phox على مختلف جزئيات السيرين، و بالتحري عنها في الجسم الحي. و يمكن استعمال فسفرة السيرين 315 كعلامة فسفرة لـ p47phox في الجسم الحي مع مختلف المنشطات الفزيولوجية.

الكلمات المفتاحية: الإلتهاب، الخلايا المتعادلة، NOX2، p47phox، فسفرة السيرين، الإنفجار التأكسدي، الأنواع الأوكسيجينية النشطة.