HAL
open science

Mise en place d'un modèle cellulaire d'étude des granulomatoses septiques chroniques autosomales récessives

Delphine Tissot Dupont

To cite this version:

Delphine Tissot Dupont. Mise en place d'un modèle cellulaire d'étude des granulomatoses septiques chroniques autosomales récessives. Sciences pharmaceutiques. 2004. dumas-01578117

HAL Id: dumas-01578117

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01578117v1

Submitted on 28 Aug 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes

UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

B.U.M GRENOBLE
D 115 078575 4

1er exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2004 N° : 7033

MISE EN PLACE D'UN MODELE CELLULAIRE D'ETUDE DES GRANULOMATOSES SEPTIQUES CHRONIQUES AUTOSOMALES RECESSIVES

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

Présenté à la Faculté de Pharmacie de GRENOBLE

Et soutenu publiquement le : 28 Octobre 2004

Pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Par : **Delphine TISSOT DUPONT**

[Données à caractère personnel]

JURY

Présidente du jury : Madame le Professeur Renée GRILLOT

Membres : Madame le Professeur Françoise MOREL

Madame le Docteur Marie-José STASIA

Monsieur le Docteur Jean-Paul BRION

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE GRENOBLE MÉDECINE-PHARMACIE

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2004 N° :

MISE EN PLACE D'UN MODELE CELLULAIRE D'ETUDE DES GRANULOMATOSES SEPTIQUES CHRONIQUES AUTOSOMALES RECESSIVES

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

Présenté à la Faculté de Pharmacie de GRENOBLE
Et soutenu publiquement le : 28 Octobre 2004
Pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Par : **Delphine TISSOT DUPONT**

[Données à caractère personnel]

JURY

Présidente du jury : Madame le Professeur Renée GRILLOT
Membres : Madame le Professeur Françoise MOREL
Madame le Docteur Marie-José STASIA
Monsieur le Docteur Jean-Paul BRION

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : M. le Professeur **P. DEMENGE**
Vice-Doyenne : Mme **A. VILLET**

PROFESSEURS DE PHARMACIE

BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	(Emérite)
BURMEISTER	Wilhelm	Biophysique
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-Technique
DANEL	Vincent	Toxicologie
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Bio-Inorganique
DEMENGE	Pierre	Physiologie / Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Immunologie / Microbiologie / Biotechnologie
FAVIER	Alain	Biochimie / Biotechnologie
GOULON	Chantal	Biophysique
GRILLOT	Renée	Parasitologie
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique
RIBUOT	Christophe	Physiologie / Pharmacologie
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacie Galénique

PROFESSEUR ASSOCIE (PAST)

CHAMPON	Bernard	Pharmacie Clinique

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie
ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique
BARTOLI	Marie-Hélène	Pharmacie Clinique et Biotechn.
BOUMENDJEL	Ahcène	Pharmacognosie
CARON	Cécile	Biologie Moléculaire
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie et génie de la formulation
DELETRAZ	Martine	Droit Pharmaceutique Economie
DEMEILLERS	Christine	Biochimie
DESIRE	Jérôme	Chimie Bioorganique
DIJOUX-FRANCA	Marie-Geneviève	Pharmacognosie
DURMORT-MEUNIER	Claire	Virologie
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique
FAURE	Patrice	Biochimie
FAURE-JOYEUX	Marie	Physiologie-Pharmacologie
FOUCAUD-GAMEN	Jacqueline	Immunologie
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie Galénique
GERMI	Raphaële	Bactériologie
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie – Pharmacologie
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique
GUIRAUD	Pascale	Biologie Cellulaire et Génétique
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie
KRIVOBOK	Serge	Botanique – Cryptogamie
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique / Chimie Thérapeutique
PINEL	Claudine	Parasitologie
RAVEL	Anne	Chimie Analytique
RICHARD	Jean-Michel	
RIONDEL	Jacqueline	Physiologie - Pharmacologie
SEVE	Michel	Ens. Physique / Rech. Biochimie
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie Bio-Inorganique
VILLEMAIN	Danielle	Mathématiques / Informatique
VILLET	Annick	Chimie Analytique

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

ROUTABOUL	Christel	Chimie Générale

Remerciements

A Madame le Professeur R. GRILLOT

Pendant mes années d'études de pharmacie puis d'internat, j'ai pu apprécier votre disponibilité, et la grande qualité de votre enseignement.
Vous me faites aujourd'hui l'honneur de présider ce jury.
Trouvez ici l'expression de mon estime et de ma respectueuse considération.

A Madame le Professeur F. MOREL

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre équipe, qui m'a apportée soutien et m'a fait bénéficier de son immense compétence. Le travail au sein du GREPI m'a appris la rigueur scientifique.
Soyez assurée de mon respect et de ma reconnaissance.

A Madame le Docteur M.J. STASIA

J'ai été ravie de travailler à tes côtés durant ces deux années : tu as su me guider et j'ai apprécié tes qualités tant professionnelles qu'humaines. Ta grande disponibilité, ta gentillesse et ta joie de vivre sont rares.
Je t'adresse un immense merci pour tout.

A Monsieur le Docteur J.P. BRION

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein du service de Maladies Infectieuses et d'avoir accepté de juger ce travail.
Je vous assure de toute ma considération et de ma gratitude.

A ma famille

A Pierre.... A notre amour et à notre vie future...enfin réunis !

A mes parents...C'est grâce à votre amour, vos attentions et vos encouragements que j'ai réussi ce parcours. Je suis heureuse d'avoir suivi vos traces et de soutenir ma thèse, aujourd'hui, face à « l'Amphi Lemarchand »... c'est chargé de souvenirs; je vous aime.

A Perrine...Ma sœur, toujours prête à me faire rire ! Ta forte personnalité et ta générosité m'impressionnent... Je te souhaite beaucoup de réussites : je n'en doute pas.

A Charles... Je te souhaite beaucoup de bonheur avec Perrine et t'assure toute ma tendresse.

A mon arrière-grand-mère « Mamie Bourg »... Ta gentillesse et tes attentions ont enchanté mon enfance : à jamais je garderai en mémoire ces bons souvenirs.

A mes grands-parents Al et Moune...Votre dynamisme, votre générosité et votre disponibilité, ont berçé mon enfance et continuent à me surprendre. Je veux vous aimer encore très longtemps ainsi.

En souvenir de mes grands-parents Paul et Mado...Je vous ai beaucoup aimés : vous me manquez.

A mes oncles, tantes, cousins, cousines....J'ai un grand plaisir à vous voir pour cette occasion, c'est malheureusement trop rare. Je vous témoigne ici toute mon affection.

A Jean....« Carpe Diem » : Tu sais profiter de la vie et faire plaisir aux autres... c'est une vraie qualité.

A mes amis...

A tous mes amis que j'aime tant, en souvenir de si bons moments passés ensemble : à la fac puis à l'internat, en vacances, et pendant nos fameuses soirées œnologie ... que tout cela ne s'arrête jamais. Vous me faites un immense plaisir d'être ici aujourd'hui. Merci à tous !

A toutes les personnes qui m'ont aidée pour ce travail,

A Xing Jun Li

J'ai beaucoup apprécié ta patience, ton aide et ton sourire! Tu mérites de réussir et je te souhaite beaucoup de joies et une brillante carrière de chercheuse.

A Michèle et Elisabeth

Je vous adresse un grand merci pour votre aide et vos nombreux conseils durant mes manip'… et cela, toujours dans la bonne humeur.

A tous les chercheurs(euses) du GREPI

Votre pugnacité m'impressionne ; je vous souhaite à tous beaucoup de réussites, des publications nombreuses et des « GREPI Days » toujours aussi riches !

A toute l'équipe d'Enzymologie

J'ai beaucoup apprécié votre accueil, et travailler à vos côtés a été un plaisir. Merci à tous.

Sommaire

Liste des figures et tableaux 11

Abréviations 12

Première partie : introduction et étude bibliographique 13

Introduction 13

1. La phagocytose et le métabolisme oxydatif du neutrophile 13

2. La NADPH oxydase 15
2.1 Structure de la NADPH oxydase 15
2.1.1 Le cytochrome b_{558} 16
2.1.2 Les facteurs cytosoliques 17
2.2 Activation et assemblage de la NADPH oxydase 21

3. La granulomatose septique chronique 24
3.1 Généralités 24
3.2 Manifestations cliniques 24
3.3 Les différentes formes de CGD 26
3.3.1 Présentation 26
3.3.2 Les CGD autosomales récessives 27
3.3.3 Les CGD liées à l'X 28
3.4 Diagnostic de la CGD 29
3.4.1 Diagnostic biochimique 30
3.4.1.1 Test de phagocytose sur lame et mesure de la réduction (NBT) 30
3.4.1.2 Quantification de la production d'ions superoxyde 30
3.4.1.3 Quantification de la production de peroxyde d'hydrogène 31
3.4.2 Diagnostic moléculaire 31
3.4.2.1 Western blot 32
3.4.2.2 Spectre d'absorption du cytochrome b_{558} 33
3.4.2.3 Etude des ARN messagers (ARNm) 33

3.5 Les traitements 34

Etude Bibliographique : Les modèles cellulaires d'étude du complexe oxydase dans les phagocytes 37

1. Description des différents modèles cellulaires 38
1.1 Les lymphocytes B immortalisés par le virus d'Epstein-Barr : les LB-EBV 38
1.2 Les cellules PLB985 39
1.3 Les cellules K562 39
1.4 Les cellules fibroblastiques 40
1.4.1 Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) 40
1.4.2 Les cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney) 40
1.4.3 Les cellules COS7 40
1.5 Les cellules $CD34^+$ 41

2. Etude des mutations humaines **41**
2.1 Diagnostic moléculaire 41
2.2 Reproduction des mutations humaines 43
3. Etude du complexe oxydase **44**
3.1 Maturation du cytochrome b_{558} et étude de la glycosylation de gp91*phox* 44
3.1.1 L'incorporation des hèmes 44
3.1.2 La glycosylation de gp91*phox* 45
3.1.3 Etude des sites fonctionnels de gp91*phox* 47
3.2 Etude du rôle des facteurs cytosoliques 48
3.2.1 Etude des rôles de p67*phox* et p40*phox* 48
3.2.2 Etude des domaines SH3 49
3.2.3 Utilisation du modèle COS*phox* 52
3.2.3.1 Caractérisation du modèle COS*phox* 52
3.2.3.2 Applications du modèle COS*phox* 53
3.3 Etude du canal à protons 54
4. Nox1 et analogues des facteurs cytosoliques p47*phox* et p67*phox* **57**
4.1 Etude de Nox 1 57
4.2 Etude de NOXO1 et NOXA1 58
5. Thérapie cellulaire *ex vivo* et thérapie génique **61**
5.1 Les LB-EBV 61
5.1.1 Utilisation des vecteurs plasmidiques 61
5.1.2 Utilisation des vecteurs rétroviraux 62
5.1.3 Utilisation du système de sécrétion de type III 63
5.2 Les PLB 985 64
5.3 Les cellules $CD34^+$ 64
6. Objectifs du travail **67**

Deuxième partie : matériel et méthodes **69**

1. Préparations biologiques **69**
1.1 Culture des cellules COS7 69
1.2 Préparation d'extraits solubles 69
1.3 Préparation de membranes et de cytosol 69
1.4 Les anticorps monoclonaux 70
1.4.1 Anticorps utilisés lors de la réalisation du Western blot 70
1.4.2 Anticorps utilisés en cytométrie en flux 70

2. Techniques biochimiques **71**
2.1 Dosage et analyse des protéines 71
2.1.1 Dosage des protéines par la technique de Pierce 71
2.1.2 Western Blot des protéines 71
2.2 Spectre d'absorption différentiel du cytochrome b_{558} 73
2.3 Cytométrie en flux 73
2.3.1 Evaluation de l'expression de gp91*phox* et de p22 *phox* dans les cellules COS7 73
2.3.2 Tri cellulaire 74
2.4 Mesure de l'activité NADPH oxydase reconstituée en CFS par réduction du cytochrome c, sensible à la SOD 74
2.4.1 Préparation du milieu de reconstitution d'activité oxydase 75
2.4.2 Détermination de l'optimum d'acide arachidonique 75
2.4.3 Mesure de la production d'O_2^- par la réduction du cytochrome c 76
2.5 Mesure de l'activité NADPH oxydase par chimiluminescence 76

3. Techniques de biologie moléculaire 77
3.1 Préparation et dosage des acides nucléiques 77
3.1.1 Préparation des ARN totaux 77
3.1.2 Préparation d'ADN complémentaire 77
3.1.3 Dosage des acides nucléiques 78
3.1.4 Purification d'ADN plasmidique ; technique de « miniprep » 78
3.2 Réaction de PCR 79
3.3 Clonage des ADNc de p67*phox* et p47*phox* 81
3.3.1 Purification du vecteur d'expression 81
3.3.2 Purification de l'insert d'ADN d'intérêt 82
3.3.3 Insertion de nouveaux sites de restriction à l'ADNc de p47*phox* 82
3.3.4 Clonage de l'insert dans le vecteur d'expression eucaryotique 83
3.3.5 Purification des plasmides pour la transfection des cellules COS7 85
3.4 Clonage de l'ADNc de p40*phox* 85
3.5 Transfection des cellules COS 7WT 86
3.5.1 Test de survie 86
3.5.2 Transfection des cellules COS7WT par différents plasmides d'intérêt 86

Troisième partie : résultats **89**

1. Caractérisation des cellules COS7 de type sauvage (COS7WT) **89**
1.1 Analyse de la présence des ARN messagers par RT-PCR et séquençage 89
1.2 Analyse de la présence des protéines du complexe oxydase 93
1.2.1 Western blot 94
1.2.2 Cytométrie en flux *95*
2. Obtention du modèle COS transgénique exprimant le cytochrome b_{558} **97**
2.1 Test de survie des cellules COS7WT à la Généticine 97
2.2 Transfection des cellules COS 7 par le plasmide pEFPGKneo – gp91*phox* 98
2.3 Caractérisation de la présence du cytochrome b_{558} dans les cellules COS7 transfectées par pEF-PGKneo-gp91*phox* 99
2.3.1 Western Blot 99
2.3.2 Cytométrie en flux 100
2.3.3 Spectres différentiels du cytochrome b_{558} 101
2.4 Evaluation de l'activité NADPH oxydase des cellules COS7WT 102
2.4.1 Chimiluminescence 103
2.4.2 Reconstitution de l'activité NADPH oxydase en «cell free system » 103
3. Obtention du modèle COS transgénique exprimant le cytochrome b_{558} et certains facteurs cytosoliques **105**
3.1 Clonage de l'ADNc de p67*phox* 105
3.2 Clonage de l'ADNc de p47*phox* 108
3.3 Contrôle du plasmide pCEP4 – p40*phox* 109
3.4 Transfection des ADNc de p67*phox* et p40*phox* dans les cellules COS7 exprimant gp91*phox* 110
3.4.1 Tests de survie des cellules COS7WT à la Zéocine et à l'Hygromycine 110
3.4.2 Transfection des ADNc de p67*phox* et/ou p47*phox* dans les cellules COS-cytb_{558} 111

Quatrième partie : discussion **113**

Conclusion **119**

Bibliographie **120**

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Phagocytose des bactéries et explosion respiratoire dans les polynucléaires neutrophiles
Figure 2 : Structure du cytochrome b_{558}
Figure 3 : Structure de la protéine p67*phox*
Figure 4 : Structures de la protéine p47*phox*, dans la cellule au repos et à l'état activé
Figure 5 : Structure de la protéine p40*phox*
Figure 6 : Schéma de l'activation de Rac
Figure 7 : Cascade de réactions permettant l'activation du complexe oxydase
Figure 8 : Mécanismes d'assemblage de la NADPH oxydase
Figure 9 : Interactions moléculaires lors de l'assemblage de la NADPH oxydase
Figure 10 : Photo d'un granulome du tissu pulmonaire
Figure 11 : Modèle d'assemblage des facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase et implications des domaines SH3
Figure 12 : Détermination de la concentration optimale d'acide arachidonique à utiliser pour la mesure de l'activité NADPH oxydase *in vitro*
Figure 13 : Structures des vecteurs d'expression utilisés pour les clonages de p47*phox* et p67*phox*.
Figure 14 : Contrôle du clonage par séquençage
Figure 15: Structure du vecteur d'expression utilisé pour le clonage de p40*phox*
Figure 16: Mise en évidence des ARNm des différents composants du complexe oxydase par RT-PCR dans les cellules COS7WT
Figure 17: Séquences des protéines correspondant aux ADNc des produits de PCR amplifiés
Figure 18: Evaluation par Western Blot de l'expression des protéines gp91*phox*, p22*phox*, p67*phox*, p40*phox*, p47*phox* et Rac1 dans les cellules COS7WT
Figure 19 : Evaluation par cytométrie en flux de l'expression de gp91*phox* et p22*phox* dans les cellules COS7WT
Figure 20 : Test de survie des cellules COS7WT en présence de concentrations croissantes de Généticine
Figure 21 : Evaluation par Western Blot de l'expression de gp91*phox* et de p22*phox* dans les cellules COS7 transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox*
Figure 22 : Evaluation par cytométrie en flux de l'expression de gp91*phox* et de p22*phox* dans les cellules COS7 transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox*
Figure 23 : Tri par cytométrie en flux des cellules COS7 transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox*
Figure 24 : Spectres différentiels du cytochrome b_{558} des cellules COS7WT et COS transfectées par l'ADNc de gp91*phox*
Figure 25 : Mesure par chimiluminescence de l'activité NADPH oxydase des cellules COS7 WT et COS7 transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox*
Figure 26 : Mesure de l'activité NADPH oxydase en système reconstitué à partir des membranes des cellules COS7WT et COS7-gp91*phox*
Figure 27 : Clonage de l'ADNc de p67*phox* dans le vecteur d'expression pEF4/V5HisB
Figure 28 : Clonage de l'ADNc de p47*phox*
Figure 29 : Digestion enzymatique par *KpnI* de pCEP4/p40*phox*
Figure 30 : Tests de survie des cellules COS7 en présence de concentrations croissantes d'Hygromycine et de Zéocine

Tableau I : Les différentes formes de CGD
Tableau II : Anticorps primaires et secondaires utilisés en Western Blot
Tableau III : Amorces oligonucléotidiques utilisées pour les réactions de PCR
Tableau IV : Récapitulatif des clonages d'ADNc dans des vecteurs d'expression eucaryotiques
Tableau V : Tailles des fragments amplifiés pour chaque ADNc des protéines du complexe oxydase à partir des lymphocytes B
Tableau VI : Mesure de l'activité NADPH oxydase en système reconstitué à partir des membranes des cellules COS7WT et COS7-gp91*phox*

Abréviations

AA	Acide Arachidonique
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATB	Antibiotiques
BCIP	Sel de 5-bromo 4-chloro 3-indoyl toluidine phosphate
CGD	Chronic Granulomatous Disease ou Granulomatose Septique Chronique
DFP	Diisopropyl fluorophosphate
DMF	Diméthyl formamide
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMLP	Formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
GTP	Guanosine triphosphate
GTPγS	Guanosine-5'-O- (3-thiotriphosphate)
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
Hepes	Acide hydroxyéthyl-pipérazine-éthane-sulfonique
Ig	Immunoglobuline
kDa	Kilodaltons
KO	'Knock out'
LB	Milieu Luria Bertani
LB-EBV	Lymphocytes immortalisés par le virus d'Epstein-Barr
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NE	Nombre d'événements
NBT	Nitrobleu de Tétrazolium
O_2^-	Ions superoxyde
pb	Pair de bases
PE	phycoérythrine
PBS	Tampon phosphate isotonique « Phosphate Buffer Saline »
PCR	'Polymerase chain reaction'
phox	Phagocyte oxidase
PMA	Phorbol myristate acétate
PMSF	Phényl méthyl sulfonyl fluorure
PN	Polynucléaires neutrophiles
p/v	Poids pour volume
RLU	Relative Luminescent Unit
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel polyacrylamide en présence de SDS
SOD	Superoxyde dismutase
SVF	Sérum de veau fœtal
TAE	Tampon « Tris- Acétate -Borate »
TCLK	Nα-p-Tosyl-L-Lysyl-Chlorométhyléthylène diamine
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	Ultra-violet
v/v	volume pour volume
WT	« Wild type » ou sauvage
WB	Western blot

Première partie :

Introduction et étude bibliographique

Introduction

1. La phagocytose et le métabolisme oxydatif du neutrophile

Les cellules phagocytaires (principalement les polynucléaires neutrophiles mais également les éosinophiles, monocytes et macrophages) sont impliquées dans la réponse immunitaire non spécifique de l'hôte contre les agents pathogènes. Ce mécanisme de défense fait intervenir une enzyme : la NADPH oxydase qui permet la production d'ions superoxyde et de dérivés toxiques de l'oxygène capables de détruire les microorganismes phagocytés. Lors d'une infection, les polynucléaires neutrophiles circulants sont attirés vers le foyer infectieux par chimiotactisme, par des composés comme le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) provenant de la destruction des parois bactériennes, le composant C5a du complément, l'interleukine IL8, le facteur d'activation plaquettaire (PAF) ou les leukotriènes (LT). Ces composés pénètrent dans les capillaires sanguins et se fixent à des récepteurs spécifiques des phagocytes. Ces récepteurs ont la particularité d'être organisés en sept domaines transmembranaires et sont couplés à une protéine G trimérique (Pour revue, Morel *et al.* 1992a). Les neutrophiles adhèrent aux cellules endothéliales, traversent l'endothélium par diapédèse et remontent le gradient chimiotactique jusqu'au foyer infectieux. Grâce à l'émission de pseudopodes qui entourent et captent les micro-organismes, ils phagocytent ces agents pathogènes dans une vésicule de phagocytose : le phagosome. Dans le même temps, la NADPH oxydase est activée et la production de dérivés toxiques de l'oxygène (ROS) débute. Les bactéries internalisées sont alors détruites par les dérivés des ions superoxyde et par des enzymes lytiques provenant des granules intracytoplasmiques des neutrophiles (Figure 1).

La NADPH oxydase est responsable de l'explosion respiratoire, caractérisée par une brusque augmentation de la consommation d'oxygène dans la cellule. Cette enzyme est un système de transfert d'électrons qui catalyse la réduction de l'oxygène en ions superoxyde en utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) :

$$\mathbf{NADPH + 2\ O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + 2\ O_2^{\cdot -}}$$

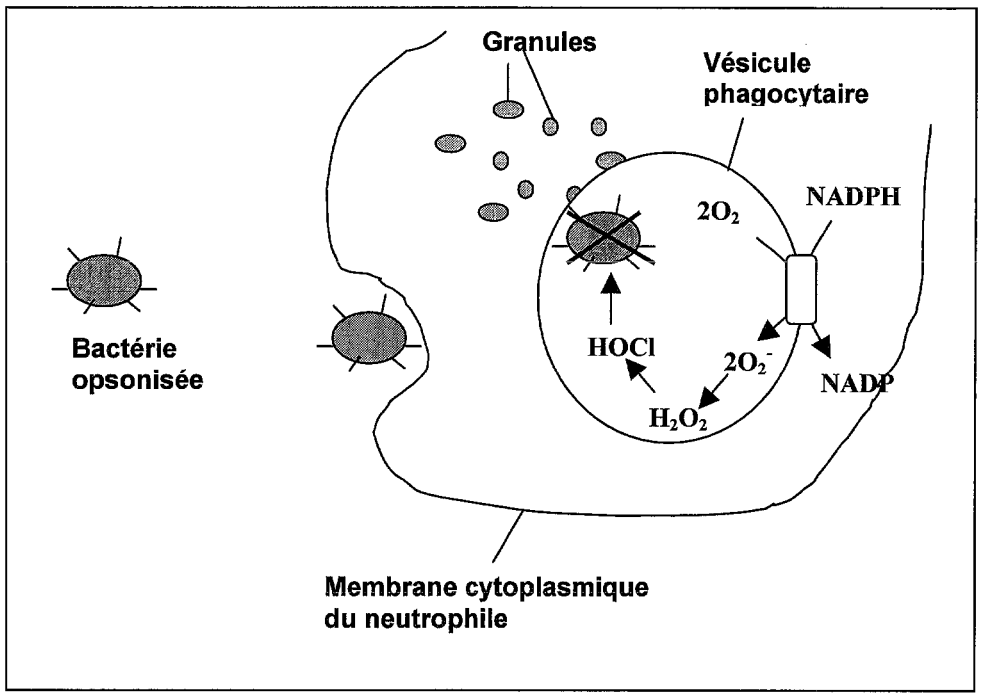


Figure 1: Phagocytose des bactéries et explosion respiratoire dans les polynucléaires neutrophiles (Morel *et al.* 1992)

Les ions superoxyde sont instables et sont transformés en composés bactéricides (ROS). Ils subissent une dismutation soit spontanée, soit sous l'action de la superoxyde dismutase (SOD) aboutissant à la formation de peroxyde d'hydrogène:

$2\ O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$

La myéloperoxydase (MPO) des polynucléaires neutrophiles catalyse ensuite la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et les anions chlorures qui aboutit à la formation des ions hypochlorites :

$ClO^- + H_2O_2 \rightarrow Cl^- + H_2O + {}^1O_2$

L'acide hypochloreux réagit avec des amines pour former des chloramines hautement toxiques :

$HOCl + RNH2 \rightarrow RNHCl + H_2O$

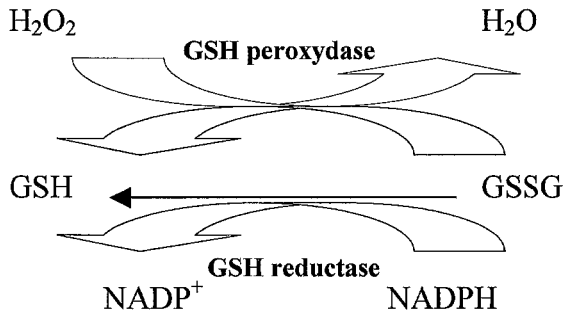
La reaction d'Haber-Weiss produit des radicaux hydroxyls et de l'oxygène singulet (${}^1O_2$). La présence de métaux (Fe^{3+}) est nécessaire pour que la réaction ait lieu:

$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow {}^1O_2 + 2OH^{\cdot} + OH^-$

La catalase et la glutathion peroxydase (GSH) sont des enzymes de détoxification qui permettent de réguler ce système afin d'éviter l'accumulation dans la cellule de dérivés toxiques de l'oxygène tel que le peroxyde d'hydrogène.

catalase

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$



2. La NADPH oxydase

2.1 Structure de la NADPH oxydase

La NADPH oxydase est un complexe multiprotéique enzymatique constitué d'un élément redox, le cytochrome b_{558} situé dans la membrane plasmique et de facteurs cytosoliques (p47*phox*, p67*phox*, p40*phox*) localisés dans le cytoplasme des phagocytes au repos. Lors de la stimulation du neutrophile, il y a translocation des facteurs cytosoliques vers la membrane où ils s'associent au niveau du cytochrome b_{558}, ce qui aboutit à la configuration active de l'enzyme (Vignais 2002). Cette activation fait également intervenir deux petites protéines G : Rac1/2 (Abo *et al.* 1991) et Rap1A (Bokoch *et al.* 1991).

Le complexe NADPH oxydase est également retrouvé dans d'autres types cellulaires : les lymphocytes B (Volkman *et al.* 1984 ; Morel *et al.* 1993), les cellules endothéliales (Gorlach *et al.* 2000) et les ostéoclastes (Yang *et al.* 2001).

2.1.1 Le cytochrome b_{558}

Il est composé de deux sous-unités : gp91*phox* (gp : glycoprotéine et *phox* : phagocyte oxydase) ou chaîne lourde (sous unité β) rebaptisée Nox2 depuis 1999, et p22*phox* ou chaîne légère (sous unité α). Ce cytochrome contient deux molécules d'hème, possèdant chacun un atome de Fer, qui permettent le transfert d'électrons (Figure 2). Ils sont fixés à gp91*phox* (Cross *et al.* 1995) par des liaisons engageant quatre résidus Histidine situés sur les hélices III et V (Biberstine-Kinkade *et al.* 2001). Les deux hèmes ont un potentiel redox standard de Em=-225mV et Em=-265mV. Le transfert d'électrons est associé à un transfert de protons qui permet de compenser l'accumulation des charges négatives. La localisation de ce canal à protons est controversée (Maturana *et al.* 2001 ; Morgan *et al.* 2002).

- La protéine gp91*phox* de 570 acides aminés est codée par le gène *CYBB* comportant 13 exons et localisé sur le bras court du chromosome X (Xp21.1) (Royer-Pokora *et al.* 1986). Cette protéine est constituée de six hélices transmembranaires situées du côté N-terminal. Le côté C-terminal, situé dans le cytoplasme, contient les sites de liaison pour le FAD et NADPH (Segal *et al.* 1992). Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur de 65KDa partiellement glycosylé dans le réticulum endoplasmique. Elle subit ensuite une maturation dans l'appareil de Golgi pour devenir une protéine hautement glycosylée de 91KDa (Porter *et al.* 1996 ; Yu *et al.* 1997). Cette maturation nécessite la présence de la protéine p22*phox* qui permet la stabilité réciproque des deux protéines.

- La protéine p22*phox* de 195 acides aminés est codée par le gène *CYBA* comportant 6 exons et situé sur le bras long du chromosome 16 (16q24) (Dinauer *et al.* 1990). Elle comporte deux domaines transmembranaires. L'ARNm de p22*phox* est exprimé dans de nombreuses cellules (Cheng *et al.* 2001), contrairement à gp91*phox*. C'est pour cette raison que dans les cellules COS7 et HEK293 qui contiennent l'ARNm de p22*phox*, l'activation de gp91*phox* a lieu sans transfection préalable de l'ADNc p22*phox* (Takeya *et al.* 2003). La protéine p22*phox* est également largement exprimée dans de nombreux types cellulaires (Parkos *et al.* 1988).

  Lors de l'activation du complexe, la région C terminale riche en proline (PRR) de p22*phox* interagit avec le domaine SH3 de la protéine p47*phox* préalablement phosphorylé (De Leo *et al.* 1996a).

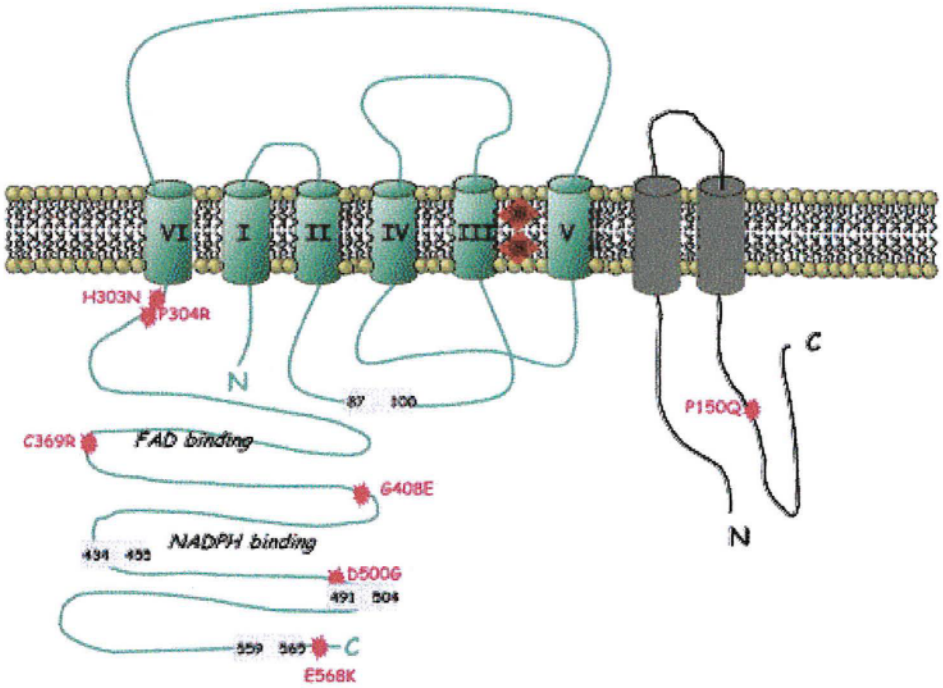


Figure 2 : Structure du cytochrome b_{558} (d'après Nauseef, 2004). En vert, la protéine gp91*phox* avec les 6 domaines transmembranaires, en gris, la protéine p22*phox*. Les carrés rouges symbolisent les deux hèmes situés entre les hélices III et V (liaisons histidines 101, 115, 209, 222). Les étoiles rouges représentent certaines mutations retrouvées chez des patients atteints de CGD X^+, empêchant l'assemblage du cytochrome b_{558}. Les rectangles indiquent les régions impliquées dans l'assemblage du complexe.

2.1.2 Les facteurs cytosoliques

- La protéine p67*phox* de 526 acides aminés est codée par le gène *NCF2* (Neutrophil Cytosolic Factor) comportant 16 exons et situé sur le chromosome 1 (1q25) (Leto *et al.* 1990). Cette protéine contient deux domaines similaires dans sa partie C terminale, caractérisés par une forte identité de séquence avec le domaine régulateur SH3 (*Src homology 3*) présent dans le produit de l'oncogène *Src* (Leto *et al.* 1990). Ces domaines SH3 entourent un motif « *phox* and Bemp1 domain » (PB1) responsable de l'interaction avec le domaine « *phox* and cdc domain » (PC) de p40*phox* dans les cellules au repos (Figure 3). Quatre motifs TPR (tetra peptide repeat) sont présents et seraient une cible pour Rac (Koga *et al.* 1999). Enfin, un motif polyproline (PRR) permet le contact avec le domaine SH3 de p47*phox*. Contrairement à la protéine p47*phox*, la présence de p67*phox* est indispensable pour reconstituer une activité oxydase (Vergnaud *et al.* 2000). En effet,

cette protéine est indispensable au transfert d'électrons, c'est pour cette raison qu'elle appartient à la famille des NOXA (Nox Activator) (Cross *et al.* 2004).

Figure 3 : Structure de la protéine p67*phox* (d'après Nauseef, 2004). L'extrémité N-terminale contient quatre TPR suivis d'un domaine (acides aminés 170-199) qui subit une modification conformationnelle lors de l'attachement de Rac GTP (étoile rouge). Le domaine d'activation, essentiel pour l'assemblage du complexe, est symbolisé par le symbole violet. Le domaine PRR est suivi de deux domaines SH3 entourant le domaine PB1.

- La protéine p47*phox* de 390 acides aminés est codée par le gène *NCF1* situé sur le bras long du chromosome 7 (7q11.23) (Lomax *et al.* 1989). Elle comporte deux domaines SH3 (qui interagissent avec les PRR de p22*phox*), un domaine PX (*phox* homology domain) capable de se lier aux phosphatidyl inositols, un domaine AIR (autoinhibitory region) contenant de nombreux sites de phosphorylation (sérines) et une région riche en proline (PRR) dans la partie C terminale (Figure 4). Le domaine PX contient le motif PXXP qui interagit avec le SH3 de p47*phox* (Hiroaki *et al.* 2001). Cette interaction ainsi que les interactions intramoléculaires entre le SH3 et le domaine AIR empêchent ainsi la liaison de PX aux phosphatidyl inositols dans la cellule au repos (Ago *et al.* 1999). P47*phox* est responsable du transport des facteurs cytosoliques à la membrane lors de l'activation du complexe oxydase. En l'absence de p47*phox*, p67*phox* ne migre pas à la membrane alors qu'en l'absence de p67*phox*, p47*phox* s'assemble au cytochrome b_{558} (Heyworth *et al.* 1991). p47*phox* stabilise et organise le complexe oxydase, elle est appelée NOXO (Nox organizer) (Cross *et al.* 2004).

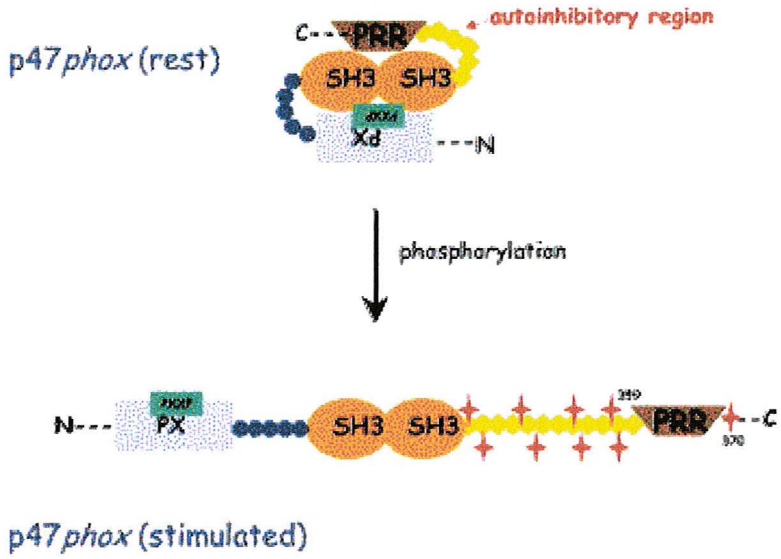


Figure 4 : Structures de la protéine p47*phox*, dans la cellule au repos et à l'état activé (d'après Nauseef, 2004). Les étoiles rouges symbolisent les résidus sérines phosphorylés lors de l'activation.

- La protéine p40*phox* de 337 acides aminés est codée par le gène *NCF3* situé sur le bras long du chromosome 22 (22q13) (Someya *et al.* 1993). Elle présente également un domaine PX, un domaine SH3 et un domaine PC interagissant avec p67*phox* (Figure 5). Sa fonction est controversée, considérée par certains comme un régulateur positif (Kuribayashi *et al.* 2002) et par d'autres comme un régulateur négatif du complexe oxydase (Sathyamoorthy *et al.* 1997). Un article récent (Lopes *et al.* 2004) démontre que la forme phosphorylée de p40*phox* conduit à l'inhibition de la NADPH oxydase. p40*phox* pourrait augmenter l'affinité entre p47*phox* et le cytochrome b_{558} en facilitant le changement conformationnel de p47*phox* (Cross *et al.* 2004).

Figure 5 : Structure de la protéine p40*phox* (d'après Nauseef 2004).

- Plusieurs protéines G monomériques interagissent avec le complexe oxydase : les protéines Rac 1 (ubiquitaire) et Rac 2 (présente dans les cellules de la lignée myeloïde et majoritaire dans les neutrophiles) (Abo *et al.* 1991) ainsi que la protéine Rap1A, dont le rôle est controversé. Rac contient trois régions : la région effectrice ou switch I qui subit un changement conformationnel lors de la liaison à GTP, la région switch II et la région

d'insertion qui est engagée dans plusieurs liaisons intra moléculaires, avec le cytochrome b_{558} notamment (Nisimoto *et al.* 1997). Dans la cellule au repos, Rac est associé à Rho-GDI dans le cytosol de la cellule et se trouve sous sa forme inactive Rac-GDP. Lors de l'activation, Rac échange le GDP contre un GTP sous l'action d'une GEF membranaire (Guanine nucleotide exchange factor) (Bokoch *et al.* 1994). Rac GTP est la forme active et peut interagir via son domaine switch I, avec le TPR (côté N terminal) de la protéine p67*phox* lors de l'activation et l'assemblage du complexe oxydase (Figure 6) (Koga *et al.* 1999). Rac, comme p47*phox* a une fonction « d'adaptateur » en constituant une zone d'interactions entre le cœur catalytique, le cytochrome b_{558} et p67*phox* (Nauseef, 2004).

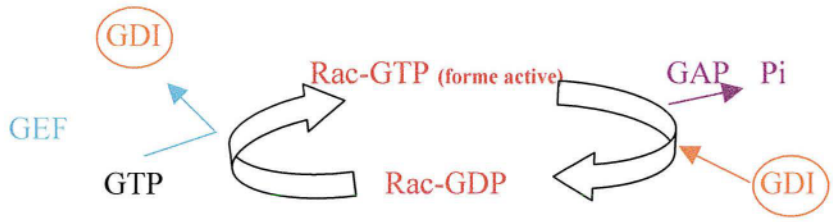


Figure 6 : Schéma de l'activation de Rac. (Bokoch, 1995). Rac-GTP est la forme active de Rac. Les protéines GAP (GTPase activating protein) inhibent la production d'ions superoxyde en système acellulaire en stabilisant Rac sous sa forme inactive (Rac-GTP). Sous l'influence des GEF, l'équilibre Rac GDP/GTP participe au contrôle de l'activité NADPH oxydase.

Depuis 1999, la famille des protéines Nox , analogues de gp91*phox* (Nox 2) s'est élargie. La première isoforme est nommée Nox1 (Suh *et al.* 1999) : elle est principalement retrouvée au niveau du colon. Les découvertes d'autres isoformes ont suivi : Nox 3, analogue de Nox 2, est localisée surtout dans les rein fœtaux, Nox 4 (Geiszt *et al.* 2000) est localisée au niveau rénal et enfin Nox 5 (Cheng *et al.* 2001) est retrouvée dans la rate et les spermatozoïdes.

Plus récemment, des protéines homologues des facteurs cytosoliques p47*phox* et p67*phox* - respectivement NOXO1 et NOXA1 - ont été décrites (Banfi *et al.* 2003). Elles participent à l'activation de Nox1 et donc, à la production d'ions superoxyde dans les cellules épithéliales du colon.

2.2 Activation et assemblage de la NADPH oxydase

L'activation du système débute par la liaison des agents stimulants libérés lors de l'infection (fMLP, C5a du complément, PAF, LTB4, IL8) à un récepteur (couplé aux protéines G) de la membrane plasmique des neutrophiles. La fixation de ces agents induit un changement conformationnel de la protéine G trimérique qui fixe alors le GTP et se dissocie en α-GTP (Figure 7).

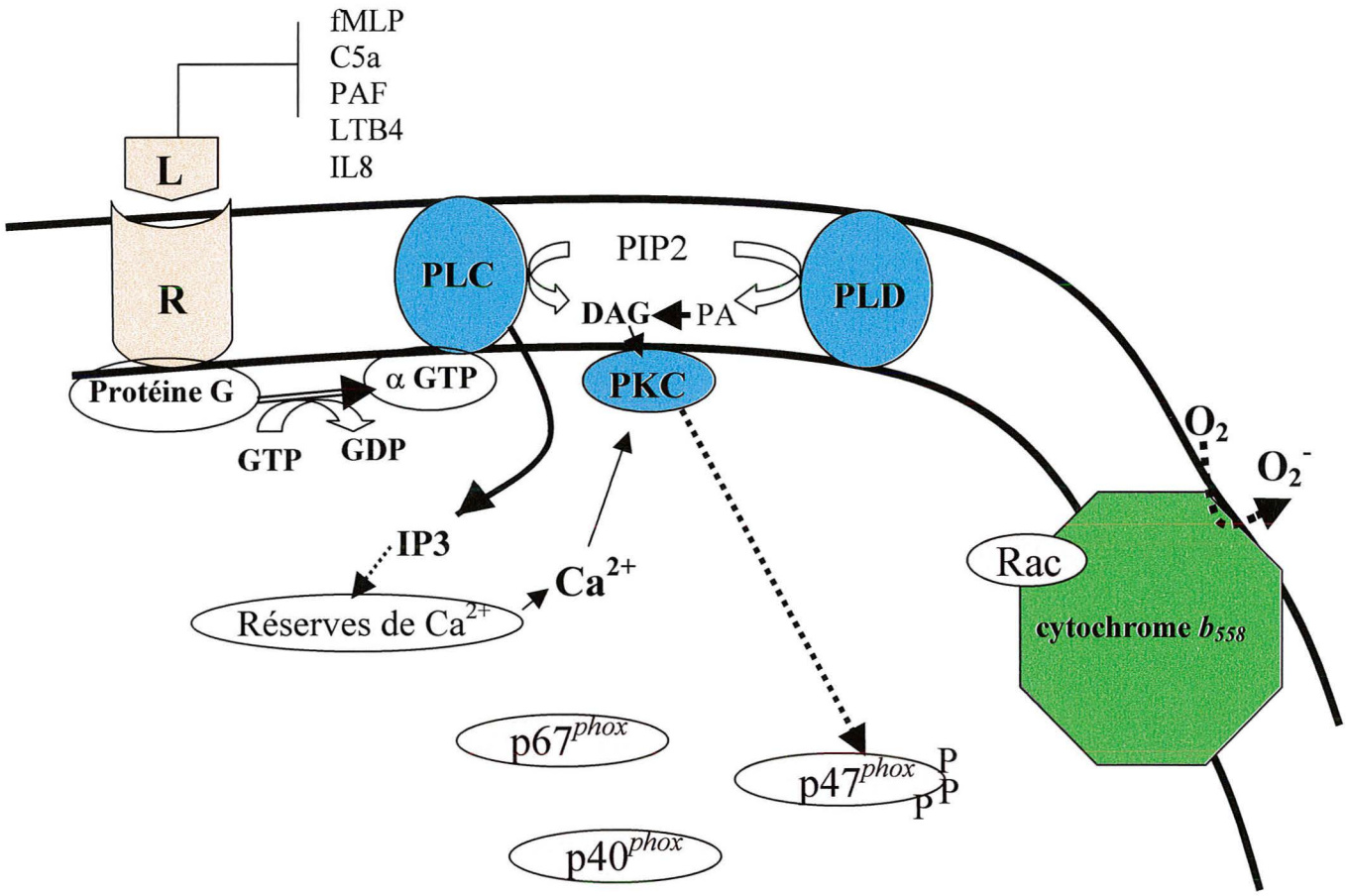


Figure 7 : Cascade de réactions permettant l'activation du complexe oxydase

L'α-GTP active ensuite la Phospholipase C (PLC) localisée sur la membrane plasmique et spécifique du phosphatidylinositol 4-5 biphosphate (PIP2). Le PIP2 est clivé en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP3) (Pour revue, Morel *et al.* 1992). L'activation de la PLC (précoce et transitoire) est relayée par l'activation de la Phospholipase D qui phosphoryle l'acide phosphatidique (PA) en DAG. L'IP3 active le relargage du calcium (Ca^{2+}) des réserves intracellulaires. L'augmentation du calcium cytosolique favorise la migration de la protéine

kinase C (PKC) vers la membrane plasmique où le DAG va l'activer. Une fois activée, la PKC phosphoryle la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2) ainsi que p47*phox*. L'augmentation du calcium intracellulaire associée à la phosphorylation de la cPLA2 permet la production d'acide arachidonique. Les phosphorylations des résidus sérines 379, 303/304 et 359/370 de p47*phox* aboutissent à la rupture des liaisons intramoléculaires et démasquent le site SH3 engagé dans la liaison à la région riche en proline de p22*phox* (Babior, 1999 ; De Leo *et al.*, 1996b). Cette interaction est essentielle et permet ensuite l'attachement de p67*phox* au cytochrome b_{558}. Une cascade de réactions intracellulaires aboutit à l'activation du complexe oxydase qui se traduit par la migration et l'assemblage des facteurs cytosoliques au niveau du cytochrome b_{558} de la membrane plasmique (Ago *et al.* 1999) (Figure 8).

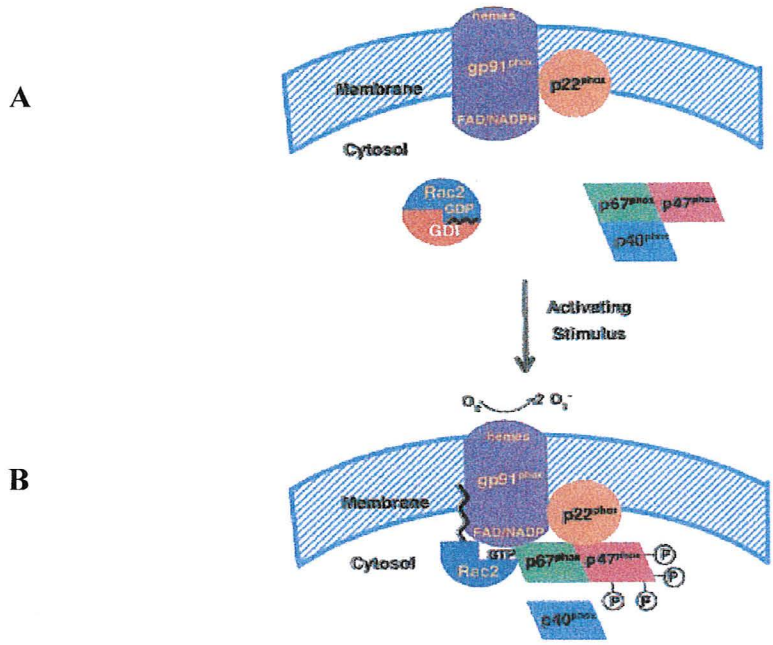


Figure 8 : Mécanismes d'assemblage de la NADPH oxydase (d'après Bokoch *et al.* 2002). **A** : Le complexe NADPH oxydase est dissocié dans les cellules au repos. p47*phox*, p67*phox* et p40*phox* forment un trimère localisé dans le cytosol. **B** : Après activation, les facteurs cytosoliques migrent à la membrane et s'assemblent au cytochrome b_{558} pour former un complexe actif capable de produire des ions superoxyde ($O2^{-}$). p40*phox* semble alors se dissocier de l'ensemble.

Dans les cellules au repos, les protéines p67*phox*, p47*phox* et p40*phox* sont liées : p67*phox* joue le rôle de pont entre les deux autres protéines (Lapouge *et al.* 2002). Après migration à la membrane, p67*phox* entre en interaction avec Rac (Figure 9).

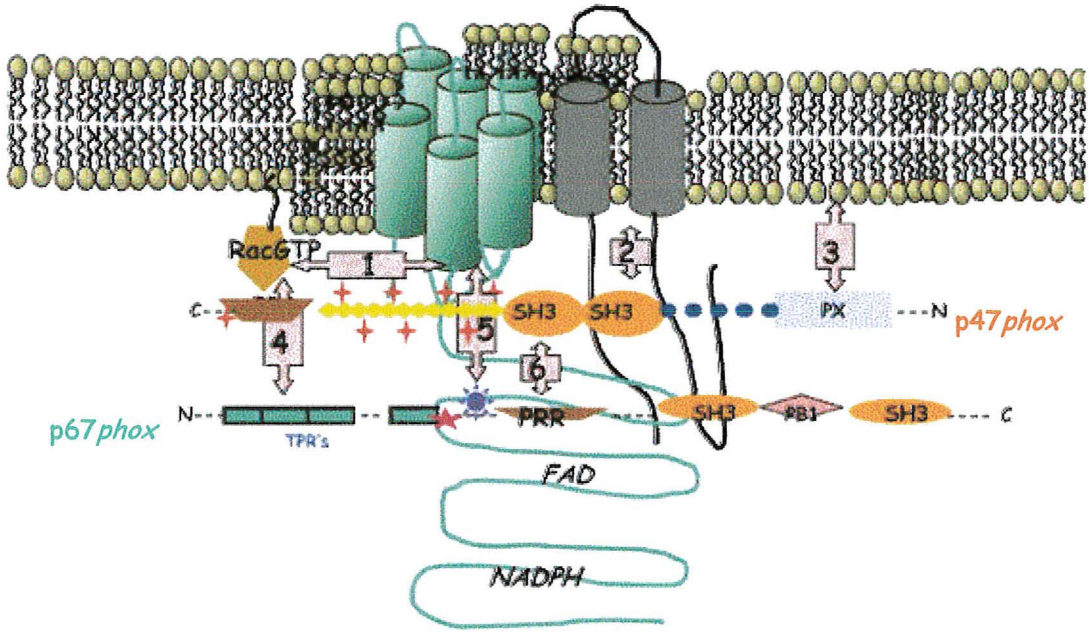


Figure 9 : Interactions moléculaires lors de l'assemblage de la NADPH oxydase (d'après Nauseef, 2004). 1 : Association de RacGTP avec gp91*phox* ; 2 : association de p47*phox* (SH3) avec p22*phox* (PRR) et avec les phosphoinositides membranaires (3) ; 4 : interaction de p67*phox* (TPR) avec Rac GTP, avec gp91*phox* (5) et avec p47*phox* via son PRR.

3. La granulomatose septique chronique

3.1 Généralités

La granulomatose septique chronique (ou CGD) a été décrite pour la première fois en 1959 par Robert Good (Bridges *et al.* 1959). Elle se manifestait chez plusieurs jeunes garçons par des infections sévères accompagnées d'hypergammaglobulinémies, d'adénopathies et de réactions granulomateuses. La CGD est une maladie génétique rare (incidence 1/250000) appartenant à la famille des syndromes d'immuno-déficience [redacted] caractérisés par des infections bactériennes et fongiques récurrentes et sévères.

Le diagnostic est établi avant l'âge d'un an dans 70% des cas. La CGD est due à un défaut dans un des quatre gènes *CYBB, CYBA, NCF2, NCF1* codant respectivement pour les protéines gp91*phox*, p22*phox*, p67*phox* et p47*phox* de la NADPH oxydase. On distingue les CGD récessives liées à l'X (CGD X), dues à des mutations sur le gène *CYBB* et les autres formes autosomiques récessives (CGD AR) liées à un défaut génique sur *CYBA*, *NCF1* et *NCF2* (Tableau I). Actuellement, un seul cas de déficience immunitaire dont les signes cliniques sont apparentés à ceux d'une CGD et liée à une mutation du gène de Rac 2 a été décrit (Ambruso *et al.* 2000). Il s'agissait d'une mutation de l'acide aminé en position 57 (Asp57Asn) qui aboutissait à une diminution de la fixation du GTP. À ce jour, aucune CGD liée à un défaut du gène *NCF3* situé sur le chromosome 22 en 22q13 et codant pour p40*phox*, n'a été identifiée (Zhan *et al.* 1996).

3.2 Manifestations cliniques

La CGD doit son nom à la présence de foyers inflammatoires de type granulomateux dans les différents parenchymes. Les granulomes résultent de la fusion des macrophages ayant séquestrés les bactéries non détruites (Goldblatt *et al.* 2000). En effet, la phagocytose a lieu dans ces cellules mais l'activité de la NADPH oxydase est abolie (la production des ions superoxyde est inexistante) ce qui rend la destruction des microorganismes impossible. Il s'en suit la formation de cellules géantes polynucléées d'aspect pseudo tumoral (Figure 10).

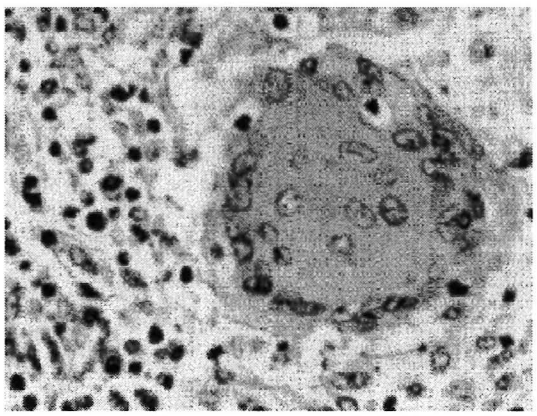


Figure 10 : Photo, en microscopie électronique, d'un granulome du tissu pulmonaire (extraite de www. magicbydesign.com)

Les foyers infectieux se localisent souvent au niveau des poumons, des ganglions, de la peau, du foie, du tractus gastro-intestinal , des os des bras et des jambes et de la sphère ORL (Winkelstein *et al.* 2000). Ils se manifestent surtout par des adénites, des pneumopathies, des otites, des sinusites à répétition, des abcès hépatiques, des ostéo-arthrites ou des ostéomyélites. Des localisations digestives peuvent entraîner des diarrhées ou des sténoses du tractus digestif.

Les germes généralement en cause expriment une catalase capable d'éliminer le peroxyde d'hydrogène, ce qui empêche la destruction des microorganismes par les phagocytes. *Staphylococcus* (*aureus* ou *epidermidis*) est responsable de 26% des abcès (cutanés, périrectaux, hépatiques) et de 14% des adénites suppurées. *Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus* et *nidulans,* qui est d'ailleurs principalement retrouvé chez les patients CGD) est le plus souvent rencontré dans les infections pulmonaires (33% des cas contre 9% pour *Staphylococcus*)(Johnston *et al.* 2001). Avec un taux de mortalité de 30%, l'aspergillose invasive est la première cause de décès chez les patients atteints de CGD (Segal *et al.* 2000). Les signes cliniques observés ne sont pas typiques des aspergilloses invasives : un tiers des patients sont asymptomatiques et 20% sont fébriles, au moment du diagnostic. Les signes radiologiques montrent un infiltrat pulmonaire et de nombreuses lésions. La biopsie pulmonaire permet d'observer les filaments mycelliens intacts, fixant les neutrophiles incapables de les détruire. Dans certains cas, l'aspergillose pulmonaire à *Aspergillus nidulans* peut s'étendre à d'autres organes : le système nerveux central, la colonne vertébrale ou la peau sont souvent concernés (Segal *et al.* 1998).

Enfin, *Serratia* species, *Nocardia* species et *Burkhoderia cepacia* sont les autres pathogènes fréquemment retrouvés.

Il est à noter que les manifestations cliniques sont souvent plus sévères chez les patients atteints de CGD X (prévalence plus élevée des abcès périrectaux, des adénites suppurées et des septicémies) et que la mortalité est plus élevée dans ce groupe (Winkelstein *et al.* 2000) par rapport aux patients atteints de CGD AR.

Enfin, d'autres manifestations non infectieuses peuvent exister chez ces patients telles que des manifestations inflammatoires (granulomes) et auto-immunes (lupus érythémateux disséminé...).

3.3 Les différentes formes de CGD

3.3.1 Présentation

Protéine affectée	Gènes	Dénomination	Transmission	Localisation chromosomique	Fréquence
gp91*phox*	*CYBB*	CGD X° CGD X^- CGD X^+	Récessive lié à l'X	Xp21.1	50% 3% 3%
p22*phox*	*CYBA*	CGD A22° CGD $A22^+$	Récessive autosomique	16q24	5%
p67*phox*	*NCF2*	CGD A67° CGD $A67^+$	Récessive autosomique	1q25	5%
p47*phox*	*NCF1*	CGD A47°	Récessive autosomique	7q11.23	33%

Tableau I : Les différentes formes de CGD.

Les CGD X°, A22°, A47° et A67° sont caractérisées par l'absence d'expression de la protéine mutée, associée à une activité NADPH oxydase totalement abolie.
Dans les formes CGD X^-, le cytochrome b_{558} est présent mais en quantité diminuée et l'activité de la NADPH oxydase est très réduite ou nulle. Ce type de CGD X^- peut être dû à des mutations ponctuelles dans la partie codante du gène *CYBB* (Roos *et al.* 1996) ou dans sa région promotrice (Stasia *et al.* 2003).

Les CGD X^+ sont des formes très rares (3%), résultant généralement d'une mutation faux sens dans les exons du gène *CYBB*, entraînant une expression normale de gp91*phox* associée à une activité NADPH oxydase totalement abolie. Ainsi l'étude des conséquences fonctionnelles des mutations de la protéine gp91*phox* est particulièrement intéressante pour comprendre les mécanismes d'activation et d'assemblage du complexe NADPH oxydase (Leusen *et al.* 2000 ; Stasia *et al.* 2002a). Seulement deux cas de CGD AR^+ ont été décrits à ce jour (Leusen *et al.* 1994, Leusen *et al.* 1996).

3.3.2 Les CGD autosomales récessives

Les formes autosomiques récessives de CGD sont rares (Tableau I). Elles sont caractérisées par l'absence d'un des deux facteurs cytosoliques (p47*phox* ou p67*phox*) de la NADPH oxydase ou de la petite sous unité du cytochrome b_{558}, p22*phox* (Goldblatt *et al.* 2000).

3.3.2.1 La CGD A47°

La CGD A47° est la deuxième en ordre de fréquence après la CGD X°: elle représente 33% des cas diagnostiqués. La même mutation sur le gène *NCF1* est retrouvée dans 90% des cas: il s'agit d'une délétion de deux nucléotides dans une répétition de GTGT située à une jonction intron-exon (début de l'exon 2) qui conduit à l'apparition d'un codon stop au niveau de l'acide aminé 51 (Volpp *et al.* 1993 ; Casimir *et al.* 1993). Un pseudogène de p47*phox* a été décrit : il porte la même délétion GT au début de l'exon 2 que celle identifiée chez les CGD 47°. Il a été démontré qu'une probable recombinaison entre les deux gènes est à l'origine de la délétion observée (Roesler *et al.* 2000), ce qui expliquerait la fréquence plus élevée de cette forme par rapport aux autres formes autosomales récessives.

3.3.2.2 La CGD A67

La CGD A67°, plus rare, constitue 5% des cas de CGD. Actuellement, 17 mutations ont été décrites dont 13 sont chacune spécifique d'une seule famille (Cohen-Tanugi *et al.* 1995). Une double mutation dans le gène *NCF2* (Asp160Val ; Lys161Glu) a également été décrite chez un patient atteint de CGD A67° (Bonizzato *et al.* 1997).

Une seule forme de CGD A67$^+$ a été décrite (Leusen *et al.* 1996), il s'agit d'une double délétion. L'analyse de l'ADNc a mis en évidence une première délétion de trois nucléotides (AAG en position 172-174) qui conduit à la délétion d'un résidu Lysine en position 58 dans la protéine p67*phox* et une autre délétion de 11 à 13 kb pour laquelle on ne retrouve pas de protéine, située sur l'autre allèle du gène. La protéine est synthétisée normalement mais la mutation empêche l'interaction de p67*phox* avec Rac1. Celle-ci interagirait avec les 199 premiers acides aminés de p67*phox*. La Lysine 58, située dans un des domaine TPR de p67*phox*, serait donc un site de liaison pour la protéine Rac ou serait un acide aminé important pour maintenir la partie N-terminale de p67*phox* dans la conformation adaptée à la liaison avec Rac1. L'absence d'interaction entre p67*phox* et Rac1 perturberait la translocation des facteurs cytosoliques et donc l'assemblage de la NADPH oxydase. Ainsi, la production d'ions superoxyde est abolie. Ce cas a permis de confirmer que la translocation de la petite protéine G Rac1 dépend de la présence de p47*phox* et de p67*phox*.

3.3.2.3 La CGD A22

Enfin, la CGD A22° est également peu rencontrée puisqu'elle ne représente que 5% des CGD (Winkelstein *et al.* 2000). Vingt deux mutations ponctuelles ont été recensées dans la littérature (Stasia *et al.* 2002b) : il s'agit de délétions (cinq cas), d'insertions (deux cas) ou des mutations (faux sens, non sens etc...) (Rae *et al.* 2000).
Un seul cas de CGD A22$^+$ a été rapporté dans la littérature (Dinauer *et al.*,1990, Leusen *et al.* 1994). Chez ce patient, la mutation du gène codant p22*phox* conduit à la substitution d'un résidu proline par un résidu glutamine en position 156. Cette substitution se situe dans une région riche en proline de la protéine p22*phox* impliquée dans l'interaction avec les domaines SH3 des protéines p47*phox* ou p67*phox*. Ainsi, le défaut de liaison des facteurs cytosoliques avec le cytochrome b_{558} empêche toute activation de la NADPH oxydase.

3.3.3 Les CGD liées à l'X

La CGD liée à l'X est la forme de CGD dont le gène a été caractérisé le premier : il s'agit de la forme la plus fréquente et la plus grave (Baehner *et al.* 1967; Royer-Pokora *et al.* 1986). Les délétions sont les mutations les plus fréquentes à l'origine des CGD liées à l'X. Leur taille peut aller de une seule paire de base à 5000 kb (Roos *et al.* 1996).

La forme dite CGD X° (Tableau I) retrouvée dans 50% des cas, se traduit par l'absence des deux sous-unités du cytochrome b_{558}. En effet, l'absence de gp91*phox* empêche l'expression de p22*phox* puisqu'il existe une auto-stabilisation des deux protéines du cytochrome b_{558} (Yu *et al.* 1997 ; Yu *et al.* 1998).

Dans la forme CGD X^-, qui représente 3% des CGD, le cytochrome b_{558} est présent mais en quantité diminuée et l'activité de la NADPH oxydase est abolie ou très réduite. Les mutations sont situées dans la partie codante du gène *CYBB* ou dans sa région promotrice. Quatre mutations situées dons la région promotrice ont été décrites (Newburger *et al.* 1994 ; Weening *et al.* 2000 ; Stasia *et al.* 2003). Les mutations C52T et C53T empêchent l'expression de la protéine gp91*phox* dans les neutrophiles mais pas dans les éosinophiles qui conservent leur activité oxydase. Par contre, les mutations T55C et A57C sont associées à des formes cliniques graves.

Les CGD X^+ sont des formes très rares (3%), généralement dues à une mutation faux-sens (Roos *et al.* 1996 ; Leusen *et al.* 2000 ; Stasia *et al.* 2002a). Elles sont caractérisées par une expression quantitativement normale de la protéine mais celle ci est non fonctionnelle ; cela se traduit par une activité oxydase abolie. Les cas de $CGDX^+$ sont des outils importants et peuvent être utilisés pour étudier les interactions des protéines du complexe oxydase, l'assemblage du cytochrome b_{558} ou les relations structure/activité des protéines. Les mutations du gène *CYBB* codant pour la protéine gp91*phox* (stable mais non fonctionnelle) sont retrouvées essentiellement au niveau de la région C-terminale, zone fonctionnelle de la protéine.

3.4 Diagnostic de la CGD

Le diagnostic s'effectue en deux temps. Tout d'abord, une analyse fonctionnelle des neutrophiles est réalisée permettant de mettre en évidence leur incapacité à développer une explosion respiratoire, en réponse à un stimulus. Si une anomalie du fonctionnement de la NADPH oxydase est détectée, une étude génétique permet de caractériser le type de CGD.

3.4.1 Diagnostic biochimique

Le diagnostic biochimique consiste à évaluer l'activité NADPH oxydase en mesurant la production d'ions superoxyde des cellules phagocytaires stimulées par des stimuli solubles (PMA, fMLP...) ou particulaires (zymosan, bactéries opsonisées...).

3.4.1.1 Test de phagocytose sur lame et mesure de la réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT)

Ce test semi-quantitatif sur lame est le plus utilisé en routine puisqu'il est très sensible (mais peu spécifique) et ne nécessite qu'une faible quantité de sang (100 à 200 µl). La réaction est basée sur la réduction du NBT par les ions superoxyde. La réduction se traduit par un changement de couleur du NBT (du jaune au bleu) et l'apparition de grains de formazan insolubles bleu foncé dans les cellules phagocytaires. Les cellules normales deviennent bleues alors que les cellules n'ayant pas d'activité oxydase restent jaunes. La lecture du test est faite au microscope.
Bien que ce test ne permette pas de mesurer la quantité d'ions superoxyde produite, il est utile pour tester les hétérozygotes dans le cas des CGD liées à l'X. Ainsi, les femmes vectrices possèdent deux populations de cellules.

Un autre test basé sur ce même principe permet de visualiser simultanément la phagocytose des neutrophiles puisque la réaction s'effectue avec des billes de latex opsonisées et en présence de sérum AB. Au microscope, on peut différencier les neutrophiles capables de phagocyter les billes sans réduire le NBT (neutrophiles de patients CGD) des neutrophiles capables de phagocyter et de réduire le NBT (neutrophiles normaux). Par ce test, on peut détecter les maladies liées à un défaut de phagocytose.

3.4.1.2 Quantification de la production d'ions superoxyde

Test de réduction du cytochrome c

Ce test mesure l'activité oxydase après stimulation des neutrophiles par un agent tel que le PMA. Le milieu PBS contenant les neutrophiles en suspension est mis en incubation avec le cytochrome *c* dans une cuve spectrophotométrique en présence de glucose (shunt des hexoses monophosphates activés). Après activation, la production d'ions superoxyde est proportionnelle

à la réduction du cytochrome *c* ; ceci se traduit par une augmentation d'absorbance à 550 nm (coefficient d'extinction molaire : 21,1 $mM^{-1}.cm^{-1}$). La superoxyde dismutase (SOD) inhibe spécifiquement cette réaction. L'activité oxydase est exprimée en nmol d'$O_2^{\cdot-}$/min/mg protéines.

Test de chimiluminescence

L'explosion respiratoire du neutrophile normal est associée à la génération d'une énergie lumineuse, la chimiluminescence, qui est dépendante de la production d'oxygène singulet ($^1O_2$). L'oxygène singulet est produit par la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et l'hypochlorite en présence de myeloperoxydase (MPO) :

$ClO^- + H_2O_2 \rightarrow Cl^- + H_2O + {}^1O_2$

La lumière émise est mesurée par une détection fluorimétrique appropriée. L'activité oxydase mesurée indirectement est exprimée en RLU. Le luminol est souvent utilisé pour améliorer la sensibilité de la réaction puisqu'il joue le rôle de substrat de l'oxygène singulet.

3.4.1.3 Quantification de la production de peroxyde d'hydrogène par cytométrie en flux

Cette technique semi-quantitative permet d'étudier un grand nombre de cellules. Les cellules phagocytaires sont incubées avec l'acétate de dichlorofluorescéine (DCFH-DA) capable de pénétrer dans le cytosol des cellules où il est clivé par les estérase en DCFH. Les cellules activées produisent du peroxyde d'hydrogène qui oxyde le DCFH en dichlorofluorescéine (DCF) émettant une fluorescence dans le vert à 530 nm, après excitation à 488 nm. Cette technique permet de visualiser l'état d'activation de chaque cellule ; elle est particulièrement utile pour déterminer la présence de deux populations de cellules chez les mères hétérozygotes des CGDX.

3.4.2 Diagnostic moléculaire

Généralement, le type de transmission de la CGD est déterminé par :

- le sexe de l'enfant atteint. S'il s'agit d'une fille, une forme autosomale récessive est suspectée.
- les valeurs de l'activité oxydase des neutrophiles de la mère. Dans les formes liées à l'X, l'activité est généralement diminuée de moitié.
- les résultats du Western Blot qui mettent en évidence la protéine manquante.

Puis l'étude de l'ADN génomique et des ARN permet de caractériser l'anomalie génétique en cause. En effet, la mutation à l'origine de la CGD suspectée est en premier lieu recherchée dans l'ARNm du patient. L'extraction des ARN messagers puis la RT-PCR permettent d'obtenir les ADN complémentaires (ADNc). Les ADNc et les ADN génomiques (ADNg) sont amplifiés par PCR puis séquencés afin de détecter les mutations. Ces techniques sont couramment utilisées pour identifier les mutations. De plus, les LB des membres de la famille du patient sont d'un grand intérêt : ils sont immortalisés et la recherche des mutations familiales peut-être facilement entreprise. La découverte de mutations permet de dresser un arbre généalogique de la maladie et d'identifier les individus hétérozygotes méconnus.

3.4.2.1 Western Blot

Cette technique semi quantitative permet de visualiser la présence ou non des différentes protéines du complexe oxydase grâce à des anticorps spécifiques. Les neutrophiles sont homogénéisés par des méthodes chimiques et physiques puis l'extrait soluble Triton X100 1% est préparé. Il contient toutes les protéines solubilisées à l'exception des protéines du cytosquelette. Dans un premier temps, les protéines sont séparées grâce à une électrophorèse dénaturante (SDS PAGE) puis sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Dans un second temps, les anticorps primaires dirigés spécifiquement contre les protéines du complexe oxydase sont mis en contact avec cette membrane (Towbin *et al.* 1979). Enfin, la présence des Ac primaires -fixés aux protéines d'intérêt- est mise en évidence grâce à un Ac secondaire. La révélation peut se faire par deux techniques. Si l'Ac secondaire est couplé à la phosphatase alcaline, une réaction enzymatique -avec apparition d'une bande bleue sur la membrane, après addition des substrats de l'enzyme : NBT et BCIP - révèlera la présence de la protéine d'intérêt. Lorsque l'Ac secondaire est couplé à la peroxydase, une réaction de chimiluminescence permettra de visualiser la protéine, par contact de la membrane avec un film photographique sensible aux rayons X. Le déficit d'une des protéines du complexe se traduit par l'absence de bandes en présence de l'Ac primaire (dirigés contre gp91*phox* ou p22*phox* ou p47*phox* ou p67*phox*). Rappelons que le cytochrome b_{558} est formé des deux sous-unités gp91*phox* ou p22*phox* et que l'absence d'expression de l'une des sous-unités entraîne l'absence de la seconde sous-unité. Ainsi, la Western Blot révèlera l'absence des deux sous-unités mais permettra uniquement de révéler un défaut global au niveau du cytochrome b_{558} global.

3 4 2 2 Spectre d'absorption du cytochrome b_{558}

Cette méthode permet de mesurer la quantité de cytochrome b_{558} contenu dans les membranes des neutrophiles. A partir du même extrait soluble Triton X100 1% utilisé précédemment, le spectre différentiel du cytochrome b_{558} réduit (par le dithionite) contre oxydé est lu entre les longueurs d'ondes 400 et 650 nm, au spectrophotomètre. Le spectre différentiel redox, spécifique du cytochrome b_{558}, est caractérisé par la présence de trois bandes d'absorption α, β, et γ situées respectivement aux longueurs d'onde : 558 nm, 530 nm et 426 nm.

3.4.2.3 Etude des ARN messagers (ARNm)

Le Northern Blot

Cette technique permet d'étudier la transcription du gène codant la synthèse de la protéine atteinte et donne une estimation semi-quantitative des ARN messagers (ARNm) correspondants. Les ARN totaux des neutrophiles sont extraits puis séparés en gel d'agarose. Ils sont transférés sur une membrane et hybridés avec une sonde marquée, spécifique de l'ARNm recherché. La révélation se fait par autoradiographie sur laquelle on observe une ou plusieurs bandes dont le nombre, la taille et l'intensité sont des indications qualitatives importantes.

La RT-PCR

Dans l'étude génétique de la CGD, il est nécessaire de rechercher, dans un premier temps, le défaut génique au niveau de la partie codante de l'ARNm car on ignore généralement, à l'exception de la mutation du gène *NCF1* à l'origine de la CGD AR47°, la localisation de la mutation en cause. La RT-PCR permet de visualiser directement une délétion ou une insertion importante au niveau de la partie codante de l'ARNm. Les mutations ponctuelles sont mises en évidence uniquement après séquençage de l'ADNc.

Dans un premier temps, l'ADNc simple brin est synthétisé à partir de l'ARNm par transcription reverse. Puis, le brin complémentaire est synthétisé par une ADN polymérase. Une réaction de PCR permet d'obtenir une quantité suffisante d'ADNc qui est alors soumis à une migration sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium (BET). Le BET s'intercale entre les bases d'ADNc et permet la révélation et l'évaluation de la taille de l'ADNc (par comparaison avec des marqueurs de poids moléculaires). Tout changement de taille de l'ADNc signe une délétion ou une insertion dans sa séquence. L'ADNc amplifié est alors séquencé afin de déterminer exactement la nature de la mutation impliquée dans la maladie.

Après séquençage de l'ADNc, deux cas de figure sont alors envisagés :

- Soit la mutation est localisée dans une partie exonique. Dans ce cas, il est facile, grâce à des amorces spécifiques, d'amplifier la région du gène impliqué pour vérifier l'existence de cette mutation au niveau du génome.
- Soit la taille de l'ADNc amplifié est anormale. Dans ce cas, le défaut génique peut se trouver dans des régions introniques jouxtant les exons. Il faut alors amplifier les séquences introniques du gène.
- Soit aucune mutation n'est mise en évidence dans l'ARNm et donc le problème peut se situer dans le promoteur du gène. Il arrive également que la mutation ne soit pas mise en évidence car probablement située dans des régions introniques influençant la synthèse de l'ARNm.

3.5 Les traitements

Actuellement, la prise en charge des patients atteints de CGD consiste en un traitement prophylactique associant antibiotiques et antifungiques (cotrimoxazole : BACTRIM® et itraconazole ou voriconazole). Une récente étude a d'ailleurs confirmé l'intérêt de l'itraconazole dans la prévention des infections fongiques chez les patients atteints de CGD (Gallin *et al.* 2003). De plus, certaines études démontrent l'utilité de l'interferon γ (IFNγ) utilisé en prophylaxie qui diminuerait la fréquence des infections de 70%. Ce dernier pourrait augmenter la production d'ions superoxyde (Ezekowitz *et al.* 1988). D'autres études, au contraire, ne montrent aucune augmentation de l'expression du cytochrome b_{558}, ni de l'activité oxydase chez les patients CGD traités par IFN γ (Muhlebach *et al.* 1992). L'IFNγ est également capable de stimuler d'autres mécanismes de défense « oxydase indépendants ». En effet, l'IFNγ augmente la production de TNFα et l'expression des molécules du CMH de classe II. L'administration d'IFNγ chez des sujets sains augmente également l'expression du récepteur FcγRI des phagocytes, ce qui favorise le mécanisme de phagocytose (Schiff *et al.* 1997). Une étude prospective a récemment montré que le traitement des patients CGD par l'IFNγ diminue la fréquence des infections ainsi que la mortalité, sans provoquer de toxixité à long terme (Marciano *et al.* 2004).

La prophylaxie antibactérienne et antifongique permet actuellement de grandes périodes de rémission chez les patients qui présentent des infections à répétition. Il faut insister sur

l'importance d'un diagnostic précoce qui permettra l'instauration d'un traitement prophylactique améliorant le pronostic vital de la maladie.

Le traitement symptomatique consiste en un traitement des épisodes infectieux aigüs avec administration d'antibiotiques ou d'antifongiques à fortes doses. Le traitement des complications inflammatoires par les corticoïdes doit être utilisé avec précaution chez des patients dont le risque de contracter des infections, est élevé. Un traitement chirurgical peut parfois être utile lorsque la réaction granulomateuse est particulièrement intense, entraînant une compression ou une obstruction, et lorsqu'un traitement corticoïde est insuffisant.

Une transplantation médullaire allogénique a été récemment proposée dans les formes sévères. Même si elle donne des résultats intéressants, (Ho *et al.* 1996) son utilisation reste encore limitée de par la mortalité et la morbidité des complications liées aux transplantations. (Horwitz *et al.* 2001). Elle est donc indiquée chez les patients qui présentent des infections graves malgré la prophylaxie par les antibiotiques, les antifongiques et l'interféron γ et possédant un donneur HLA compatible. Cependant, la difficulté majeure de ce traitement est la détermination du moment propice pour l'instaurer puisque chaque patient a une évolution clinique différente imprévisible. Certains auteurs ont décrit que des facteurs génétiques pouvaient intervenir dans le profil d'évolution clinique de la maladie (Foster *et al.* 1998) mais sans doute, l'observance du traitement antibiotique prophylactique y joue un rôle prépondérant. Récemment, l'équipe de Fisher (Seger *et al.* 2002) a fait le bilan des greffes effectuées entre 1985 et 2000 en Europe. Parmi les vingt-sept patients greffés (dont vingt-cinq enfants), vingt-cinq ont reçu un greffon d'un membre de la famille HLA compatible, et deux d'un donneur HLA compatible extérieur à la famille. Ces patients présentaient des infections sévères (pulmonaires, hépatiques, osseuses...) et neuf d'entre eux avaient des infections fongiques (huit) ou mycobactériennes (un) résistantes aux traitements. Au total, sept patients ont présenté un syndrome de GVHD (graft-versus-host-disease) aigü (dont quatre sévères entraînant le décès) et trois un GVHD chronique, traité par immunosuppresseurs. Parmi les vingt trois patients greffés, vingt deux ont été soignés ; pour un patient la greffe n'a pas été bénéfique, et il y a eu une reconstitution autologue. Cependant, parmi ces vingt deux patients, dix neuf ont été parfaitement guéris mais le recul n'est que de deux ans en moyenne. Enfin, quatre décès sont survenus chez des patients présentant avanrt la greffe des infections fongiques résistantes aux traitements. Les auteurs tentent de définir le stade clinique de la maladie où la greffe peut être envisagée. Ils recommandent la greffe pour les sujets jeunes (ayant dans leur famille un donneur HLA compatible) présentant des infections à répétition ou des pathologies inflammatoires et n'ayant

pas une bonne observance thérapeutique. Les patients ayant des infections résistantes au traitement ou des pathologies inflammatoires chroniques, auront plus de risque de développer des GVHD post greffe. Ces recommandations encouragent la réalisation de greffes chez les patients CGD mais ces conclusions semblent un peu hâtives étant donné le nombre assez peu élevé de cas et le recul parfois court pour évaluer le devenir des greffés.

La CGD semble être un candidat idéal pour la thérapie génique pour plusieurs raisons (Malech *et al.* 1997) :

- d'une part, les observations cliniques montrent qu'un faible pourcentage de neutrophiles fonctionnels est suffisant pour protéger les patients des infections. En effet, les femmes dites « vectrices » des CGD liées à l'X n'ont parfois que 3 à 5% de neutrophiles fonctionnels, capables de produire des ions superoxyde (Malech *et al.* 1999). De plus, certains auteurs ont montré qu'en mettant en présence des neutrophiles normaux avec des neutrophiles de patients CGD, le peroxyde d'hydrogène -généré par les neutrophiles normaux- diffusait au niveau des cellules déficitaires et restaurait l'activité microbicide dans ces cellules ; il s'agit de l'effet « bystander » (Rex *et al.* 1990).

- d'autre part, les gènes qui codent la synthèse des protéines du complexe oxydase ont tous été identifiés, clonés et séquencés. De plus, la transfection des cellules (PLB985 par exemple) avec l'ADNc du gène défecteux entraîne l'expression de la protéine et rétablit l'activité oxydase du complexe. Un essai clinique de thérapie génique a été réalisé chez des patients atteints de CGD déficitaires en p47*phox*, sans conditionnement de la moelle. Cet essai a consisté à administrer, par voie intraveineuse, des précurseurs CD34+ du sang périphérique transfectés *ex vivo* par un rétrovirus codant la synthèse de p47*phox*. Les résultats se sont avérés prometteurs (Malech *et al.* 1997). Ces derniers résultats seront développés dans l'étude bibliographique (partie 5.3).

Etude Bibliographique :

Les modèles cellulaires d'étude du complexe oxydase dans les phagocytes

Les modèles cellulaires d'étude de la NADPH oxydase ont été développés d'une part pour comprendre les mécanismes d'activation du complexe et d'autre part, pour réaliser le diagnostic moléculaire des mutations responsables de la CGD. Ils ont également été très intéressants pour réaliser les premiers essais de thérapie cellulaire *ex vivo* qui ont permis ensuite de faire les premiers pas vers la thérapie génique. Dans certains cas, les mutations humaines sont reproduites dans ces modèles et l'impact de ces mutations sur les mécanismes d'assemblage du complexe oxydase est étudié.
Enfin, l'étude du rôle des analogues de certaines protéines du complexe oxydase tels que Nox1, NOXO1 et NOXA1 a été réalisée grâce à ces modèles. Les premiers essais de thérapie cellulaire *ex vivo* et un essai de thérapie génique de la CGD ont été entrepris en utilisant les précurseurs hématopoïétiques $CD34^+$.

Dans une première partie, les différents modèles seront présentés : il s'agit des cellules LB-EBV (lymphocytes B immortalisés par le virus d'Epstein-Barr), des cellules PLB985 (issues d'une lignée cellulaire myélomonoblastique humaine), des cellules K562, des cellules fibroblastiques (HEK 293, CHO et COS7) et des cellules $CD34^+$.

Une deuxième partie décrira l'étude des mutations humaines à l'origine de la CGD.

Puis, des travaux portant sur l'étude du complexe oxydase seront exposés : la maturation du cytochrome b_{558}, le rôle des facteurs cytosoliques ainsi que la fonction du canal à protons de gp91*phox*.

Une troisième partie fera état des analogues de certains composants du complexe oxydase tels que Nox1, NOXO1 et NOXA1 et de leur rôle.

Enfin, le point sera fait sur les essais de thérapie cellulaire *ex vivo* et de thérapie génique entrepris dans le cadre de la CGD.

1. Description des différents modèles cellulaires

1.1 Les lymphocytes B immortalisés par le virus d'Epstein-Barr : les LB-EBV

L'infection par le virus EBV de lymphocytes B normaux conduit à la génération de lignées cellulaires proliférant indéfiniment. Une des caractéristiques qui distingue ce virus des autres Herpes virus est sa capacité à infecter uniquement les lymphocytes B. En effet, ces cellules possèdent des récepteurs de surface spécifiques du virus EBV (Gordon *et al.* 1986). Les lignées cellulaires proliférantes appelées lignées lymphoblastoïdes sont stables, bien que des modifications caryotypiques et phénotypiques aient été rapportées à très long terme. Les lymphocytes B immortalisés ont un aspect polymorphique et possèdent de nombreuses mitochondries. Ils sont non adhérents et croissent en suspension isolée ou sous forme d'amas. Ces cellules se cultivent facilement, à la différence des neutrophiles isolés du sang périphérique dont la demie-vie est de l'ordre de quelques heures.

Les LB-EBV possèdent un complexe NADPH oxydase fonctionnel très proche de celui des neutrophiles (voies d'activation communes) mais dont l'activité est plus faible. En effet, après stimulation par le PMA la production d'ions superoxyde des LB-EBV est de l'ordre de 1% de l'activité oxydase des neutrophiles. Cette activité diminuée est essentiellement expliquée par une quantité limitante de cytochrome b_{558} (Morel *et al.* 1993). La faible quantité de cytochrome b_{558} serait due à un blocage post transcriptionnel empêchant la synthèse des protéines (Chetty *et al.* 1995). Les expériences de reconstitution de l'activité oxydase en système acellulaire ou « cell free system » (Matériel de méthodes 2.4) permettent de mettre en évidence que :

- le cytosol de LB-EBV induit une activité oxydase dans les membranes de neutrophiles comparable au cytosol de neutrophiles (Cohen-Tanugi *et al.* 1991).

- le cytosol de neutrophiles de même que le cytosol lymphocytaire est peu efficace dans l'activation des membranes de LB-EBV.

- les sites de gp91*phox* impliqués dans l'assemblage du complexe oxydase des LB-EBV seraient moins accessibles lors de l'activation de l'enzyme (Batot *et al.* 1998).

- la protéine p67*phox*, présente dans les LB-EBV, est exprimée en quantité inférieure par rapport aux neutrophiles ce qui peut expliquer également une activité oxydase diminuée des LB-EBV (Chetty *et al.* 1995).

Les LB-EBV constituent donc un outil précieux pour l'étude de la NADPH oxydase et pour immortaliser les mutations géniques à l'origine de la CGD en permettant le diagnostic moléculaire de cette maladie (Morel *et al.* 1993).

1.2 Les cellules PLB985

Les cellules PLB985 représentent un autre modèle d'étude du complexe oxydase. Ces cellules sont issues d'une lignée cellulaire myélomonoblastique humaine d'une patiente atteinte d'une leucémie myéloïde chronique, en phase de rémission. Ces cellules bipotentes, bloquées au stade promyélocytaire, ont la capacité de se différencier en granulocytes ou en monocytes après addition d'agents de différenciation. Il y a alors expression des différentes sous-unités du complexe NADPH oxydase avec production d'$O_2^{\cdot -}$ et d'H_2O_2 (Tuker *et al.* 1987). Dans cette lignée, le gène *CYBB* codant gp91*phox* a été invalidé par recombinaison homologue et insertion d'une cassette de résistance -phosphotransférase hygromycine B- au niveau du troisième exon (PLB985 KO ou PLB985-XCGD). Ainsi, cette lignée KO mime les neutrophiles des patients CGD X°. Leur transfection par l'ADNc de gp91*phox* (PLB985-gp91) restaure totalement leur capacité à produire les ions superoxyde (Zhen *et al.* 1993 ; Yu *et al.* 1999b ; Bionda *et al.* 2004).

Elles peuvent également être utilisées pour l'étude de certaines mutations humaines à l'origine de $CGDX^+$ mais également pour la détermination de la fonction de certains partenaires de l'oxydase.

1.3 Les cellules K562

Les cellules K562 sont des cellules provenant d'un patient atteint de leucémie myéloïde chronique. Ce sont des cellules malignes pluripotentes, hautement indifférenciées et précurseurs de la lignée hématopoïétique. Suite à divers stimuli ou spontanément, elles peuvent se différencier en précurseurs des cellules érythrocytaires, granulocytaires ou

mégacarytocytaires. Il faut préciser que ces cellules expriment les protéines p22*phox* (Parkos *et al.* 1988) et Rac. Elles ont été particulièrement utilisées dans l'étude des interactions protéiques entre les différents constituants de la NADPH oxydase (de Mendez *et al.* 1995) puisqu'elles présentent plusieurs avantages: elles sont facilement transfectables et, après reconstitution du complexe oxydase, la production d'ions superoxyde est importante.

1.4 Les cellules fibroblastiques

1.4.1 Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary)

Cette lignée cellulaire est issue d'une biopsie d'ovaires de hamster. Ces cellules ne contiennent ni l'ARNm de p22*phox* (Northern Blot et RT-PCR), ni la protéine p22*phox* (immunoblot, anticorps monoclonal 449) (Biberstine-Kinkade *et al.* 2002). Ces cellules ont été utilisées pour étudier le canal à protons (Henserson *et al.* 1995 ; Henderson *et al.* 1997) ainsi que la position de l'hème au sein de l'hétérodimère (Biberstine-Kinkade *et al.* 2001 et 2002).

1.4.2 Les cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney)

Les cellules HEK293 ont été obtenues à partir de cellules embryonnaires hépatiques humaines infectées avec l'ADN de l'adenovirus type 5 (Graham *et al.* 1977). Elles contiennent l'ARNm de p22*phox* (Cheng *et al.* 2001). Elles ont permis d'étudier le canal à protons (Maturana *et al.* 2001) ainsi que les analogues de Nox 2 et des facteurs cytosoliques, p47*phox* et p67*phox* (Banfi *et al.* 2003; Cheng *et al.* 2004a).

1.4.3 Les cellules COS7

Les cellules COS7 sont des cellules fibroblastiques de rein de singe cultivables et facilement transfectables avec un taux d'expression protéique important. De plus, elles expriment Rac1, petite protéine G indispensable au fonctionnement optimal du complexe oxydase ainsi que la petite sous unité du cytochrome b_{558}, p22*phox*. Ces cellules ont été utilisées par l'équipe de MC Dinauer pour réaliser des transfections des ADNc de gp91*phox*

et/ou de p22*phox* afin de produire un cytochrome b_{558} recombinant pour l'étude de sa maturation (Yu *et al.* 1997). Ces cellules ont également permis de reconstituer un complexe oxydase fonctionnel et d'en réaliser son étude (Price *et al.* 2002 ; De Coursey *et al.* 2002).

1.5 Les cellules CD34$^+$

Ces cellules constituent la cible des essais de thérapie cellulaire *ex vivo* (Weil *et al.* 1997) et de thérapie génique (Malech *et al.* 1997). L'antigène CD34$^+$ est une glycoprotéine exprimée à la surface de 2 à 4% des cellules médullaires. Cependant, les cellules CD34$^+$ sont également présentes au niveau périphérique (0,1% des cellules mononucléées circulantes; Malech 1999) et font partie des progéniteurs hématopoïétiques du sang périphérique (PBSC) ; on peut les recueillir par aphérèse. L'injection au patient de G-CSF (ganulocyte-macrophage colony-stimulating factor) stimule la myélopoïèse : la production de cellules CD34$^+$ est augmentée de 50 à 100 fois. Une colonne d'affinité est ensuite utilisée pour sélectionner spécifiquement les cellules CD34$^+$ (Sekhasaria *et al.* 1993) ce qui permet d'obtenir une population cellulaire composée à 70% de cellules CD34$^+$.

2. Etude des mutations humaines

Parmi ces modèles, les LB-EBV issus des patients CGD sont utilisés pour réaliser le dignostic moléculaire de la maladie.

2.1 Diagnostic moléculaire

De nombreuses mutations des gènes *CYBB* et *CYBA* responsables de la CGD liée à l'X et de la CGDA22 ont pu être détectées à partir de l'ADNc des LB-EBV (Rae *et al.* 2000 ; Ishibashi *et al.* 2000 ; Roos *et al.* 1996). Ces mutations sont très hétérogènes dans les gènes.
Dans les CGD liées à l'X où la majorité correspond aux formes de CGD X°, la principale anomalie est une délétion qui a pour conséquence un ARNm ou une protéine gp91*phox*

instable (Roos *et al.* 1996). Dans les formes variantes rarrissimes (CGD X^- et CGD X^+), les mutations ponctuelles sont les anomalies les plus fréquemment rencontrées et n'entraînent généralement pas d'instabilité de l'ARNm. La protéine est retrouvée en quantité normale (CGD X^+) ou diminuée (CGD X^-) dans la membrane des neutrophiles. Les mutations ponctuelles sont réparties sur l'ensemble du gène codant pour la protéine gp91*phox*. Les CGD X^- sont dues à des mutations soit dans le promoteur (Weening *et al.* 2000 ; Woodman *et al.* 1995 ; Newburger *et al.* 1994) soit dans la partie codante. Dans la partie C-terminale de la protéine (acides aminés 408 à 570), on ne trouve que des formes X^+. Ceci pourrait indiquer que la partie C-terminale est peu impliquée dans les mécanismes de synthèse et/ou de stabilisation de l'expression de gp91*phox* mais par contre, c'est est une zone fonctionnelle importante. En effet, elle possède les sites de fixation du FAD et du NADPH et interagit avec les facteurs cytosoliques.
Au laboratoire, une double mutation (His303Asn, Pro304Arg) responsable d'une CGD X^+ (Stasia *et al.* 2002a) a été mise en évidence en utilisant les LB-EBV du patient. Elle semble abolir l'assemblage du complexe oxydase.

Récemment, six nouvelles mutations situées dans le gène *CYBB* ont été diagnostiquées au laboratoire (Stasia *et al.*, 2004). Quatre d'entre elles sont associées à une CGD X° et les deux autres sont responsables de $CGDX^-$ et $CGDX^+$. Les données cliniques ont pu montré l'absence de corrélation entre la sévérité de la maladie et le type de CGD. En effet, la même mutation retrouvée chez quatre patients est associée à des manifestations cliniques très différentes. C'est pour cette raison qu'il est impossible d'établir un pronostic en se référant uniquement au type de mutation en cause.

Dans les CGD A22, la majorité des anomalies retrouvées sur le gène correspond à des mutations ponctuelles qui conduisent à une absence de la protéine. Ceci est dû à une instabilité de la protéine mutée ou à une diminution de l'interaction avec gp91*phox* (Roos *et al.* 1996). La plupart des acides aminés atteints se situent sur les deux premiers tiers de la protéine sauf dans le cas de la CGD $A22^+$ où la mutation est située dans le dernier tiers de la protéine (proline 156). Un cas de CGD A22 a été diagnostiqué au laboratoire. Il s'agit d'une délétion de 36 bp dans le gène *CYBA* située entre la fin de l'intron 4 et le début de l'exon 5. Ceci entraîne la perte du site accepteur AG de l'intron 4 et l'activation d'un site cryptique en position 355-356. La conséquence au niveau de l'ARNm est une insertion anormale de 179bp de l'intron 4 et une délétion de 21bp du début de l'exon 5 (Stasia *et al.* 2002a).

2.2 Reproduction des mutations humaines

La mutagénèse dirigée a été utilisée par deux équipes pour étudier les mutations détectées chez des patients CGDX$^+$. Après avoir caractérisé les mutations (à partir des LB-EBV du patient), elles ont été reproduites par mutagénèse dirigée dans les PLB985. Ces cellules ont alors permis d'analyser l'impact des mutations sur l'expression et la stabilité des protéines du complexe et sur les mécanismes d'assemblage.

Une délétion de 30 nucléotides au niveau du chromosome X, responsable d'une délétion des acides aminés en position 488-497, a été détectée chez un patient atteint de CGDX$^+$ (Schapiro *et al.* 1991). Cette délétion a été reconstituée par mutagénèse dirigée dans les PLB985 (mutant Δ488-497). Ce modèle a permis de montrer un défaut de transfert d'électrons du NADPH au FAD et l'absence de production d'ions superoxyde dans ces mutants. Cependant la translocation des facteurs cytosoliques et l'assemblage du complexe oxydase restent normaux. Un peptide synthétique correspondant aux résidus d'acides aminés absents (488-497) est utilisé pour montrer que cette partie de la protéine n'est pas directement impliquée dans l'assemblage du complexe (Yu *et al*, 1999).

Au laboratoire, le diagnostic de la CGD X$^+$ précédemment cité a permis de construire un modèle transgénique dans les PLB985 (Bionda *et al.* 2004). Il s'agit d'un patient présentant une double mutation dans le gène *CYBB*, entraînant le changement de deux acides aminés (His303 → Asn et Pro304 → Arg) au niveau de la queue C-terminale cytosolique de gp91*phox* (Stasia *et al.* 2002b). Le but était de connaître l'impact de chacune des deux mutations et de la double mutation, sur l'expression de gp91*phox* sur l'activité et l'assemblage du complexe oxydase. Ce modèle a permis de montrer que la mutation His303 → Asn est suffisante pour empêcher l'assemblage -et donc l'activité- du complexe oxydase. La mutation Pro304 → Arg inhibe cette activité mais pas totalement ; une activité résiduelle peut être mesurée. D'autre part, l'étude de la translocation de p47*phox* par microscopie confocale a confirmé que chacune des deux mutations perturbe la translocation des facteurs cytosoliques. Enfin, grâce à ce modèle, les auteurs ont pu montrer qu'aucune des deux mutations n'est un polymorphisme du gène *CYBB*.

3. Etude du complexe oxydase

3.1 Maturation du cytochrome b_{558} et étude de la glycosylation de gp91*phox*

3.1.1 L'incorporation des hèmes

La présence de deux molécules d'hèmes dans le cytochrome b_{558} a été démontrée préalablement par Cross *et al.* en 1995. Cependant, la position des hèmes au sein de l'hétérodimère a été longtemps controversée.

En effet, en 1998 Yu *et al.* ont montré que des membranes plasmiques préparées à partir d'une lignée de cellules COS7 transfectées uniquement par l'ADNc de gp91*phox* (COS-gp91*phox*) possèdaient un spectre redox identique à celui des membranes de neutrophiles. Ils en ont déduit que gp91*phox* contenait au moins un hème indépendemment de la présence de p22*phox*. Cependant, cette conlusion est à nuancer puisque les auteurs partent de l'hypothèse que les cellules COS7 ne possèdent pas la protéine p22*phox*. Or, il a été démontré par plusieurs équipes que ces cellules expriment de façon constitutive p22*phox*.

D'autre part, certains auteurs avaient suggéré que le résidu Histidine 94 de p22*phox* jouait le rôle de ligand entre une molécule d'hème et les deux sous-unités gp91*phox* et p22*phox* (Quinn *et al.* 1992). Cela pourrait expliquer le la mutation His 94→ Arg, retrouvée chez un patient atteint de CGD A22° , soit caractérisée par l'absence du cytochrome b_{558} (Cross *et al.* 2000)

Finalement, les travaux de Biberstine-Kinkade ont permis de statuer définitivement sur la localisation des deux hèmes dans gp91*phox*. A partir des cellules COS7 transfectées par l'ADNc de gp91*phox* et l'ADNc de p22*phox*, des mutations de certains résidus Histidines de gp91*phox* susceptibles d'être engagés dans l'interaction avec l'hème ont été introduites dans la séquence de gp91*phox*, par mutagénèse dirigée (Biberstine-Kinkade *et al.* 2001). La formation de l'hétérodimère, l'existence d'un spectre du cytochrome b_{558} et l'activité oxydase ont été évaluées dans ces cellules transgéniques. Ce modèle a permis de préciser la topologie de l'hème au sein du cytochrome b_{558}. En effet, les résidus Histidines en positions 101, 115, 209 et 222 situés sur les hélices III et V, dans la partie N-terminale de gp91*phox* participent à la coordination de l'hème. Puis, les cellules CHO-gp91*phox* ont permis d'étudier plus

précisemment la conformation du cytochrome b_{558} et l'attachement des hèmes aux deux sous-unités (Biberstine-Kinkade *et al.* 2002). Cependant, le rôle précis de p22*phox* dans la liaison avec l'hème restait controversé. Afin de déterminer définitivement si l'Histidine 94 de p22*phox* était impliquée ou non dans la liaison avec l'hème, les cellules COS7-gp91*phox* et CHO gp91*phox* ont été utilisées et transfectées avec des mutants (résidu 94) de p22*phox* (Biberstine-Kinkade *et al.* 2002). Pour chaque type de clone obtenu, l'expression de gp91*phox* et p22*phox* a été évaluée par immunoblot. Les résultats montrent que les mutations His 94→Leu, Met, Tyr n'empêchent ni l'expression de la protéine p22*phox*, ni la maturation de gp91*phox*. L'hétérodimère peut se former et le spectre de l'hème est inchangé. Dans un second temps, les auteurs ont reconstitué un système oxydase complet en transfectant les cellules CHO gp91*phox* avec les ADNc de gp91*phox*, p47*phox* et p67*phox*, p22*phox* (portant une mutation sur l'acide aminé 94). Ils montrent que ces cellules ont la même activité oxydase que les cellules exprimant une protéine p22*phox* non mutée. Ceci confirme que le résidu Histidine 94 de p22*phox* n'est pas indispensable à l'activité oxydase des cellules entières.
En revanche, le mutant His 94→Arg provoque une instabilité de p22*phox* et une diminution de l'expression de gp91*phox* et de l'activité oxydase. Cependant, ces résultats sont à interpréter avec prudence car il partent de l'hypothèse que les cellules COS7 et CHO ne possèdent pas la protéine p22*phox*. Or, il a été démontré récemment que la protéine p22*phox* est présente dans ces deux types de cellules.

3.1.2 La glycosylation de gp91*phox*

Les LB-EBV de patients atteints de CGD A22° ont permis d'étudier les étapes de maturation de l'hétérodimère formant le cytochrome b_{558} (Porter *et al.* 1994). Ces cellules, déficientes en p22*phox*, expriment un précurseur de la protéine gp91*phox* : p65, très riche en résidus mannose. La transduction des cellules par un rétrovirus contenant l'ADNc de p22*phox* a permis la maturation de ce précurseur et la synthèse de gp91*phox*. La protéine gp91*phox* recombinante a été retrouvée dans les membranes des lymphocytes et l'activité NADPH oxydase a été reconstituée (chimiluminescence). Ces résultats montrent que l'association des protéines p22*phox* et gp91*phox* a probablement lieu avant la sortie du réticulum endoplasmique et le transfert dans l'appareil de Golgi.

Afin de compléter ces travaux, les étapes de biosynthèse et de maturation du cytochrome b_{558} ont été étudiées dans les PLB985 (Yu *et al.* 1997 ; Yu *et al.* 1999b ; De Leo

et al. 2000). Dans un premier temps, les auteurs se sont intéressés à la biosynthèse du cytochrome b_{558} en étudiant le rôle de l'hème dans la maturation et la stabilité des deux sous-unités gp91*phox* et p22*phox* (Yu *et al.* 1997). Ils montrent que le succinyl-acétone (SA), inhibiteur de la synthèse de l'hème, diminue l'expression de gp91*phox* et de p22*phox* mais n'a pas d'influence sur l'expression de p65, précurseur de gp91*phox*. Cela signifie que la transcription de l'ARNm de gp91*phox* n'est pas affectée par le SA (résultat vérifié en Northern Blot). Ainsi, le SA empêche l'assemblage de l'hétérodimère et diminue l'activité oxydase des PLB985. Les auteurs ont suggéré que l'incorporation de l'hème permettrait la formation de l'hétérodimère, soit en agissant directement comme agent dimérisant, soit en facilitant le repliement de gp91*phox* et p22*phox*. Au cours de ce même travail, l'équipe de Dinauer a également utilisé les cellules COS7 pour étudier le rôle de l'hème dans la biosynthèse du cytochrome b_{558}. Cependant, leur hypothèse de départ est discutable (Yu *et al.* 1997) comme nous l'avons vu précédemment, puisqu'ils considèrent que les cellules COS7 ne contiennent pas l'ARNm de p22*phox*. En effet, leurs expériences les conduisent à conclure que la sous-unité p22*phox* ne serait pas indispensable à la glycosylation, et donc à la maturation de la sous-unité gp91*phox*. Par contre, cet article permet de confirmer que la stabilité du complexe dépend de la présence des deux sous-unités gp91*phox* et p22*phox*.

Deux ans plus tard, la même équipe s'est intéressée à la localisation des étapes de synthèse et de maturation de p65, gp91*phox* et p22*phox* (Yu *et al.* 1999). Les cellules X CGD PLB985 transfectées par l'ADNc de gp91*phox* ont été utilisées puisqu'elles expriment gp91*phox* recombinante et p65 de façon constitutive. La présence des protéines gp91*phox*, p65 et p22*phox* a été identifiée spécifiquement par immunoblot. On peut observer que p22*phox* n'est pas associée à p65 dans le réticulum endoplasmique mais que la formation de l'hétérodimère a lieu plus tard dans le processus de maturation des protéines. De plus, une expérience de cytométrie en flux utilisant l'Ac monoclonal 7D5 (anti gp91*phox*) a pemis la mise en évidence de l'absence de gp91*phox* dans les cellules traitées au SA. Ce résultat permet, à nouveau, de monter que l'insertion de l'hème est essentielle pour la formation d'un hétérodimère stable, mais qu'elle n'a aucune influence sur la formation de p65. Enfin, un autre article a confirmé ces différents résultats (De Leo *et al.* 2000). Les auteurs démontrent que l'assemblage de p65 et de p22*phox* a lieu avant le passage dans l'appareil de Golgi et que la présence de l'hème est indispensable à la formation de l'hétérodimère p65-p22*phox*.

Il a été démontré que le cytochrome b_{558} des LB-EBV est plus fortement glycosylé que celui des neutrophiles (Porter *et al.* 1994 ; Yu *et al.* 1999). De plus, l'activité oxydase des LB-EBV est plus faible que celle des neutrophiles : le cytochrome b_{558} étant considéré comme le facteur limitant de cette activité (Batot *et al.* 1998). Au laboratoire, une étude plus précise de la glycosylation de gp91*phox* a été réalisée dans les LB-EBV (Paclet *et al.* 2001), par comparaison aux neutrophiles. Le but de ce travail a été de comprendre quelle était l'influence de l'état de glycosylation de gp91*phox* sur l'assemblage du cytochrome b_{558} dans les LB-EBV. La microscopie à force atomique a permis de mesurer la force des interactions entre des anticorps spécifiques du cytochrome b_{558} natif ou déglycosylé (de LB-EBV ou de neutrophiles). Les résultats ont montré que la glycosylation de gp91*phox*, plus importante dans les LB-EBV que dans les neutrophiles, empêcherait le changement conformationnel du cytochrome b_{558} et, par conséquence, le transfert d'électrons et la production d'ions superoxyde. Ainsi, le précurseur p65 est présent dans les lymphocytes B, alors qu'il est indétectable dans les neutrophiles.

3.1.3 Etude des sites fonctionnels de gp91*phox*

Le rôle de la partie C-terminale de gp91*phox* a été étudié dans les cellules X-CGD PLB985 (Zhen *et al.* 1998). En effet, cette région est particulièrement intéressante puisque l'analyse de la structure de gp91*phox* par modélisation moléculaire informatique chez des patients CGDX, a permis de montrer que la délétion de cette région -comportant les sites de liaisons du FAD et du NADPH- aboutit à une instabilité de la protéine (Taylor *et al.* 1993). Cette partie cytosolique comporte une région qui pourrait être engagée dans la liaison potentielle avec p47*phox* par le biais d'un résidu phénylalanine 570 très conservé dans toutes les protéines de la famille des flavoprotéines. Ainsi plusieurs mutants comportant différentes mutations dans la zone codant la partie C-terminale ont été obtenus par mutagénèse dirigée et transfection dans les cellules X-CGD PLB985. Les auteurs ont montré que des mutations dans la région 559-565 de gp91*phox* ont une influence sur l'expression de gp91*phox* qui se trouve diminuée, et l'activité oxydase est également abaissée proportionnellement à cette diminution de quantité. La délétion des 11 acides aminés terminaux entraîne une instabilité de gp91*phox* et la délétion de la phénylalanine en position 570 aboutit à une diminution de la production d'ions superoxyde, également en rapport avec une diminution de l'expression de gp91*phox*. Ces observations ont permis de conclure que la partie C-terminale de gp91*phox* jouerait un rôle important dans le maintien de la stabilité conformationnelle de l'hétérodimère. Par

contre, aucune conclusion n'a pu être apportée sur le rôle de la région C-terminale dans la translocation de p47*phox* ni sur les zones de contact entre gp91*phox* et p47*phox*.

D'autre part, le rôle de la boucle B de gp91*phox* a été étudiée par mutagénèse dirigée, à partir des cellules PLB985-XCGD (Biberstine-Kinkade *et al.* 1999). Cette région avait préalablement été identifiée, en utilisant la technique du phage display, comme étant une zone d'interaction avec p47*phox* (De Leo *et al.* 1995). Il s'agit d'une région hydrophile située entre les acides aminés 86 et 102 et qui comporte des domaines polybasiques. Les auteurs ont cherché à déterminer quels acides aminés de cette séquence étaient impliqués dans l'assemblage du complexe. Les résultats obtenus montrent que les résidus Arginines en position 91 et 92 de gp91*phox* sont indispensables car ils permettent la translocation des facteurs cytosoliques vers la membrane plasmique et donc l'assemblage du complexe.

3.2 Etude du rôle des facteurs cytosoliques

3.2.1 Etude des rôles de p67*phox* et p40*phox*

Les LB-EBV de patients atteints de CGD A67° ont été utilisés pour étudier les rôles de p67*phox* et de p40*phox* (Vergnaud *et al.* 2000). Les ADNc de p47*phox* et de p40*phox* ont été clonés dans des vecteurs de type pGEX (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) afin de synthétiser les protéines recombinantes et de les utiliser en système acellulaire (CFS). Les résultats obtenus en CFS et en immunoblot permettent de tirer plusieurs conclusions :

- d'une part, p67*phox* est un facteur limitant qui est indispensable à l'assemblage du complexe oxydase. En son absence, le cytochrome b_{558} reste à l'état inactivé.
- d'autre part, dans la cellule au repos, p67*phox* et p40*phox* sont associés : le passage à l'état activé implique leur dissociation.

De plus, l'addition de p40*phox* au milieu réactionnel inhibe l'activation de l'oxydase ce qui signifie que p40*phox* stabilise le complexe oxydase dans son état inactivé. Ceci est un argument en faveur du rôle de régulateur négatif de p40*phox*.

Puis, la lignée cellulaire K562 a permis d'étudier le rôle, toujours très controversé, de p40*phox*. Une première équipe a montré que p40*phox* avait un rôle de régulateur positif du

complexe oxydase (Kuribayashi *et al.* 2002). Son expression dans les cellules K562 transgéniques (exprimant les autres protéines du complexe) permet d'augmenter la production d'ions superoxyde. D'autre part, grâce à l'interaction- via son domaine PC- avec le domaine PB1 de p67*phox*, la protéine p40*phox* favorise la translocation des facteurs cytosoliques p47*phox* et p67*phox* (Figure 5, introduction). Cette interaction PC-PB1 semble être un élément central permettant à p40*phox* d'exercer le rôle d'activateur du complexe oxydase.

Une autre équipe s'est également intéressée au rôle de p40*phox* et a montré, au contraire, que p40*phox* a un rôle de régulateur négatif (Sathyamoorthy *et al.* 1997), comme le suggèrent les travaux de Vergnaud *et al.* 2000. La transfection de p40*phox* dans les cellules K562 transgéniques diminue de 40% l'activité oxydase. L'interaction du domaine SH3 de p40*phox* avec p47*phox* intervient dans cette inhibition puisque le domaine SH3 de p40*phox* suffit à inhiber l'activité oxydase, plus efficacement que p40*phox* exprimé entièrement. En fait, le SH3 de p40*phox* se lie au domaine PPR situé en C-terminal de p47*phox* qui entre normalement en interaction avec p67*phox* ; ceci empêche l'interaction de p67*phox* avec p47*phox*.

Récemment, un travail de l'équipe de Babior (Lopes *et al.* 2004) a étudié l'influence de la phosphorylation de p40*phox* sur son rôle au sein du complexe oxydase. Ils ont montré que la forme phosphorylée de p40*phox* (au niveau du résidu Thréonine 154) inhibe l'activation du complexe en système acellulaire.

3.2.2 Etude des domaines SH3

L'équipe de Leto s'est intéressée aux rôles des domaines SH3 de p67*phox* (de Mendez *et al.* 1994). Pour comprendre la fonction de p67*phox* dans le complexe oxydase, le rôle des deux domaines SH3 a été étudié (Figure 3, introduction), d'une part en système acellulaire et d'autre part en cellules entières (LB-EBV). *In vitro*, les domaines SH3 ne sont pas indispensables pour reconstituer une activité oxydase : seuls les 246 acides aminés N-terminaux suffisent à l'activation du complexe. Par contre en cellules entières, les deux domaines SH3 sont indispensables à l'activité oxydase (attachement de p67*phox* à la membrane) et particulièrement le SH3 situé en C-terminal. Ces résultats différents sont dus à des mécanismes d'activation différents, *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, les domaines SH3 de

p67*phox* pourraient être engagés dans des interactions avec Rac et p47*phox* puisque la translocation de p67*phox* a lieu uniquement en présence de p47*phox*.

Pour poursuivre l'étude des domaines SH3 de p67*phox*, l'équipe de Leto a utilisé les cellules K562 (Leto *et al.* 1994). Dans un premier temps, un modèle cellulaire d'étude de la NAPDH oxydase a été reconstitué dans ces cellules. Le clonage des ADNc de p67*phox*, p47*phox* et gp91*phox* a été réalisé dans des vecteurs plasmidiques (pREP) puis les cellules ont été transfectées par électroporation (de Mendez *et al.* 1995). L'étude de l'expression de chacune des protéines ainsi que la mesure de la production d'ions superoxyde ont permis de vérifier que le complexe oxydase est fonctionnel. Les membranes des cellules ont été testées en système acellulaire en présence de cytosol de neutrophiles ; l'activité mesurée représente 1-2% de l'activité obtenue avec des membranes de neutrophiles. Deux interactions ont pu être mises en évidence: la liaison du SH3 de p47*phox* avec le PRR de p47*phox* et avec avec le PRR de p22*phox* (Figure 9, introduction). Notons que le site PRR contient le résidu Pro 156 qui, lorsqu'il est muté, est reponsable de CGDA22^{+}. En effet, cette mutation empêche l'interaction de p22*phox* avec p47*phox* et donc la migration de p47*phox* à la membrane.
Dans un second temps, les cellules K562 ont été transfectées avec les ADNc de p22*phox* et p47*phox* et la translocation a été déterminée en évaluant les quantités cytosoliques et membranaires de p47*phox* après stimulation par le PMA par immunoblotting. Les résultats indiquent que la translocation de p47*phox* est dépendante de la présence de p22*phox*.
Les auteurs proposent un modèle d'assemblage du complexe dans lequel la translocation de p67*phox* dépend de la présence de p47*phox* mais celle de p47*phox* n'est dépendante que de la présence du cytochrome b_{558}.

Ces travaux ont été poursuivis en étudiant le rôle précis de chacun des domaines SH3 de p47*phox* et de p67*phox* (de Mendez *et al.* 1996). Un nouveau modèle d'assemblage du complexe, comprenant trois liaisons engageant les domaines SH3, est proposé. Les deux domaines SH3 de p47*phox* auraient un rôle central puisqu'ils interagiraient avec le PRR de p22*phox* et le PRR de p67*phox* (N-ter) permettant ainsi la translocation des facteurs cytosoliques et l'interaction avec le cytochrome b_{558}, via p22*phox*. Le domaine SH3 de p47*phox* situé en C-terminal serait lié avec le PRR de p47*phox* (interaction intramoléculaire) et participerait aussi au processus d'assemblage. Par contre, aucun ligand du deuxième domaine SH3 de p67*phox* n'a été déterminé. Globalement le rôle central de p47*phox* est confirmé.

Enfin, les auteurs déterminent avec précision le rôle de chacun des deux domaines SH3 de p47*phox* (de Mendez *et al.* 1997) dans les mécanismes d'assemblage et d'activation du complexe oxydase : un modèle « définitif » est suggéré (Figure 11). Le premier SH3 de p47*phox* est engagé dans deux interactions : l'une avec le PRR de p22*phox*, l'autre avec son propre PRR (liaison intramoléculaire) ; ce SH3 a donc un rôle essentiel. L'autre SH3 est engagé dans la liaison avec le PRR de p67*phox* (N-ter). Une mutation dans la séquence de ce domaine SH3 modifie la translocation de p67*phox* et son attachement à p47*phox*, après stimulation par le PMA.

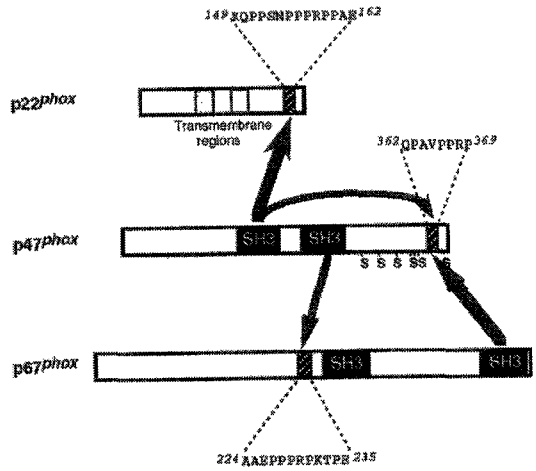


Figure 11 : Modèle d'assemblage des facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase et implications des domaines SH3 (d'après de mendez *et al.* 1997)

D'autres équipes se sont intéressées à l'étude des domaines SH3 et particulièrement ceux engagés dans les liaisons intramoléculaires de p47*phox* (Ago *et al.* 1999). Dans la cellule au repos, les sites SH3 sont masqués par les liaisons intramoléculaires. Lors de l'activation, plusieurs résidus sérine sont phosphorylés. Les auteurs ont montré que la mutation de trois d'entre eux (en position 303, 304 et 328) par des résidus –tels que l'aspartate ou le glutamate- « mimant » une phosphorylation, aboutit à la rupture des liaisons intramoléculaires et permet l'interaction avec p22*phox*. *In vitro*, ces trois mutations entraînent l'activation du complexe oxydase même en l'absence d'acide arachidonique. *In vivo*, la substitution des résidus Sérines par des résidus alanines (ne pouvant être phosphorylés), empêche la production d'ions superoxyde. Ces résultats indiquent donc que la phosphorylation des trois résidus sérine 303,

304 et 328 de p47*phox* induit un changement conformationnel de la protéine lui permettant d'interagir avec p22*phox*.

3.2.3 Utilisation du modèle COS*phox* pour l'étude des partenaires et des mécanismes d'assemblage du complexe NADPH oxydase.

Le modèle COS*phox* a été mis en place par l'équipe de Dinauer (Price *et al.* 2002a) et a permis d'étudier les régions fonctionnelles de p67*phox*, les rôles de Rac1, de GEF (guanine nucleotide exchange factor) (Price *et al.* 2002b) et de Cdc42 (Diebold *et al.* 2004).

3.2.3.1 Caractérisation du modèle COS*phox*

Les cellules COS7 transgéniques exprimant gp91*phox* et p22*phox* (Yu *et al.* 1997), utilisées préalablement pour l'étude de la maturation du cytochrome b_{558}, ont été transfectées par les ADNc de p47*phox* et p67*phox* afin de reconstituer un complexe oxydase complet et actif appelé le modèle COS*phox* (Price *et al.* 2002a). Ce modèle a été caractérisé et comparé au neutrophile. L'expression de chacune des sous-unités évaluée par immunoblot montre que les quatre sous-unités sont exprimées en quantités équivalentes au neutrophile, et les petites protéines G (Rap1A et Rac1) sont également présentes; seule Rac 2 est absente des cellules.

Pour contrôler que le modèle COS*phox* répond aux mêmes stimuli que les neutrophiles, le PMA et l'AA sont testés. Bien que l'AA soit un activateur plus efficace que le PMA sur le modèle COS*phox*, la production d'ions superoxyde mesurée représente 80% de celle des neutrophiles. De plus, la translocation des facteurs cytosoliques a lieu puisque p47*phox*, p67*phox* et Rac1 sont présents dans les fractions membranaires purifiées obtenues après activation des cellules COS*phox*.

Dans le neutrophile, la phosphorylation des résidus sérine 303, 304 et 379 de p47*phox* via la PKC est essentielle pour initier l'activation du complexe (Ago *et al.* 1999). Afin de vérifier que le système COS*phox* fonctionne selon le même mode, des mutants de p47*phox* (portant des mutations sur ces résidus) ont été obtenus. Les mutations des résidus Sérines cités ci-dessus diminuent très fortement l'activité oxydase prouvant que la phosphorylation des ces trois résidus sérine de p47*phox* est essentielle à l'activation du système, comme dans le neutrophile.

D'autre part, les isoformes des PKC du modèle COS*phox* sont comparées à celles du neutrophile. Contrairement aux neutrophiles, les cellules COS*phox* sont riches en PKC α, τ et

ζ mais n'ont qu'un faible taux de PKCIIβ et δ -qui sont majoritaires dans les neutrophiles (Dekker *et al.* 2000). Or les formes α, β et δ sont DAG dépendantes et sont donc activables par le PMA. Cependant, l'expression des isoformes β et δ du neutrophile dans le système COS*phox* n'entraîne aucune modification du taux de production d'ions superoxyde par les cellules COS*phox.* Cela signifie que la présence d'isoformes de la PKC différentes dans les cellules COS7, par rapport au neutrophile, n'a aucune influence sur l'activité oxydase de ces cellules.

Le rôle de Rac est ensuite confirmé dans ce modèle et la translocation de la petite protéine G semble essentielle à l'assemblage du complexe.

Les cellules COS*phox* constituent un système présentant de nombreux avantages sur les autres modèles mis en place précédemment. Il est facilement transfectable et exprime toutes les sous-unités de la NADPH oxydase, ce qui lui permet de produire des d'ions superoxyde à un niveau presque équivalent à celui du neutrophile (80%).

3.2.3.2 Applications du modèle COS*phox*

En 1998, l'équipe de Han *et al.* avait montré que le domaine d'activation de p67*phox* se situait entre les acides aminés 199 et 210 de p67*phox*. Le modèle COS*phox* a été utilisé pour confirmer sa localisation. Le mutant Val204Ala de p67*phox* a été transfecté dans les cellules COS7 exprimant les protéines gp91*phox*, p22*phox* et p47*phox* (Price *et al.* 2002a) puis la production d'ions superoxyde a été mesurée. En parallèle, l'expérience a été menée en transfectant l'ADNc WT de p67*phox*. La production d'ions superoxyde a été indétectable dans les cellules transfectées par le mutant Val204Ala de p67*phox*, contrairement aux cellules transfectées par l'ADNc WT de p67*phox*. Ainsi, le mutant Val204Ala de p67*phox* inactive le complexe oxydase ce qui confirme que le domaine d'activation est bien situé dans la zone prédéterminée.

L'équipe de Price (Price *et al.* 2002b) a étudié les mécanismes d'activation et d'assemblage du complexe oxydase ainsi que le rôle de Rac dans le système COS*phox.* Ils montrent que l'activation de Rac (via les GEF) dans les cellules COS*phox* suffit à déclencher le processus de translocation des facteurs cytosoliques. En activant différentes phospholipases qui participent à la phosphorylation de p47*phox*, Rac permettrait la translocation de p47*phox* à la membrane. Ainsi, d'après ce travail, Rac1 a une double fonction dans l'activation de la

NADPH oxydase. D'une part, en s'associant à p67*phox* (via les TPR), il participe à la formation du complexe oxydase et permet la translocation de p67*phox* vers la membrane. D'autre part, en régulant l'activation des GEF impliquées dans la signalisation intracellulaire, Rac1 participe à l'activation et à l'assemblage du complexe oxydase.

Ce modèle COS*phox* a également permis d'étudier le rôle de la molécule Cdc42 faisant partie de la famille des Rho GTPase, comme Rac et Rho (Diebold *et al.* 2004). Les séquences de Rac et de Cdc42 diffèrent de 4 acides aminés. Rac interagit avec les TPR de p67*phox* via son domaine switch I ; par contre Cdc 42 est incapable d'interagir avec p67*phox* puisqu'il possède deux mutations dans la séquence du domaine switch I. En système acellulaire, les auteurs déterminent que Cdc42 entre en compétition avec Rac et se fixe au cytochrome b_{558} via son domaine d'insertion. Ainsi, Cdc42 est capable d'inhiber la production d'ions superoxyde par ce mécanisme. Ces observations *in vitro* ont été confirmées en cellules entières grâce au système COS*phox*. En effet, Cdc42 inhiberait la production de ROS dans les cellules COS7 exprimant un complexe oxydase actif.

3.3 Etude du canal à protons

La localisation du canal à protons associé à l'activité de la NADPH oxydase a été longtemps controversée. Rappelons que ce canal à protons permet de compenser la dépolarisation engendrée par le flux d'électrons produit lors de l'activation du complexe oxydase. En effet, une grande quantité « d'équivalents-acides » est produite dans le cytosol lors de l'explosion respiratoire et lors du cycle des hexoses monophosphates, permettant la synthèse du NADPH. Plusieurs équipes ont des idées opposées sur la localisation du canal à protons. Alors que l'équipe de De Coursey montre que le canal à protons est situé dans la membrane plasmique, l'équipe de Henderson a réalisé plusieurs études montrant que la sous-unité gp91*phox* -notamment le résidu Histidine 115-contient le canal à protons.

Les premières études concernant le canal à protons ont été réalisées en 1995 par l'équipe d' Henderson, à partir des cellules CHO (Henderson *et al.* 1995). Elles montrent que ce canal se situe au niveau de la sous-unité gp91*phox*. Les cellules sont transfectées par l'ADNc de gp91*phox* (CHO-gp91*phox*) et sont utilisées pour démontrer que la sous-unité gp91*phox* constitue le canal à protons. En effet, l'expression isolée de gp91*phox* permet

d'observer un flux de protons après activation des cellules par l'acide arachidonique (qui permet l'ouverture de ce canal ; Henderson *et al.* 1992) ; la présence des autres composants de l'oxydase ne semble pas influencer cette ouverture. Afin de préciser le domaine de gp91*phox* impliqué dans le transfert de protons à travers la membrane, les auteurs ont répété l'expérience en transfectant les cellules avec l'ADNc codant la synthèse des 230 premiers acides aminés situés en N-terminal de gp91*phox* (Henderson *et al.* 1997). Ils ont démontré que cette région N-terminale de gp91*phox* était suffisante pour reconstituer le canal à protons ; ceci suppose que cette séquence contient une région transmembranaire.

Afin de déterminer précisemment les acides aminés indispensables au fonctionnement du canal à protons, des mutations ont été introduites dans la séquence de gp91*phox* (mutagénèse dirigée) et les ADNc mutés correspondants ont été transfectés dans les cellules CHO (Henderson, 1998). Le flux de protons a été mesuré dans chacun des mutants. Le rôle de trois résidus Histidines situés dans une région transmembranaire de gp91*phox* en position 111, 115 et 119 a été étudié. La mutation His115Leu empêche le passage transmembranire des protons ce qui se traduit par l'absence de courant. Cela signifie que le résidu Histidine 115 est essentiel au fonctionnement du canal à protons.

Puis, les cellules HEK293 ont permis d'étudier le rôle des résidus Histidines engagés dans la liaison de l'hème sur l'activité du canal à protons. Préalablement à ce travail, les auteurs avaient réalisé une étude sur les polynucléaires éosinophiles et avaient montré l'existence de deux types de courants (Banfi *et al.* 1999). L'un existe dans toutes les cellules (1) , y compris les cellules des patients atteints de CGD; l'autre (2) présente des propriétés différentes. D'une part, il est absent des cellules provenant des patients atteints de CGDX et CGD A47°, d'autre part, il n'est mesurable que dans des conditions expérimentales précises, lorsque la NADPH oxydase est activée. Enfin, le second canal activable est vingt fois plus sensible au Zn^{2+} (agent inhibiteur du flux de protons) et il a des cinétiques d'activation et de désactivation différentes. Il n'est pas couplé au transfert d'électrons puisqu'il persiste en présence de DPI (diphényliodinium, inhibiteur de l'oxydase). Suite à ce travail, les auteurs concluent que les phagocytes possèdent deux types de canaux à protons, gp91*phox* jouant le rôle de canal fonctionnant quand la NADPH oxydase est activée.

A partir des cellules HEK293-gp91*phox* obtenues par transfection, les auteurs montrent que l'inhibition de la synthèse de l'hème (avec le SA) n'a pas de conséquence sur l'expression de gp91*phox* mais sur le courant mesuré (Maturana *et al.* 2001). Celui-ci a les caractéristiques du courant (2) décrit dans les éosinophiles. De plus, la mutation Hist115Leu entraîne la disparition du spectre différentiel du cytochrome b_{558} et du courant mesuré. Ceci signifie que

le résidu Histidine 115 est engagé dans l'interaction avec l'hème et dans le transfert de protons. Pour conclure, gp91*phox* joue le rôle de canal à protons : il est activé par la rupture de la liaison entre l'hème et le résidu Histidine 115.

De Coursey *et al.*, en 2001, ont utilisé les PLB985 pour étudier le canal à protons dépendant de l'activité de la NADPH oxydase. Ils ont comparé les flux de protons dans les neutrophiles de patients CGD X, les PLB985-XCGD et les PLB985-gp91. Ils n'observent aucune différence de fonctionnement du flux de protons entre les trois types de cellules. Contrairement à l'équipe d'Henderson et de Demaurex, les auteurs n'ont aucun argument en faveur de l'existence de deux types de canaux à protons et ils concluent qu'un seul canal à protons est présent dans les phagocytes. Ainsi, le canal à protons des phagocytes non stimulés ne serait pas situé au niveau de la sous-unité gp91*phox*. Dans certaines conditions, gp91*phox* pourrait seulement participer au flux de protons mesuré. D'après les expériences utilisant les cellules CHO, HEK293 et COS7, les auteurs montrent que la protéine gp91*phox* n'est pas le canal à protons de l'oxydase (De Coursey *et al.* 2002). Dans les cellules CHO-gp91*phox*, les caractéristiques du courant mesuré sont différentes de celui mesuré dans les phagocytes : l'activation du canal est beaucoup plus rapide et une très faible variation de pH inhibe totalement le courant. De plus, la quantité de Zn^{2+} (inhibiteur du canal à protons) nécessaire à ralentir l'activation du canal est 200 fois plus élevée dans ces cellules que dans les phagocytes. Enfin, le rôle du canal à protons dans la cellule est de compenser la charge due au mouvement d'électrons or les cellules CHO, HEK293 ou COS7-gp91*phox* n'ont pas d'activité oxydase.

Le modèle COS*phox* élaboré par l'équipe de MC Dinauer (Price *et al.* 2002) est un outil intéressant pour confirmer ce qui a été montré à partir des cellules PLB985 (De coursey *et al.* 2001) et pour étudier l'éventuelle existence d'un canal à protons au sein de la sous-unité gp91*phox* (Morgan *et al.* 2002). En effet, les cellules COS7 n'expriment pas constitutivement de canal à protons, contrairement aux cellules CHO et HEK293 (Maturana *et al.* 2001). Ces cellules COS*phox* produisent des ions superoxyde après stimulation par le PMA mais ne possèdent pas d'activité de transfert de protons (différence de potentiel mesuré entre les milieux extra et intra cellulaires). Ainsi, les auteurs supposent que les cellules COS*phox* possèdent un autre mécanisme de compensation de charge : il s'agirait peut-être d'un canal à Cl^-. Ces résultats contredisent l'existence d'un canal à protons au niveau du troisième passage transmembranaire de gp91*phox* contenant les Histidines impliquées dans la liaison des hèmes (Maturana *et al.* 2000).

Les résultats opposés des deux équipes pourraient s'expliquer par le fait que gp91*phox* jouerait le rôle de canal à protons uniquement lorsqu'il est exprimé seul. En présence de p22*phox*, il n'assurerait plus cette fonction.

4. Nox1 et analogues des facteurs cytosoliques p47*phox* et p67*phox* (NOXO1 et NOXA1)

4.1 Etude de Nox 1

Nox1 est un analogue de Nox2 (gp91*phox*) de la NADPH oxydase présent au niveau de l'épithélium intestinal (Suh *et al.* 1999 ; Banfi *et al.* 2000). L'étude de cette protéine a été réalisée grâce à trois types cellulaires : les PLB985-XCGD, les cellules K562 et les cellules $CD34^+$(Geiszt *et al.* 2003a). Cet article tente de démontrer que Nox1 possède un mode d'activation et de fonctionnement analogue à gp91*phox* ou Nox2 et notamment, essaye d'étudier les interactions possibles de Nox1 avec les facteurs cytosoliques du complexe oxydase des phagocytes. Les cellules PLB985-XCGD contenant tous les composants de l'oxydase, à l'exception de Nox2, ont été infectées par un rétrovirus codant la synthèse de Nox1, ce qui a permis de restaurer l'activité oxydase après activation par le PMA (l'activité représente 2% de l'activité des PLB985 normaux). Dans un second temps, les cellules K562 - qui expriment constitutivement la protéine p22*phox*- ont été transfectées avec les ADNc de p47*phox* et p67*phox* et $^+$/- l'ADNc de Nox 1 afin d'étudier les interactions entre Nox1 et les facteurs cytosoliques. L'expression simultanée des trois protéines permet une production maximale d'ions superoxyde ce qui montre que l'assemblage du complexe a eu lieu. Enfin, les cellules $CD34^+$ d'un patient CGDX sont infectées *in vitro* avec le rétrovirus codant Nox1. Après trois semaines de culture, la production d'ions superoxyde mesurée équivaut à 3% de la production des $CD34^+$ normaux. L'absence de gp91*phox*, contrôlée par cytométrie en flux, montre que Nox1 est responsable de cette activité oxydase.

En conclusion, Nox1 présente deux points communs avec Nox2 du système *phox* : d'une part, c'est un système activable - *via* la PKC- par le PMA, et d'autre part il peut être activé par les mêmes cofacteurs cytosoliques que Nox2: les protéines p47*phox* et p67*phox*. Ces résultats confirment que Nox1, en produisant des ROS, participe à la défense contre les pathogènes

intestinaux. Cependant, une production excessive de ROS pourrait être à l'origine de pathologies inflammatoires du tube digestif voire même de cancers du colon. L'homologie fonctionnelle entre Nox1 et gp91*phox* est intéressante pour étudier de nouvelles approches thérapeutiques des CGDX (Geiszt *et al.* 2003a).

4.2 Etude de NOXO1 et NOXA1

Trois équipes, en 2003, se sont intéressées aux analogues des facteurs cytosoliques p47*phox* et p67*phox* (Banfi *et al.* 2003 ; Takeya *et al.* 2003 ; Geiszt *et al.* 2003b). Nox1, comme nous l'avons vu précédemment, est capable de générer des ions superoxyde en présence de p47*phox* et p67*phox* (Geiszt *et al.* 2003b) ; ces deux facteurs cytosoliques semblent être exprimés uniquement dans les cellules phagocytaires. Les différentes équipes émettent l'hypothèse de la présence d'analogues dans les cellules épithéliales intestinales. En effet, les auteurs ont découvert, grâce à l'utilisation d'une banque génomique de données, et par analogie de séquences, des analogues des facteurs cytosoliques nommés NOXO1 (Nox organizer 1, analogue de p47*phox*) et NOXA1 (Nox activator 1, analogue de p67*phox*). Par Northern Blot, l'ARNm de NOXO1 est mis en évidence uniquement dans ces cellules alors que l'ARNm de NOXA1 est beaucoup plus ubiquitaire.

Afin d'étudier le rôle respectif des analogues des facteurs cytosoliques de l'oxydase vis-à-vis de Nox1, l'équipe de Geiszt a effectué une transfection des ADNc de Nox1, NOXO1 et NOXA1 dans les cellules fibroblastiques NIH-3T3 (Geiszt *et al.* 2003b). Leur but a été de savoir si Nox1 était capable de fonctionner comme gp91*phox* c'est-à-dire de former un complexe « type » oxydase permettant la formation d'ions superoxyde dans les cellules épithéliales de l'intestin. L'expression simultanée des trois protéines a permis aux cellules de produire des ions superoxyde, après activation par le PMA. De plus, lorsque les auteurs ont transfecté p47*phox* et p67*phox*, les partenaires connus de Nox2, ils obtiennent une activation de Nox1 comme l'avait précédemment démontré Banfi *et al.* en 2003. Cela montre que Nox1 et Nox2 possèdent des mécanismes d'activation proches. Afin de savoir si gp91*phox* est activable par ces deux analogues, les cellules K562 qui contiennent uniquement la protéine p22*phox*, ont été transfectées par les ADNc de gp91*phox*, NOXO1 et NOXA1. L'activité oxydase reconstituée dans les cellules K562-gp91*phox* est très faible en présence de NOXO1 et NOXA1 (<1% de l'activité reconstituée avec p47*phox* et p67*phox*). Cela montre la spécificité des deux analogues pour Nox1.

Une autre équipe a réalise le même type de travail en réalisant la cotransfection des ADNc de Nox1, NOXO1 et NOXA1 dans les cellules HEK293, CHO et COS7 (Banfi *et al.* 2003). Selon eux, la production d'ions superoxyde est PMA indépendante ce qui est contraire aux résultats trouvés dans les fibroblastes NIH-3T3 (Geiszt *et al.* 2003b). L'addition d'AA ou de PMA n'augmenterait pas l'activité oxydase. Par contre, l'activation de Nox1 par p47*phox* et NOXA1 serait PMA dépendante ce qui prouve que p47*phox* et NOXO1 ont des mécanismes d'action différents.

Enfin l'équipe de Takeya a réalisé un travail très complet sur ce même sujet à partir des cellules HEK293, CHO, COS7 et K562. Globalement, des résultats similaires sont obtenus et le système Nox1/NOXO1/NOXA1 a une activité oxydase augmentée en présence de PMA. Cependant, la stimulation par le PMA a des effets différents d'un type cellulaire à l'autre : les cellules COS7 sont plus sensibles au PMA que les HEK293 : cela pourrait s'expliquer par la présence d'une quantité plus importante de Rac-GTP dans les cellules COS7 qui activerait le processus d'assemblage. Ces remarques ont également été faites par d'autres équipes (Cheng *et al.* 2004a).

Par contre, l'activation par le PMA semble nécessaire lorsque gp91*phox* ou Nox1 sont activés par p47*phox* (en présence de p67*phox* ou NOXA1). En effet, NOXO1, contrairement à p47*phox*, ne possède pas de région AIR (auto inhibition), responsable des liaisons intra-moléculaires dans la séquence de p47*phox*. Ainsi, les phosphorylations des résidus Sérines de p47*phox* qui détruisent les liaisons intra-moléculaires, semblent inutiles pour activer NOXO1 qui peut directement interagir avec p22*phox*.

De plus, p67*phox* et NOXA1 ne semblent pas avoir les mêmes mécanismes de régulation. L'interaction entre p40*phox* et p67*phox* serait indispensable et provoquerait la translocation des facteurs cytosoliques (Kuribayashi *et al.* 2002). Contrairement à p67*phox*, NOXA1 est incapable d'interagir avec la protéine p40*phox* (observé avec la technique du double hybride) et ne provoque pas la translocation des facteurs cytosoliques. Par contre, NOXA1 interagit avec Rac via le domaine TPR et avec p47*phox* via un domaine SH3, comme p67*phox*.

Enfin, les auteurs ont étudié le rôle de p22*phox* dans les cellules CHO exprimant Nox1, NOXO1 et NOXA1. Notons que les cellules CHO ont une très faible expression constitutive de p22*phox*. Ils ont transfecté ces cellules avec l'ADNc de p22*phox* puis ont comparé la production d'ions superoxyde des cellules exprimant ou non p22*phox*. L'activité oxydase est

très largement augmentée en présence de p22*phox* ce qui prouve que Nox1 forme un hétérodimère avec p22*phox*.

Plus récemment, la structure et la localisation intracellulaire de NOXO1 ont été étudiées par microscopie confocale dans les cellules HEK293 transgéniques exprimant Nox1 et NOXO1 et/ou NOXA1 (Cheng *et al.* 2004a). Contrairement à p47*phox*, NOXO1 est localisé dans la membrane, comme Nox1, dans la cellule au repos. Cette co-localisation a d'abord été expliquée par l'interaction du domaine SH3 de NOXO1 avec la protéine p22*phox*. En effet, étant donné l'absence de domaine AIR dans NOXO1, le SH3 n'est pas masqué et peut interagir avec p22*phox* (Takeya *et al.* 2003). Cependant, le domaine PX de NOXO1 semble jouer un rôle important dans cette co-localisation. Pour comprendre le rôle de ce domaine, les auteurs ont comparé l'affinité pour les lipides, des domaines PX de p47*phox* et de NOXO1 en utilisant les cellules HEK293 (Cheng *et al.* 2004a).
Le domaine PX de p47*phox* se lie spécifiquement à des lipides phosphorylés par la phosphatidylinositol 3-kinase (Ago *et al.* 2001). L'activation simultanée de la phosphatidylinositol 3-kinase et de la PKC (par des produits bactériens par exemple) déclenche l'assemblage du complexe. En fait, il semblerait que les domaines PX de NOXO1 et de p47*phox* n'aient pas les mêmes ligands lipidiques. Le domaine PX de p47*phox* interagit avec des lipides phosphorylés, présents lors de l'activation de l'oxydase alors que le domaine PX de NOXO1 interagit avec des lipides présents constitutivement dans la membrane de la cellule au repos. Ainsi, une mutation dans la séquence du domaine PX de NOXO1 empêche la co-localisation de Nox1 et de NOXO1. Les auteurs ont donc montré que le domaine SH3 de NOXO1 n'est pas le seul élément responsable de la colocalisation de Nox1, p22*phox* et NOXO1 mais que le domaine PX intervient aussi pour expliquer la co-localisation de NOXO1 et Nox1.

La régulation et les mécanismes d'activation de Nox3 présent dans les tissus fœtaux, ont été étudié à partir du modèle transgénique HEK293 (Cheng *et al.* 2004b). Les auteurs se sont intéressés au rôle du domaine AIR présent dans la séquence de p47*phox* mais absent de NOXO1. L'activation de Nox3 par p47*phox* serait PMA dépendante contrairement à l'activation en présence de NOXO1. De plus, la délétion du domaine AIR de p47*phox* semble induire une activation PMA-indépendante de Nox3 et de gp91*phox*. En fait, les domaines AIR et SH3 de p47*phox* pourraient être liés dans la cellule au repos afin d'empêcher l'interaction avec p22*phox*. Lors de l'activation du complexe, le PMA induirait la phosphorylation de

résidus Sérines du domaine AIR de p47*phox* ce qui provoquerait la rupture de cette interaction (AIR/SH3 de p47*phox*) et permettrait la fixation de p47*phox* à p22*phox*. Ainsi, l'absence de domaines AIR dans la séquence de NOXO1 explique le mécanisme d'activation, PMA indépendant, de Nox3.

5. Thérapie cellulaire *ex vivo* et thérapie génique

La thérapie cellulaire *ex vivo* consiste à transfecter les cellules du patient avec l'ADNc codant la synthèse de la protéine déficitaire. Ces essais ont débuté en utilisant les LB-EBV des patients puis les cellules souches hématopoiétiques $CD34^+$. Le but de ces manipulations *ex vivo* est d'obtenir des cellules génétiquement modifiées qui permettent :

- une restauration de l'activité oxydase,
- d'assurer une production d'ions superoxyde suffisante, après avoir été infusées au malade.

5.1 Les LB-EBV

5.1.1 Utilisation des vecteurs plasmidiques

Les premiers travaux de thérapie cellulaire *ex vivo* ont été réalisés à partir de LB-EBV de patients atteints de CGDA47°, plus aisément transfectables et cultivables que les neutrophiles. Ces cellules déficitaires en p47*phox* ont été transfectées par électroporation avec l'ADNc de p47*phox*, préalablement cloné dans un vecteur plasmidique épisomal (Chanock *et al.* 1992). Les cellules transfectées ont montré une expression ainsi qu'une production d'ions superoxyde mais en faible quantité. Cependant, l'interprétation des résultats est délicate à cause de la grande variabilité de production d'ions superoxydes des LB-EBV normaux. Ainsi, une faible augmentation de production d'ions superoxyde dans les LB-EBV transfectés ne semble pas être significative.

Une autre équipe a effectué ce même travail l'année suivante (Volpp *et al.* 1993). Le résultat a été particulièrement intéressant puisque la production d'ions superoxyde mesurée dans les LB-EBV transfectés était équivalente à celle des LB-EBV normaux. Ainsi, l'expression de p47*phox* dans les LB-EBV de patients CGD A47° permettrait de reconstituer un complexe oxydase actif.

Le même type de travail a été entrepris en utilisant les LB-EBV des patients CGDA67 (Chanock *et al.* 1996). Dans un premier temps, les LB-EBV de patients atteints de CGD A67° ont été transfectés avec l'ADNc de p67*phox*, cloné dans un vecteur plasmidique. Ainsi, la production d'ions superoxyde dans ces cellules a été partiellement restaurée après transfection. Dans un second temps, deux vecteurs rétroviraux contenant des fragments de l'ADNc p67*phox* ont été transfectés indépendamment dans les LB-EBV des patients CGDA67° puis la production d'ions superoxyde a été mesurée.
Ce travail a permis d'étudier une stratégie de thérapie cellulaire *ex vivo* et de préciser les rôles de deux régions de la protéine p67*phox* dans l'activation du complexe oxydase.

5.1.2 Utilisation des vecteurs rétroviraux

La même expérience que celle de Chanock en 1992 a été menée en utilisant un vecteur rétroviral (type pLXSN) permettant la synthèse de la protéine p47*phox* recombinante dans les cellules infectées (Cobbs *et al.* 1992). Après transfection, les LB-EBV-CGD 47° ont montré une expression de p47*phox*, mais en quantité dix fois inférieure par rapport aux LB-EBV normaux non transfectés. L'absence de production d'ion superoxyde dans ces cellules est évaluée par chimiluminescence après activation par le PMA. Le manque de restauration d'activité oxydase dans ces cellules transfectées peut s'expliquer par le fait que l'activité oxydase est déjà très faible et difficilement mesurable dans les LB-EBV normaux. De ce fait, si l'expression de p47*phox* est encore diminuée dans les cellules transfectées, il est peu probable de pouvoir mesurer l'activité oxydase dans ces cellules. La transfection des LB-EBV a été comparée à celle réalisée dans des lignées cellulaires hématopoïétiques humaines (HL60, U937) (Cobbs *et al.* 1992). L'expression de la protéine p47*phox* dans ces cellules s'est avérée largement supérieure à celle mesurée dans les LB-EBV transfectés. De plus, les auteurs ont constaté une nette augmentation après différentiation des cellules par le DMSO devenant équivalente à celle détectée dans les neutrophiles.

On peut conclure que les LB-EBV ne sont pas un bon modèle pour les essais de thérapie cellulaire *ex vivo* et que les cellules promyélocytaires types HL60 ou U937 constituent de meilleurs modèles cellulaires pour ces expériences.

La même année, d'autres auteurs ont testé une théapie cellulaire *ex vivo* en utilisant les LB-EBV CGD A47° et un vecteur rétroviral (type pBabe) (Trasher *et al.* 1992). Les résultats obtenus sont différents de ceux de Cobbs *et al.* en 1992 puisque la production d'ions superoxyde (réduction du cytochrome c, après activation par le PMA) des LB-EBV CGD transfectés par l'ADNc p47*phox*, correspond au tiers de la production mesurée dans les LB-EBV normaux. L'utilisation d'un vecteur rétroviral différent peut expliquer ce résultat. En effet, il induit certainement une expression de la protéine p47*phox* plus importante dans les cellules transfectées ce qui se traduit par une production d'ions superoxyde supérieure.

5.1.3 Utilisation du système de sécrétion de type III

Enfin, au laboratoire, des essais de transfection via le système de secrétion de type III de *Pseudomonas aeruginosa* ont été réalisés dans les LB-EBV de patients CGDA67° (Polack *et al.* 2000). La protéine Exo S est le facteur de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* secrété par le système de type III. L'ADNc de la protéine ExoS a été fusionné à l'ADNc de p67*phox*. La construction ExoS-ADNc p67*phox* a été clonée dans un vecteur plasmidique puis transfectée par électroporation dans *Pseudomonas aeruginosa.* Le système de secrétion de type III permet d'injecter la protéine hybride dans le cytosol des LB-EBV CGD. Dans un premier temps, les auteurs ont mis en évidence, par immunoblot, la présence de la protéine ExoS-p67*phox* dans le cytosol des LB-EBV A67° infectés par la souche de *Pseudomonas aeruginosa.* La protéine hybride a été retrouvée dans le cytosol des LB-EBV prouvant ainsi l'efficacité du système de secrétion de type III. Dans un second temps, la protéine ExoS-p67*phox* a été purifiée sur colonne d'affinité (coatée avec un Ac anti p67*phox*) puis testée *in vitro* en présence de cytochrome b_{558} de neutrophiles et des facteurs cytosoliques p47*phox* et p40*phox* issus des mêmes LB-EBV. La production d'ions superoxyde mesurée a prouvé que l'activité oxydase a été restaurée. La protéine hybride ExoS-p67*phox* a remplacé p67*phox* ce qui a permis l'assemblage des facteurs cytosoliques au cytochrome b_{558} et l'activation du complexe oxydase.

Enfin, une activité oxydase -mesurée par chimiluminescence- a été reconstituée dans les LB-EBVA67° infectés par la souche *Pseudomonas aeruginosa* secrétant la protéine ExoS-p67*phox*. En conclusion, la protéine ExoS-p67*phox* a pu s'assembler aux autres facteurs cytosoliques afin de reconstituer un complexe oxydase actif. Ce système constitue une perspective intéressante pour les projets de thérapie génique.

Cependant, même si ces derniers résultats sont intéressants, les LB-EBV ne constituent pas une cible idéale pour l'étude de stratégies thérapeutiques de la CGD, par thérapie cellulaire *ex vivo*. En effet, la production d'ions superoxyde des LB-EBV normaux est bien inférieure à celle des neutrophiles : il est donc difficile de détecter une restauration, même partielle, de l'activité oxydase après transfection des LB-EBV de patients CGD.

5.2 Les PLB 985

Les cellules PLB985 bipotentes ont la capacité de se différencier en granulocytes ou en monocytes après addition d'agents de différenciation spécifiques, le DMF ou le PMA respectivement (Tuker *et al.* 1987). Ces cellules sont alors capables de produire des ions superoxyde en quantité presque équivalente aux neutrophiles (Zhen *et al.* 1993). La transfection des PLB985 KO, mimant les neutrophiles de CGD type X°, avec l'ADNc de gp91*phox* cloné dans un vecteur plasmidique, a permis de rétablir la production d'ions superoxyde équivalente à celle mesurée dans les PLB985 normaux (Bionda *et al.* 2004). Ces cellules PLB985KO ont permis de réaliser d'autres essais de transfections avec des Adénovirus (Li *et al.* 1998). 2 à 14% des cellules sont NBT positives dans la première semaine de transfection puis l'activité oxydase reste stable pendant 8 à 14 mois. Des essais ont aussi été réalisés avec des Lentivirus contenant l'ADNc gp91*phox* ; après infection des cellules X-CGD, 26 à 48% des cellules expriment gp91*phox*. Après différenciation des cellules, 63% ont montré une activité oxydase, avec une production d'ions superoxyde de 31% par rapport aux cellules PLB985 normaux (Saulnier *et al.* 2000).
On peut conclure que les cellulesPLB985 constituent un bon modèle pour réaliser des essais de thérapie cellulaire *ex vivo*.

5.3 Les cellules CD34$^+$

Des études sur les progéniteurs hématopoïétiques s'avèrent essentielles pour envisager des stratégies de thérapie génique. C'est ainsi qu'en 1993, l'équipe de Malech a débuté des études sur les progéniteurs hématopoïétiques du sang périphérique ou PBHP (peripheral blood hematopoietic progenitors). Puis, les cellules CD34$^+$ ont été particulièrement étudiées dans les essais de thérapie cellulaire *ex vivo* et les essais de thérapie génique. Cette technique consiste

à prélever les précurseurs hématopoïétiques $CD34^+$ du patient atteint de CGD (hémaphérèse) puis à corriger le déficit en introduisant une copie fonctionnelle du gène affecté et à réinjecter les cellules génétiquement modifiées au patient.

Les premiers essais de thérapie cellulaire *ex vivo* chez des patients atteints de CGD A47 ont été réalisés à partir des PBHP. En 1993, l'équipe de Malech (Sekhasaria *et al.* 1993) a construit un rétrovirus MFG (Maloney Leukemia virus-based) intégrant l'ADNc de p47*phox*. Dans un premier temps, le vecteur a été testé sur les LB-EBV des patients permettant de contrôler que la transfection par le rétrovirus codant p47*phox* rétablissait la production d'ions superoxyde dans ces cellules, comme cela a été précédemment démontré par d'autres équipes. Les conditions optimales de culture et de différentiation des PBHP ont été déterminées afin d'augmenter l'efficacité de transfection. Les PBHP des patients CGD ont été isolés (aphérèse) puis purifiés. Afin de sélectionner les cellules $CD34^+$, un anticorps anti $CD34^+$ a été utilisé. Il fixe les cellules $CD34^+$ puis le complexe immun est séparé grâce à des billes magnétiques recouvertes d'un anti IgG. Les PBHP ont été ensuite différenciés avant d'être infectés avec le rétrovirus. Le test au NBT et la chimiluminescence ont permis d'évaluer la production d'ions superoxyde dans les cellules transfectées. Les résultats montrent qu'après infection avec le rétrovirus codant p47*phox*, l'activité oxydase des progéniteurs hématopoïétiques -nulle ou faible avant transfection- est augmentée. Ces premiers résultats sont intéressants mais les conditions de culture des PBHP doivent être améliorées afin d'assurer la prolifération de ces cellules à long terme. Une réinfusion au patient des cellules modifiées pourra alors être envisagée.

La même équipe s'est intéressée ensuite aux CGD X et CGD A22° (Li *et al.* 1994). Ces CGD sont caractérisées par l'absence de cytochrome b_{558}. En effet, les deux sous-unités se stabilisent l'une et l'autres et lorsque l'une d'entre elles est absente, le cytochrome b_{558} ne peut être synthétisé. Les mêmes types de rétrovirus (contenant l'ADNc de gp91*phox* ou p22*phox*) ont été utilisés et les cellules $CD34^+$ des patients ont été purifiées puis infectées avant d'être différenciées *in vitro*. Les cellules $CD34^+$ transfectées ont pu produire des ions superoxyde. Cependant, la quantité produite était faible et ne représentait que 2,5% à 4,9% de la production des $CD34^+$ normaux. L'expression de la protéine déficiente a permis de reconstituer un cytochrome b_{558} fonctionnel capable de produire des ions superoxyde en présence des facteurs cytosoliques.

Un autre essai été réalisé par la même équipe avec des cellules $CD34^+$ de patients CGD A67° (Weil *et al.* 1997). Après transduction des cellules avec le rétrovirus contenant l'ADNc de p67*phox*, l'activité oxydase a été partiellement restaurée : la production d'ions superoxyde représentait 25% de la production des $CD34^+$ normaux. Bien que ce taux paraisse faible, il peut être suffisant *in vivo* pour corriger le déficit chez les patients CGD.

C'est encore l'équipe de Malech qui a poursuivit ces études en s'intéressant cette fois à un schéma de thérapie génique chez cinq patients CGD A47 (Malech *et al.* 1997). C'est un essai clinique en phase I dont le protocole est le suivant. Les patients reçoivent d'abord plusieurs injections de G-CSF permettant de mobiliser les précurseurs hématopoïétiques. Cinq jours plus tard, les cellules PBSC sont prélevées par hémaphérèse puis purifiées. Vingt-quatre heures après, les cellules sont cultivées et infectées par le rétrovirus MFGS contenant l'ADNc de p47*phox*. Trois jours après, les patients reçoivent de 0,1 à $4,7.10^6$ cellules transfectées / kg. En parallèle, après dix-sept jours de culture en milieu liquide, la production d'ions superoxyde des cellules $CD34^+$ -stimulées par le PMA- est évaluée par chimiluminescence. *In vitro*, l'activité oxydase est également mesurée par cytométrie en flux, avec la dihydrorhodamine (DHR). Enfin, l'expression de la protéine p47*phox* est évaluée par immunoblot. A ce stade, les cellules se sont différenciées *in vitro*, et 10 à 12% sont des granulocytes, responsables du signal positif en cytométrie en flux. La cytométrie en flux sert également *in vivo* à détecter les neutrophiles du patient dont l'activité oxydase a été restaurée. Globalement, ces neutrophiles fonctionnels apparaissent deux semaines après la réinfusion des progéniteurs. Ces derniers subissent d'abord un cycle de maturation et de différentiation indispensable dans la moelle. Un mois après la réinfusion, seulement 0,004% à 0,05% des granulocytes circulants ont une activité oxydase et ce taux diminue et devient nul six mois plus tard. Bien qu'assez prometteur *ex vivo*, cet essai n'a pas donné les résultats escomptés *in vivo*. Il pourrait peut-être être amélioré en administrant au patient, avant l'autogreffe, un conditionnement myéloablatif, c'est-à-dire une cure de chimiothérapie et de radiothérapie.

L'année suivante, un autre essai clinique a été entrepris par la même équipe chez des patients atteints de CGD X (Malech *et al.* 1998). Seul le protocole de transduction a été modifié. En effet, dans ce dernier protocole, ils utilisent des fragments de fibronectine humaine pour recouvrir le fond de la boîte de culture cellulaire dans laquelle a lieu la transduction des $CD34^+$ par le retrovirus. Cette méthodologie a été décrite par Hanenberg *et al.* en 1996 et semble augmenter le rendement de transduction des progéniteurs

hématopoïétiques. Finalement, le résultat final est le même que précédemment puisque seuls 0,06% à 0,2% des neutrophiles circulants ont une activité oxydase un mois après la réinfusion, et ce taux diminue au cours du temps.

Ainsi, deux hypothèses peuvent être émises. D'une part, l'administration d'un conditionnement myéloablatif avant la réinfusion des cellules pourrait améliorer le résultat obtenu. D'autre part, on pourrait envisager d'insérer un gène de résistance à un médicament dans le rétrovirus transfecté. Ainsi, en administrant ce médicament au patient, la pression de sélection pourrait permettre d'augmenter *in vivo* le nombre de $CD34^+$ génétiquement modifiés.

6. Objectifs du travail

Les modèles d'étude cellulaires de la NADPH oxydase ont particulièrement été développés pour l'étude des CGD liées à l'X : les Lymphocytes B immortalisés par le virus d'Epstein-Barr les cellules PLB985 sont les principaux outils utilisés.
Actuellement, il n'existe pas de modèles cellulaires qui permettent l'étude fonctionnelle approfondie des CGD autosomales récessives et plus particulièrement les CGD AR^+. En effet, la quantité de sang prélevée au patient ne permet pas d'approfondir le diagnostic biochimique et moléculaire de la maladie. La constitution d'un modèle permettrait de reproduire des mutations ou d'en créer *de novo* afin de vérifier l'effet de ces mutations sur le phénotype. Par mutagénèse dirigée, des mutations faux sens peuvent être réalisées. Elles conduisent à la synthèse de protéines modifiées présentant des substitutions d'acides aminés dans leur séquence. Ainsi, il est possible d'identifier des régions protéiques impliquées dans le fonctionnement du complexe NADPH oxydase, via l'étude des interactions protéines/protéines.

L'objectif de ce travail a été de mettre en place un modèle cellulaire d'étude des granulomatoses septiques chroniques autosomales récessives (CGD AR) caractérisées par un défaut dans les gènes codant la petite sous-unité du cytochrome b_{558}, p22*phox* ou l'un des deux facteurs cytosoliques p47*phox* et p67*phox*. Pour cela, des cellules fibroblastiques de rein de singe, les cellules COS7 ont été choisiées.

Dans un premier temps, les cellules seront caractérisées afin de mettre en évidence:

1 - la présence d'un ou de plusieurs ARNmessagers codant la synthèse d'une (ou de plusieurs) protéines du complexe NADPH oxydase et / ou

2 - l'expression d'une (ou de plusieurs) protéines du complexe.

Dans un second temps, nous constituerons une lignée cellulaire COS7 transfectées par l'ADNc de gp91*phox* et permettant l'expression du cytochrome b_{558}. La fonctionnalité du cytochrome b_{558} recombinant exprimé dans les membranes plasmiques de ces cellules transfectées, sera alors évaluée en présence de cytosol de neutrophiles, afin de reconstituer une activité NADPH oxydase *in vitro*.

Puis, à partir de ces cellules transfectées, d'autres modèles exprimant le cytochrome b_{558} et un ou plusieurs facteurs cytosoliques pourront être obtenus. En effet, les ADNc de p47*phox*, p67*phox* et p40*phox* seront clonés dans des vecteurs d'expression eucaryotique possèdant des cassettes de résistance à un antibiotique, différentes puis transfectés dans les cellules COS7-cytochrome b_{558}.

Ces modèles cellulaires de CGD AR seront des outils intéressants pour étudier l'impact de certaines mutations des ADNc de p47*phox* ou p67*phox* sur le fonctionnement du complexe oxydase et les mécanismes moléculaires de son assemblage.

Deuxième partie : Matériel et méthodes

1. Préparations biologiques

1.1 Culture des cellules COS7

Les cellules COS7 de type sauvage (COS7WT) sont des cellules fibroblastiques de rein de singe. Elles sont cultivées à 37 °C, en atmosphère humide (5% CO_2), et divisées 2 fois par semaine. Le milieu de culture utilisé est le milieu DMEM/NUT MIX F-12 avec glutamax-1 et pyridoxine (Invitrogen®), SVF 10% (v/v), Pénicilline 100 U/ml, Streptomycine 100 µg/ml. Ces cellules sont adhérentes et il est nécessaire d'utiliser de la trypsine pour les décoller avant la division (0,05% trypsine, 0,53 mM EDTA pendant 3 min à 37 °C). Leur viabilité et leur numération sont évaluées par coloration au Bleu Trypan 0,07% (p/v).

1.2 Préparation d'extraits solubles

10^8 cellules sont récupérées, lavées en PBS et traitées par une solution anti-protéasique (DFP 3 mM) pendant 15 min dans la glace. Le culot cellulaire récupéré après centrifugation (13000 g, 10 sec, 4°C) est mis en suspension dans le tampon de lyse : Triton X100 1% (p/v), Hepes 10 mM, $MgCl_2$ 3,5 mM, PMSF 1 mM, leupeptine 0,1 mM , pH 7,4. La suspension cellulaire est lysée pendant 20 min dans la glace avec une agitation toutes les 5 min. Le surnageant appelé « extrait soluble Triton X100 1% » obtenu après centrifugation (30 min à 12000 g, 4°C) est ensuite utilisé pour effectuer les spectres différentiels du cytochrome b_{558}, le dosage des protéines et le Western blot.

1.3 Préparation de membranes et de cytosol

10^8 cellules sont récupérées, lavées en PBS et traitées par une solution anti-protéasique (DFP 3 mM) pendant 15 min dans la glace. Puis le culot cellulaire est remis en suspension dans le tampon PBS additionné d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (TCLK 10 µM, leupeptine 1,8 µM et pepstatine 1,5 µM). Il est ensuite soumis aux ultrasons dans la glace pendant 10 s à

l'aide d'un appareil Branson muni d'une sonde délivrant une puissance de 40 W. L'opération est répétée deux fois après un intervalle de 1 min dans la glace (évitant l'échauffement du milieu). L'homogénat de cellules cassées subit une centrifugation à 200 000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot représente les membranes brutes, elles sont remises en suspension dans le tampon PBS contenant le mélange d'inhibiteurs de protéases. Les membranes plasmiques et le cytosol sont conservés à – 80°C.

1.4 Les anticorps monoclonaux

1.4.1 Anticorps utilisés lors de la réalisation du Western blot

Ac anti p22*phox* du cytochrome b_{558} : Ac 449 dont l'épitope (^{182}GPQV^{185}) est cytosolique ; don du Pr. Roos; Amsterdam (Verhoeven *et al.* 1989).
Ac anti gp91*phox* du cytochrome b_{558} : Ac 48 dont l'épitope (^{498}EKDVITGL^{505}) est cytosolique; don du Pr Roos Amsterdam (Verhoeven *et al.* 1989).
Ac anti p47 *phox* : Ac anti peptide polyclonal (PC) de lapin (GREPI).
Ac anti p67 *phox* : Ac anti peptide PC de chèvre (Santacruz Biotechnology).
Ac anti p40 *phox* : Ac anti peptide PC de lapin dirigé contre la partie C-terminale (GREPI).
Ac anti Rac (1 et 2) : Ac anti peptide PC de lapin (GREPI ; Vergnaud *et al.* 2000)

1.4.2 Anticorps utilisés en cytométrie en flux

Ac anti gp91*phox* : Ac monoclonal 7D5 (Nakamura *et al.* 1987). L'épitope reconnu contient les séquences ^{160}IKNP^{163} et ^{226}RIVRG^{230} de gp91*phox* situées sur deux boucles extramembranaires (Burrit *et al.* 2001).
Ac anti p22*phox* : Ac monoclonal 449. L'épitope est cytosolique ce qui nécessite une perméabilisation préalable des cellules par la saponine 0,05% (p/v).

2. Techniques biochimiques

2.1 Dosage et analyse des protéines

2.1.1 Dosage des protéines par la technique de Pierce (BCA Protein Assay Kit®)

La concentration protéique, proportionnelle à l'augmentation de l'absorbance à 562 nm, est déterminée grâce à la courbe d'étalonnage établie à partir de concentrations croissantes de Sérum Albumine Bovine (BSA). Cette technique permet de mesurer de faibles concentrations protéiques comprises entre 20 µg/ml et 2000 µg/ml.

2.1.2 Western Blot des protéines

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 10% (v/v) en milieu dénaturant selon la technique décrite par Laemmli et Favre (Laemmli et Favre 1973).

2.1.2.1 Composition des gels d'acrylamide (pour 2 minigels de 6,5 X 9 cm, 1,5 mm d'épaisseur)

Gel de séparation 10 %		Gel de concentration	
Tris-HCl 1,5M pH 8,9	4,5 ml	Tris-HCl 0.5M pH 6,8	1,2 ml
Acrylamide/bisacrylamide 40%	4,5 ml	Acrylamide/bisacrylamide 40%	470 µl
SDS 10% (p/v)	180 µl	SDS 10% (p/v)	50 µl
Persulfate d'ammonium 10%	113 µl	Persulfate d'ammonium 10%	35µl
TEMED	18,8 µl	TEMED	5 µl
Eau distillée	qsp 20ml	Eau distillée	qsp 5ml

2.1.2.2 Electrophorèse des protéines en milieu dénaturant sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les extraits solubles Triton X100 1% sont dénaturés en présence de SDS 20% (p/v), tampon Tris-HCl 0,63 M pH 6,7, Bleu de bromophénol 0,04%, saccharose 10% (p/v), EDTA 10mM,

β Mercaptoéthanol 2,5% (v/v) pendant 1 min à 100 °C. La migration des échantillons se fait en appliquant un courant d'intensité constante (30 mA par minigel), pendant 1 heure.

2.1.2.3 Electrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les protéines séparées par électrophorèse SDS-PAGE sont transférées sur membrane de nitrocellulose (0,2 µm) en milieu semi-sec selon la technique de Towbin (Towbin *et al.* 1979). La membrane et le gel sont mis en contact et le transfert se fait en appliquant un courant constant entre deux électrodes (0,8 mA/cm de gel). Après une heure et demie de transfert, les sites libres de la nitrocellulose sont saturés avec le tampon TBS/Tween 20 (0,05% v/v) et 1% de protéines de lait (p/v). Puis, une incubation de deux heures avec les Ac primaires mono ou polyclonaux dilués (Tableau II) permet de mettre en évidence la présence des protéines recherchées. La membrane de nitrocellulose est lavée par le tampon TBS/Tween 20 0,05%, 5 fois pendant 5 minutes puis incubée durant 45 minutes à température ambiante avec un Ac secondaire dilué au 1/5000ème et couplé à la peroxydase. La membrane de nitrocellulose est ensuite abondamment lavée et l'addition du substrat chimiluminescent permet la révélation des protéines d'intérêt (kit ECL Amersham®). La réaction de chimiluminescence est assurée par l'oxydation du luminol par la peroxydase en présence d'un peroxyde et d'un catalyseur chimique comme le phénol. Le temps d'exposition varie de 10 secondes à 5 minutes suivant le taux de luminescence. Le film est ensuite développé de façon classique à l'aide d'un révélateur. Cette technique de détection non radioactive est très sensible et permet de révéler des quantités très faibles d'antigènes sur la membrane de nitrocellulose, inférieures à 1 pg de protéines.

Protéines	Ac primaire et dilution utilisée	Ac secondaire
gp91 *phox*	Ac 48 (1/500)	Ac anti IgG de souris
p22 *phox*	Ac 44.1 (1/500)	Ac anti IgG de souris
p47 *phox*	Ac PC de lapin; 1/1000ième	Ac anti IgG de lapin
p67 *phox*	Ac PC de chèvre ; 1/2000ième	Ac anti IgG de chèvre
p40 *phox*	Ac PC de lapin; 1/1000ième	Ac anti IgG de lapin
Rac 1 et Rac 2	Ac PC de lapin; 1/400ième	Ac anti IgG de lapin

Tableau II : Anticorps primaires et secondaires utilisés en Western Blot

2.2 Spectre d'absorption différentiel du cytochrome b_{558}

A l'aide de l'extrait protéique soluble Triton X100 1% natif, on réalise le « blanc dosage» qui correspond au spectre d'absorption du cytochrome b_{558} à l'état oxydé. Puis l'ajout de dithionite de sodium réduit le cytochrome b_{558} et l'absorbance est alors mesurée (longueur d'onde : entre 400 et 650 nm) contre le précédent « blanc dosage ». Ce spectre d'absorption différentiel permet de déterminer la quantité de cytochrome b_{558} présent. Il est caractérisé par la présence de trois bandes d'absorption caractéristiques: α β, γ, respectivement à 558 nm, 430 et 426 nm. L'activité totale (pmoles/ml) et l'activité spécifique (pmoles/mg) du cytochrome b_{558} sont calculées à partir de la valeur du □DO à la longueur d'onde 558 nm (ε_{558} = 21,7 $mM^{-1}.cm^{-1}$) et du dosage de protéines des extraits solubles.

2.3 Cytométrie en flux

2.3.1 Evaluation de l'expression de gp91*phox* et de p22 *phox* dans les cellules COS7

La cytométrie en flux va nous permettre de vérifier la présence des protéines gp91*phox* et p22*phox* dans les cellules COS7, en utilisant les Ac monoclonaux 7D5 et Ac 449.
5.10^5 cellules sont lavées, centrifugées (10 sec, 13000 g), réparties en microtubes de 1,5 ml et reprises dans 100 µl de PBS (A/Ca^{++}+/- saponine 0,05% (p/v)) . La saponine est utilisée dans le cas de l'Ac 449 dont l'épitope cytosolique nécessite une perméabilisation préalable. Puis, les cellules sont incubées en présence de l'Ac 7D5 ou Ac 449 (10 µg/ml) pendant 30 min dans la glace. Un témoin négatif est réalisé en remplaçant l'Ac par des IgG1 « irrelevant » de souris. Enfin 150 µl d'un deuxième anticorps anti IgG de souris (dilué au 1/200ième) sont ajoutés. Il s'agit d'un Anti Fab' des IgG marqué à la phycoérythrine (le fluorochrome). Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 min dans la glace, à l'abri de la lumière, centrifugées (10 sec, 13000 g) et lavées 2 fois avec du PBS (A/Ca^{++}+/- saponine 0,05%). Enfin, le culot est repris par 500 µl de PBS (A/Ca^{++}). Les cellules sont maintenues dans la glace avant l'analyse par cytométrie en flux (FACScalibur ; Becton Dickinson). La lecture est effectuée en position FL2 et les données sont collectées sur 10000 cellules avec le logiciel CellQuest software. Une compensation électronique FL2-FL1 est de 15%.

2.3.2 Tri cellulaire

La cytométrie en flux est utilisée, dans ce cas, pour purifier une population de cellules transfectées par l'ADNc de gp91*phox* (Grâce à l'aide du Dr Matthieu, CRSSA, Grenoble). Les cellules sont traitées comme indiqué ci-dessus et la technique de tri sur jet est utilisée en mode enrichissement (pour revue « La cytométrie en flux, » P. Métézeau, Editions PULIM). Grâce à une légère surpression, la suspension à analyser arrive dans une tubulure qui assure le centrage hydrodynamique du jet. Les cellules passent par un premier trou de 50-70 µm de diamètre. Ce micro-trou, polarisé, permet la mesure électrique du volume. Puis le jet intercepte un ou plusieurs faisceaux laser ; la fluorescence et la lumière diffusée à 90° sont collectées par un système optique et mesurées au moyen de photomultiplicateurs. La diffusion aux petits angles est également mesurée au moyen d'une photodiode. Sur les trieurs de cellules, le jet sort par un deuxième trou d'environ 70-100 µm de diamètre. Un générateur de vibrations (dispositif ultrasonore piézo-électrique) permet le fractionnement du jet en gouttelettes. Elles sont chargées, ce qui permet de les dévier dans un champ à haute tension créé entre deux plaques. Les cellules sont ainsi triées et recueillies dans des tubes à essai. Le cytomètre est piloté par un système informatique. Cette technique n'endommage pas les cellules ainsi triées, elles peuvent donc être remises en culture stérilement.

2.4 Mesure de l'activité NADPH oxydase reconstituée en « cell-free system » (CFS) par réduction du cytochrome *c*, sensible à la SOD

En 1984, le premier système de reconstitution de l'activité oxydase en milieu acellulaire est décrit (Heynemann *et al.* 1984 ; Bromberg *et al.* 1984). Il permet de reconstituer une activité NADPH oxydase en mettant en contact une fraction membranaire et une fraction cytosolique préparées à partir de neutrophiles au repos, en présence de GTP, de magnésium ($MgCl_2$) et d'un acide gras à longue chaîne insaturée (comme l'acide arachidonique, AA) ou d'un agent amphiphile (SDS). A chaque série d'expérience, il est nécessaire de déterminer la quantité optimale d'AA à ajouter au système de reconstitution qui dépend essentiellement de la qualité des membranes plasmiques utilisées. Après addition de NADPH, les $O_2^{\cdot-}$ sont mesurés par réduction du cytochrome *c* sensible à la SOD (Pilloud-Dagher *et al.* 1989 ; Cohen-Tanugi *et al.* 1991).

2.4.1 Préparation du milieu de reconstitution d'activité oxydase

Un milieu commun de pré-incubation pour 10 essais est préparé :

	Quantité	Concentration finale
Membranes brutes	0,3 mg	0,3 mg/ml
Cytosol	3 mg	3 mg/ml
$MgCl_2$ (50mM)	100 µl	5 mM
GTPγS (2mM)	20 µl	40 µM
PBS	qsp 1000 µl	qsp 1 ml

Le milieu commun (1 ml) est divisé en fractions de 100 µl (milieu de pré-incubation), ces dernières sont conservées dans la glace jusqu'à utilisation (2 h maximum).

2.4.2 Détermination de l'optimum d'acide arachidonique

La réduction du NBT est habituellement utilisée pour déterminer la quantité optimale d'acide arachidonique (AA) nécessaire pour obtenir une production maximale d'$O_2^{\cdot-}$ de l'oxydase. Des concentrations croissantes d'AA de 0 à 100 nmoles sont ajoutées à 100 µl du milieu de pré-incubation, et après agitation le mélange est incubé 10 min à température ambiante. L'ensemble est transféré dans une cuve de spectrophotomètre contenant les composés suivants :

Composés	Quantité / cuve	Concentration finale
NBT (10mM)	10 µl	100 µM
NADPH (10mM)	15 µl	150 µM
PBS^-	900 µl	

Le mélange réactionnel est incubé pendant 2 min à température ambiante avant d'initier l'activité NADPH oxydase par 50 µl de SDS 10%. La lecture de l'absorbance à 550 nm du NBT permet de suivre la réduction par les $O_2^{\cdot-}$ produits .

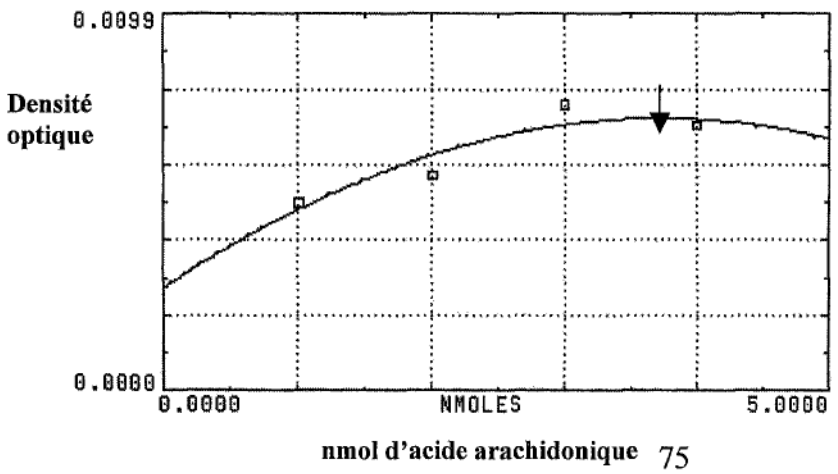


Figure 12 : Détermination de la concentration optimale d'acide arachidonique à utiliser pour la mesure de l'activité NADPH oxydase *in vitro*.

2.4.3 Mesure de la production d'O_2^- par la réduction du cytochrome *c*, sensible à la SOD

Des aliquots (100 µl) du milieu de pré-incubation activés par la quantité optimum d'acide arachidonique préalablement déterminée, sont placés dans une cuve de spectrophotomètre contenant le tampon PBS^- (qsp 1ml) supplémentés par du cytochrome *c* (100 µM). La réaction est initiée par l'addition de NADPH (150 µM). La production d'ions O_2^- est suivie à 37°C par la réduction du cytochrome *c* à 550 nm (coefficient d'extinction molaire εcyt *c* = 21,1 $mM^{-1}.cm^{-1}$). On mesure une augmentation d'absorbance. La réduction du cytochrome *c* est inhibée par l'addition de la superoxyde dismutase (SOD) 15 U.

2.5 Mesure de l'activité NADPH oxydase par chimiluminescence

La chimiluminescence est une technique qui permet de quantifier l'activité NADPH oxydase des cellules. Après activation des cellules par les stimulants solubles (Phorbol Myristate Acetate (PMA) ou Acide Arachidonique (AA)) les cellules produisent des ions superoxyde qui sont transformés en H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène) par la peroxydase : $2H^+ + 2O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Le peroxyde d'hydrogène en présence de luminol génère l'émission de photons qui seront quantifiés par luminescence. L'émission d'un rayonnement lumineux après quelques minutes à une longueur de 428 nm permet de quantifier l'activité oxydase, exprimée en somme des RLU (Relative Luminescent Unit).

10^6 cellules COS7 WT ou transgéniques sont lavées en PBS, reprises par 50 µl de tampon PBS^+ (PBS additionné de $CaCl_2$ 0,9 mM et de $MgCl_2$ 0,5 mM) puis déposées dans les puits d'une plaque 96 puits, 200 µl de milieu commun (Luminol 2 mM, HRPO 500U/ml, glucose 0,8 M, PBS^+ 2 µg/ml) sont alors ajoutés. La plaque est incubée pendant 1 min à 37°C dans le luminomètre (Luminoscan Labsystem). L'activité NADPH oxydase est initiée par l'addition de l'activateur : 10 µl de PMA (0,4µg/ml) pour la première série et 10 µl d'AA (10 µM) pour la seconde. La réaction est suivie pendant 60 minutes avec une mesure toutes les 30 secondes. La courbe d'émission de photons permet de quantifier ensuite l'activité oxydase.

3. Techniques de biologie moléculaire

3.1 Préparation et dosage des acides nucléiques

3.1.1 Préparation des ARN totaux

10^8 cellules sont lavées dans du PBS$^-$, et mises en suspension dans 1 ml de Trizol® (GIBCO-BRL). Cette solution contient 50% de phénol et un agent dissociant, le thiocyanate de guanidium qui détruit les structures cellulaires et inactive les RNases endogènes. Les cellules sont incubées 5 à 10 min à température ambiante et 0,2 ml de chloroforme sont ajoutés. Après agitation et incubation (2-3 minutes à température ambiante), les cellules sont centrifugées (12000 g, 15 min, 4°C) et les ARN totaux sont isolés dans la phase aqueuse supérieure. Les ARN sont transférés dans un tube stérile et précipités par addition de 0,5 ml d'isopropanol pendant 10 min à température ambiante. Après 10 min de centrifugation à 12000 g et 4°C, le culot d'ARN est lavé par 1 ml d'éthanol 70% (v/v), séché à l'air libre, et remis en suspension dans 34 à 54 µl d'eau distillée stérile selon sa taille. Il est ensuite chauffé 10 min à 65°C afin d'obtenir une dissolution complète. Les ARN sont conservés à –20°C en éthanol 70% pendant un mois ou à –80°C en eau stérile pendant un an.

3.1.2 Préparation d'ADN complémentaire

La synthèse d'ADNc est réalisée à partir de 5 µg d'ARN total dans un volume final de 20 µl de tampon Tris 10 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM auquel on ajoute 4 µl de Mix dNTP 5 mM, 20 unités (U) de la Transcriptase Reverse d'AMV Roche (enzyme du retrovirus de la myeloblastose aviaire), 50 unités d'inhibiteur de RNAses ainsi que 2 µl d'amorce oligonucléotidique poly$(dT)_{15}$. Après 10 min d'hybridation de l'amorce avec la séquence terminale polyA des ARNm à 25°C, les ARNm sont transcrits en ADN complémentaires (ADNc) simple brin par l'AMV-RT pendant 1 h à 42°C. La réaction est alors arrêtée par dénaturation de l'enzyme à 99°C pendant 5 min et les ADNc sont conservés à –20°C.

3.1.3 Dosage des acides nucléiques

Diluer 4 µl de la solution d'ARN ou 5 µl d'ADN dans 1 ml d'eau distillée stérile et lire la DO de 240 à 340 nm. Les DO à 260 nm représentent les acides nucléiques, à 280 nm, les protéines et à 310 nm, les peptides. Appliquer les formules suivantes pour connaître la quantité d'ADN ou d'ARN. :

D.O 260 nm = 1 pour [ARN] = 40 µg/ml

D.O 260 nm = 1 pour [ADN] = 50 µg/ml

3.1.4 Purification d'ADN plasmidique ; technique de « miniprep »

L'ADN plasmidique des vecteurs est extrait par « miniprep ». Une préculture des bactéries obtenues est réalisée dans 3 ml de milieu Luria Bertani (LB) additionné d'Ampicilline (100 µg/µl), à 37°C pendant une nuit. Puis 1,5 ml sont centrifugés à 12000 g, 30 sec, à 4°C. Le culot est resuspendu dans 100 µl de solution I glacée (Glucose 50mM, Tris HCl 25mM, EDTA 10mM , pH 8) qui remet les bactéries en suspension et lyse partiellement les bactéries. Ensuite, 200 µl de solution II préparée extemporanément (NaOH 0,2 N, SDS 1% (p/v)) sont ajoutés pour dénaturer les protéines. Enfin, 150 µl de solution III (Acétate K 5M : 60 ml, acide acétique :11,5 ml, H_2O qsp 100 ml) neutralisent la solution. Puis le tube est mis pendant 5 min dans la glace, centrifugé (12000 g, 5 min, 4°C) et le surnageant est récupéré. L'extraction de l'ADN est réalisé par un mélange phénol/chloroforme glacé puis l'ADN est précipité par de l'éthanol 70% (v/v), récupéré par centrifugation et lavé. Le culot obtenu est repris par 50 µl d'eau distillée stérile et conservé à –20°C. 10 µl d'ADN plasmidique sont digérés par l'enzyme de restriction correspondante (1 U d'enzyme et 1 U de Rnase Dnase free, 1 µl de tampon spécifique de l'enzyme de restriction) 2 heures, à 37°C. La réaction est stoppée par incubation des aliquots pendant 15 min à 65°C. Enfin, le vecteur, préalablement ouvert par l'enzyme de restriction correspondante, est déphosphorylé au niveau de l'extrémité 3' afin d'éviter la fermeture sur lui même lors de la ligation. La phosphatase alcaline de crevette (1 µl, 20 U, ROCHE®), est utilisée à 37°C, pendant 45 min pour 10 µl de solution de vecteur purifié. La réaction est stoppée à 65°C pendant 15 min.

3.2 Réaction de PCR

La technique de synthèse d'ADN par amplification en chaîne par la polymérase permet d'obtenir des quantités importantes d'une séquence présente à l'état de traces au départ. Le principe est le suivant ; après dénaturation par la chaleur du double brin d'ADN, deux oligonucléotides complémentaires situés aux extrémités 5' du double brin d'ADN à amplifier s'hybrident avec le fragment d'ADN à amplifier à une température particulière dite température de fusion (Tf) inférieure de 5°C (dans le cas de la Taq polymérase) à la température d'hybridation. La température d'hybridation (Th), ou température théorique, est fonction de la séquence nucléotidique des amorces. En pratique pour déterminer la Th, on applique les formules suivantes :

$$Th\ (°C) = 2\ (A+T) + 4\ (G+C)$$

$$Tf\ (°C) = Th - 5$$

Après l'étape d'hybridation, la température est amenée à 72°C. Dans ces conditions les extrémités des oligonucléotides servent d'amorces à une ADN polymérase thermostable. Chaque brin sert alors de matrice à l'enzyme qui synthétise les brins complémentaires en assemblant des désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), le facteur de multiplication est de 2. Les produits issus de ce premier cycle sont ensuite dénaturés par la chaleur à 94°C pour séparer les deux brins. Les amorces s'hybrident de nouveau à la température Th avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification, chaque brin servant de matrice à l'ADN polymérase. La réaction se poursuivant, le nombre de copies d'ADN croît de manière exponentielle et on obtient 2^n fragments après n cycles.

La réaction de PCR est réalisée dans 100µl final de tampon de réaction (Tris HCl 10mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, 0.1% Triton X100, 0.2 mg/ml BSA) contenant 2 µl d'ADNc, 0.7 µM d'amorces sens et anti-sens à 40 µM, 4 µl du mélange de dNTP à 5 mM et 0.5 µl de Taq polymérase (polymérase de la bactérie *Thermophilus Aquaticus*) à 5 U/µl. L'ADNc de p22*phox* est amplifié en utilisant un mélange dNTP particulier contenant 50 µM dGTP et 150 µM 7-déaza-2'-GTP. Enfin, un volume de 40 µl d'huile minérale est déposé à la surface afin d'éviter toute évaporation au cours de la réaction.

Gènes	Amorces	Séquences	Position	Taille fragment (bp)
gp91*phox*	β1	CCTCTGCCACCATGGGGAAC	4	620
	β2*	GACTTCAAAGTAAGACCTCCGGATG	624	
	β3	GCATCACTGGAGTTGTCATCA	539	683
	β4*	CCACCTCATAGCTGAACACA	1222	
	β5	ATAAGCAGGAGTTTCAAGAT	1127	619
	β6*	TTTCCTCATGGAAGAGACAAG	1746	
p22*phox*	a1	CAGTGTCCCAGCCGGGTTCGTGTC	2	437
	a2*	TTGGGCTCGATGGGCGTCCACTG	439	
	a3	GCCATTGCGAGCGGCATCTACCTA	371	108
	a4*	CTGCTTGATGGTGCCTCCGATCTG	479	
	a5	AGCAGTGGACGCCCATCGAGCCCAAG	413	248
	a6*	ATTGCAGGTGGGTGCACCTGGTGGGAG	661	
p67*phox*	F2	TTGTCTTTGTCTTGAAGAAGGGCAA	864	801
	R2*	GACTTCTCTCCGAGTGCTTTC	1645	
p40*phox*	F2	TGGCAGCTCCGAGAGCAGAGG	665	507
	R2*	GGCATCGTGTTGTAGACCCTG	1172	
	F3	ACCACAGGCTGAGACGAGA	48	732
	R4*	CAGCCAGTCTTTGTTGATCC	780	
p47*phox*	A47	CGAGATCTACGAGTTCCATAAAAC	147	468
	AS47*	CTTTGCTTTCATCTGACAGAACCA	615	
	PAC47S	TGGAATTCTCTAGACACCCAGTCATGG GGGACACC	48	1212
	PAC47AS*	GTGCGGCCGCTCCAGCCTCAGACGGCA GAC	1260	
Rac1	2S	ATGCAGGCCATCAAGTGTGT	1	578
	1AS*	GAGACATTTACAACAGCAGGC	579	
Rac2	2S	ATGCAGGCCATCAAGTGTGT	1	578
	2AS*	TAGAGGAGGCTGCAGGCG	579	

*amorces antisens

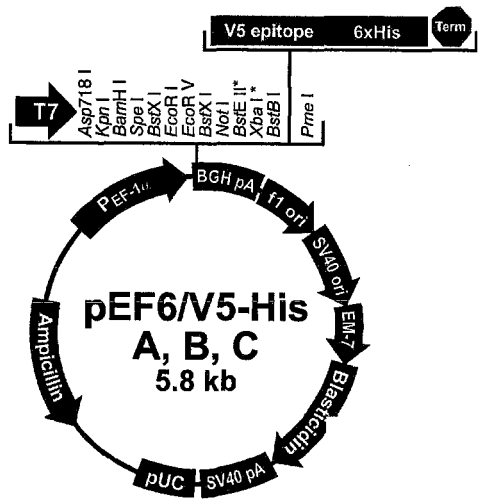
Tableau III: Amorces oligonucléotidiques utilisées pour les réactions de PCR

3.3 Clonage des ADNc de p67*phox* et p47*phox*

3.3.1 Purification du vecteur d'expression

Les vecteurs commerciaux sont transformés dans les bactéries *E.Coli JM 109* compétentes afin de les conserver et de les purifier. 50 µl de suspension bactérienne sont mis en contact avec 0,5 µl (concentration :1 µg/µl) pendant 30 min dans la glace, puis soumis à un choc thermique de 45 s à 42 °C. Une nouvelle incubation dans la glace de 2 min permet alors au plasmide de pénétrer dans les bactéries. Chaque transformation est diluée dans 1 ml de milieu SOC stérile et incubée pendant 1h à 37°C sous agitation. 100 µl de la suspension sont ensuite étalés sur boîte d'agarose contenant de l'Ampicilline (100 µg/µl) ; les 900 µl restants sont centrifugés pour concentrer les bactéries et le culot est également ensemencé. Les bactéries ayant intégré le plasmide sont résistantes à cet antibiotique et se multiplient après une nuit d'incubation à 37°C.

Deux vecteurs commerciaux sont utilisés :



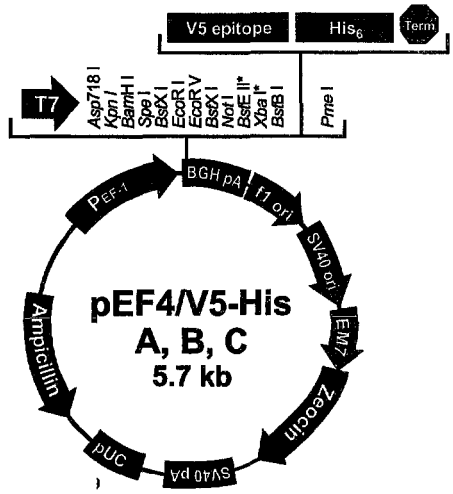


Figure 13: Structures des vecteurs d'expression utilisés pour les clonages de p47*phox* et p67*phox*. Ils contiennent le promoteur (EF-1α), une cassette de résistance à la Blasticidine ou à la Zéocine (sélection dans les cellules eucaryotes), une cassette de résistance à l'Ampicilline (sélection dans les cellules procaryotes).

3.3.2 Purification de l'insert d'ADN d'intérêt

L'ADN d'intérêt est préalablement contenu dans un plasmide entre deux sites de restriction. Dans un premier temps, 10 µl d'ADN plasmidique purifié par miniprep contenant l'insert sont digérés par l'enzyme de restriction correspondante (1 U d'enzyme, 1 U de Rnase Dnase free, 1 µl de tampon spécifique ×10 de l'enzyme, dans un volume final de 10 µl) pendant 2 heures, à 37°C. Ces endonucléases coupent l'ADN plasmidique double brin au niveau de séquences palindromiques spécifiques. La réaction est stoppée par incubation des aliquots pendant 15 min à 65°C.

10 µl de produits digérés (comme précédemment décrit) sont déposés avec 2 µl de bleu de migration (×5) et migrent pendant 1 h sous un courant électrique de 100V en gel d'agarose 1,5% en tampon TAE 0,5X, bromure d'éthidium 0,01%. Les fragments « inserts » d'ADN sont repérés sous lampe UV, grâce au BET intercalé entre les bases d'ADN, et par comparaison avec la migration d'ADN des marqueurs de taille connue (1 kb Ladder Eurogentec®et marqueurs VII, XIV , 250 µg/ml, ROCHE®). L'ADN plasmidique est purifié à partir du gel d'agarose, après migration. La bande correspondant à l'insert est alors découpée et placée en tube de 1,5 ml afin de réaliser l'extraction de l'ADN et sa purification avec le kit Sephaglass Band Prep® (Pharmacia). Les morceaux de gel sont dissous dans un tampon « solubilizer » à 60°C, puis la solution Sephaglass BP des billes de verre est ajoutée permettant de fixer l'ADN (liaisons électrostatiques). Le culot de billes récupéré par centrifugation (12000 g, 1 min, 4°C) est lavé et traité par le tampon d'élution. L'ADNc ainsi obtenu est conservé à - 20°C.

3.3.3 Insertion de nouveaux sites de restriction à l'ADNc de p47*phox*

L'ADNc de p47*phox* est cloné dans le vecteur pGEX2T (construction donnée par le Pr Segal, UK) entre les sites de restriction *BamHI* et *EcoRI*. Or le site *BamHI* est présent dans la séquence de l'ADNc de p47*phox* : il est donc nécessaire d'inclure d'autres sites de restriction aux extrémités de la séquence afin de pouvoir extraire l'ADNc de pGEX2T. Les amorces de PCR sens et antisens (PAC47S et PAC47AS, cf Tableau III) permettent d'inclure les sites de restriction *EcoRI* et *NotI*. La réaction de PCR est réalisée dans 100 µl final de tampon de réaction (Tris HCl 10 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, 0.1% Triton X100, 0.2 mg/ml BSA) contenant 100 ng d'ADNc, 1 µl d'amorces sens et anti-sens à 10 µM, 2 µl du mélange de

dNTP à 5 mM et 0.4 µl de Pfu Turbo à 5 U/µl. Les produits de PCR ainsi obtenus sont concentrés et 2 µl sont déposés sur gel pour contrôler la taille et la quantité.

Le sous clonage des produits de PCR est réalisé grâce au kit Zero Blunt TOPO PCR cloning kit® (Invitrogen®). Ce kit permet l'insertion de fragments d'ADN à bouts francs dans le vecteur pCR-BluntII-TOPO®. Ce vecteur est fourni sous forme linéaire. La Topoisomérase I du virus de la Vaccine est fixée sur les deux extrémités 3' phosphate de ce vecteur de façon covalente. Cette enzyme coupe l'ADN bicaténaire au site spécifique 5' CCCTT 3' et se fixe à l'extrémité 3' par création d'une liaison phosphodiester entre le phosphate de la dernière base d'ADN en 3' et son résidu tyrosine en position 274. La liaison phospho-tyrosyl entre l'ADN et l'enzyme est réversible car elle peut être détruite par les extrémités 5'OH du vecteur lui même ou de tout autre fragment d'ADN, tel un produit de PCR ; la topoisomérase est alors relarguée. Ainsi le vecteur pCR-BluntII-TOPO® peut se refermer facilement sur lui même et le clonage de l'insert n'a pas lieu. Cependant dans ce cas, le gène *ccdB* est exprimé ce qui inhibe la croissance des bactéries compétentes transformées. Lors du clonage de l'insert dans le vecteur pCR-BluntII-TOPO®, le gène *ccdB* est, au contraire, réprimé ce qui permet aux bactéries compétentes transformées de pousser.

2 µl de produits sont utilisés pour la transformation de 50 µl de suspension bactérienne d'*E.Coli* compétentes qui sont ensuite ensemencées sur un milieu Kanamycine (50 µg/ml). L'extraction du plasmide est réalisée par « miniprep » puis le clonage est contrôlé par digestion enzymatique avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *NotI.*

L'ADNc de p47*phox* est ensuite cloné entre les sites *EcoRI* et *NotI* dans le vecteur pEF6/V5 HisB, comme suit.

3.3.4 Clonage de l'insert dans le vecteur d'expression eucaryotique

L'ADNc de p67*phox* est cloné entre les sites de restriction *KpnI* du vecteur d'expression pEF4/V5 HisB (Invitrogen®), celui de p47*phox* entre *EcoRI* et *NotI* dans le vecteur pEF6/V5 HisB (Invitrogen®).

Dans un premier temps, on réalise la ligation de l'insert et du vecteur. Pour cela, l'ADNc de l'insert est concentré. La précipitation se fait par addition d'éthanol 100% (2,5V) et d'acétate de Na 3M (1/10ème V). Le mélange est incubé 2h à - 20 °C puis le culot d'ADN récupéré après centrifugation est lavé avec de l'éthanol 70% et centrifugé de nouveau (10 min, + 4°C). Le

surnageant est éliminé. Après séchage à l'air, le culot est repris par 12 µl d'eau distillée stérile et conservé à –20 °C.

Les concentrations respectives d'ADNc de l'insert et d'ADN du vecteur déphosphorylé sont estimées après migration sur gel d'agarose. Cette détermination est approximative puisqu'on apprécie visuellement les intensités respectives de chaque bande. Puis, deux conditions de ligation sont réalisées : ratio « insert/vecteur » égal à 1 ou à 2. Ce mélange est incubé en présence de 3 U de T4 DNA ligase (Invitrogen®), avec le tampon de l'enzyme (1 µl, 10X) et 1µl d'ATP 10 mM dans un volume final de 10 µl, pendant 18 heures à 16 °C. 3 µl de produit de ligation sont ensuite utilisés pour la transformation de 50 µl de suspension bactérienne d'*E.Coli JM 109* compétentes (Promega®).

Le clonage est ensuite contrôlé. L'ADN plasmidique est extrait des clones bactériens résistants à l'Ampicilline par « miniprep ». Il faut vérifier que : d'une part l'insert a bien été intégré dans le vecteur et d'autre part que le sens d'insertion est correct, surtout dans le cas d'une coupure monoenzymatique (ADNc de p67*phox*). On réalise une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction (comme précédemment décrit) : *KpnI* dans le cas du clonage de l'ADNc de p67*phox* et *EcoRI* et *NotI* simulatnément pour le clonage de l'ADNc de p47*phox*. Ceci permet de contrôler les tailles du vecteur et de l'insert après migration en gel d'agarose 1,5% comme décrit précédemment. Le sens d'insertion ainsi que la séquence de l'insert sont contrôlés par séquençage (Figure 14). Deux amorces spécifiques sont utilisées : une située aux extrémités de l'insert, l'autre située en amont de la séquence ATG. On vérifie la position de l'ATG ainsi que la séquence Kozac (**A**xxATG**G**) (Génome Express, Meylan).

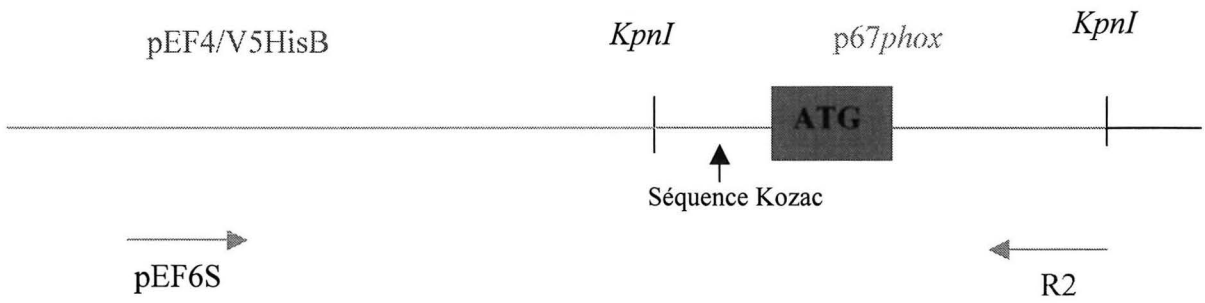


Figure 14: Contrôle du clonage par séquençage

3.3.5 Purification des plasmides pour la transfection des cellules COS7

La purification des plasmides « Endofree » est une étape essentielle pour améliorer la qualité de la transfection dans les cellules eucaryotes (cellules COS7). Grâce au kit « endofree » (QIAGEN® Plasmid Maxi kit) on élimine toutes les endotoxines bactériennes qui gêneraient cette transfection.

La quantification de l'ADN plasmidique est réalisée par spectrophotométrie comme précédemment décrit.

3.4 Clonage de l'ADNc de p40*phox*

Le plasmide pCEP4 (Invitrogen®) a été utilisé pour le clonage de l'ADNc de p40*phox*. Il s'agit d'un vecteur épisomal d'expression permettant la production d'une protéine sans être inséré dans le génome de la cellule hôte. Cette construction (concentration de 1µg/µl) m'a été donnée par Sabrina Vergnaud (GREPI).

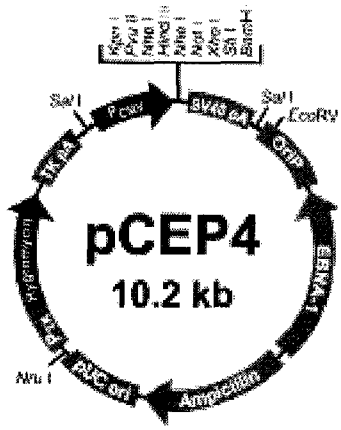


Figure 15: Structure du vecteur d'expression utilisé pour le clonage de p40*phox* Il contient le promoteur (CMV), une cassette de résistance à l'Hygromycine (sélection dans les cellules eucaryotes), une cassette de résistance à l'Ampicilline (sélection dans les cellules procaryotes).

3.5 Transfection des cellules COS 7WT

Les cellules COS7 sont transfectées par un ou plusieurs plasmide(s) précédemment obtenu(s).

3.5.1 Test de survie

Avant la transfection, il est nécessaire de réaliser le test de survie des cellules afin de déterminer la concentration d'antibiotique à utiliser pour la sélection des clones transfectés. Les cellules COS7WT sont lavées en PBS^-, centrifugées (500 g, 10 min, 4°C) et reprises dans le milieu de culture (cf Annexe 1) + SVF 20%. Elles sont ensuite réparties dans une plaque 6 puits à la concentration de 1 à 2.10^6 cellules/ml. Puis l'antibiotique est ajouté à des concentrations croissantes. Les concentrations d'antibiotiques testées varient d'un antibiotique à l'autre (cf Tableau IV). Les plaques sont incubées pendant 10 jours à 37 °C (5% CO_2). Les cellules sont comptées à J_0 avant l'ajout de l'antibiotique et à J_{10} après culture. Le pourcentage de cellules vivantes est évalué après coloration au bleu Trypan.

3.5.2 Transfection des cellules COS7WT par différents plasmides d'intérêt

5.10^5 cellules sont centrifugées, lavées en tampon PBS stérile et remises en suspension dans 500 µl de tampon de transfection. Elles sont incubées avec 10 µg de plasmide « endofree » dans une cuve d'électroporation pendant 2 min dans la glace puis soumises à un courant de 250 V appliqué par un pulse de 20 ms. Puis, les cellules sont mises en suspension dans 20 ml de milieu de culture et incubées 48 h à 37°C sous 5% CO_2. Après 48 h, les cellules sont décollées par traitement à la trypsine et diluées dans 80 ml du milieu de culture additionné de l'antibiotique permettant la sélection. La concentration d'antibiotique à utiliser a été préalablement déterminée grâce au test de survie des cellules.

	gp91*phox*	**p67*phox***	**p47*phox***	**p40*phox***
Plasmide contenant l'ADNc de l'insert	PBluescriptKS	pCRscript	pGEX2T	/
Vecteur de clonage	pEF-PGKneo	pEF4/V5HisB	pEF6/V5HisB	pCEP4
Enzymes de restriction (clonage)	*BamHI*	*KpnI*	*EcoRI-NotI*	*KpnI*
Enzyme de restriction (contrôle sens d'insertion)	*EcoRI*	*BamHI*	/	/
ATB et concentrations permettant la sélection	Généticine 1,5 mg/ml	Zéocine 100 µg/ml	Blasticidine 3 µg/ml	Hygromycine 50 µg/ml
Gammes de concentrations testées	0-2 mg/ml	0-1000 µg/ml	0-10 µg/ml	0-250 µg/ml

Tableau IV: Récapitulatif des clonages d'ADNc dans des vecteurs d'expression eucaryotique

Annexe 1 : Composition des tampons et milieux de culture

Milieu de culture des cellules COS 7	DMEM/NUT Mix F12 avec Glutamax et pyridoxine (GIBCO®), Pénicilline 100 U/ml, Streptomycine 100µg/ml, SVF 10%(v/v)
Tampon PBS^-	NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, NaHPO4 8 mM, pH 7,3
Tampon PBS^+	PBS^- contentant $CaCl_2$ 0,9 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM
Tampon de migration	Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.1% (p/v) , pH 8,8
TBS	Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7,5
Tampon de transfert semi-sec	Tris 25 mM, glycine 129mM, SDS 0.1% (p/v), éthanol 10% (v/v) , pH 8,3
Tampon PBS (A/Ca++)	PBS filtré, Albumine 0.2%, $CaCl_2$ 1 mM
Tampon de transfection	DMEM/NUT Mix F12 (GIBCO®), $NaHPO_4$ 10 mM, saccharose 250 mM, MgCl2 1 mM

Milieu LB	Tryptone 10 g/l, extrait de levure 5 g/l , NaCl 10g/l, pH 7
SOB	Tryptone 20 g/l, extrait de levure 5g/l , NaCl 0,5g/l,KCl 250mM, MgCl2 2M, pH 7
SOC	SOB contenant 20mM glucose
Boîte de Pétri LB-agar	Tryptone 10g/l, extrait de levure 5g/l , NaCl 10g/l, agar 15 g/l, pH 7

Troisième partie : résultats

1. Caractérisation des cellules COS7 de type sauvage (COS7WT): évaluation de la présence des composants du complexe oxydase

1.1 Analyse de la présence des ARN messagers par RT-PCR et séquençage

L'ARNm des composants du complexe NADPH oxydase (gp91*phox*, p22*phox*, p67*phox*, p47*phox* et Rac 1,2) dans les cellules COS7WT est mis en évidence par RT-PCR, suivi d'un séquençage comme décrit dans Matériel et méthodes. Leur présence et leur taille sont évaluées par rapport à un marqueur commercial (marqueur XIV, Roche Diagnostic, Meylan). Les ADNc amplifiés à partir d'ARN de lymphocytes B (Lympho) servent de témoins positifs. Les ADNc des différentes protéines du complexe oxydase sont amplifiés en plusieurs fragments dont les séquences se chevauchent partiellement.

ADNc	Tailles théoriques des fragments amplifiés
gp91*phox*	620bp (β1β2)
p22*phox*	437bp (a1-a2), 108bp (a3-a4), 248bp (a5-a6)
p40*phox*	507bp
p47*phox*	468bp
p67*phox*	801bp
Rac 2	578bp
Rac 1	578bp

Tableau V: Tailles des fragments amplifiés pour chaque ADNc des protéines du complexe oxydase à partir des lymphocytes B.

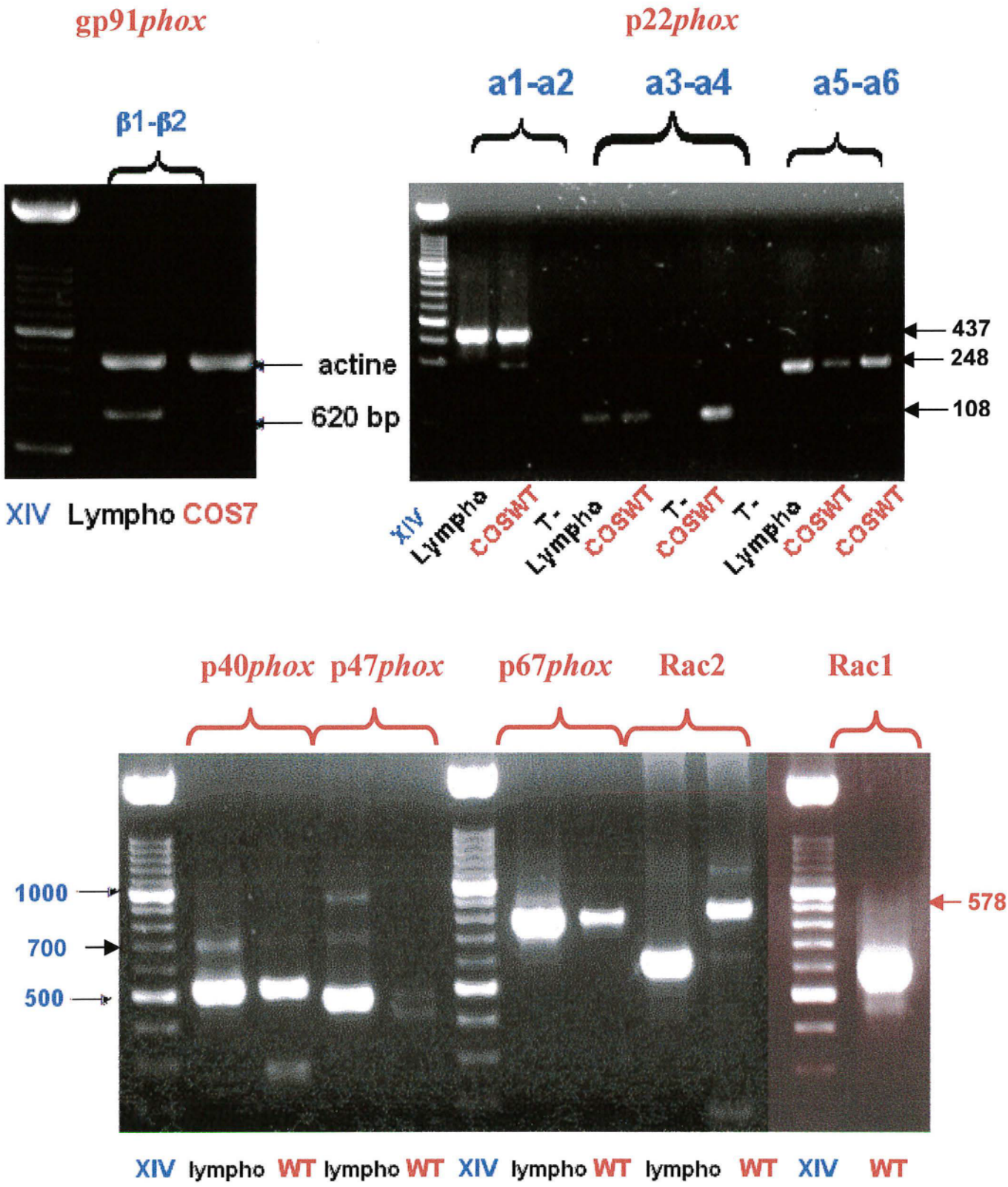


Figure 16: Mise en évidence des ARNm des différents composants du complexe oxydase par RT-PCR dans les cellules COS7WT. Les produits de RT-PCR subissent une migration électrophorétique en gel d'agarose. L'évaluation des tailles se fait par rapport à un témoin positif (Lympho). L'absence de contamination est contrôlée (T-) et correspond à une réaction de PCR en absence d'ADNc. XIV : marqueur de tailles commercial (Roche Diagnostic).

⇒ D'après cette expérience, les cellules COS7WT contiennent les ARNm de p22*phox* (amplificat à 108bp, 248bp et 437bp), de p40*phox*, de p67*phox* et de Rac2 (bandes d'amplification à 507bp, 801bp, 578bp respectivement).

Par contre, les cellules COS7WT ne contiennent pas les ARNm de gp91*phox*, p47*phox* et Rac2 puisqu'aucune bande correspondante n'a pu être identifiée. Le produit PCR obtenu avec les amorces de Rac2 dans les cellules COS7WT ne possède pas la taille attendue de 578 bp (cf flèche rouge Figure 16)

Ces résultats sont confirmés après séquençage de tous les fragments d'ADNc amplifiés.

p22*phox*

```
         10        20        30        40        50        60        70        80
         |         |         |         |         |         |         |         |
MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMERWGQKYMTSVVKLFGPLTRNYYV
••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMERWGQKHMTAVVKLFGPFTRNYYV
         |         |         |         |         |         |         |         |
         10        20        30        40        50        60        70        80

90        100       110       120       130       140       150       160       170
|         |         |         |         |         |         |         |         |
RAILHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERPQIGGTIKQPPSNPPPRPPAEARKKPSEEEEAAAAGG
••|••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
RAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERPQIGGTIKQPPSNPPPRPPAEARKKPSEEEAAAAAGG
|         |         |         |         |         |         |         |         |
90        100       110       120       130       140       150       160       170

180       190
|         |
PPGGPQANPIPVTDEVV
•••••• •••••••••••
PPGGPQVNPIPVTDEVV
|         |
180       190
```

p67*phox*

```
                                        10        20        30        40        50
                                        |         |         |         |         |
                                RIHPQQQPQEESSPESDIPAPPSSKAPGRPQLSPGQKQKEEPKEVKLSVPMPYTLKV
                                •••••••••••••••|••••••••••••••|••••••••••••••••••••••••••••
VLKKGNDNWATVMFNGQKGLVPCNYLEPVELRIHPQQQPQEESSPQSDIPAPPSSKAPGKPQLSPGQKQKEEPKEVKLSVPMPYTLKV
|         |         |         |         |         |         |         |         |         |
270       280       290       300       310       320       330       340       350

60        70        80        90        100       110       120       130       140
|         |         |         |         |         |         |         |         |         |
YKYTVVMETQPGLPYSQVRDMVSKKLELRLEHTKLSYRPRDSNELVPLSEDNMKDAWGQVKNYCLTLWCENTVGDQGFPDEPKESEKA
••••••• •••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
YKYTVVMKTQPGLPYSQVRDMVSKKLELRLEHTKLSYRPRDSNELVPLSEDSMKDAWGQVKNYCLTLWCENTVGDQGFPDEPKESEKA
|         |         |         |         |         |         |         |         |         |
360       370       380       390       400       410       420       430       440

150       160       170       180       190       200
|         |         |         |         |         |
ANNQTTDPQLKKGSQVEALFSYEATQPEDLEFQEGDIILVLSKVNDEWLEGECKGKVGISP
••••••|••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
ANNQTTEPQLKKGSQVEALFSYEATQPEDLEFQEGDIILVLSKVNEEWLEGECKGKVGIFPKVFVEDCATTDLESTRREVDVSQTTK
|         |         |         |         |         |         |         |         |         |
450       460       470       480       490       500       510       520       530
```

p40*phox*

```
AVAQQLRAESDFEQLPDDVAISANIADIEEKRGFTSHFVFVIEVKTKGGSKYLIYRRYRQFHALQSKLEERFGPDSKSSALACTLPTL
         |         |         |         |         |         |         |         |
          10        20        30        40        50        60        70        80

AKVYVGVKQEIAEMRIPALNAYMKSLLSLPVWVLMDEDVRIFFYQSPYDSEQVPQAIRRLRPRTRKVKSVSPQGNSVDRMAAPRAEAL
         |         |         |         |         |         |         |         |
90        100       110       120       130       140       150       160       170

                 10        20        30        40        50        60        70        80
                  |         |         |         |         |         |         |         |
       LELNFKAGDVIFLLSRINKDWLEGTVRGATGIFPLSFVKILKDFPEEDDPTNWLRCYYYEDTISTVKDIAVEEDLSSTPLF
       ••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
DFTGNSKLELNFKAGDVIFLLSRINKDWLEGTVRGATGIFPLSFVKILKDFPEEDDPTNWLRCYYYEDTISTIKDIAVEEDLSSTPLL
|         |         |         |         |         |         |         |         |
 180       190       200       210       220       230       240       250       260

       90        100       110       120       130       140
        |         |         |         |         |         |
DLLELTRREFQREDIALNYRDAEGDLVRLLSDEDVVLMVRKARGLPSQKRLFPWKLHITQKDNYRVY
••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
DLLELTRREFQREDIALNYRDAEGDLVRLLSDEDVALMVRQARGLPSQKRLFPWKLHITQKDNYRVYNTMP•ADGVPGAVRGHQQKPS
 |         |         |         |         |         |         |         |         |
  270       280       290       300       310       320       330       340       350
```

Rac 1

```
         10        20        30        40        50        60        70        80
          |         |         |         |         |         |         |         |
MVDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQTDVFLICFSLVSPASFENVRAKWYPEVRHHCPNTPIILVGTKLDLRDDKDTIEKLKEKK
••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
MVDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQTDVFLICFSLVSPASFENVRAKWYPEVRHHCPNTPIILVGTKLDLRDDKDTIEKLKEKK
          |         |         |         |         |         |         |         |
           10        20        30        40        50        60        70        80

90        100       110       120       130       140
|         |         |         |         |         |
LTPITYPQGLAMAKEIGAVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIRAVLCPPPVKKRKRKCLL
••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
LTPITYPQGLAMAKEIGAVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIRAVLCPPPVKKRKRKCLLL•MSQPLVLGPVPWNLCTLCSKKNKKKKQKK
|         |         |         |         |         |         |         |         |         |
 90        100       110       120       130       140       150       160       170
```

Figure 17: **Séquences des protéines correspondant aux ADNc des produits de PCR amplifiés**. Séquence du haut : protéines (p22*phox*, p40*phox*, p67*phox* ou Rac1) de COSWT, séquence du bas : protéines de Lymphocyte B.

⇒ Les cellules COS7WT possèdent l'ARNm de p22*phox*. Quelques mutations sont présentes dans la séquence mais elles n'entraînent pas de changement de polarité de la protéine correspondante. Ala75Ser, Phe83Leu, Ile92Val, Val185Ala (flèches vertes, Figure 17). Par contre, la mutation Ala172Glu correspond à un changement de charge (flèche rouge). En position 72, on observe un polymorphisme déjà décrit (Dinauer *et al.* 1990) : His72Tyr (flèche bleue).

L'ARNm de p67*phox* est également présent dans les cellules COS7WT. Cependant, on observe quelques mutations dans la séquence de la protéine codée. Des changements de charge sont observés : Glu314Gln, Glu365Lys. D'autres mutations n'entraînent pas de différences de charges sauf pour certaines, des changements d'hydrophobicité: Asn409Ser, Asp453Glu, Asp492Glu, Ser506Phe. Enfin, la mutation Arg328Lys est un polymorphisme de la protéine p67*phox* déjà décrit (Patino *et al.* 1999).

D'autre part, les cellules COS7WT possèdent l'ARNm de p40*phox,* variant 2. Cependant, on observe quelques mutations dans la séquence de la protéine codée par les cellules COS7WT: en position 252, sans changement de charges, Val252Ile, Phe267Leu ; avec changement de charges, Lys309Gln. Les mutations en 252 et en 267 correspondent à la séquence du variant 1 de la protéine p40*phox*, il s'agit donc d'un polymorphisme (Hasebe *et al.* 1999).

La séquence de la protéine Rac1 codée par le gène des cellules COS7WT est totalement identique à celle du variant c de la protéine Rac1.

Les résultats de RT PCR et des séquençages nous permettent de conclure que les cellules COS7WT possèdent les ARNm de p22*phox*, p67*phox*, p40*phox* et Rac1c, avec quelques mutations entraînant certains changement en acides aminés.

1.2 Analyse de la présence des protéines du complexe oxydase

Après avoir démontré que les cellules COS7WT possèdent certains ARNm du complexe oxydase, il est nécessaire d'évaluer l'expression des différents protéines correspondantes.

1.2.1 Western blot

La présence de ces protéines est mise en évidence dans les cellules COS7WT par Western Blot à partir d'extraits Solubles Triton X100 1%, à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les différentes protéines du complexe comme décrit dans Matériel et méthodes.

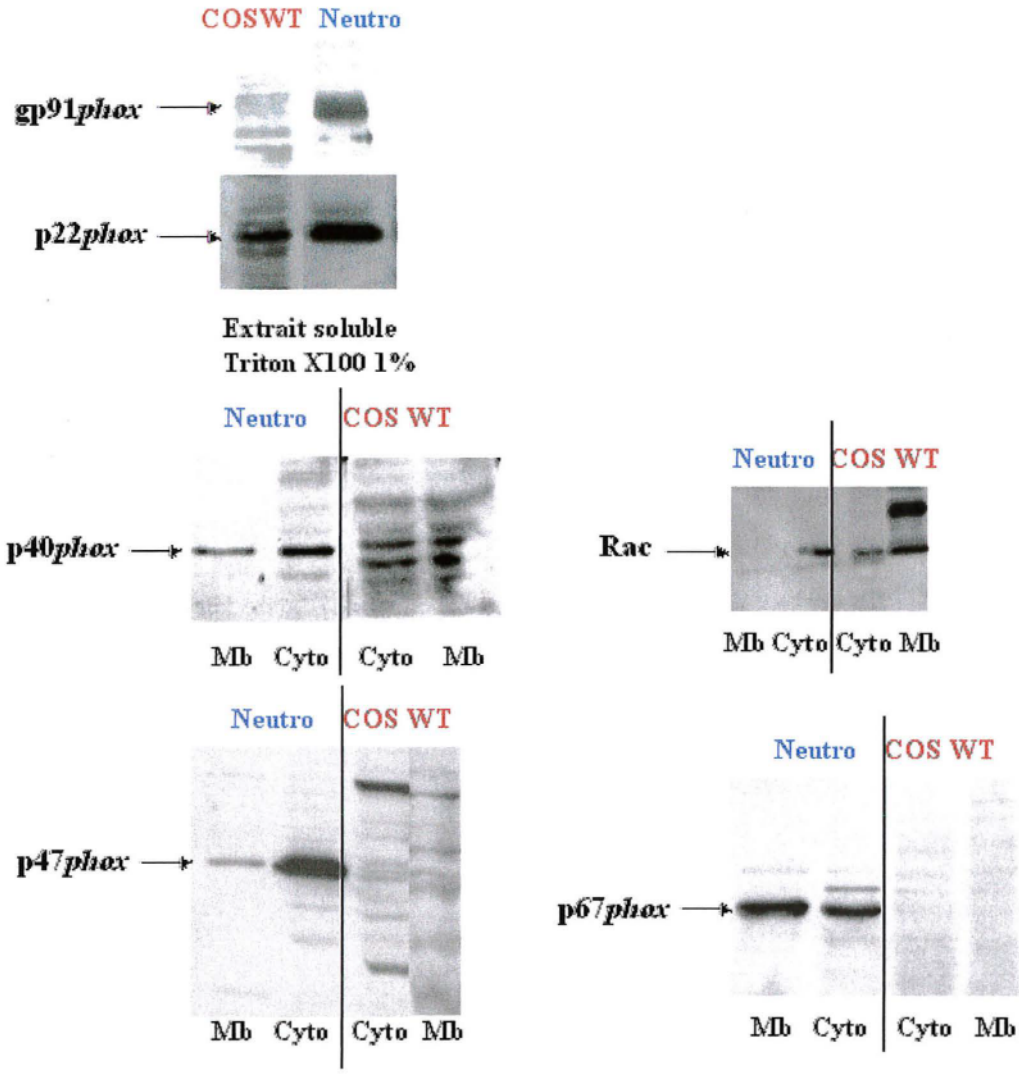


Figure 18: Evaluation par Western Blot de l'expression des protéines gp91*phox*, p22*phox*, p67*phox*, p40*phox*, p47*phox* et Rac dans les cellules COS7WT. 50 µg de protéines des extraits solubles Triton X100 1% (**A**) ou 50 µg de membranes (Mb) et cytosols (cyto) (**B**) sont séparées par SDS-PAGE, transférées sur nitrocellulose et révélées par ECL comme décrit dans Matériel et méthodes. Neutro (témoin positif): extraits Triton X100 1% ou membranes/cytosols de neutrophiles.

⇒ Les résultats obtenus en Western Blot permettent de conclure que les protéines p22*phox*, p40*phox* et Rac sont présentes dans les cellules COS7WT. Par contre, les protéines gp91*phox*, p67*phox*, p47*phox* n'ont pas été mises en évidence. Il est à noter que pour cette

technique, le type d'isoforme de Rac ne peut être déterminé, l'anticorps utilisé reconnaissant Rac1 et Rac2.

1.2.2 Cytométrie en flux

Le contrôle de l'expression des protéines gp91*phox* et p22*phox* est également réalisé par cytométrie en flux en utilisant des anticorps monoclonaux. La cytométrie en flux analyse l'émission de fluorescence de la PE liée à l'anticorps secondaire, qui est spécifique du type d'immunoglobuline de l'anticorps primaire.

L'anticorps monoclonal 7D5 est dirigé contre un épitope externe de la protéine gp91*phox*. Par contre, l'Ac 449 dirigé contre un épitope cytosolique de la protéine p22*phox* nécessite une perméabilisation préalable des cellules avec la saponine 0,05%.

Une IgG1 « irrelevant » est utilisé comme contrôle négatif et confirme la fixation spécifique de l'anticorps. Les résultats sont donnés sous forme d'histogrammes, représentant la distribution de la population cellulaire sélectionnée en fonction de la fluorescence émise (Figure 19)

Les histogrammes obtenus après marquage des cellules avec les anticorps 7D5 et IgG1 irrelevant (Figure 19A) sont superposables ce qui signifie que les cellules COS7WT n'expriment pas la protéine gp91*phox*.

En ce qui concerne la protéine p22*phox*, la perméabilisation préalable des cellules avec 0,05% de saponine est essentielle : elle permet à l'anticorps monoclonal 449 de se fixer sur la partie cytosolique de la protéine p22*phox*. Dans l'expérience réalisée en présence de l'IgG1 irrelevant, aucune fluorescence n'est observée ce qui confirme que la fixation de l'anticorps 449 à la protéine p22*phox* est spécifique (Figure 19B). On peut déduire de ce résultat que les cellules COS7WT expriment la protéine p22*phox* (80% des cellules comptées).

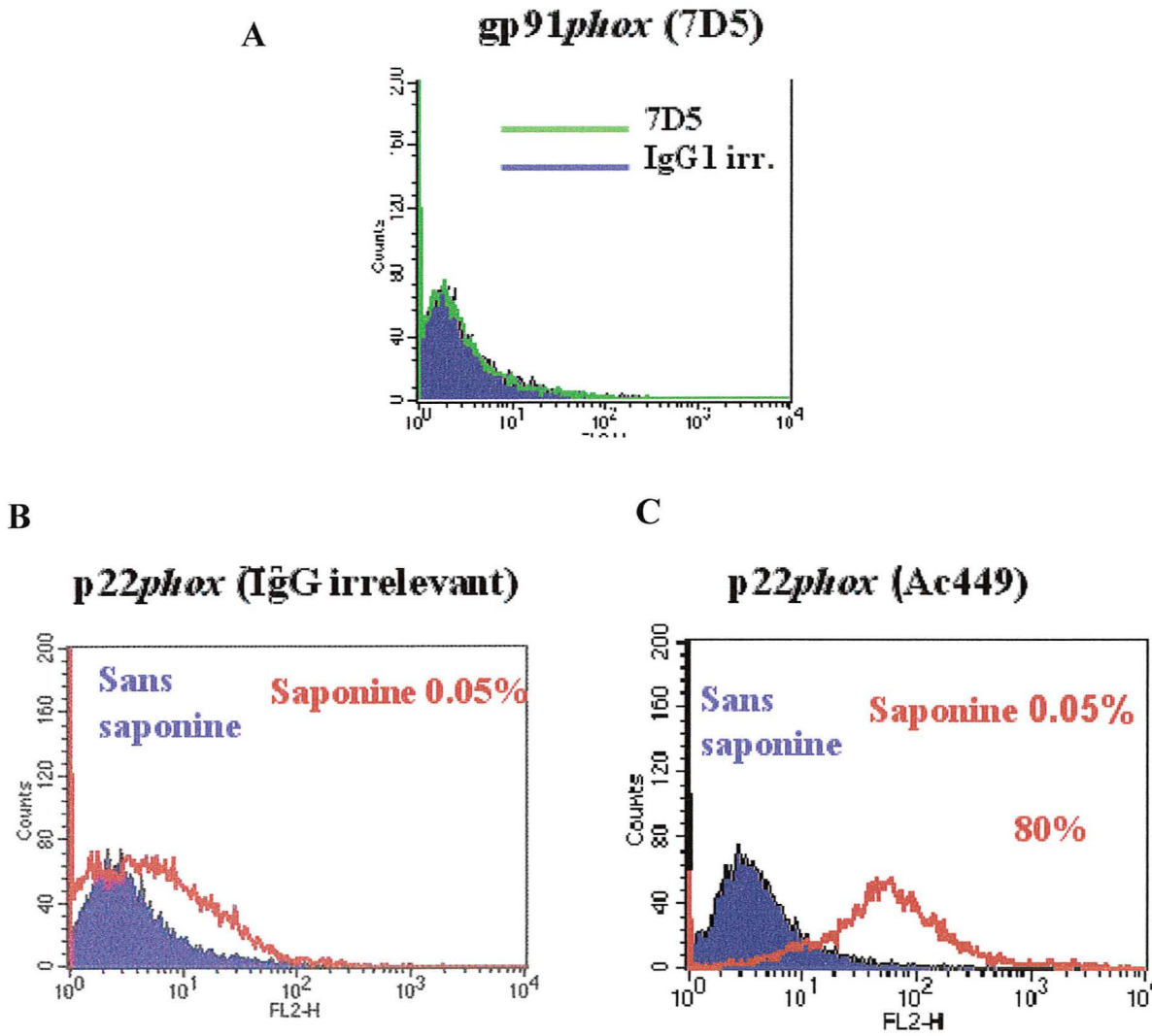


Figure 19 : Evaluation, par cytométrie en flux, de l'expression de gp91*phox* et p22*phox* dans les cellules COS7WT. A : 5.10^5 cellules sont incubées avec l'anticorps 7D5 ou l'IgG1 irrelevant puis avec un anticorps secondaire marqué à la PE comme décrit dans Matériel et méthodes. **B** : 5.10^5 cellules perméabilisées ou non avec la saponine 0,05% sont marquées avec l'anticorps 449 (2) ou l'IgG1 irrelevant (1). L'enregistrement est effectué sur 10000 cellules ; la compensation électronique FL2-FL1 est de 15%.

Les résultats du Western Blot et du FACS permettent de conclure que les protéines p22*phox*, p40*phox* et Rac du complexe oxydase sont présentes dans les cellules COS7WT.

Bien que l'ARNm de p67*phox* soit présent dans les cellules COS7WT, la protéine ne semble pas exprimée dans ces cellules. Enfin, l'absence de gp91*phox* dans les cellules COS7WT visualisée par Western Blot est confirmée par cytométrie en flux.

2. Obtention du modèle COS7 transgénique exprimant le cytochrome b_{558}

On a démontré dans la partie 1, la présence constitutive de la protéine p22*phox* et l'absence d'expression de la protéine gp91*phox* dans les cellules COS7WT. Ainsi, la transfection de l'ADNc gp91*phox* permetta l'expression des deux sous-unités du cytochrome b_{558} : gp91*phox* et p22*phox*.

2.1 Test de survie des cellules COS7WT à la Généticine

Préalablement à la transfection des cellules COS7WT, il est nécessaire d'effectuer un test de survie avec l'antibiotique qui sera utilisé pour sélectionner les clones de cellules COS7 ayant intégrer le plasmide d'intérêt. pEFPGKneo est le plasmide ayant servi au clonage de l'insert d'ADNc de gp91*phox* , il possède une cassette de résistance à la Généticine (G418). La concentration de Généticine nécessaire pour inhiber la prolifération des cellules COS7WT doit être déterminée. Les cellules sont cultivées en présence de concentrations croissantes d'antibiotique. Elles sont comptées à J0 et à J10 pour déterminer la survie des cellules COS7 cultivées en présence de concentrations croissantes de Généticine.

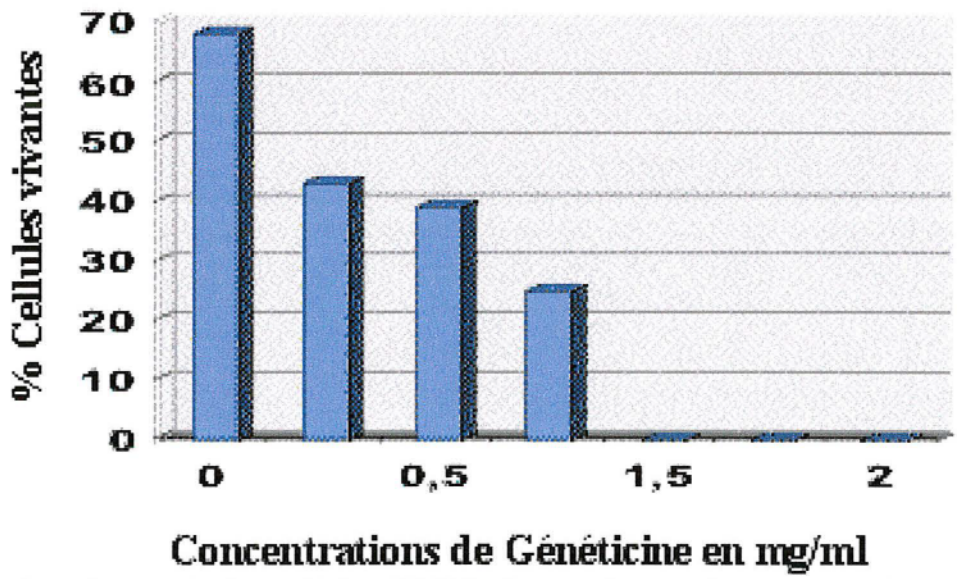


Figure 20: Test de survie des cellules COS7WT en présence de concentrations croissantes de Généticine. 2.10^6 cellules sont mises en culture -en milieu DMEM contenant 10% de SVF- dans chaque puit d'une plaque 6 puits et en présence de concentrations croissantes de Généticine (0 à 2 mg/ml).

⇒ Après 10 jours de culture, les cellules sont comptées dans chaque puit, comme décrit dans Matériel et méthodes. On constate que plus de 90% des cellules incubées avec 1,5 mg/ml de Généticine sont mortes : cette concentration d'antibiotique sera utilisée pour sélectionner les clones positifs après transfection.

2.2 Transfection des cellules COS 7 par le plasmide pEFPGKneo – gp91*phox*

L'ADNc de gp91*phox* a préalablement été cloné dans le vecteur d'expression pEF-PGKneo (Bionda et al. 2004). L'insert, initialement contenu dans le plasmide pBluescriptKS+, a été introduit au niveau du site de restriction *BamH1* du vecteur pEF-PGKneo (Don du Pr MC. Dinauer). Il contient le promoteur du facteur d'élongation humain 1α (EF-1α) et une cassette de résistance à la Néomycine (PGK-neo, sélection dans les cellules eucaryotes), une cassette de résistance à l'Ampicilline (sélection dans les cellules procaryotes). La taille de ce vecteur est de 7,1 kb.

5.10^5 cellules sont transfectées avec 10 µg d'ADN plasmidique purifié pour être exempt de toxines («endofree») préparé à partir du vecteur pEFPGKneo contenant l'ADNc gp91*phox,* par électroporation (250V un pulse de 20ms). Les cellules ensuite sélectionnées comme décrit dans Matériel et méthodes .

Parallèlement, 5.10^5 cellules sont transfectées par 10 µg d'ADN plasmidique « endofree » de pEFPGKneo ne contenant pas l'insert (vecteur vide). Les conditions de transfection et de sélection des clones positifs sont identiques à celles décrites présedemment. Ces cellules constituent un contrôle négatif de transfection.

Cinq clones positifs (après transfection par l'ADNc de gp91*phox*) sont sélectionnés et cultivés en milieu DMEM/F12 additionné de 1,5 mg/ml de Généticine afin d'évaluer l'expression de gp91*phox.* Après sélection, les clones positifs sont cultivés en maintenant une pression de sélection (Généticine : 0,5 mg/ml).

2.3 Caractérisation de la présence du cytochrome b_{558} dans les cellules COS7 transfectées par pEF-PGKneo-gp91*phox*

L'expression des deux sous-unités du cytochrome b_{558} dans les cinq clones sélectionnés de cellules COS7 transfectées par pEF-PGKneo-gp91*phox* est étudiée par Western Blot et cytométrie en flux. Le clone présentant la meilleure expression du cytochrome b_{558} sera choisi pour la suite des expérimentations.

2.3.1 Western Blot

Les extraits Triton X100 1% sont analysés par Western Blot en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre les deux sous unités du cytochrome b_{558}.

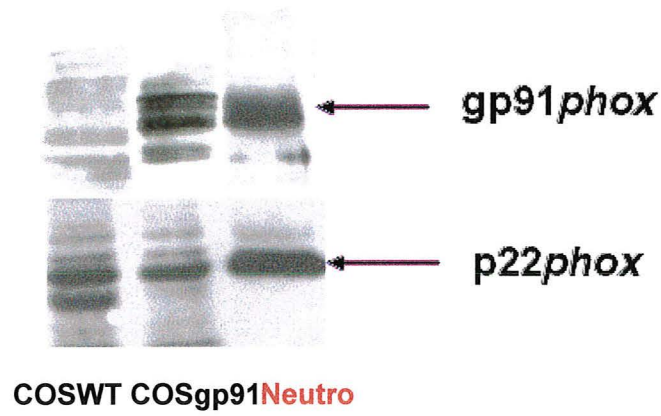


Figure 21: Evaluation par Western Blot de l'expression de gp91*phox* et de p22*phox* dans les cellules COS7 transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox*. 50 µg de protéines des extraits solubles Triton X100 1% des COS7WT (COSWT) et transfectées (COSgp91) sont analysés. Neutro (témoin positif) : extrait soluble de neutrophiles (5µg de protéines).

Dans le cas des cellules transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox*, la présence d'une bande au même niveau que celle du contrôle positif permet de déduire que ces cellules expriment la protéine gp91*phox* (Figure 21). Par contre, dans les cellules COSWT, seule la protéine p22*phox* est exprimée, comme ce qui a déjà été démontré auparavant dans la Figure 18. On peut remarquer l'absence de surexpression de p22*phox* dans les cellules COS7 transfectées par l'ADNc de gp91*phox* par rapport aux cellules COSWT.

B.U. MED. GRENOBLE

2.3.2 Cytométrie en flux

Le contrôle de l'expression des protéines gp91*phox* et p22*phox* dans les cellules COS7 transfectées (COS gp91*phox*) est réalisé par cytométrie en flux. L'utilisation d'anticorps monoclonaux 7D5 (anti gp91*phox*) et 449 (anti p22*phox*) permet de contrôler que les clones COS7 transfectés expriment ces deux protéines.

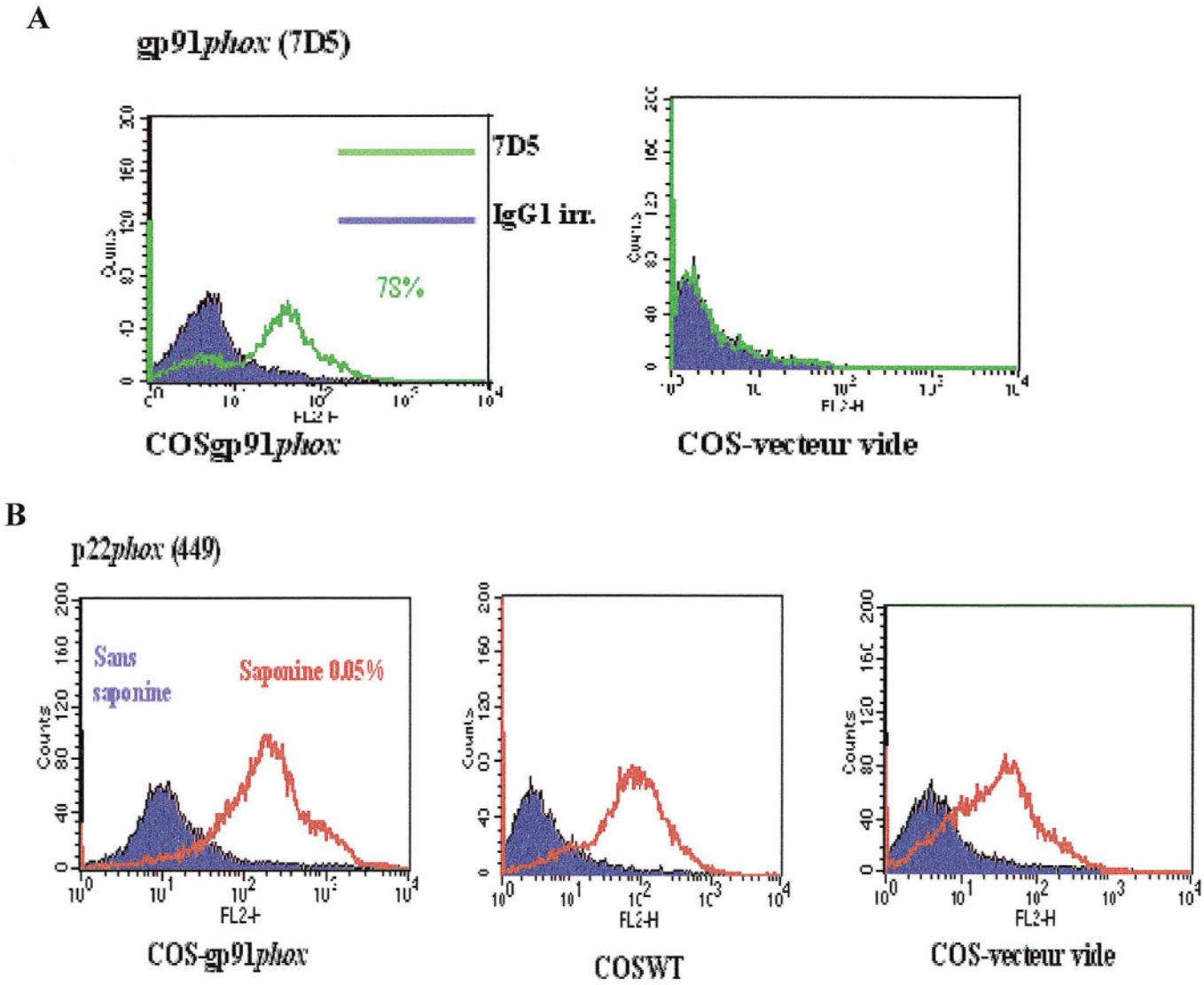


Figure 22: Evaluation, par cytométrie en flux, de l'expression de gp91*phox* (A) et de p22*phox* (B) dans les cellules COS7 transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox*. **A** : 5.10^5 cellules COS7WT transfectées par le vecteur vide ou par pEFPGKneo – gp91*phox* sont incubées avec l'anticorps 7D5 ou l'IgG1 irrelevant puis avec un anticorps secondaire marqué à la PE comme décrit dans Matériel et méthodes. **B** : 5.10^5 cellules COS7WT ou COS7 transfectées par le vecteur vide ou par pEFPGKneo – gp91*phox* sont perméabilisées (ou non) avec la saponine 0,05% puis marquées avec l'anticorps 449 avant incubation avec l'anticorps secondaire marqué à la PE, comme décrit dans Matériel et méthodes. Nb d'évènements : 10000.

En utilisant l'anticorps 7D5, un pic de fluorescence significatif par rapport à celui obtenu avec l'IgG1 irrelevant, est visible sur la Figure 22A. On en déduit que 78% des cellules COS7 transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox* expriment la protéine gp91*phox*. Les cellules COS7 transfectées par le vecteur vide (Figure 22A) servent de contrôle négatif :aucune expression de gp91*phox* n'est observée. La Figure 22B confirme que les cellules COS7WT préalablement perméabilisées par la saponine 0,05% expriment constitutivement la protéine p22*phox*. Cependant, on observe une augmentation de l'expression de p22*phox* dans les cellules COS7 transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox*, ceci n'avait pas été visualisé par Western Blot (Figure 21).

Ce clone de cellules COS7 transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox* exprimant gp91*phox* à 78% est choisi pour effectuer un tri cellulaire par cytométrie en flux (comme décrit dans Matériel et méthodes). Ce tri cellulaire (Figure 23) permet d'obtenir une population cellulaire dans laquelle 97% des cellules expriment gp91*phox*. Ce clone sera utilisé pour la suite des expérimentations.

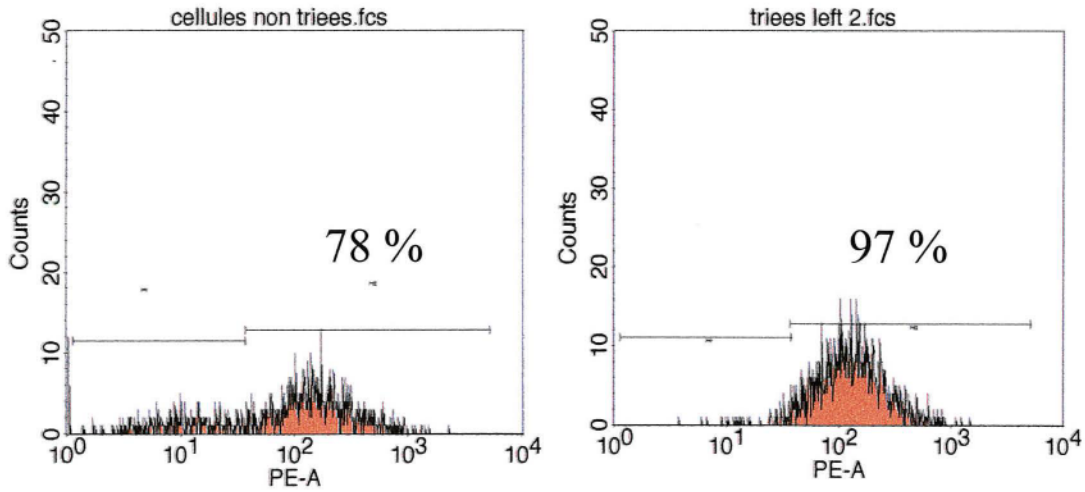


Figure 23: Tri par cytométrie en flux des cellules COS7 transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox*

2.3.3 Spectres différentiels du cytochrome b_{558}

Après lecture de la fraction réduite contre la fraction oxydée, les concentrations de cytochrome b_{558} sont évaluées , pour chaque extrait soluble. La concentration est calculée à partir de la valeur du ΔDO à 558 nm, du coefficient d'extinction molaire à cette longueur d'onde rapportée à la concentration protéique.

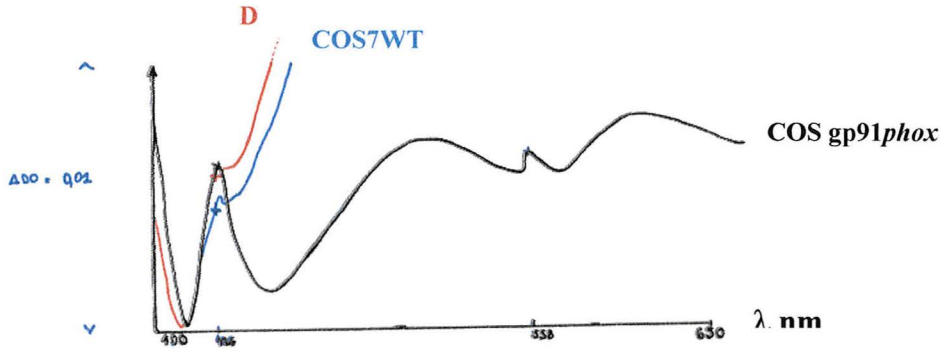


Figure 24: Spectres différentiels du cytochrome b_{558} des cellules COS7WT et COS transfectées par l'ADNc de gp91*phox* (COSgp91*phox*) ou par le vecteur vide (D).

⇒ Le cytochrome b_{558} présent uniquement dans les cellules COS7 transfectées par l'ADNc de gp91*phox* est caractérisé par la présence pic d'absorption à 426 nm et 558 nm (Bande de Soret) du spectre différentiel. La concentration en cytochrome b_{558} de l'extrait soluble des COS7 transfectées par l'ADNc de gp91*phox* est de 4,4 pmol/mg de protéines.

2.4 Evaluation de l'activité NADPH oxydase des cellules COS7WT et COS gp91*phox*

La production de peroxyde d'hydrogène des cellules COS7WT et COS gp91*phox* est mesurée par chimiluminescence. Puis l'activité NADPH oxydase des deux types cellulaires est reconstituée en système acellulaire en mettant en présence des membranes de cellules (COS7WT ou COS gp91 *phox*) et du cytosol de neutrophiles humains.

2.4.1 Chimiluminescence

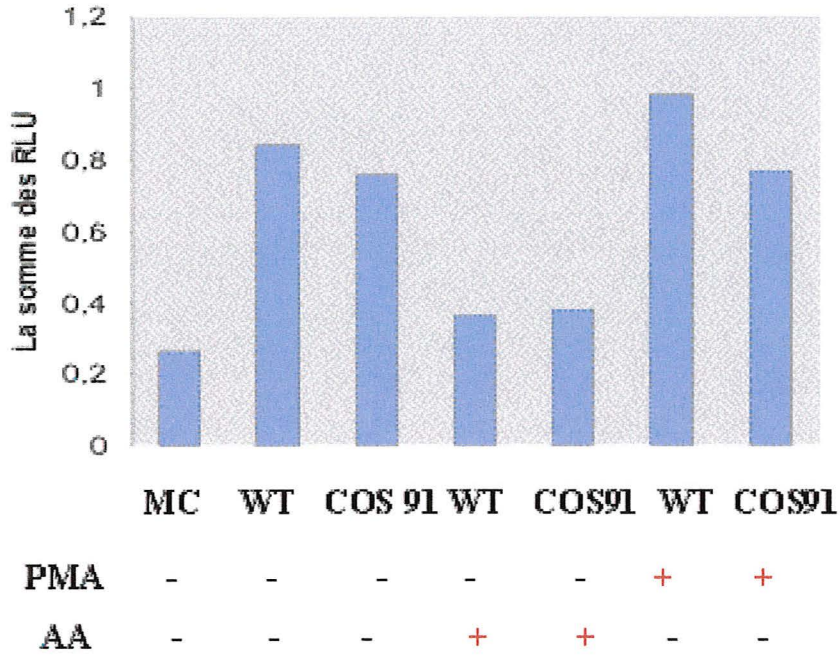


Figure 25: Mesure par chimiluminescence de l'activité NADPH oxydase des cellules COS7 WT et COS7 transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox* . 10^6 cellules COS7WT ou transfectées par l'ADNc de gp91*phox* sont activées par l'AA 10 µM ou le PMA 0,4 µg/ml. La production d'H_2O_2 est évaluée en présence de luminol 2mM et est exprimée en unité arbitraire (RLU) comme décrit dans Matériel et méthodes.

⇒ Les cellules COSWT ou transfectées par l'ADNc de gp91*phox* semblent avoir une production d'H_2O_2 constitutionnelle faible du même ordre. De plus, l'activité NADPH oxydase de ces cellules WT ou transfectées n'est pas augmentée par une stimulation par le PMA ou l'AA. Enfin, on remarque que l'AA aurait une action inhibitrice sur l'activité oxydase constitutionnelle, indépendamment de l'expression de gp91*phox*.

2.4.2 Reconstitution de l'activité NADPH oxydase en «cell free system »

Une activité NADPH oxydase est reconstituée artificiellement à partir de membranes plasmiques purifiées de cellules COS7 WT ou transfectées par l'ADNc de gp91*phox* en présence de cytosol de neutrophiles comme décrit dans Matériel et méthodes. On mesure pour chaque système la production d'ions O_2^- / min / mg de protéines, en présence d'acide arachidonique (concentration

optimale ajoutée, déterminée avant chaque reconstitution d'activité pour chaque type de membranes). Des membranes de neutrophiles humains servent de contrôle positif. Le contrôle négatif est constitué de membranes issues de cellules COS7 transfectées par le vecteur pEFPGKneo vide.

Origine des membranes	**Moyenne de la production d'O_2^- (nmolO_2^- / min / mg prot.) ; n=3**
COS7 WT	3,1 ± 0,5
COS7 transfectées par l'ADNc de gp91*phox*	38 ± 5
COS7 transfectées par le vecteur vide	3,6 ± 0,7

Tableau VI : Mesure de l'activité NADPH oxydase en système reconstitué à partir des membranes des cellules COS7WT et transfectées (par pEFPGKneo – gp91*phox* ou pEFPGKneo vide).

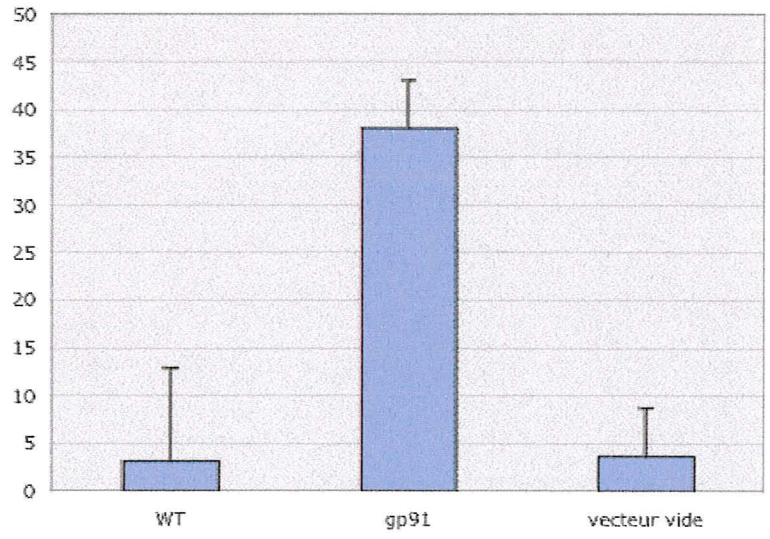


Figure 26: Mesure de l'activité NADPH oxydase en système reconstitué à partir des membranes des cellules COS7WT et transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox* ou pEFPGKneo vide.

L'activité NADPH oxydase est mesurée pour chaque clone ainsi que l'activité intrinsèque du cytosol de neutrophiles seul (68,3 nmol $O2^-$/min/mg prot). Puis, la valeur de l'activité oxydase du cytosol seul est soustraite à la valeur de l'activité oxydase obtenue pour chaque clone (Tableau VI).

⇒ Les cellules COS7 transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox* ont une activité NADPH oxydase reconstituée beaucoup plus importante que les cellules COS7WT et les cellules transfectées par le vecteur vide. Ceci signifie que les cellules COS7 transfectées par pEFPGKneo – gp91*phox* possèdent un cytochrome b_{558} fonctionnel qui résulte de l'assemblage de la protéine gp91*phox* à la protéine p22*phox* (présente de manière constitutive dans les cellules COSWT). Ce cytochrome b_{558} permet, grâce à la présence des facteurs cytosoliques apportés par le cytosol de neutrophiles, de former un complexe oxydase actif.

3. Obtention du modèle COS transgénique exprimant le cytochrome b_{558} et certains facteurs cytosoliques

Pour l'obtention des cellules COS7 transgéniques exprimant les facteurs cytosoliques, il est nécessaire que les ADNc de p40*phox*, p47*phox* et p67*phox* soient clonés dans des vecteurs eucaryotiques d'expression permettant une sélection différentes par les antibiotiques. Ils sont ensuite transfectés dans les cellules COS7 exprimant la protéine gp91*phox*.

3.1 Clonage de l'ADNc de p67*phox*

Le vecteur pEF4/V5HisB ainsi que le vecteur pPCR-script Amp contenant l'ADNc de p67*phox* sont coupés spécifiquement par digestion enzymatique avec *KpnI,* puis subissent une migration électrophorétique sur gel d'agarose 1.5%, comme décrit dans Matériel et méthodes pour permettre leur purification (Figure 27A). Les quantités respectives d'insert et de vecteur déphosphorylé sont appréciées visuellement après migration électrophorétique sur gel d'agarose 1,5%.

Deux ratios « insert / vecteur » de 1 et 2 sont utilisés pour réaliser la ligation en présence de T4 Ligase. Après transformation, chaque clone bactérien résistant à l'Ampicilline (50µg/ml) est contrôlé sur gel d'agarose 1,5%. L'ADN plasmidique des clones est purifié et digéré par *KpnI* comme décrit dans Matériel et méthodes (Figure 26B). Le sens d'insertion de l'ADNc p67*phox* dans le vecteur pEF4 /V5HisB est ensuite vérifié en réalisant une digestion enzymatique par *BamHI* (Figure 27B) car ce site de restriction est présent dans le vecteur pEF4/V5 HisB et dans l'insert p67*phox*.

Les fragments d'ADN de 640 bp obtenus après digestion par *BamHI* correspondent à une intégration correcte de l'insert dans le vecteur. Par contre, une insertion incorrecte conduit à l'obtention d'un fragment de 974 bp, pour le clone 2.

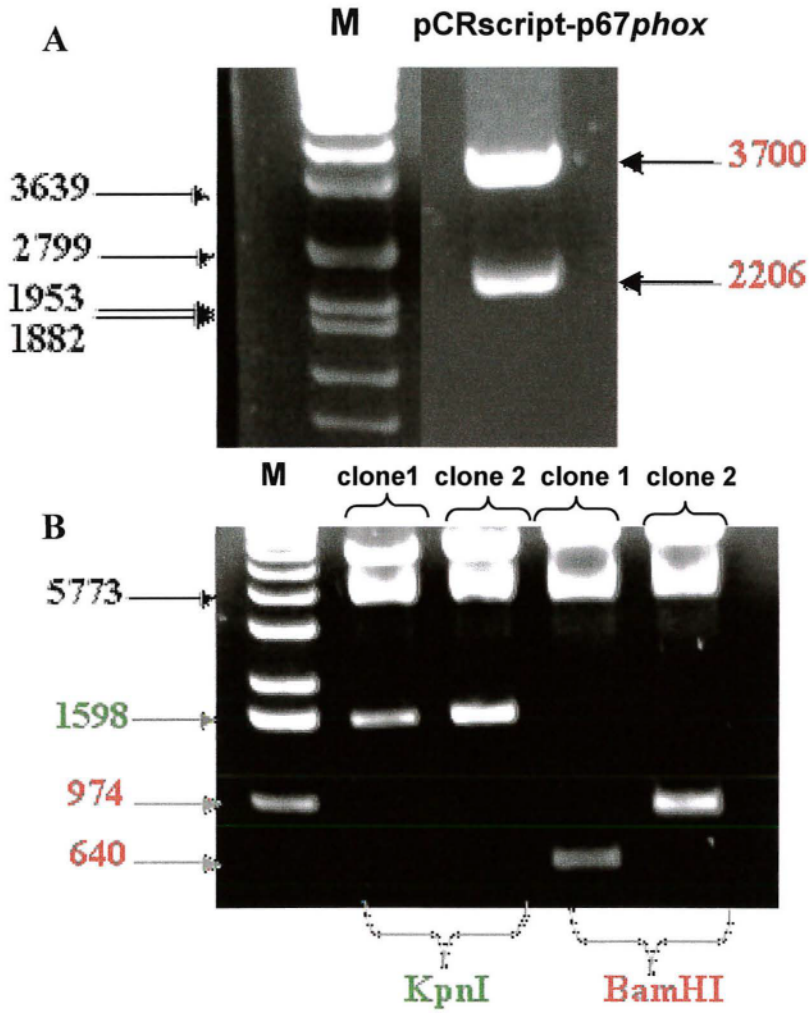


Figure 27: Clonage de l'ADNc de p67*phox* dans le vecteur d'expression pEF4/V5HisB
A : Digestion enzymatique par *KpnI* de 10 µl d'ADNc p67*phox* cloné dans pPCR script; **B** : Contrôle du clonage et du sens d'insertion de l'insert par digestion enzymatique par *KpnI* et *Bam HI* des plasmides résistants à l'Ampicilline pour les clones 1 et 2. M :marqueur de taille.

Le séquençage permet de confirmer le sens correct d'insertion de l'insert ADNc p67*phox* dans le vecteur pEF4/V5HisB. La présence des séquences Kozak et ATG nécessaires à une expression protéique correcte ainsi que l'absence de mutation dans l'ADNc de p67*phox* sont également vérifiées.

Le clone 1 est choisi pour permettre la purification du plasmide grâce au kit QIAGEN Plasmid Maxi kit® qui constitue une étape primordiale avant la transfection. Cette même étape

de purification est menée pour un clone bactérien contenant le vecteur pEF4/V5HisB vide. Les concentrations d'ADN plasmidique purifié des clone 1 et « clone vecteur vide » sont de 7,1 µg/µl et 8 µg/µl respectivement.

Enfin, ce clone bactérien positif sélectionné et contrôlé est remis en culture dans 3ml de milieu LB additionné d'Ampicilline (50µg/ml) pendant 1 nuit puis les bactéries sont congelées à - 80°C en glycérol 50% (aliquots de 1 ml).

3.2 Clonage de l'ADNc de p47*phox* :

L'ADNc de p47*phox* a été cloné dans le vecteur pGEX2T entre les sites *BamHI* et *EcoRI* (don du Dr Wienjes, London College, UK). Or le site *Bam HI* est également présent dans la séquence de l'ADNc de p47*phox* : il n'est donc pas possible d'extraire l'ADNc de p47*phox* de ce vecteur. Une PCR avec l'enzyme PfuTurbo et les amorces PAC47S et PAC47AS (Matériel et méthodes) permet d'inclure les sites de restriction *EcoRI* à l'exptrémité 3' et *NotI* à l'extrémité 5' de l'ADNc de p47*phox*.

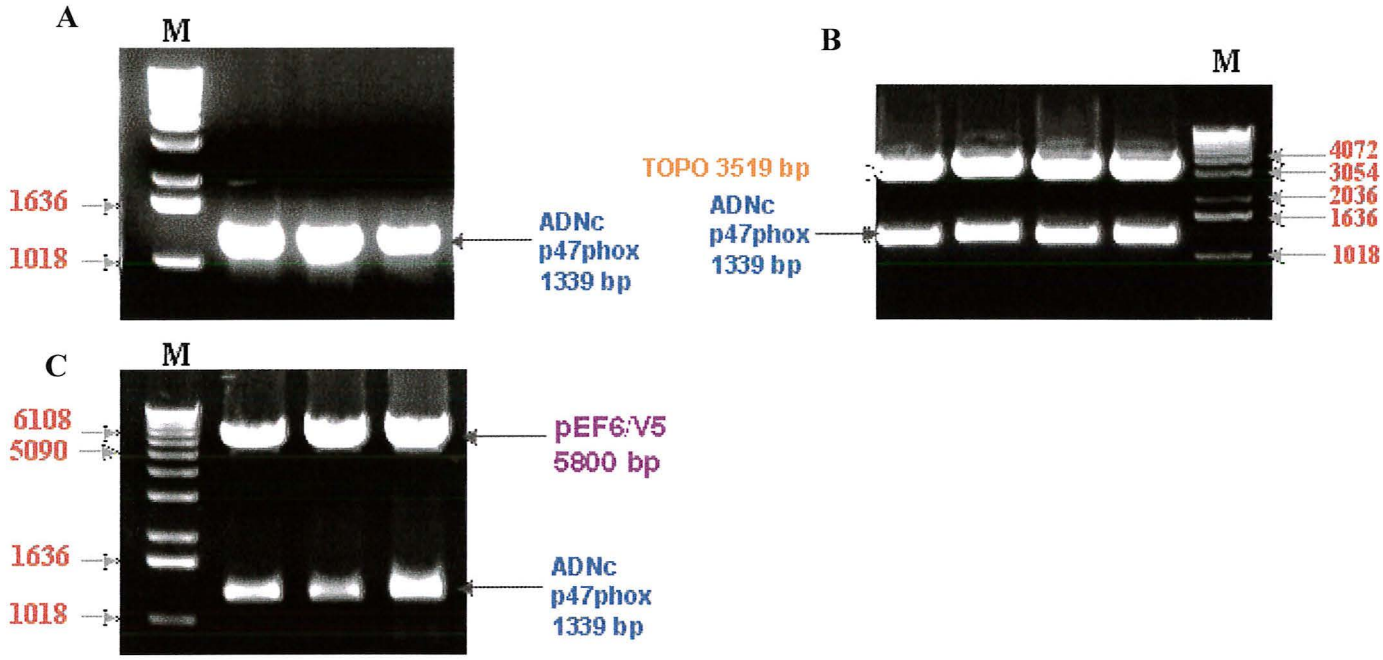


Figure 28: Clonage de l'ADNc de p47*phox*. A : Contrôle de la taille des produits de PCR de l'ADNc p47*phox* **; B** : Contrôle du sous clonage dans le vecteur TOPO ; **C**: Contrôle du clonage dans pEF6/V5 par digestion enzymatique par *EcoRI* et *NotI* des plasmides résistants à l'Ampicilline. **M** : marqueur de taille (Roche Diagnostic)

La taille des produits PCR obtenus est contrôlée par migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% (Figure 28A) par comparaison avec un marqueur de tailles du commerce (XIV, Roche Diagnostics). Les produits de PCR ont une taille comprise entre 1018 et 1636 bp ce qui correspond à la taille de l'ADNc de p47*phox* qui comporte 1339 bp.

Le kit « TOPO » permet ensuite un sous clonage rapide de l'ADNc de p47*phox*. Après transformation dans les bactéries *E.Coli* compétentes, chaque clone bactérien résistant à la Kanamycine (50µg/ml) est contrôlé sur gel d'agarose 1,5%, après purification du plasmide (miniprep) et digestion enzymatique par *EcoRI* et *NotI* comme décrit dans Matériel et méthodes (Figure 28B).

Le vecteur pEF6/V5HisB est coupé par les mêmes enzymes de restriction *EcoRI* et *NotI* et une migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% permet de contrôler sa taille. Après purification, les quantités respectives d'insert et de vecteur sont appréciées visuellement après migration électrophorétique sur gel d'agarose 1%. Deux ratios insert/vecteur de 1 et 2 ont été utilisés pour réaliser la ligation en présence de T4 ligase. Après transformation, chaque clone bactérien résistant à l'Ampicilline (50µg/ml) est contrôlé sur gel d'agarose 1% après digestion enzymatique par *EcoRI* et *NotI* (Figure 28C).

Comme dans le cas du clonage de p67*phox*, le séquençage permet enfin de confirmer le sens correct d'insertion de l'insert ADNc de p47*phox* dans le vecteur pEF6/V5HisB ainsi que la présence des séquences Kozak et ATG nécessaires à une expression protéique correcte et l'absence de mutation dans l'ADNc de p47*phox*.

⇒ En conclusion, l'ADNc de p47*phox* est cloné dans le vecteur d'expression eucaryotique pEF6/V5 His B entre les sites de restriction *Eco RI* et *Not I*, dans un sens correct.

3.3 Contrôle du plasmide pCEP4 – p40*phox*

Ce clonage a été effectué par Sabrina Vergnaud (GREPI). L'insert p40*phox* a été cloné dans le vecteur pCEP4 entre les sites de restriction *KpnI*. Une digestion enzymatique par cette enzyme permet de vérifier les tailles respectives de l'insert et du vecteur (Figure 29).

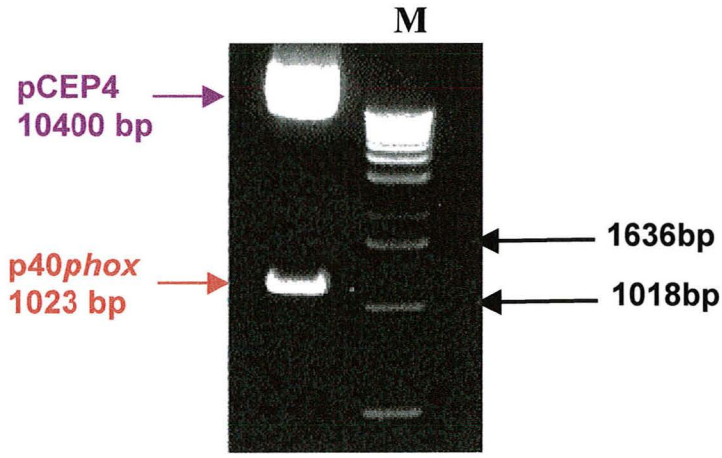


Figure 29: Digestion enzymatique par *KpnI* de pCEP4/p40*phox*. Puit 1 **:** dépôt de 2µl de plasmide ; **M** :marqueur de taille (Roche Diagnostic).

Les tailles des fragments correspondant au vecteur pCEP4 et à l'insert d'ADNc de p40*phox* sont correctes. La taille du vecteur est de 10000bp environ (taille réelle de 10400bp) celle de l'insert comprise entre 1018bp et 1636bp (taille réelle de 1023bp).

3.4 Transfection des ADNc de p67*phox* et p40*phox* dans les cellules COS7 exprimant gp91*phox*

3.4.1 Tests de survie des cellules COS7WT à la Zéocine et à l'Hygromycine

Les plasmides pEF4/V5-HisB et pCEP4 contenant respectivement les inserts p67*phox* et p40*phox* possèdent les cassettes de résistance à la Zéocine et à l'Hygromycine. On a déterminé les concentrations de chaque antibiotique nécessaires pour que la quasi totalité des cellules COS7WT soient mortes au bout de 10 jours de culture. Les cellules sont cultivées en présence de concentrations croissantes d'antibiotique.

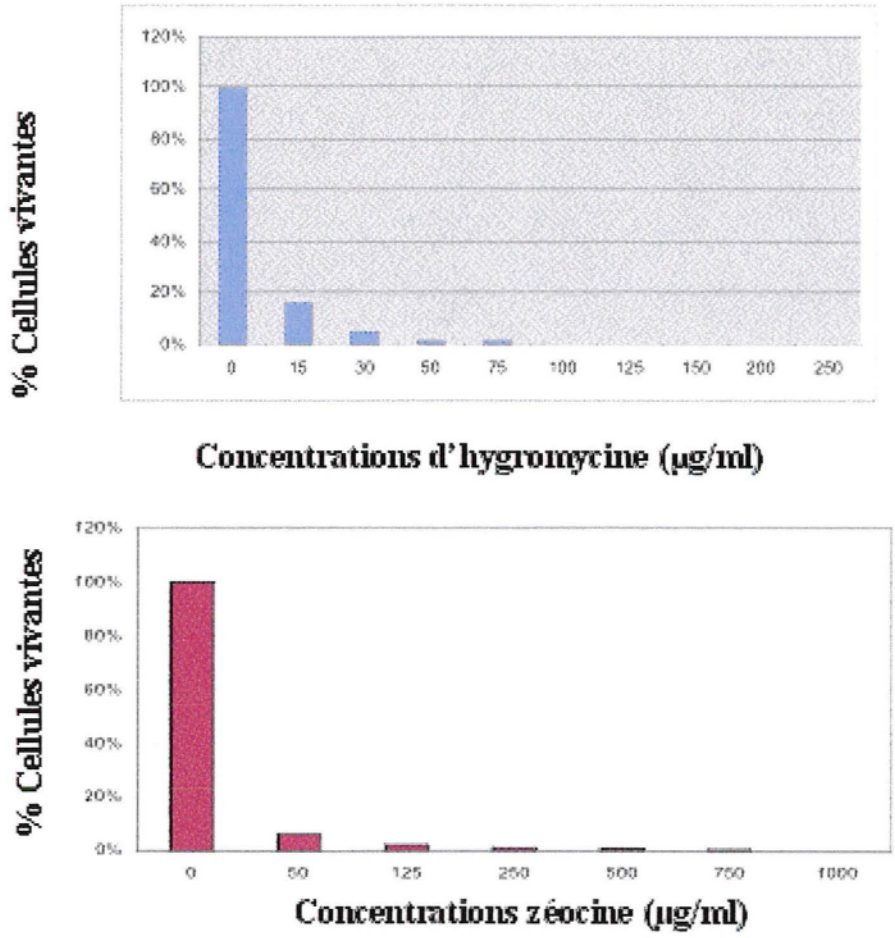


Figure 30: Tests de survie des cellules COS7 en présence de concentrations croissantes d'Hygromycine et de Zéocine. 2.10^6 cellules sont mises dans chaque puit d'une plaque 6 puits, des concentrations croissantes d'Hygromycine (0 à 250 µg/ml) ou de Zéocine (0 à 1000 µg/ml).

⇒ Après 10 jours de culture, on observe que les cellules COS7 sont sensibles à des concentrations de 100 µg/ml de Zéocine et de 50 µg/ml d'Hygromycine. Les cellules transfectées sont cultivées en présence de ces concentrations d'antibiotique.

3.4.2 Transfection des ADNc de p67*phox* et/ou p47*phox* dans les cellules COS-cytochrome b_{558}

5.10^5 cellules COS7 exprimant gp91*phox* sont transfectées avec 10 µg de plasmide « endofree » – pEF4/V5HisB- ADNc de p67*phox* et/ou 10 µg de plasmide « endofree » ADNc de pCEP4 - p40*phox* par électroporation selon les conditions décrites dans Matériel et méthodes. Les cellules sélectionnées à 48h par addition de Zéocine (100µg/ml) et/ou d'Hygromycine (50µg/ml) sont distribuées après dilution au 1/100ème en plaque de 24 et 48 puits stériles. Après 3 semaines, les

clones positifs (résistants à (aux) l'antibiotique(s)) sont repérés par changement de couleur du milieu de culture qui vire du rouge Phénol au jaune. Parallèlement, 5.10^5 cellules sont transfectées par 10 µg de plasmide « endofree » pEF4/V5HisB et/ou pCEP4 ne contenant pas le (les) insert(s). Les conditions de transfection et de sélection des clones positifs sont identiques à celles décrites ci-dessus. Ces cellules servent de contrôle négatif de transfert.

⇒ Cinq clones de cellules COS7 - gp91*phox* transfectés par l' ADNc de p67*phox* et deux clones de cellules COS7 - gp91*phox* transfectés par l' ADNc de p40*phox* sont sélectionnés. Ils sont cultivés en milieu DMEM/F12 additionné respectivement de 100µg/ml de Zéocine ou 50µg/ml d'Hygromycine. Après sélection, les clones positifs sont cultivés en maintenant une pression de sélection (Zéocine : 50µg/ml ou Hygromycine: 25µg/ml). Les cellules sont ensuite congelées à –80°C.

Par contre, aucun clone transfecté simultanément par l'ADNc de p67*phox* et l'ADNc de p40*phox* n'a pu être sélectionné.

Quatrième partie : discussion

L'objectif principal de ce travail de thèse a été de mettre en place un modèle cellulaire de base afin de pouvoir reconstituer les défauts géniques à l'origine des granulomatoses septiques chroniques autosomales récessives (CGD AR). Ces formes de CGD sont rares et les mutations à l'origine de cette maladie sont très hétérogènes. En effet trois gènes sont impliqués dans les formes AR ; *CYBA*, *NCF1* et *NCF2* codant respectivement les protéines p22*phox*, la petite sous-unité du cytochrome b_{558} et les facteurs cytosoliques p47*phox* et p67*phox*. De plus la localisation des mutations est également très hétérogène à l'exception de la double délétion au début de l'exon 2 du gène *NCF1* à l'origine de la CGD 47AR (Cathebras *et al.* 2000). À l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle d'étude de ces formes CGD AR et il nous a paru intéressant de pouvoir créer une lignée cellulaire eucaryote afin de pouvoir étudier l'impact de mutations dans l'un des gènes impliqués dans cette maladie sur l'activation et l'assemblage du complexe oxydase. Les formes CGD AR les plus intéressantes sont certainement celles dans lesquelles la mutation génique entraîne l'expression normale de la protéine mutée correspondante, mais qui est non fonctionnelle (Leusen *et al.* 1994, Leusen *et al.* 1996). Ainsi certaines régions stratégiques des protéines d'intérêt peuvent être mises en évidence et notamment les séquences d'interaction protéine/protéine impliquées dans l'assemblage du complexe oxydase et son fonctionnement.

La première étape de ce projet a consisté à caractériser le contenu des cellules COS7 en composants du complexe oxydase. Dans un premier temps, la RT-PCR a permis de mettre en évidence la présence des ARNm de p22*phox*, p40*phox* (variant 2), p67*phox* et Rac1. Au contraire, les ARNm de gp91*phox*, p47*phox* et Rac2 sont absents des cellules COS7. La validité de l'amplification a été réalisée en comparaison avec les lymphocytes B.
Contrairement à l'équipe de Dinauer (Yu *et al.* 1997), nous avons mis en évidence l'ARNm de p22*phox* dans les cellules COS7. Dans leur article, la technique du Northern Blot avait été utilisée mais les données obtenues n'étaient pas exposées. Cependant, cette même équipe avait mis en évidence la présence d'ARNm de p22*phox* dans de nombreuses cellules non phagocytaires et avait souligné que la présence d'ARNm de p22*phox* n'était pas toujours associée à l'expression de la protéine p22*phox* comme dans les cellules K562 et Hela (Northern Blot) (Parkos *et al.* 1988). De même, au cours d'un travail sur les analogues de

Nox2, l'équipe de Cheng avait montré par RT-PCR que l'ARNm de p22*phox* etait présent dans de nombreux types cellulaires (cerveau, foie, rein, pancréas etc...) (Cheng *et al.* 2001). Enfin, d'autres auteurs ont précisé -sans le démontrer- que les cellules COS7 contiennent l'ARNm de p22*phox* et s'appuyent sur cette hypothèse pour confirmer que l'activation de gp91*phox* dans les cellules COS7 a lieu sans transfection préalable de p22*phox* (Takeya *et al.* 2003).

Par RT-PCR, nous avons obtenu des fragments d'ADNc qui ont été séquençés puis les séquences nucléotidiques ont été traduites en séquences protéiques. Ces dernières ont été comparées aux séquences connues des protéines correspondantes présentes dans les lymphocytes B.

La séquence de la protéine p22*phox*, déduite du séquençage de l'ADNc de p22*phox* des cellules COS7, présente quatre mutations n'entraînant aucun changement de charge dans la protéine: Ala75Ser, Phe83Leu, Val92Ile, Val185Ala. De plus, la mutation His72Tyr correspond à un polymorphisme déjà décrit (Dinauer *et al.* 1990).

En outre, la mutation Ala172Glu provoque un changement de charge et d'hydrophobicité. Cependant, cet acide aminé en position 172 n'est pas impliqué dans la liaison avec p47*phox* ou p67*phox* (Dahan *et al.* 2002). Dans cette étude, la technique du « peptide walking » a permis de déterminer précisemment les régions impliquées dans la fixation des facteurs cytosoliques. Les auteurs ont confirmé que p47*phox* interagissait avec le PRR (acides aminés 151-160) de p22*phox* mais également, qu'il existait une autre liaison au niveau d'une boucle cytosolique de p22*phox*, située entre les acides aminés 51-63. De plus, p67*phox* semblait interagir avec la même région PRR de p22*phox* et se liait au niveau des acides aminés 81-91 et 111-115.

En ce qui concerne la séquence de p67*phox*, quatre mutations n'entraînant aucun changement de charges ont été identifiées: Asn409Ser, Asp453Glu, Asp492Glu, Ser506Phe. De même, le polymorphisme Lys328Arg décrit par Patino *et al.* en 1999 a été retrouvé. Deux mutations Glu314Gln et Glu365Lys peuvent être intéressantes puisqu'elles correspondent à des changements de charges. On peut noter que l'acide aminé Glu365 appartient au domaine PB1 (345-427) de p67*phox*, engagé dans l'interaction avec le domaine PC de p40*phox* par liaisons électrostatiques, dans les phagocytes au repos (Nakamura *et al.* 1998). Un changement de charge à ce niveau pourrait gêner la liaison entre ces deux protéines. Par contre, l'acide aminé Glu314 n'appartient ni aux domaines SH3, ni au TPR, ni au PRR de p67*phox* et donc, une mutation à ce niveau aura peu d'influence sur l'interaction de p67*phox* avec les autres facteurs cytosoliques.

D'autre part, la protéine p40*phox* retrouvée dans les cellules COS7 correspond au variant 2 décrit par Hasebe *et al* en 1996. Deux mutations Val252Ile et Phe267Leu n'entraînent pas de changement de charge dans la protéine, contrairement à la mutation Lys309Gln. Cet acide aminé en position 309 fait partie du domaine PC situé en C-terminal de p40*phox* (283-310) qui interagit avec le domaine PB1 de p67*phox*. Les mutations dans les domaines PC et PB1 risquent de gêner l'interaction entre p40*phox* et p67*phox*. D'ailleurs, l'importance du domaine PC de p40*phox* a été mis en évidence par Kuribayashi *et al.* en 2002. Ces travaux ont montré que les mutations Asp289Ala dans le domaine PC de p40*phox* et Lys355Ala dans le domaine PB1 de p67*phox* empêchaient la translocation de p47*phox* et p67*phox* ce qui avait pour conséquence une nette diminution de la production d'ions superoxyde.

Enfin, nous avons identifié la présence de la protéine Rac1 dans les cellules COS7 avec une homologie de séquence de 100% avec celle retrouvée dans les lymphocytes B. Il s'agit du variant c (Zhao *et al.* 2003) dont la séquence est plus courte que celle de Rac 1a puisqu'une région codante en 5' est absente.

Après avoir mis en évidence la présence des ARNm de p22*phox*, p67*phox*, p40*phox* et Rac1 dans les cellules COS7, nous avons voulu connaître leur contenu protéique correspondant.

La présence de p22*phox* et l'absence de gp91*phox* dans les cellules COS7 ont été visualisées grâce à la technique du Western Blot, réalisé à partir des extraits Triton X100 1%, et par cytométrie en flux. Le Western Blot, réalisé à partir des fractions membranaires et cytosoliques des cellules, a également montré la présence des protéines p40*phox* et Rac et l'absence des protéines p47*phox* et p67*phox*. Seule la protéine p67*phox* n'a pas été mise en évidence alors que les cellules COS7 contiennent l'ARNm correspondant.

La présence de la protéine p22*phox* dans les cellules COS7 est un résultat nouveau et très intéressant. Au contraire, l'équipe de Dinauer a étudié les mécanismes de maturation du cytochrome b_{558} en partant de l'hypothèse de l'absence de la protéine p22*phox* dans les cellules COS7 (Yu *et al.* 1997). Ainsi, les auteurs ont montré que les étapes de glycosylation de gp91*phox* ne requièraient pas la présence de p22*phox*. Or, nos résultats mettent en défaut cette conclusion puisque la protéine p22*phox* est naturellement exprimée dans les cellules COS7. Cependant, on peut imaginer que la transfection d'ADNc de p22*phox* permet une surexpression de la protéine dans les cellules. D'autre part, dans le même article et partant de la même hypothèse, les auteurs ont montré que gp91*phox* seul était localisé dans la membrane

plasmique et qu'il possédait les caractéristiques spectrales du cytochrome b_{558} (Yu *et al.* 1997). De même, ces conclusions peuvent être rediscutées à la lumière de nos résultats.
De plus, d'après nos résultats de cytométrie de flux, nous avons constaté que la transfection de l'ADNc de gp91*phox* entraîne la surexpression de la protéine p22*phox* et donc certainement, du cytochrome b_{558}.

La présence de la protéine Rac dans les cellules COS7 était prévisible puisque cette protéine est ubiquitaire, contrairement à Rac2 qui est exprimé uniquement dans les neutrophiles humains. L'isotype n'a pu être déterminé par Western blot puisque l'anticorps utilisé reconnaît les deux isotypes mais il s'agit vraisemblablement de Rac1 étant donné la présence de son ARNm dans les cellules COS7 WT. Notons que ces deux petites protéines G jouent le même rôle dans le complexe oxydase.

En ce qui concerne p40*phox*, peu de données sont disponibles dans la littérature sur l'expression de cette protéine dans les différents types cellulaires. Les travaux de Zhan *et al.* en 1996 ont montré la présence de l'ARNm de p40*phox* dans les cellules hématopoiétiques, à l'exception des cellules érythrocytaires (Northern Blot). Les cellules monomyéloblastiques PLB985 contiennent également l'ARNm de p40*phox*.
Notre travail a montré que dans les cellules COS7, le variant 2 de la protéine p40*phox* est exprimé (RT-PCR). L'ADNc du variant 2 possède 245 bp supplémentaires au niveau de l'intron 8, par rapport au variant 1 (Hasebe *et al.* 1999). De ce fait, les séquences des deux variants de p40*phox* diffèrent au niveau de la partie C-terminale, située entre les acides aminés 254 et 348. Ainsi, on peut noter que le variant 2 ne possède pas de domaine PC impliqué dans la liaison avec p67*phox* (Nakamura *et al.* 1998)

Dans un second temps notre travail a consisté à obtenir, par transfection, des cellules COS7 exprimant le cytochrome b_{558}. On a préalablement montré que les cellules COS7 expriment la protéine p22*phox* ; de ce fait, la transfection de l'ADNc de gp91*phox* est suffisante pour permettre l'expression du cytochrome b_{558}.

Après transfection de l'ADNc de gp91*phox*, préalablement cloné dans le vecteur pEFPGKneo (DEA C. Bionda, GREPI), cinq clones positifs ont été sélectionnés. L'expression de gp91*phox* et de p22*phox* a été évaluée à partir d'extraits solubles par la technique du Western blot mais également à partir des cellules intactes transfectées, par cytométrie en flux.

Un clone exprimant la protéine gp91*phox* à 78% a été sélectionné et a subi un tri cellulaire afin d'enrichir la population de cellules exprimant gp91*phox* (grâce à l'aide du Dr Mathieu CRSSA, Grenoble). Après ce tri cellulaire, 97% des cellules exprimaient la protéine gp91*phox*.

Nous avons démontré qu'en présence de la protéine p22*phox*, exprimée de façon constitutionnelle dans les cellules COS7, la transfection de l'ADNc de gp91*phox* permet la synthèse de l'hétérodimère p22*phox*/gp91*phox*. Afin de vérifier que l'hétérodimère formé correspondait au cytochrome b_{558}, un spectre différentiel à partir des cellules COS7WT et COS7-gp91*phox* a été réalisé. On constate que seules les cellules transfectées par l'ADNc de gp91*phox* possèdent le cytochrome b_{558}. On peut conclure que la présence de gp91*phox* et de p22*phox* est indispensable pour la formation du cytochrome b_{558}. Cependant, nous n'avons pas pu étudier l'éventuelle expression de gp91*phox* et/ou sa maturation en l'absence de p22*phox*, comme l'avait entrepris l'équipe de Dinauer (Yu *et al.* 1997).

Pour confirmer que le cytochrome b_{558} formé est fonctionnel, l'activité oxydase des cellules (COS7 WT et COS7 transfectées) est reconstituée en système acellulaire en mettant en présence des membranes purifiées des cellules et du cytosol de neutrophiles humains. Les cellules COS7 transfectées avec l'ADNc de gp91*phox* ont une activité NADPH oxydase reconstituée beaucoup plus importante que les cellules COS7WT ; ceci signifie qu'elles possèdent un cytochrome b_{558} fonctionnel résultant de l'assemblage de la protéine gp91*phox* à la protéine p22*phox*. Ce cytochrome b_{558} permet de former un complexe oxydase actif en présence des facteurs cytosoliques apportés par le cytosol de neutrophiles humains. Les résultats des travaux de Dinauer montraient également que la production d'ions superoxyde des cellules COS7-gp91*phox* en système acellulaire était cinq fois plus élevée que celle des cellules COS7WT (Yu *et al.* 1998). Cependant, les cellules COS7-gp91*phox* transfectées avec l'ADNc de p22*phox* produisaient cent trente fois plus d'ions superoxyde que les cellules COS7-gp91*phox*, ce qui pourrait s'expliquer par la surexpression de p22*phox* et de gp91*phox* dans ces cellules.

D'autre part, on observe en chimiluminescence, que les cellules COS7WT et COS7-gp91*phox* ont une production d'H_2O_2 constitutive du même ordre. Cette production n'est stimulable ni par l'AA ni par le PMA et serait même diminuée en présence d'AA. Ainsi, cette production d'H_2O_2 n'est vraisemblablement pas due à la présence du cytochrome b_{558} mais peut-être à d'autres Nox. De plus, l'absence de certains facteurs cytosoliques dans les cellules COS7 tels que p47*phox* et p67*phox* peut expliquer que, même dans les cellules COS transfectées, aucun cytochrome b_{558} fonctionnel ne puisse être reconstitué.

Enfin, à partir des cellules COS7-cytochrome b_{558}, on a voulu obtenir un nouveau modèle exprimant le cytochrome b_{558} et certains facteurs cytosoliques. L'ADNc de p40*phox* ayant été préalablement cloné au laboratoire (Sabrina Vergnaud), les ADNc de p67*phox* et p47*phox* ont été clonés dans des vecteurs d'expression eucaryotiques possèdant des cassettes de résistance à des antibiotiques, différentes. Les cellules COS7-cytochrome b_{558} ont été transfectées avec l'ADNc de p67*phox* ou avec l'ADNc de 40*phox* et deux types de clones ont pu être obtenus (COS7-cytochrome b_{558} + p40*phox* et COS7-cytochrome b_{558} + p67*phox*). Notons que la transfection simultanée de l'ADNc de p40*phox* et de l'ADNc de p67*phox* a été tentée mais qu'aucun clone n'a pu être sélectionné.
Actuellement, ces modèles COS7-cytochrome b_{558} exprimant un ou plusieurs facteurs cytosoliques sont en cours d'évaluation et de caractérisation.

En conclusion générale, nous avons voulu mettre en place un modèle cellulaire d'étude des CGD AR puisqu'actuellement, aucun modèle n'est disponible, contrairement aux CGD liées à l'X. Nous pouvons penser que la méthodologie employée pour obtenir nos trois différents modèles : COS7-cytochrome b_{558} , COS7-cytochrome b_{558}-p67*phox* et COS7-cytochrome b_{558}-p40*phox*, est correcte. Pour compléter notre étude, des modèles de CGD AR exprimant également le facteur cytosolique p47*phox* devront être établis. Ainsi, ces modèles permettront de reproduire les mutations géniques à l'origine des CGD AR. De plus, ils pourront être utilisés afin de créer des mutations *de novo* et d'étudier leur impact sur le fonctionnement du complexe oxydase. Ces modèles seront également pertinents dans l'étude et la caractérisation de nouveaux partenaires de l'oxydase.

MEMOIRE SOUTENU PAR : Delphine TISSOT DUPONT

TITRE : Mise en place d'un modèle cellulaire d'étude des Granulomatoses Septiques Chroniques Autosomales Récessives.

CONCLUSION

La Granulomatose septique chronique (CGD) est une maladie orpheline caractérisée par un défaut de fonctionnement de la NADPH oxydase des phagocytes professionnels. Cette enzyme est constituée d'un élément membranaire, le cytochrome b_{558}, et de facteurs cytosoliques, p47*phox*, p67*phox* et p40*phox*. Le cytochrome b_{558} est formé de deux sous-unités, la glycoprotéine gp91*phox* et p22*phox*. Deux petites protéines G Rac1/2 et Rap1 sont également impliquées dans la régulation du fonctionnement de la NADPH oxydase. Au cours de son activation, l'assemblage des éléments cytosoliques et membranaires de l'enzyme permet la formation d'un complexe actif produisant des ions superoxyde. On distingue deux types de transmission de la CGD : la forme liée à l'X et les formes autosomales récessives (CGD AR) dûes à des mutations dans les gènes codant p22*phox* ou les deux facteurs cytosoliques (p47*phox* et p67*phox*). Ces dernières sont rares et les mutations géniques impliquées, très hétérogènes. Actuellement, il n'existe pas de modèles cellulaires qui permettent l'étude approfondie des CGD autosomales récessives et plus particulièrement les CGD AR^+ dans lesquelles la protéine mutée est exprimée en quantité normale mais est non fonctionnelle.

L'objectif de ce travail a été de mettre en place un modèle cellulaire permettant de reproduire les mutations géniques à l'origine des CGD AR ou d'en créer *de novo,* afin d'étudier l'impact de ces mutations sur le fonctionnement du complexe oxydase.

Ce modèle a été réalisé dans les cellules fibroblastiques de rein de singe (cellules COS7). Dans un premier temps le contenu en ARNm et en protéines du complexe oxydase a été évalué dans ces cellules. La RT-PCR et le séquençage ont permis de mettre en évidence la présence des ARN messagers (ARNm) de p22*phox*, p67*phox*, p40*phox* et Rac1 dans les cellules COS7. Les résultats obtenus par western blot et cytométrie en flux ont montré que les protéines p22*phox*, p40*phox* et Rac étaient exprimées dans les cellules COS7.

La seconde étape a été l'obtention de cellules COS7 exprimant le cytochrome b_{558}. L'ADNc de gp91*phox* préalablement cloné dans un vecteur d'expression eucaryotique, a été transfecté de façon stable dans ces cellules. La fonctionnalité du cytochrome b_{558} recombinant exprimé dans les membranes plasmiques des cellules COS7 transfectées, a été évaluée en présence de cytosol de neutrophiles, afin de reconstituer une activité NADPH oxydase *in vitro*.

A partir de ces cellules transgéniques, d'autres modèles exprimant le cytochrome b_{558} et un ou plusieurs facteurs cytosoliques ont été obtenus. Les ADNc de p47*phox*, p67*phox* et p40*phox* ont été clonés dans des vecteurs d'expression eucaryotique possédant des cassettes de résistance à un antibiotique différentes. Les modèles COS7-cytochrome b_{558} exprimant un ou plusieurs facteurs cytosoliques sont en cours d'évaluation et de caractérisation.

Ces modèles cellulaires de CGD AR seront des outils intéressants pour étudier l'impact de certaines mutations des ADNc de p47*phox* ou p67*phox* sur le fonctionnement du complexe oxydase et les mécanismes moléculaires de son assemblage.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le

LE DOYEN
Professeur P. DEMENGE

LE PRESIDENT DU MEMOIRE
Professeur R. GRILLOT

Bibliographie

1- Abo A., Pick E., Hall A., Totty N., Teahan C.G., Segal A.W. (1991). Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac. *Nature*. **353** : 668-670.

2- Ago T., Numoi H., Ito T., Sumimoto H. (1999). Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47*phox* triple replacement of serines 303, 304, 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular. *J. Biol. Chem.* **274**: 33644-33653.

3- Ago T., Takeya R., Hiroaki H., Kuribayashi F., Ito T., Kohda D., Sumimoto H. (2001). The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**: 733-738.

4- Ambruso D.R., Knall C., Abell A.N. *et al.* (2000). Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **9**: 4654-4659.

5- Baehner R.L., Nathan D.G. (1967). Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. *Science*. **155**: 835-836.

6- Banfi B., Schrenzel J., Nusse O., Lew D.P., Ligeti E., Krause K.H., Demaurex N. (1999). A novel conductance in eosinophils: unique characteristics and absence in chronic granulomatous disease. *J. Exp. Med.* **190**: 183-194.

7- Banfi B., Maturana A., Jaconi S., Arnaudeau S., Laforge T., Sinha B., Ligeti E., Demaurex N., Krause K.H. (2000). A mammalian H+channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science*. **287**: 138-142.

8- Banfi B., Clark R.A., Steger K., Krause K.H. (2003). Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J. Biol. Chem.* **278**: 3510-3513.

9- Babior B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood.* **93:** 1464-1476.

10- Batot G., Paclet M.H., Doussière J., Vergnaud S., Martel C., Vignais P.Y., Morel F. (1998). Biochemical and immunochemical properties of B lymphocytes cytochrome b_{558}. *Biochim. Biophys. Acta.* **1406**:188-202.

11- Biberstine-Kinkade K.J., Yu L., Dinauer M.C. (1999). Mutagenesis of an arginine and lysine rich domain in the gp91*phox* subunit of the phagocyte NADPH oxidase flavocytochrome b_{558}. *J. Biol. Chem.* **274**: 10451-10457.

12- Biberstine-Kinkade K.J., De Leo F.R., Epstein R.I., LeRoy B.A., Nauseef W.M., Dinauer M.C. (2001). Heme-ligating Histidines in Flavocytochrome b_{558}. *J. Biol. Chem.* **276**: 31105-31112.

13- Biberstine-Kinkade K.J., Yu L., Stull N., LeRoy B., Bennett S., Cross A., Dinauer M.C. (2002). Mutagenesis of p22*phox* Histidine 94. *J. Biol. Chem.* **277**: 30368-30374.

14- Bionda C., Li X.J., van Bruggen R., Eppink M., Roos D., Morel F., Stasia M.J. (2004). Functionnal analysis of two-amino acid substitutions in gp91*phox* in a patient with X-linked flavocytochrome b_{558}-positive chronic granulomatous disease by means of transgenic PLB985 cells. *Hum. Gen.* **115**: 418-427.

15- Bokoch G.M., Quilliam L.A., Bohl B.P., Jesaitis A.J., Quinn M.T. (1991). Inhibition of rap1A binding to cytochrome b_{558} of NADPH oxidase by phosphorylation of Rap1A. *Science.* **254** : 1754-1796.

16- Bokoch G.M., Bohl B.P., Chuang T.H. (1994). Guanine nucleotide exchange regulates membranes translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **269** : 31674-31679.

17- Bokoch G.M. (1995). Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding protein. *Trends Cell Biol.* **5** : 109-113.

18- Bokoch G.M., Diebold B.A. (2002). Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood.* **100** :2692-2696.

19- Bonizzato A. Russo M.P., Donini M., Dusi S. (1997). Identification of double mutation (D160V-K161E) in p67*phox* gene of a chronic granulomatous disease patient. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231** : 861-863.

20- Burritt J.B., Quinn M.T., Jutila M.A., Bond C.W., Jesaitis A.J. (1995). Topological mapping of neutrophil cytochrome b epitope with phage-display libraries. *J. Biol Chem.* **270**:16974-16980.

21- Burritt J.B., DeLeo F.R., McDonald C.L., Prigge J.R., Dinauer M.C., Nakamura M., Nauseef W.M., Jesaitis A.J. (2001). Phage display epitope mapping of human neutrophil Flavocytochrome b_{558}. *J. Biol. Chem.* **276**: 2053-2061.

22- Bridges R.A., Berendes H., Good R.A. (1959). A fatal granulomatous disease of childhood. *Am. J. Child.* **97**:387-408.

23- Bromberg H, Pick E. (1984). Unsaturated fatty acid stimulate NADPH-oxidase superoxyde production by cell free system derived from macrophages. *Cell. Immunol.* **88** : 213-221.

24- Casimir C.M., Bu-Ghanuim H.N., Rosaway A.R.F, Bentley D.L., Rowe P., Segal A.W. (1993). Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by deletion at a dinucleotide repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **88**: 2753.

25- Cathebras P., Sauron C., Rabeyrin H., Morel F., Stasia M.J. (2001). An usual case of sarcoidosis. *Lancet.* **358**: 294.

26- Chanock S.J., Faust L.R.P., Barrett D. *et al.* (1992). O2- production by lymphocytes lacking the respiratory burst oxidase subunit p47*phox* after transfection with an expression vector containing a p47*phox* cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 10174-10177.

27- Chanock S.J., Faust L.R., Barrett D., Christensen B., Newburger P.E., Babior B.M. (1996). Partial reconstitution of the respiratory burst oxidase in lymphoblastoid B cell lines lacking p67*phox* after transfection with an expression vector containing wild-type and mutant p67*phox* cDNA: deletions of the carboxy and amino terminal residues of p67*phox* are not required for activity. *Exp. Hematol.* **24**: 531-536.

28- Cheng G., Cao Z., Xu X., van Meir E.G., Lambeth J.D. (2001). Homologs of gp91*phox*:cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene.* **269:** 131-140.

29- Cheng G., Lambeth J.D. (2004a). NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the *phox* homology (PX) domain. *J. Biol. Chem.* **279**: 4737-4742.

30- Cheng G., Ritsick D., Lambeth J.D. (2004b). Nox3 regulation by NOXO1, p47*phox* and p67*phox*. *J. Biol. Chem.* **279**:34250-5.

31- Chetty M., Thrasher A.J., Abo A., Casimir C.M. (1995). Low NADPH oxidase activity in Epstein-Barr-virus-immortalized B-lymphocytes is due to a post-transcriptionnal block in expression of cytochrome b_{558}. *Biochem. J.* **306**:141-145.

32- Cobbs C.S., Malech H.L., Leto T.L., Freeman S.M., Blaese R.M., Gallin J.I., Lomax K.J. (1992). Retroviral expression of recombinant p47*phox* protein by epstein barr virus transformed B lymphocytes from a patient with autosomal chronic granulomatous disease. *Blood.* **79**: 1829-1835.

33- Cohen-Tanugi L., Morel F., Pilloud-Dagher M.C., Seigneurin J.M., Francois P., Bost M., Vignais P. (1991). Activation of O_2^- generating in an heterologous cell-free system derived from Epstein-Barr-virus-transformed human B lymphocytes and bovine neutrophils. *Eur. J. Biochem.* **202**: 649-655.

34- Cross A., Rae J., Curnutte J.T. (1995). Cytochrome b_{558} of the neutrophil superoxide generating system contains two non identical hemes. *J. Biol. Chem.* **270**:17075-17077.

35- Cross A.R., Noack D., Rae J., Curnutte J.T., Heyworth P.G. (2000). Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood Cells Mol. Dis.* **26**: 561-565.

36- Cross A.R., Segal A.W. (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Bioch. Biophys. Acta.* **1657**: 1-22.

37- Dahan I., Issaeva I., Gorzalczany Y., Sigal N., Hirshberg M., Pick E. (2002). Mapping of functionnal domains in the p22*phox* subunit of flavocytochrome b_{558} participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by "peptide walking". *J. Biol. Chem.* **277**: 8421-8432.

38- De Coursey T., Cherny V.V., Morgan D., Katz B.Z., Dinauer M.C. (2001). The gp91*phox* component oxidase is not the voltage-gated proton channel in phagocytes, but it helps. *J. Biol. Chem.* **276**: 36063-36066.

39- De Coursey T., Morgan D., Cherny V.V. (2002). The gp91*phox* component of NADPH oxidase is not a voltage-gated proton channel. *J. Gen. Physiol.* **120**: 773-779.

40- Dekker L.V., Leitges M., Atschuler G. *et al.* (2000). Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem. J.* **347**: 285-289.

41- De Leo F.R., Yu L., Burritt J.B., Loetterle L.R., Bond C.W., Jesaitis A., Quinn M.T. (1995). Mapping sites of interaction of p47*phox* and flavocytochrome b with random sequence peptide phage display libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:7110-7114.

42- De Leo F.R., Quinn M.T. (1996a). Assembly of the phagocyte NADPH oxydase : molecular interaction of oxidase proteins. *J. Leukoc. Biol.* **60** : 677-691.

43- De Leo F.R., UlmanK.V., Davis A.R., Jutila K.L., Quinn M.T. (1996b). Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67*phox* and flavocytochrome *b* to a common functional domain in p47*phox*. *J. Biol. Chem.* **29**: 17013-17020.

44- De Leo F.R., Burritt J.B., Yu L., Jesaitis A.J., Dinauer M.C., Nauseef W.M. (2000). Processing and maturation of flavocytochrome b_{558} include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J. Biol. Chem.* **275**: 13986-13993.

45- de Mendez I., Garrett M.C., Adams A.G., Leto T.L. (1994). Role of p67*phox-phox* SH3 domains in assembly of the NADPH oxidase system. *J. Biol. Chem.* **269**: 16326-16332.

46- de Mendez I., Leto T.L. (1995). Functionnal reconstitution of the phagocyte NADPH oxidase by transfection of its multiple components in a heterologous system. *Blood.* **4**: 1104-1110.

47- de Mendez I., Adams A.G., Sokolic R.A., Malech H.L., Leto T.L. (1996). Multiple SH3 domain interactions regulate NADPH oxidase assembly in whole cells. *EMBO J.* **15**: 1211-1220.

48- de Mendez I., Homayounpour N., Leto T.L. (1997). Specificity of p47*phox* SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2177-2185.

49- Diebold B.A., Foweler B., Lu J., Dinauer M.C., Bokoch G.M. (2004). Antagonist cross-talk between Rac cdc42 GTPase regulates generation of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **279**: 28136-28142.

50- Dinauer M.C., Pierce E.A., Bruns G.A.P., Curnutte J.T., Orkin S.H. (1990). Human neutrophil cytochrome b ligh chain (p22*phox*): gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* **86**: 1729-1737.

51- Ezekowitz R.A.B., Dinauer M.C., Jaffe H.S., Orkin S.H., Newburger P.E. (1988). Partial correction of the phagocyte defect in patient with X-linked chronic granulomatous disease by subcutaneous interferon gamma. *N. Engl. J. Med.* **319**: 146-151.

52- Gallin J.I., Alling D.W., Malech H.L. *et al.* (2003). Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease. *N. Engl. J. Med.* **348**: 2416-2422.

53- Geiszt M., Kopp J.B., Varnai P., Leto T.L.(2000). Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 8010-8014.

54- Geiszt M., Lekstrom K., Brenner S., Hewitt S.M., Dana R., Mallech H.L., Leto T.L. (2003a). NAD(P)H oxidase 1, a product of differential colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91*phox* in the regulated production of superoxide by phagocytes. *J. Immunol.* **170**: 299-306.

55- Geiszt M., Lekstrom K., Wittaa J., Leto T.L. (2003b). Proteins homologous to p47*phox* and p67*phox* support superoxide production by NADPH oxidase 1 in colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 20006-20012.

56- Goldblatt D., Thrasher J. (2000). Immunodeficiency Review : Chronic granulomatous disease. *Clin. Exp. Immunol.* **122** : 1-9.

57- Gordon J., Webb A.J., Walker L., Guy G.R., Row M. (1986). Evidence for an association between CD23 and the receptor for low molecular weight B cell growth factor. *Eur. J. Immunol.* **16**:1627-1630.

58- Gorlach A., Brandes R.P., Bassus S., Kronemann N., Kirchmaier C.M., Busse R., Schini-Kerth V.B. (2000). Oxidative stress and expression of p22*phox* are involved in the up-regulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response to activated platelets. *FASEB J.* **14**: 1518-1528.

59- Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36:** 59-74.

60- Han C., Freeman J., Lee T., Notalebi S., Lambeth D. (1998). Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: identification of an activation domain in p67*phox*. *J. Biol. Chem.* **273**: 16663-16668.

61- Hanenberg H., Xiao X.L., Diloo D., Hashino K., Kato I., Williams D.A. (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragment increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat. Med.* **2**:876-882.

62- Hasebe T., Someya A., Nagaoka I. (1999). Identification of a splice variant mRNA of p40*phox*, an NADPH oxidase component of phagocytes. *FEBS Lett.* **455**: 257-261.

63- Henderson L.M., Chappell J.B. (1992). The NADPH-oxidase-associated H+ channel is opened by arachidonate. *Biochem. J.* **283**: 171-175.

64- Henderson L.M., Banting G., Chapell J.B. (1995). The arachidonate-activable, NADPH oxidase-associated H^+ channel. Evidence that gp91*phox* functions as an essential part of the channel. *J. Biol. Chem.* **207**: 5909-5916.

65- Henderson L.M., Thomas S., Banting G., Chappell B. (1997). The arachidonate-activable NADPH oxidase-associated H^+ channel is contained within the multi-membrane-spanning N-terminal region of gp91*phox*. *Biochem. J.* **325**: 701-705.

66- Henderson L.M. (1998). Role of histidines identified by mutagenesis in the NADPH oxidase-associated H^+ channel. *J. Biol. Chem.* **273**: 32216-32223.

67- Heynemann R., Vercauteren R.E. (1984). Activation of the NADPH oxidase from horse polymorphonuclear leukocytes in a cell-free system. *J. Leukoc. Biol.* **36** : 751-759.

68- Heyworth P.G., Curnutte J.T., Nauseef W.M., Volpp B.D., Pearson D.W., Rosen H., Clark R.A. (1991). Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. *Mol. Biol. Cell.* **4**: 261-269.

69- Hiroaki H. Ago T., Ito T., Sumimoto H., Kohda D. (2001). Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 526-530.

70- Ho C.M., Vowels M.R., Ziegler J.B. (1996). Successful bone marrow transplantation in a child with X-linked chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant.* **18** : 213-5.

71- Horwitz M.E., Barrett A.J., Brown M.R., Malech H.L. (2001). Treatment of chronic granulomatous disease with nonmyeloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft. *N. Engl. J. Med.* **344** : 881-888.

72- Ishibashi F., Nunoi H., Endo F., Matsuda I., Kanegasaki S. (2000). Statistical and mutational analysis of chronic granulomatous disease in Japan with special reference to gp91*phox* and p22*phox* deficiency. *Hum.Gen.* **106**: 473-481.

73- Johnston R.B. (2001). Clinical aspects of chronic granulomatous disease. *Hematology.* **8**:17-22.

74- Koga H., Terasawa H., Nunoi H., Takeshige K., Inagaki F., 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.* **35**: 25501-25600.

75- Kuribayashi F., Nunoi H., Wakamatsu K., Tsunawaki S., Sato K., Ito T., Sumimoto H. (2002). The adaptor protein p40*phox* as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J.* **21**: 6312-6320.

76- Lapouge K., Smith S.J.M., Groemping Y., Rittinger K. (2002). Architecture of the p40-p47-p67*phox* complex in the resting state of the NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **12**: 1021-10128.

77- Laemmli U.K., Favre M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **80** : 575-599.

78- Leusen J.H.W., Bolscher B.G., Hilarius P.M. *et al.* (1994). ^{156}Pro → Gln substitution in the light chain of cytochrome b_{558} of the human NADPH oxidase (p22*phox*) leads to defective translocation of the cytosolic proteins p47*phox* and p67*phox*. *J. Exp. Med.* **180**: 2329-2334.

79- Leusen J.H.W., de Klein A., Hilarius P.M. *et al.* (1996). Disturbed interaction of p21*rac* with mutated p67*phox* causes chronic granulomatous disease. *J. Exp. Med.* **184**: 1243-1249.

80- Leusen J.H.W., Meischl C., Eppink M.H.M. *et al.* (2000). Four novel mutations in the gene encoding gp91*phox* of the human NADPH oxidase: consequences for oxidase assembly. *Blood.* **95**: 666-673.

81- Leto T.L., Lomax K.J., Volpp B.D., Nunoi H., Sechler J.M.G., Nausseef W.M., Clark R.A., Gallin J.L., Malech H.L. (1990). Cloning of a 67kDa neutrophil oxidase factors with similarity to a noncatalytic region of p90s-src. *Science.* **248** : 727-730.

82- Leto T.L., Adams A.G., de Mendez I. (1994) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **91**: 10650-10654.

83- Li F., Linton G.F., Sekhsaria S., Whiting-Theobald N., Katkin J.P., Gallin J.I., Malech H.L. (1994). CD34+ peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of the two flavocytochrome b_{558} defective forms of chronic granulomatous disease. *Blood.* **84**: 53-58.

84- Li L.L., Dinauer M.C. (1998). Reconstitution of NADPH oxidase activity in human X-linked chronic granulomatous disease myeloid cells after stable gene transfer using a recombinant adeno-associated virus 2 vector. *Blood Cells Mol. Dis.* **24** : 522-38.

85- Lomax K.J., Leto T.L., Nunoi H., Gallin J., Malech H.L. (1989). Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science.* **245** : 409-412.

86- Lopes L.R., Dagher M.C., Gutierrez A., Young B., Bouin A.P., Fuchs A., Babior B.M. (2004). Phosphorylated p40*phox* as a negative regulator of NADPH oxidase. *Biochem. J.* **43**: 3723-3730.

87- Malech H.L., Bauer T.R., Hickstein D.D. (1997). Prospects for gene therapy of neutrophil defects. *Semin. Hematol.* **34**: 355-361.

88- Malech H.L., Maples P.B., Whiting-Theobald N. *et al.* (1997). Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc. Natl. Sci U.S.A.* **94:** 12133-12138.

89- Malech H.L., Horwitz M., Linton G., Theobald-Whiting N., Brown M., Farell C., *et al.* (1998). Extended production of oxidase normal neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease (CGD) following gene therapy with gp91*phox* transducted $CD34^+$ cells. *Blood.* **92**:690a.

90- Malech H.L. (1999). Progress in gene therapy for chronic granulomatous disease. *J. Infect. Dis.* **179**(suppl 2): 218-25.

91- Marciano B.E., Wesley R., De Carlo E.S. *et al.* (2004). Long term interferon γ therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clin. Inf. Dis.* **29**:692-699.

92- Maturana A., Arnaudeau S., Ryser S., Banfi B., Hossle JP., Schlegel W., Krause K.H. Demaurex N. (2001). Heme histidine ligands within gp91*phox* modulate proton conduction by the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **276**: 30277-84.

93- Morgan D., Cherny V.V., Price M.O., Dinauer M.C., DeCoursey T.E. (2002). Absence of proton channels in COS7 cells expressing functional NADPH oxidase components. *J. Gen. Physiol.* **119**: 571-80.

94- Morel F., Vignais P. (1984). Examination of the oxidase function of the b-type cytochrome in human polymorphonuclear leucocytes. *Biochim Biophys Acta.* **764**: 213-225.

95- Morel F., Doussière J., Vignais P.V. (1991). The superoxyde-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur. J. Biochem.* **201** : 523-546.

96- Morel F., Boulay F., Doussière J., Vignais P.V. (1992). Bases moléculaires de la granulomatose septique chronique. *Médecine/Sciences.* **8** : 912-920.

97- Morel F., Cohen Tanugi Cholley L., Brandolin G. *et al.* (1993). The O2 generating oxidase of B lymphocytes: Epstein Barr virus-immortalized B lymphocytes as a tool for the identification of a defective component of the oxidase in chronic granulomatous disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1182**: 101-109.

98- Muhlbach T.J., Gabay J., Nathan C.F. *et al.* (1992) Treatment of patients with chronic granulomatous disease with recombinant human interferon gamma does not improve neutrophil oxidative metabolism, cytochrome b_{558} content or levels of four antimicrobial proteins. *Clin. Exp. Immunol.* **88**: 203-206.

99- Nakamura M., Murakami M., Koga T., Tanaka Y., Minakami S. (1987). Monoclonal antibody 7D5 raised to cytochrome b_{558} of human neutrophils: immunocytochemical detection of the antigen in peripheral phagocytes of normal subjects, patients with chronic granulomatous disease, and their carrier mothers. *Blood.* **69** :1404-1408.

100- Nakamura M., Sumimoto H., Mizuki K., hata K., Ago T., Kitajima S., Takeshige K., Sakaki Y., Ito T. (1998). The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40*phox* and p67*phox*, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase. *Eur. J. Biochem.* **251**: 583-9.

101- Nauseef W.M. (2004). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. (2004). *Histochem. Cell Biol.*

102- Newburger P.E., Skalnik D.G., Jopkins P.J., Eklund E.A., Curnutte J.T. (1994). Mutations in the promoter region of the gene for gp91*phox* in X-linked chronic granulomatous disease with increased espression. *J. Clin. Invest.* **94**: 1205-1211.

103- Nisimoto Y., Freeman J.L., Motalebi S.A., Hirshberg M., Lambeth J.D. (1997). Rac binding to p67*phox*. Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* **272**: 18834-18841.

104- Paclet M.H., Coleman A.W., Burritt J., Morel F. (2001). NADPH oxydase of Epstein-barr-virus immortalized B lymphocytes. Effect of cytochrome b_{558} glycosylation. *Eur. J. Biochem.* **268**: 5197-5208.

105- Parkos C.A., Dinauer M.C., Walker L.E., Allan R.A., Jesaitis A.J., Orkin S.H. (1988). Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Pro .Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 3319.

106- Patino P.J, Rae J, Noack D., Erickson R.W., Ding J., Garcia de Olarte D., and Curnutte J.T. (1999). Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the NADPH oxidase component p67*phox*. *Blood.* **94:** 2505-2514.

107- Polack B., Vergnaud S., Paclet M.H., Lamotte D., Toussaint B., Morel F. (2000). Protein delivery by *Pseudomonas* type III secretion system : *Ex-vivo* complementation of p67*phox* deficient chronic granulomatous disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275** : 854-858.

108- Porter C.D., Parkar M.H., Collins M.K., Levinsky R.J., Kinnon C. (1992). Superoxide production by normal and chronic granulomatous disease (CGD) patient-derived EBV-transformed B cells lines measured by chemiluminescence-based assays. *J. Immunol. Methods* **155**: 151-157.

109- Porter C.D., Parkar M.H., Verhoeven A.J., Levinsky R.J., Collins M.K.L., Kinnon C. (1994). p22*phox* deficicent chronic granulomatous disease: reconstitution by retrovirus mediated expression and identification of a biosynthetic intermediate of gp91*phox*. *Blood.* **84**: 2767-2775.

110- Porter C.D., Kuribayashi F., Parkar M.H., Roos D., Kinnon C. (1996). Detection of gp91*phox* precursors protein in B-cell lines from patients with X-linked chronic granulamotous disease as an indicator for mutations impairing cytochrome b_{558} biosynthesis. *Biochem. J.* **315** : 571-575.

111- Price M.O., McPhall L.C., Lambeth J.D., Han C.H., Knaus U.G., Dinauer M.C. (2002a). Creation of a genetic system for analysis of the phagocyte respiratory burst: high level reconstitution of the NADPH oxidase in a nonhematopoietic system. *Blood.* **99**: 2653-2661.

112- Price M.O., Atkinson S.J., Knaus U., Dinauer M.C. (2002b). Rac activation induces NADPH oxidase activity in transgenic COS*phox* cells and level of superoxide production is exchange factor-dependent. *J. Biol. Chem.* **277**: 19220-8.

113- Quinn M.T., Mullen M.L., Jesaitis A.J. (1992). Human neutrophil cytochrome b_{558} contains multiple hemes. Evidence for heme associated with both subunits. *J. Biol. Chem.* **267**: 7303-7309.

114- Rae J., Noack D., Heyworth P.G., Ellis B.A., Curnutte J.T., Cross A.R. (2000). Molecular analysis of 9 new families with chronic granulomatous disease caused by mutations in *CYBA*, the gene encoding p22*phox*. *Blood.* **96**:1106-1112.

115- Rex J.H., Bennett J.E, Malech H.L. (1990). Normal and deficient neutrophils can cooperate to damage Aspergillus fumigatus hyphae. *J. Inf. Dis.* **162** : 523 – 8.

116- Roesler J., Curnutte J.T., Rae J., Barrett., Patino P., Chanock S.J., Goerlach A. (2000). Recombination events between the p47*phox* gene and its highly homologous pseudogenes are the main cause of autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Blood.* **95**: 2150-2156.

117- Roos D., de Boer M., Kuriabayashi F. *et al.* (1996). Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood.* **87**: 1663-1681.

118- Royer-Pokora B., Kunkel L.M., Monaco A.P., *et al.* (1986). Cloning for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease on the basis of its chromosomal location. *Nature.* **322** : 32-38.

119- Sathyamoorthy M., de Mendez I., Adams A.G., Leto T.L. (1997). p40*phox* down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J. Biol. Chem.* **272**: 9141-9146.

120- Schapiro B., Newburger P., Klempner M., Dinauer M.C. (1991). Chronic granulomatous disease in a 69-year-old man. *N. Engl. J. Med.* **325**: 1786.

121- Schiff D.E., Rae J., Martin T.R., Davis B.H., Curnutte J.T. (1997). Increased phagocytes Fc gamma RI expression and improved Fc gamma receptor-mediated phagocytosis after *in vivo* recombinant human interferon gamma treatment of normal human subjects. *Blood.* **90**:3187-3194.

122- Segal A.W., West I., Wientjes F., Nugent J.H.A., Chavan A.J., Garcia R.C., Rosen H., Scrace G. (1992). Cytochrome b245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem. J.* **284:** 781-788.

123- Segal AW, Peters TJ. (1996). Characterisation of the enzyme defect in chronic granulomatous disease. *Lancet.* **1** : 1363-1365.

124- Segal B.H., De Carlo E.S., Kwon-Chung K.J., Malech H.L., Gallin J.I., Holland S.M. (1998). Aspergillus nidulans infection in chronic granulomatous diseae. *Medecine* (Baltimore). 77: 345-354.

125- Segal B.H., Leto T.L., Gallin J.I., Malech H.L., Holland S.M. (2000). Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Rev. Molec. Med.* **79**: 170-199.

126- Seger R.A., Gungor T., Belohradsky B.H., *et al.* (2002). Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: a survey of the European exerience, 1985-2000. *Blood.* **100** : 4344-4350.

127- Sekhsaria S., Gallin J.I., Linton G.F., Mallory R.M., Mulligan R.C., Malech H.L. (1993). Peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of p47*phox* deficient chronic granulomatous disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 7746-7450.

128- Someya A., Nagaoka I., Yamashita T. (1993). Purification of the 260 kDa cytosolic complex involved in the superoxide production of guinea pig neutrophils. *FEBS Letters.* **330** : 215-218.

129- Stasia M.J., Lardy B., Maturana A. *et al.* (2002a). Molecular and functionnal characterization of a new X-linked chronic granulomatous disease variant ($X91^+$) case with a double missense mutation in the cytosolic gp91*phox* C-terminal tail. *Bioch. Biophys. Acta.* **1586**: 316-330.

130- Stasia M.J., Bordigoni P., Martel C., Morel F. (2002b). A novel and unusual case of chronic granulomatous disease in a child with a homozygous 36bp deletion in the *CYBA* gene (A22°) leading to the activation of a cryptic splice in intron 4. *Hum. Gen.* **110:** 444-450.

131- Stasia M.J., Brion J.P., Martel C., Morel F. (2003) Severe clinical forms of cytochrome b-negative chronic granulomatous disease (X91) in three children with point mutation in the promoter region of the *CYBB* gene. *J. Infect. Dis.* **188**:1593-1604.

132- Stasia M.J., Bordigioni P., Floret D. *et al.* (2004). Characterization of six novel mutations in the CYBB gene leading to different sub-types of X-linked chronic granulomatous disease. *Hum. Gen.* Article accepté

133- Suh Y.A., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B. (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature.* **401**: 79-82.

134- Sumimoto H., Hata K., Misuki K., Ito T., Kage Y., Sakayi Y., Fukumabi Y., Nakamura M., Takeshige K. (1996). Assemblage and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **271**: 22152-22158.

135- Takeya R., Ueno N., Kami K., Taura M., Kohjima M., Izaki T., Nunoi H., Sumimoto H. (2003). Novel human homologues of p47*phox* and p67*phox* participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **278**: 25234-25246.

136- Taylor W., Jones D., Segal A. (1993). A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain. *Protein Sci.* **2**: 1675-1685.

137- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and same application. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76** : 4350-4354.

138- Tucker K.A., Lilly M.B., Heck L., Rado T.A. (1987). Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood.* **70** : 372-8.

139- Trasher A., Chetty M., Casimir C., Segal A.W. (1992). Restoration of superoxide generation to a chronic granulomatous disease B cell line by retrovirus mediated gene transfer. *Blood.* **80**: 1125-1129.

140- Vergnaud S., Paclet M.H., El Benna J., Pocidalo M.A., Morel F. (2000). Complementation of NADPH oxidase in p67*phox* deficient CGD patients; p67*phox*/p40*phox* interaction. *Eur. J. Biochem.* **267** : 1059-1067.

141- Verhoeven A.J., Bolscher G.J.M., Meerhof L., van Zwieten R., Keijer J., Roos D. (1989). Characterization of two monoclonal antibodies against cytochrome b_{558} of human neutrophils. *Blood.* **73** : 1686-1694.

142- Vignais P.V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **59:** 1428-1459.

143- Volkman D.J., Buescher E.S., Gallin J.I., Fauci A.S. (1984). B cell line as models for inherited phagocytic disease: abnormal superoxide generation in chronic granulomatous disease and giant granules Chediak-Higashi syndrome. *J. Immunol.* **133**: 3006-3009.

144- Volpp B.D., Lin Y. (1993). *In vitro* molecular reconstitution of the respiratory burst in B lymphoblasts from p47*phox* deficient chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* **91**: 201-207.

145- Weil W.M., Linton G.F., Whiting-Theobald N., Vowells S.J., Rafferty S.P., Li F., Malech H.L. (1997). Genetic correction of p67*phox* deficient chronic granulomatous disease using peripheral blood progenitor cells as a target for retrovirus mediated gene transfer. *Blood.* **89**: 1754-1761.

146- Weening R.S., de Boer M., Kuijpers T.W., Neefjes M.E., Hack M., Roos D. (2000). Point mutations in the promoter region of the *CYBB* gene leading to mild chronic granulomatous disease. *Clin. Exp. Immunol.* **122**: 410-417.

147- Winkelstein J.A., Marino M., Johnston R., Malech H.L., Dickler H. (2000). Chronic Granulomatous Disease. Report on a National Registry of 368 Patients. *Medecine.* **79** : 155-169.

148- Woodman R.C., Newburger P.E., Anklesaria P., Erickson R.W., Rae J., Cohen M.S., Curnutte J.T. (1995). A new X-linked variant of chronic granulomatous disease characterized by the existence of a normal clone of respiratory burst-component phagocytic cells. *Blood.* **85**: 231-241.

149- Yang S., Madyastha P., Bingel S., Ries W., Key L. (2001). A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J. Biol. Chem.* **276**: 5452-5458.

150- Yu L., Zhen L., Dinauer M.C. (1997). Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b_{558}. *J. Biol. Chem.* **272** : 27288-27294.

151- Yu L., Quinn M., Cross A., Dinauer M.C. (1998). Gp91*phox* is the heme binding subunit of the superoxyde-generating NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95** : 7993.

152- Yu L., Zhen L., Dinauer M.C. (1999a). Functional analysis of NADPH oxidase in granulocytic cells expressing a Δ488-497 gp91 *phox* deletion mutant. *Blood.* **94** : 2497-2504.

153- Yu L., DeLeo F.R., Biberstine-Kinkade K.J., Renee J., Nauseef W.M., Dinauer M.C. (1999b). Biosynthesis of flavocytochrome b_{558}. *J. Biol. Chem.* **274**: 4364-4369.

154- Zhan S., Vaquez N., Wientjes F.B. *et al.* (1996). Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the p40*phox*, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *Blood.* **88**: 2714-2721.

155- Zhao X., Carnevale K.A., Cathcart M.K. (2003). Human monocytes use Rac1, not Rac2, in the NADPH oxidase complex. *J. Biol. Chem.* **278**: 40788-40792.

156- Zhen L., King A.J., Xiao Y., Chanock S.J., Orkin S.H., Dinauer M.C. (1993). Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid

leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91 *phox*. *Proc. Natl. Acad. USA*. **90** : 9832-9836.

157- Zhen L., Yu L., Dinauer M.C. (1998). Probing the role of the carboxy terminus of the gp91*phox* subunit of the neutrophil flavocytochrome b_{558} using site directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **273**: 6575-6581.

Serment des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les moeurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Delphine TISSOT DUPONT

Mise en place d'un modèle cellulaire d'étude des Granulomatoses Septiques Chroniques Autosomales Récessives

Résumé

La Granulomatose septique chronique (CGD) est une maladie orpheline caractérisée par un défaut de fonctionnement de la NADPH oxydase des phagocytes professionnels. Cette enzyme est constituée d'un élément membranaire, le cytochrome b_{558}, et de facteurs cytosoliques, p47*phox*, p67*phox* et p40*phox*. Le cytochrome b_{558} est formé de deux sous-unités, la glycoprotéine gp91*phox* et p22*phox*. Deux petites protéines G Rac1/2 et Rap1 sont également impliquées dans la régulation du fonctionnement de la NADPH oxydase. Au cours de son activation, l'assemblage des éléments cytosoliques et membranaires de l'enzyme permet la formation d'un complexe actif produisant des ions superoxyde. On distingue deux types de transmission de la CGD : la forme liée à l'X et les formes autosomales récessives (CGD AR) dûes à des mutations dans les gènes codant p22*phox* ou les deux facteurs cytosoliques (p47*phox* et p67*phox*). Ces dernières sont rares et les mutations géniques impliquées, très hétérogènes. Actuellement, il n'existe pas de modèles cellulaires qui permettent l'étude approfondie des CGD autosomales récessives et plus particulièrement les CGD AR^+ dans lesquelles la protéine mutée est exprimée en quantité normale mais est non fonctionnelle.

L'objectif de ce travail a été de mettre en place un modèle cellulaire permettant de reproduire les mutations géniques à l'origine des CGD AR ou d'en créer *de novo,* afin d'étudier l'impact de ces mutations sur le fonctionnement du complexe oxydase.

Ce modèle a été réalisé dans les cellules fibroblastiques de rein de singe (cellules COS7). Dans un premier temps le contenu en ARNm et en protéines du complexe oxydase a été évalué dans ces cellules. La RT-PCR et le séquençage ont permis de mettre en évidence la présence des ARN messagers (ARNm) de p22*phox*, p67*phox*, p40*phox* et Rac1 dans les cellules COS7. Les résultats obtenus par western blot et cytométrie en flux ont montré que les protéines p22*phox*, p40*phox* et Rac étaient exprimées dans les cellules COS7.

La seconde étape a été l'obtention de cellules COS7 exprimant le cytochrome b_{558}. L'ADNc de gp91*phox* préalablement cloné dans un vecteur d'expression eucaryotique, a été transfecté de façon stable dans ces cellules. La fonctionnalité du cytochrome b_{558} recombinant exprimé dans les membranes plasmiques des cellules COS7 transfectées, a été évaluée en présence de cytosol de neutrophiles, afin de reconstituer une activité NADPH oxydase *in vitro*.

A partir de ces cellules transgéniques, d'autres modèles exprimant le cytochrome b_{558} et un ou plusieurs facteurs cytosoliques ont été obtenus. Les ADNc de p47*phox*, p67*phox* et p40*phox* ont été clonés dans des vecteurs d'expression eucaryotique possédant des cassettes de résistance à un antibiotique différentes. Les modèles COS7-cytochrome b_{558} exprimant un ou plusieurs facteurs cytosoliques sont en cours d'évaluation et de caractérisation.

Ces modèles cellulaires de CGD AR seront des outils intéressants pour étudier l'impact de certaines mutations des ADNc de p47*phox* ou p67*phox* sur le fonctionnement du complexe oxydase et les mécanismes moléculaires de son assemblage.

Mots-clés : Granulomatose septique chronique autosomale récessive, cellules COS7, NADPH oxydase, cytochrome b_{558}

Jury : Présidente : Madame le Professeur Renée GRILLOT
Membres : Madame le Professeur Françoise MOREL
Madame le Docteur Marie-José STASIA
Monsieur le Docteur Jean-Paul BRION

Date de soutenance : 28 octobre 2004

Adresse de l'auteur : [Données à caractère personnel]