



HAL
open science

Regulation de la nadph oxydase phagocytaire par la pat1 “ protein interacting with app tail 1

Riad Arabi Derkawi

► **To cite this version:**

Riad Arabi Derkawi. Regulation de la nadph oxydase phagocytaire par la pat1 “ protein interacting with app tail 1. Immunologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T061 . tel-00739376

HAL Id: tel-00739376

<https://theses.hal.science/tel-00739376>

Submitted on 8 Oct 2012

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.

**UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

Année : 2011-2012

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

SPECIALITE

IMMUNOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement

par

Riad ARABI DERKAWI

Le 21 Octobre 2011

**TITRE: REGULATION DE LA NADPH OXYDASE PHAGOCYTAIRE
PAR LA PAT1 « PROTEIN INTERACTING WITH APP TAIL 1 »**

JURY

Pr	Jean-Claude DRAPIER	- Président
Dr	Marie-Hélène PACLET	- Rapporteur
Dr	Michel MALLAT	- Rapporteur
Pr	Sylvie CHOLLET-MARTIN	- Examineur
Dr	Jamel EL BENNA	- Examineur
Pr	Marie-Anne GOUGEROT-POCIDALO	- Directeur de thèse

**UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

Année : 2011-2012

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

**Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI
SPECIALITE
IMMUNOLOGIE**

Présentée et soutenue publiquement

par

Riad ARABI DERKAWI

Le 21 Octobre 2011

**TITRE: REGULATION DE LA NADPH OXYDASE PHAGOCYTAIRE
PAR LA PAT1 « PROTEIN INTERACTING WITH APP TAIL 1 »**

JURY

Pr	Jean-Claude DRAPIER	- Président
Dr	Marie-Hélène PACLET	- Rapporteur
Dr	Michel MALLAT	- Rapporteur
Pr	Sylvie CHOLLET-MARTIN	- Examineur
Dr	Jamel EL BENNA	- Examineur
Pr	Marie-Anne GOUGEROT-POCIDALO	- Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier ici toutes les personnes ayant participé à la réalisation de ce travail de thèse chacun à son niveau.

Je tiens à remercier le **Pr Jean Claude DRAPIER** de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse et le **Dr. Michel MALLAT** et le **Dr. Marie Hélène PACLET** d'avoir accepté la charge d'être rapporteurs de ce travail ainsi que le **Pr Sylvie CHOLLET-MARTIN** pour l'intérêt qu'elle a porté à cette étude en acceptant d'être membre du jury.

Je remercie tout particulièrement Madame le professeur **Marie-Anne GOUGEROT-POCIDALO** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire hospitalier (unité « dysfonctionnement immunitaire ») me permettant de rester au contact de mon domaine de spécialité (la biologie médicale) et de financer ma thèse, et dans son unité de recherche (U773) au sein de laquelle ce travail a été réalisé. Merci Marie-Anne pour ton aide à la rédaction, tes conseils, ta rigueur scientifique, et ta gentillesse aux quelles s'ajoutent des connaissances scientifiques et une expérience exceptionnelle en immunologie.

Je remercie le **Dr Jamel EL BENNA** qui m'a encadré pendant ces 5 années de thèse, pour ses caractères personnels et scientifiques exceptionnels, sa patience que j'estime beaucoup, son soutien, sa disponibilité et surtout pour les conseils et l'encadrement de ce travail. Jamel, tu es une personne remarquable chez qui plusieurs qualités sont réunies.

Je remercie le **Dr Yvonne O'Dowd** qui a initié ce travail.

Je remercie également tous les autres chercheurs de l'équipe, **Dr My-Chan DANG, Dr Jean Claude MARIE, Dr Françoise BRAUT, Dr Axel PERIANIN, Dr Margarita Hurtado-Nedelec, Dr Larissa Kotelevets et Dr Eric CHASTRE** pour leur gentillesse et leurs discussions fructueuses au cours des réunions de l'équipe.

Je voudrais remercier particulièrement **Tarek Boussetta** qui était à mon côté scientifiquement et en tant qu'ami pendant ce parcours. Merci mon ami.

Je tiens à remercier tous les autres membres de l'équipe présents actuellement ou anciens, et en particulier, **Houssam, Karama, Sahra, Maya, Pia, Yolande, Michèle, Catherine, Odile, Grégory, Mahmoud, Yannick, Benoit, Loïc, Nesrine et Soumeya.**

Enfin, Je souhaite remercier mes parents qui m'ont encouragé à continuer dans la voie de la science et qui ont tant sacrifié pour moi. Sincères et grands remerciements à ma femme **Rahaf** qui m'a aidé à tous les niveaux moral et affectif afin de me permettre de travailler dans d'excellentes conditions.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	4
Liste des abréviations	6
INTRODUCTION GENERALE.....	9
I. Généralités sur les Polynucléaires neutrophiles (PN)	12
1. Origine et devenir des PN	12
2. Les granulations du PN	13
a. Les granulations primaires ou azurophiles	14
b. Les granulations secondaires ou spécifiques.....	15
c. Les granulations riches en gélatinases	15
d. Les vésicules sécrétoires	16
3. Fonctions des PN.....	17
a. Recrutement du PN au niveau du foyer inflammatoire.....	17
b. La reconnaissance et la phagocytose de l'agent pathogène :	19
c. Elimination de l'agent pathogène.....	20
i. Mécanisme indépendant de l'oxygène	20
ii. Mécanisme bactéricide dépendant de l'oxygène : Production	22
des formes réactives de l'oxygène (FRO)	22
iii. Bactéricidie médiée par les NET's (Neutrophil Extracellular Traps)	24
d. Production de médiateurs par les PN	24
e. Résolution de l'inflammation et apoptose des polynucléaires neutrophiles	26
II. Généralités sur les monocytes/macrophages.....	27
III. Les cellules COS-phox.....	30
IV. Structure de la NADPH oxydase phagocytaire	30
1. Structure	31
a. Les composants membranaires de la NADPH oxydase phagocytaire	31
i. La gp91phox/NOX2	32
ii. La p22phox.....	33
b. Les composants cytosoliques de la NADPH oxydase phagocytaire	34
i. La p47phox.....	34
ii. La p67phox.....	35
iii. La p40phox.....	35
iv. La petite protéine G Rac 2.....	36
2. La granulomatose septique chronique.....	37
3. Les NADPH oxydases non phagocytaires	37
V. Les différents états d'activation de la NADPH oxydase dans les PN: Rôle de la phosphorylation de la p47phox et des interactions moléculaires	39
1. La NADPH oxydase au repos	41
2. Le priming de la NADPH oxydase	41
3. Activation de la NADPH oxydase	44
a. Phosphorylation des sous unités de la NADPH oxydases.....	45
i. Phosphorylation de la p47phox	45
ii. Phosphorylation de p67phox	47
iii. Phosphorylation de p40phox	47
iv. Phosphorylation de p22phox	48
v. Phosphorylation de NOX2	48
b. Activation de Rac2	48
c. Interactions moléculaires des sous-unités de la NADPH oxydase lors de son activation	48

d.	Les kinases qui contrôlent la phosphorylation des composants de l'oxydase et son activation	50
i.	La protéine kinase C.....	50
ii.	Les MAP kinases.....	51
iii.	Les PI3 kinases.....	52
iv.	La protéine kinase A	53
e.	Désensibilisation de la production des FRO par les PN.....	53
VI.	La PAT1 (protein interacting with APP tail)	55
1.	Structure de PAT1	55
2.	Le gène de PAT1	58
3.	Distribution de la PAT1	60
4.	Localisation subcellulaire de PAT1	62
5.	Fonctions connues de la PAT1 et son effet sur le « processing » de l'APP.....	63
6.	Autres interactions et fonctions de la PAT1.....	65
	RESULTATS	67
	Régulation de la NADPH oxydase phagocytaire par une nouvelle interaction entre la partie cytosolique de la p22phox et PAT1 (Protein interacting with Amyloid Precursor Protein Tail).....	68
1.	Article soumis pour publication: Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by a novel interaction between p22phox and PAT1	70
2.	Résultats supplémentaires	110
	Interaction de PAT1a/p22phox avec les microtubules.....	110
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	113
	REFERENCES.....	120
	ANNEXE	140
	Article 2:.....	141
	The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A.....	141
	Article 3:.....	150
	The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF α -induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils	150
	RESUME.....	160

Liste des abréviations

AA	Acide arachidonique
aa	acide aminé
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AID	Atypical PKC-interaction domain
AIR	auto-inhibitory region
ALPP	Amyloid beta like precursor protein
APP	Amyloid beta precursor protein
APPBP2	Amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding Protein
AR	Androgen Receptor
ARA67	Androgen Receptor Associated 67Kda
ARNm	ARN messagers
BaSS	Basolateral sorting signal
BPI	Bactericidal permeability increasing protein
BSA	Bovine Serum Albumin (albumine sérique bovine)
C5a	Fraction 5 du complément activé
CD	Cluster of differentiation
CDK	cyclin-dependant kinases
CGD	Chronic granulomatous disease
CLK	chaînes légères de la kinésine
COS	simian fibroblasts transformed by simian virus 40
CR1	Récepteur du complément
CR3	Récepteur de la fraction 3 du complément
CYBA	Cytochrome b ₅₅₈ alpha chain
CYBB	Cytochrome b ₅₅₈ beta chain
Cyto B	Cytochalasine B
DAG	1,2-diacylglycerol
DPI	Diphenylene iodonium
DTT	Dithiothreitol
DUOX	Dual Oxidase
EDTA	Acide éthylènediaminetétra-acétique
EGTA	Acide éthylène glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tétra acétique
Erk	Extracellular signal regulated kinase
FAD	Flavine adénine dinucléotide
Fc γ R	Récepteur des immunoglobulines
FKBP	FK506-binding proteins
fMLF	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FPR	Récepteur du fMLF
FRO	Formes réactives de l'oxygène
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.
GAP	GTP activating protein
G-CSF	Granulocyte - Colony stimulating factor
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	GTP exchange factor
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage- Colony stimulating factor
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosine triphosphate
HBSS	Hank's balanced salt solution

HEPES	Acide (N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthane-sulfonique])
HPP-CFU	High proliferative potential-Colony forming unit
HOCl	Acide hypochloreux
HRP	Horse Radish Peroxydase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)
IL-	Interleukine
LIP	Lambda interacting protein
LOX	5-lipo-oxygénase
LT	leucotriènes
LTB ₄	leucotriène B ₄
LPS	Lipopolysaccharide
Kda	kilo dalton
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MEK	Mitogen extracellular kinase
MGG	May-Grünwald Giemsa
MICI	Maladies inflammatoires chronique de l'intestin
MPO	Myéloperoxydase
NADPH	Nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (réduit)
NCF1	Neutrophil cytosolic factor 1
NES	Nuclear export signal
NLS	Nuclear localization signal
NO	Monoxyde d'azote
NOX	NADPH oxydase
NP-40	Nonidet P-40 (Nonylphenoxy polyethoxy ethanol)
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OH°	Radical hydroxyle
PA	Acide phosphatidique
PAF	Platelet activating factor
PAT1	Protein interacting with APP tail
PB1	Phox and Bem1p domain
PBS	Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate)
PC	Phox and cdc42 domain
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
Phox	Phagocyte oxidase
pI	point isoélectrique
PI	phosphoinositides
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
Pin1	peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1
PIP ₃	Phosphatidylinositol 3 phosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PM	poids moléculaire
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PN	Polynucléaire neutrophile
PP2A	Protéine Phosphatase 2A
PRR	Proline rich region

PS	Phosphatidyl sérine
PTP	Protéine tyrosine phosphatase
PX	Phox homology domain
RGS	regulatory G protein signaling
Rho-GDI	Rho GDP-dissociation inhibitor
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis
SER	Sérine
SET	template activating factor 1 β ; Phosphatase 2A inhibitor2
SH3	Src homology domain
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOD	Superoxyde dismutase
TNF α	Tumor necrosis factor α
TPR	Tetratricopeptide repeated domain
TRIS	Tris (hydroxyméthyl amino méthane)
Tween 20	Polyoxyéthylène-sorbitan monolaurate

INTRODUCTION GENERALE

Introduction Générale

Les polynucléaires neutrophiles (PN) humains jouent un rôle capital dans la défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Au cours d'une réaction inflammatoire, les facteurs chimioattractants libérés induisent la migration des PN de la circulation sanguine vers le foyer inflammatoire. Le contact de l'agent pathogène avec le PN va provoquer sa phagocytose et sa destruction. Ce processus peut se faire par la libération de molécules contenues dans les granules du PN et par la production de l'anion superoxyde générateur des autres formes réactives de l'oxygène (FRO) comme le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle par un processus appelé "explosion oxydative". Bien que les FRO soient essentielles à la défense immunitaire, elles peuvent être délétères pour les tissus environnants ce qui nécessite une régulation fine et précise de leur production.

L'anion superoxyde est produit par un système enzymatique multimoléculaire appelé NADPH oxydase. Dans les PN au repos, cette enzyme est composée de protéines cytosoliques (p40phox, p47phox, p67phox et Rac2) et de protéines membranaires (gp91phox ou NOX2 et p22phox formant le cytochrome b_{558}). L'activation de la NADPH oxydase nécessite la translocation des protéines cytosoliques vers le cytochrome b_{558} . Ce processus est régulé par des réactions de phosphorylation/déphosphorylation et des interactions protéine/protéine. L'interaction de la région cytosolique de la p22phox avec la p47phox constitue un mécanisme majeur de l'activation de la NADPH oxydase. Cependant, l'existence d'autres protéines qui pourraient interagir avec la partie cytosolique de la p22phox n'était pas connue.

Mon travail de recherche a eu pour premier objectif d'identifier les protéines qui lient la région cytosolique de la p22phox en utilisant le système double hybride, puis d'étudier leur rôle dans l'activation de la NADPH oxydase.

Mes résultats montrent que :

- La partie cytosolique de la p22phox composée des acides aminés 132 à 195, lie de façon spécifique une protéine qui s'appelle APPBP2 (Amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein) ou PAT1 (Protein interacting with APP tail).
- APPBP2/PAT1 possède un effet activateur sur la NADPH oxydase reconstituée dans un système acellulaire *in vitro* ainsi que dans les monocytes et les cellules COS phox.

- La liaison d'APPBP2/PAT1 aux microtubules pourrait favoriser l'assemblage du complexe NADPH oxydase pendant l'activation.

Cette interaction « p22phox/PAT1 » constitue un nouveau mécanisme de régulation de la NADPH oxydase et pourrait constituer une nouvelle cible pharmacologique pour moduler la production des FRO par la NADPH oxydase phagocytaire.

Je ferai tout d'abord un rappel des connaissances sur les neutrophiles, la NADPH oxydase et sur la protéine PAT1. Je présenterai ensuite mes résultats expérimentaux et je terminerai par des conclusions et perspectives.

I. Généralités sur les Polynucléaires neutrophiles (PN)

1. Origine et devenir des PN

Les PN comme toutes les autres cellules sanguines dérivent d'une même cellule : la cellule souche totipotente nommée HPP-CFU (High proliferative potential-Colony forming unit) qui a une forte capacité d'autoprolifération et de différenciation. Sous l'action de différents facteurs de différenciation, elle peut donner naissance à la cellule souche multipotente (cellule non encore spécifique d'une lignée cellulaire) puis au progéniteur bipotent des granulocytes et des monocytes-macrophages connu sous le nom de GM-CFU (Granulocyte/Macrophage-Colony forming unit). A son tour cette cellule donnera le progéniteur granulocyttaire de la lignée des PN : le G-CFU. Chaque étape de transformation est régulée et orientée par l'intervention de différentes cytokines, par exemple : IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF, G-CSF.... Le progéniteur granulocyttaire va se différencier en myéloblaste qui représente 2% des cellules médullaires et dont la taille varie de 15 à 25 μm . Le promyélocyte dérive à son tour du myéloblaste par une mitose et une maturation nucléocytoplasmique. Il représente 2 à 6 % des cellules d'un frottis médullaire et sa taille varie de 15 à 30 μm . De la division mitotique du promyélocyte résulte le myélocyte (15 à 18 μm) qui représente 12 à 20 % des cellules médullaires. Enfin une dernière mitose donne naissance au métamyélocyte (14 à 15 μm). La phase mitotique au cours de laquelle le myéloblaste se transforme en métamyélocyte dure environ 6 jours. La maturation finale donne naissance à la population de cellules la plus nombreuse dans la moelle (20 à 30 % de cellules médullaires): les polynucléaires neutrophiles (PN) immatures puis matures. Ces cellules sont caractérisées par un noyau polylobé et par de nombreuses granulations (Figure 1).

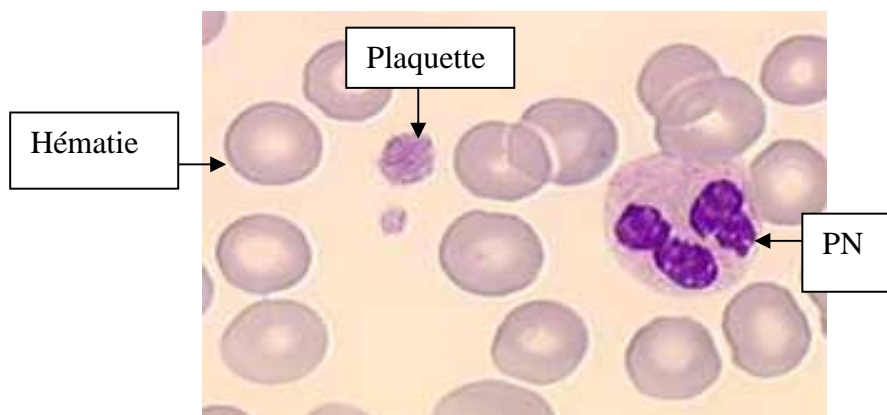


Figure 1. Frottis sanguin vue au microscope optique. On voit un PN (10-14 μm), des hématies (7-8 μm) et une plaquette (2-3 μm)

Les granulations ou granules sont de différentes natures et apparaissent successivement au cours de la granulopoïèse: les granulations azurophiles (ou primaires), les granulations spécifiques (ou secondaires), les granulations à contenu élevé en gélatinase (tertiaires) puis plus tardivement les vésicules sécrétoires (Feldhaus et al., 2002). Le contenu de ces granulations joue un rôle majeur, comme nous le reverrons, dans les différentes étapes fonctionnelles des PN. Les PN matures restent de zéro à cinq jours dans la moelle osseuse où ils constituent la réserve médullaire. La moelle produit environ $0,85$ à $1,6 \times 10^9$ PN par kg et par jour dans des circonstances normales. Cette production peut augmenter en cas de pathologie infectieuse. A la suite de son séjour dans la moelle, le PN passe dans la circulation sanguine où il reste pendant un temps limité puisque sa demi-vie est de 6 à 10 heures. Les PN sanguins se répartissent en deux secteurs à peu près équivalents : un secteur circulant, accessible à la numération sanguine (1800 à 7000/ μ l), et un secteur marginé (environ 50 % du pool total), adhérant à l'endothélium et migrant dans les tissus au niveau des veinules post-capillaires. La survie tissulaire du PN est difficilement mesurable. En l'absence de stimulus inflammatoire, on estime qu'il réside dans le tissu pendant 1 à 2 jours puis il meurt par apoptose et est phagocyté par les macrophages tissulaires résidents.

Les PN exercent l'ensemble de leurs fonctions physiologiques dans les tissus. Sous l'influence de différents stimuli (cytokines, chimiokines, lipides et peptides médiateurs de l'inflammation), les PN initialement à l'état de repos dans le sang circulant, vont répondre à ces stimuli, être ralentis (c'est le phénomène du roulement ou "rolling") pour s'arrêter en adhérant aux cellules endothéliales. Puis, sous l'influence d'un gradient de substances chimioattractantes, les PN franchissent la barrière endothéliale et se dirigent de façon orientée vers l'agent étranger ayant déclenché la réponse inflammatoire. Les PN exercent alors leur rôle de défense de l'organisme.

2. Les granulations du PN

Une des particularités du PN est d'être une cellule compartimentée. Un grand nombre de molécules intervenant dans ses fonctions sont synthétisées puis stockées dans les granulations apparaissant au cours de la granulopoïèse. Selon Borregaard, cet empaquetage se ferait au fur et à mesure de la synthèse expliquant l'hétérogénéité des granulations que l'on peut cependant classer schématiquement en granulations primaires ou azurophiles, granulations secondaires ou spécifiques, granulations gélatinases et vésicules sécrétoires (Borregaard et al., 1996, 1997; Gullberg et al., 1999). Historiquement, les granulations furent d'abord classées en peroxydase positive pour les granulations primaires et peroxydase négatives pour les autres.

Les granulations contiennent d'une part des molécules insérées dans leur membrane, d'autre part des molécules intragranulaires liées à la matrice de protéoglycanes. Le contenu des granulations joue un rôle majeur dans les différentes étapes fonctionnelles des PN. Sous l'effet de différents stimuli, survient une mobilisation des granulations avec déversement de certains composants dans le milieu extracellulaire, dans les phagosomes, ou expression de certaines molécules à la surface cellulaire. Cette dégranulation permet une décompartmentalisation rapide des molécules stockées dans les granulations des PN au repos. Ces molécules permettent donc une action rapide des PN d'où leur rôle majeur dans les défenses anti-infectieuses. Dans l'ordre, les granulations les plus facilement mobilisables sont les vésicules sécrétoires puis les spécifiques et enfin les azurophiles (Tableau I). La facilité à dégranuler dépend de la densité de protéines de fusion comme la protéine « vesicle-associated membrane protein ou VAMP-2 » à la surface des granulations (Borregaard et al., 2007).

a. Les granulations primaires ou azurophiles

Ces granulations apparaissent les premières pendant la maturation du PN au stade promyélocytaire (Egsten et al., 1994) jusqu'au stade mature. Ces organites sont identifiables par le fait qu'ils ont une affinité pour le colorant basique azure A qui se fixe sur les mucopolysaccharides (Spicer et al., 1969). Ces granulations représentent un tiers des granulations du PN (environ 1500 granules/ PN) (Damiano et al., 1988); ce sont des organelles de petites tailles (0,5-0,8 μm), de formes variables (sphérique, ellipsoïde ou cristalline) qui apparaissent très denses en microscopie électronique. La matrice contient, en particulier, la myéloperoxydase (MPO), le lysozyme, l'élastase, la cathepsine G, les défensines, la β glucuronidase et la BPI (*Bactericidal permeability increasing protein*). La localisation précise et le contenu de ces protéines peut varier d'une granulation à l'autre. En effet pour les plus grosses granulations azurophiles, les défensines peuvent représenter jusqu'à 50 % des protéines totales (Rice et al., 1987) alors que d'autres en sont totalement dépourvus. En parallèle de l'apparition chronologique des granulations, les ARN messagers (ARNm) apparaissent séquentiellement au cours de la maturation des PN. Ainsi l'ARNm de la myéloperoxydase est détectable au stade myéloblaste. Les ARNm pour l'élastase et la cathepsine G apparaissent après celui de la MPO mais avant ceux des défensines. Parmi les protéines localisées au niveau de la membrane de ces granulations on peut citer le CD63 (granulophysine), le CD68 et des pompes à protons (H^+ -ATPase type V) qui participent à l'acidification de la matrice de ces granulations.

b. Les granulations secondaires ou spécifiques

Ces granulations font partie de la famille des granulations peroxydase négatives tout comme les granulations gélatinases. Elles apparaissent pendant la maturation du PN au stade myélocytaire (Borregaard et al., 2007) et persistent jusqu'au stade mature. Lorsque le frottis sanguin est coloré au May Grünwald Giemsa (MGG) elles prennent des colorants acides et basiques (neutrophile) à la différence des granulations des éosinophiles prenant les colorants acides (coloration orange au MGG) ou des basophiles prenant les colorants basiques (coloration violet foncé au MGG). Ce sont des organelles sphériques, de taille inférieure à celle des granulations primaires (environ 0,2 μm), ou en forme de bâtonnet (0,1 x 1 μm). Elles apparaissent claires aux électrons. Elles contiennent l'essentiel du lysozyme, la lactoferrine, la transcobalamine II (vitamin B12 binding protein), la gélatinase, la N-acétyl β glucosaminidase mais aussi, insérés dans leur membrane, on trouve certains récepteurs d'adhésion (CD11b/CD18 ou CR3, Fibronectine-R, Laminine-R,...) (Bainton et al., 1987), des récepteurs de chimioattractants (fMLF-R)(Fletcher et al., 1982), le cytochrome b_{558} (ou -245) qui est le composant catalytique de la NADPH oxydase (Jesaitis et al., 1990). La synthèse des molécules contenues dans les granulations est là aussi séquentielle et s'opère pendant la différenciation du granulocyte. Ainsi la synthèse de la lactoferrine commence au stade myélocyte, avant la biosynthèse de la gélatinase (métamyélocyte), et se termine avant la fin de la synthèse de cette même gélatinase (Gullberg et al., 1999).

c. Les granulations riches en gélatinases

Ces granulations ont été longtemps confondues avec les granulations spécifiques. A la différence de ces dernières, elles sont caractérisées par la présence de gélatinase mais aussi par l'absence de lactoferrine et ensuite par le fait que ces granulations apparaissent plus tardivement lors de la maturation des PN dans la moelle. Les granulations riches en gélatinase apparaissent après le stade métamyélocytaire tandis que les granulations spécifiques apparaissent avant ce stade. Elles contiennent la gélatinase, les cathepsines B et D, la β -glycérophosphatase, la N-acétyl- β -glucosaminidase, et des récepteurs tel le CD11b/CD18.

d. Les vésicules sécrétoires

Ces organites sont très facilement mobilisables. Ils sont caractérisés par la présence de CR1 (CD35). Comme nous l'avons vu ces vésicules apparaissent au dernier stade de différenciation des granulocytes.

Tableau 1 : Contenu des granulations du PN (Faurischou et al., 2003).

Azurophil granules	Specific granules	Gelatinase granules	Secretory vesicles
<i>Membrane</i>			
CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	Alkaline phosphatase
CD68	CD15	Cytochrome <i>b</i> ₅₅₈	CD10
Presenilin 1	CD66	Diacylglycerol deacetylating enzyme	CD11b/CD18
Stomatin	CD67	fMLP-R	CD13
V-type H ⁺ -ATPase	Cytochrome <i>b</i> ₅₅₈	Leukolysin	CD14
	fMLP-R	NRAMP-1	CD16
	Fibronectin-R	SCAMP	CD45
	G-protein _α -subunit	SNAP-23, -25	CR1
	Laminin-R	uPA-R	C1q-R
	Leukolysin	VAMP-2	Cytochrome <i>b</i> ₅₅₈
	NB1 antigen	V-type H ⁺ -ATPase	Decay-accelerating factor (DAF)
	19-kDa protein		fMLP-R
	155-kDa protein		Leukolysin
	Rap1, Rap2		VAMP-2
	SCAMP		V-type H ⁺ -ATPase
	SNAP-23, -25		
	Stomatin		
	Thrombospondin-R		
	TNF-R		
	uPA-R		
	VAMP-2		
	Vitronectin-R		
<i>Matrix</i>			
Acid β-glycerophosphatase	β ₂ -Microglobulin	Acetyltransferase	Plasma proteins
Acid mucopolysaccharide	Collagenase	β ₂ -Microglobulin	
α ₁ -Antitrypsin	CRISP-3 (SGP-28)	CRISP-3	
α-Mannosidase	Gelatinase	Gelatinase	
Azurocidin	hCAP-18	Lysozyme	
BPI	Histaminase		
β-Glycerophosphatase	Heparanase		
β-Glucuronidase	Lactoferrin		
Cathepsins	Lysozyme		
Defensins	NGAL		
Elastase	uPA		
Lysozyme	Sialidase		
MPO	Transcobalamin-I		
N-acetyl-β-glucosaminidase			
Proteinase-3			
Sialidase			
Ubiquitin-protein			

3. Fonctions des PN

a. Recrutement du PN au niveau du foyer inflammatoire

Les PN comme toutes les autres cellules du sang sont des cellules mobiles. En l'absence de tout stimulant, il se déplace au centre du vaisseau sanguin, là où le flux est le plus rapide et ceci de façon aléatoire (Figure 2). Les PN expriment de façon constitutive une protéine d'adhérence, la L-sélectine (CD-62L) responsable de la formation du pool marginal par adhérence aux sucres présents sur les cellules endothéliales des veinules post-capillaires. L'intrusion d'un agent pathogène ou un stress cellulaire qui conduit à une inflammation provoque une libération de médiateurs de l'inflammation comme l'histamine, la thrombine, le tumor necrosis factor α (TNF- α), l'IL-1, l'IL-8, ou encore les endotoxines bactériennes. Ces molécules induisent chez la cellule endothéliale une augmentation d'expression des E-sélectines et un recrutement à la membrane des P-sélectines préformées et contenues à l'intérieur des grains de Weibel-Palade (Smith et al., 1993a). L'interaction de ces molécules d'adhérence, E et P sélectines avec les sucres de la membrane du PN et des récepteurs (PSGL-1) va lui permettre de ralentir son mouvement par une adhérence de faible affinité (c'est le « rolling »). Une deuxième phase d'adhérence de forte affinité est initiée par la production de médiateurs par l'endothélium vasculaire tels que l'interleukine-8 (IL-8), le facteur activateur des plaquettes (PAF : Platelet activating factor), le TNF- α ou encore le GM-CSF. Ces médiateurs induisent la coupure de la L-sélectine nécessaire au roulement par l'activation d'une métalloprotéinase et la dégranulation des granulations les plus mobiles entraînant une surexpression des β 2-intégrines notamment CD11b/CD18 et une augmentation de leur affinité pour leur ligand (ICAM) (Diez-Fraile et al., 2002). Cette adhérence de forte affinité est un préalable nécessaire à la migration transendothéliale des PN vers le foyer inflammatoire. Un certain nombre de mécanismes ont été décrits permettant le passage entre les cellules endothéliales (diapédèse) et la traversée de la membrane basale (Figure 2). Les PN par le biais de l'élastase ouvrent les jonctions cellule-cellule en provoquant le désassemblage des complexes cadhérine/caténine. La gélatinase, connue aussi sous le nom de métalloprotéase 9 (MMP9), participe à la dégradation de la membrane basale. Pendant ce processus, les PN exposent également la leucolysine (MMP25) sur leur surface (Borregaard et al., 2007). Certains auteurs ont également montré par des approches ultrastructurales l'existence d'une migration transcellulaire des PN à travers les cellules endothéliales (Kvietys et al., 2001; Vestweber., 2002).

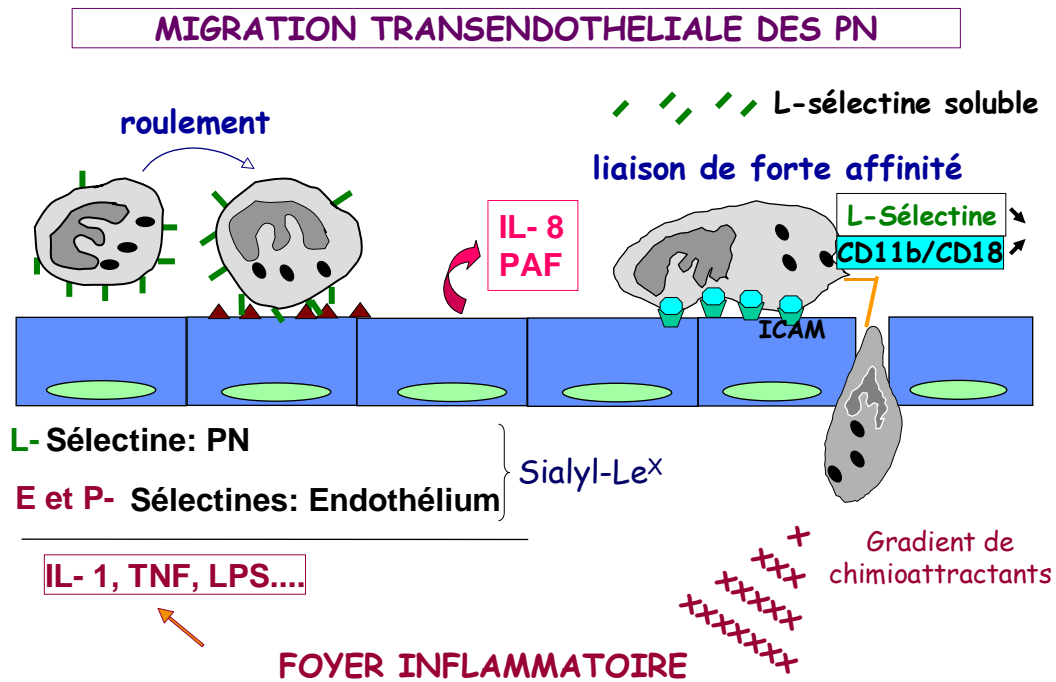


Figure 2. Roulement, transmigration et migration du neutrophile du vaisseau sanguin vers le site infectieux

Après avoir franchi l'endothélium et la membrane basale, les PN migrent dans les tissus en remontant le long d'un gradient de substances chimioattractantes en direction du foyer inflammatoire (Figure 2) où ces cellules vont exercer leur rôle défensif. Les principaux chimioattractants sont les suivants :

- des dérivés des protéines bactériennes tels que les N-formyl-peptides et en particulier le N-formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine : fMLF. Le fMLF est un tripeptide formylé qui se lie à la surface des PN sur des récepteurs de faible ou forte affinité (fMLF-R) (Prossnitz et al., 1997),
- des protéines dérivées du complément comme le C5a, après activation de la voie classique ou de la voie alterne,
- des dérivés lipidiques tels que le leucotriène B4 et le « Platelet-Activating Factor » (PAF),
- des chimiokines dont le prototype pour les PN est l'IL-8.

Les facteurs chimioattractants possèdent à faible concentration une activité chimiotactique et/ou chimiocinétiq. En se rapprochant du lieu de l'inflammation, la concentration de chimioattractants est plus grande, ce qui a pour conséquence d'induire une activation des PN et une génération de FRO qui vont participer à l'élimination de l'agent pathogène. De plus, ils ont également en commun des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Le mouvement orienté des PN dépend de nombreux mécanismes transductionnels aboutissant à la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine que nous ne détaillerons pas dans ce travail.

b. La reconnaissance et la phagocytose de l'agent pathogène :

Arrivé au contact de leur cible, les PN vont tenter de la phagocyter. La phagocytose (Figure 3) de l'agent pathogène se déroule en trois étapes : reconnaissance, adhérence et englobement de l'agent pathogène. La reconnaissance et l'adhérence à la cible, dépendent de différents récepteurs présents à la surface des PN : il peut s'agir de récepteurs tels les "Toll like receptors" (TLR) qui reconnaissent des motifs présents à la surface de différents agents pathogènes et conservés au cours de l'évolution. Par exemple, le TLR2 reconnaît, entre autre, le peptidoglycane de bactéries gram positif alors que le TLR4 reconnaît principalement le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram négatif. Par ailleurs, des récepteurs pour des molécules facilitant les interactions entre cible et effecteur de l'immunité (dénommées opsonines) comme des récepteurs [Par ex : CR1 (CD35) et CR3 (CD11b/CD18)] pour certaines protéines dérivées du C3 du complément (C3b et C3bi) ou les récepteurs (FcγR de type I, II et III) pour les fragments Fc des immunoglobulines notamment IgG1 et IgG3 (Smith et al., 1994). La reconnaissance et l'adhérence sont en général suivies d'un englobement de l'agent pathogène dans la vacuole de phagocytose, mais ceci n'est pas systématique. Cette étape dépend de la taille de l'agent pathogène, de mouvements de membranes des PN et de différents mécanismes transductionnels que nous ne détaillerons pas ici.

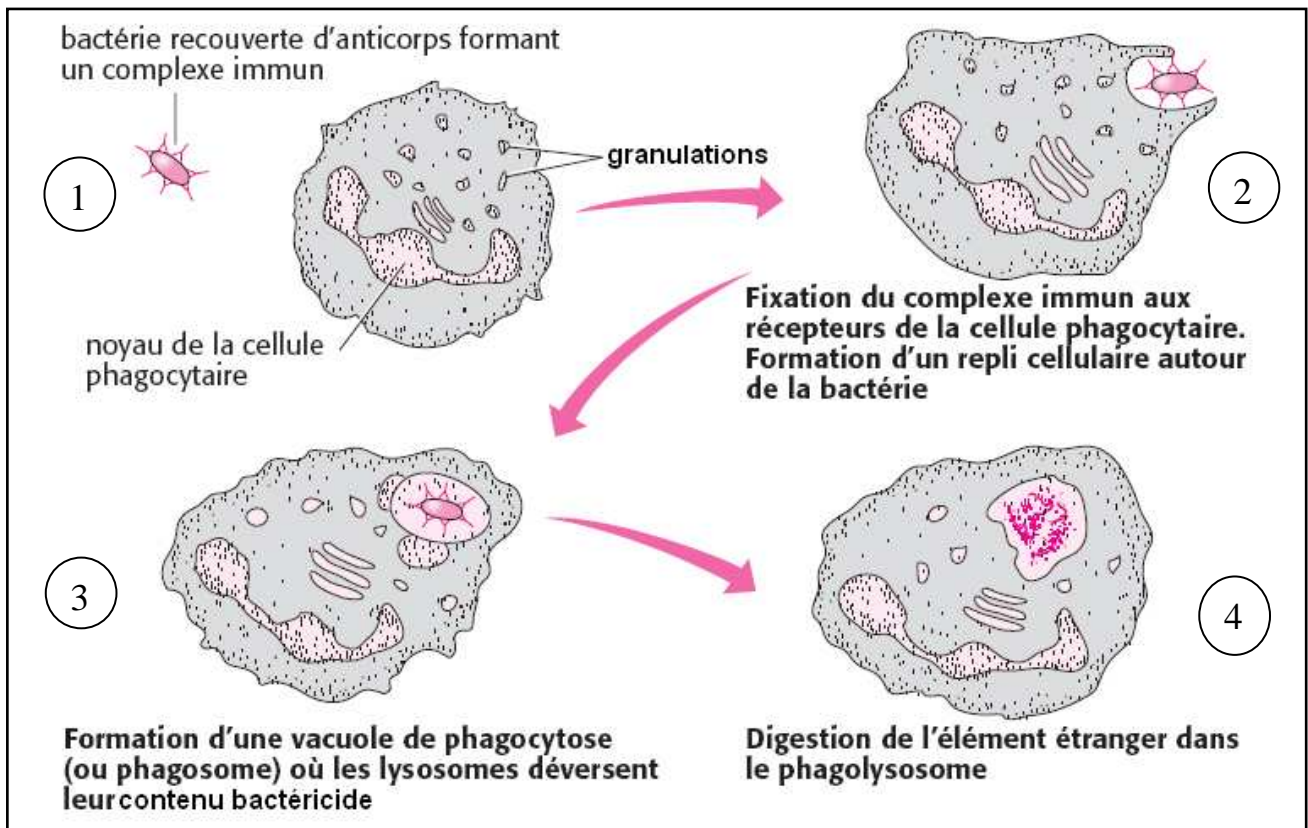


Figure 3. Phagocytose et dégradation de la bactérie par les PN. La phagocytose implique la reconnaissance, l'ingestion et la digestion de grosses molécules et de micro-organismes.

c. Elimination de l'agent pathogène

Les PN possèdent deux mécanismes essentiels pour détruire les microorganismes. Le premier est lié à la dégranulation : déversement d'un ensemble de peptides et de protéines bactéricides dans le phagosome, augmentation d'expression de récepteurs à la membrane ; le deuxième repose sur l'utilisation de l'oxygène du milieu sous l'influence d'un système enzymatique, la NADPH oxydase. Ces deux systèmes agissent en coopération (Figure 4).

i. Mécanisme indépendant de l'oxygène

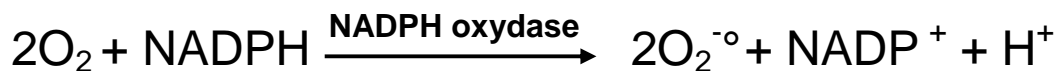
L'activation du PN par un agent pathogène phagocyté en conjonction avec différents facteurs solubles comme les N-formyl peptides, la fraction 5 du complément activé (C5a) ou encore le PAF, induit une mobilisation des granulations qui vont ensuite fusionner avec le phagosome, déverser leur contenu sur l'agent phagocyté et insérer leurs protéines membranaires dans la membrane phagosomale. Ainsi, l'insertion de la pompe à protons (H^+ -ATPase type V) contenus dans les membranes de différentes granulations aboutit à une diminution du pH à

environ 4.5 favorisant l'action des hydrolases acides. Les enzymes hydrolytiques participent à la digestion des microorganismes morts et des cellules hôtes endommagées. Le lysosome hydrolyse les glycosaminoglycanes de la paroi bactérienne. Un certain nombre de protéines cationiques déversées dans le phagosome y exercent une activité antibiotique. Les défensines sont de petits peptides de 29 à 34 acides aminés présents en très grande quantité dans les PN (ils représentent 30 à 50% du contenu protéique des granules azurophiles). Elles exercent une activité microbicide très large ; en effet, elles sont actives sur les bactéries à Gram+ et Gram-, les champignons et même les virus en formant des canaux membranaires dans les bicouches lipidiques et en augmentant la perméabilité membranaire. Les défensines sont probablement un facteur primitif de défense retrouvé très tôt au cours de l'évolution animale (Lehrer et al., 1993). La «Bactericidal Permeability Increasing protein» (BPI), est présente dans les granulations azurophiles. Elle a une homologie avec les protéines décrites sous le nom de LBP (« LPS-Binding Protein ») et est très efficace contre les bactéries à Gram- en altérant les propriétés des membranes bactériennes et en augmentant leur perméabilité, ce qui entraîne l'inhibition du métabolisme et de la respiration bactérienne. Les serprocidines sont des sérines protéases comme l'élastase, la protéinase 3, la cathepsine G ou l'azurocidine qui ont également une activité bactéricide (Levy et al., 1996; Ganz et al., 1995). Par ailleurs, le déversement de la myéloperoxydase illustre la coopération entre les mécanismes de dégranulation et la production de FRO par la NADPH oxydase comme nous le décrirons plus loin. D'autres protéines à activité anti-microbiennes stockées dans les granulations spécifiques/gélatinases comme la lactoferrine, la NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), la cathelicidine hCAP18 clivée par l'élastase en LL37 active contre les bactéries Gram négatif et Gram positif jouent un rôle important et illustrent également une coopération entre le contenu des différents types de granulations (Borregard et al., 1997 ; 2007).

La dégranulation permet aussi l'apport à la membrane d'un pool de récepteurs stockés dans les granulations permettant ainsi un recyclage ou une augmentation de l'expression de ces récepteurs à la surface membranaire ; c'est le cas pour le récepteur du fMLF, le CD11b/CD18. Il a été suggéré que cette mobilisation de récepteurs a pour conséquence la potentialisation de la réception du signal. La dégranulation va aussi permettre le transfert du cytochrome b₅₅₈ du pool granulaire vers la membrane plasmique ou phagosomale (Figure 4).

ii. Mécanisme bactéricide dépendant de l'oxygène : Production des formes réactives de l'oxygène (FRO)

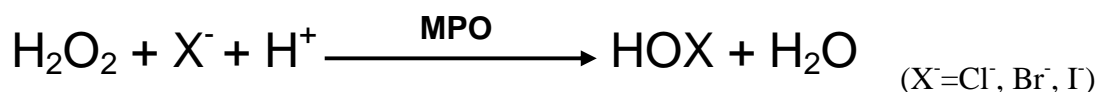
Un des mécanismes majeurs conduisant à l'élimination de l'agent pathogène phagocyté est la production rapide d'anions superoxyde, source des autres formes réactives de l'oxygène (FRO). Cette production rapide par les phagocytes (PN ou monocytes) de FRO en réponse à divers stimuli est appelée explosion oxydative. L'oxygène est réduit par les phagocytes en anion superoxyde grâce à un système enzymatique appelé NADPH oxydase suivant la réaction suivante (Babior et al., 1973) :



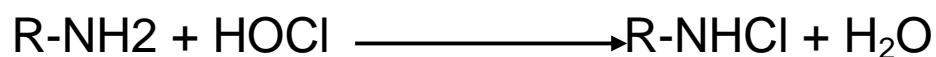
L'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ formé est instable, à pH acide dans le phagosome, il se transforme en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), suivant la réaction de dismutation suivante:



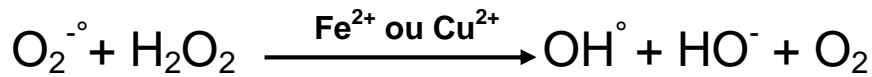
Cette dismutation est spontanée dans le phagosome. Elle est catalysée dans le cytosol par une enzyme, la superoxyde dismutase (SOD). Le H_2O_2 formé peut ensuite donner d'autres molécules à capacité oxydante grâce à la myéloperoxydase (MPO) qui, libérée dans le phagosome à partir des granulations azurophiles catalyse le système peroxyde d'hydrogène/halogénure (X^-) :



En présence de chlore, se forme l'acide hypochloreux (HOCL) qui transforme les amines en N-chloramines qui ont aussi des propriétés microbicides. En présence de brome ou d'iode, il se forme de l'hypobromure (OBr^-) et de l'hypoiodure (OI^-) qui sont aussi des puissants agents antimicrobiens.



La réaction entre l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène en présence de fer (Fe^{2+}) ou de cuivre (Cu^{2+}) génère une molécule très toxique : l' OH^\bullet (radical hydroxyle):



Le radical hydroxyle est hautement toxique réagissant avec les molécules de l'environnement à la vitesse de la diffusion moléculaire.

Ces réactions forment aussi un composé très toxique l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), (Babior 2000; Hampton et al., 1998; Wang et al., 1996).

La production des FRO se fait sur la face externe de la membrane plasmique, devenant la face interne du phagosome lors du processus de phagocytose des microorganismes. Les FRO sont donc physiologiquement produites au contact direct de l'agent pathogène phagocyté, atteignant de hautes concentrations dans le phagosome qui est un milieu clos et jouant un rôle majeur dans la bactéricidie. Les FRO produites par la face externe de la membrane plasmique dans le milieu extracellulaire sont physiologiquement peu concentrées. Cependant, produites de façon excessive ou inappropriée dans le milieu extracellulaire, les FRO peuvent participer à la survenue de lésions tissulaires au niveau du site inflammatoire. En effet, les FRO induisent différentes lésions biochimiques (Weiss et al., 1989) : peroxydation lipidique aboutissant à une désorganisation membranaire ; atteinte protéique avec fragmentation, agrégation et oxydation des groupements sulfhydriles ; atteinte des acides nucléiques avec cassure et mutation de l'ADN.

La première réaction à l'origine de toutes ces FRO est catalysée par une enzyme : La NADPH oxydase. Le contrôle de son activation fait l'objet de cette thèse ; sa structure et son importance dans l'immunité innée et l'inflammation seront détaillées dans la deuxième partie de l'introduction.

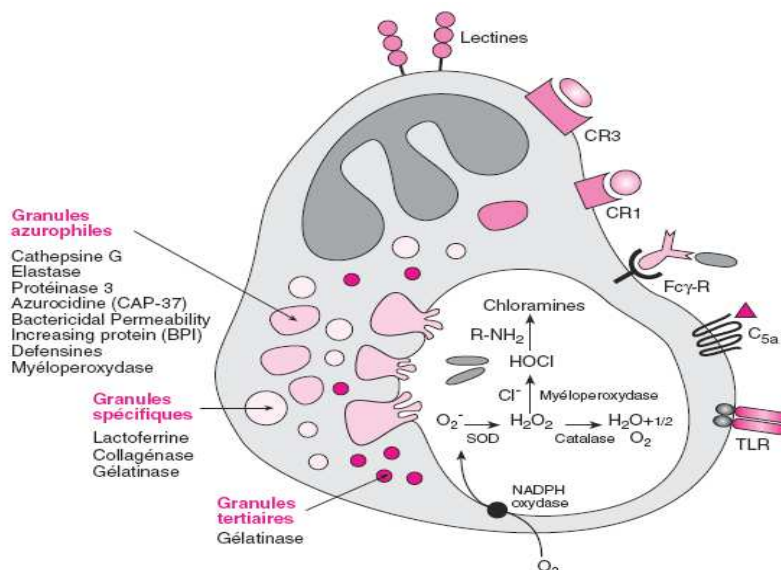


Figure 4. mécanismes tueurs du PN.

iii. Bactéricidie médiée par les NET's (Neutrophil Extracellular Traps)

Récemment a été décrit un phénomène de bactéricidie original dépendant de l'émission de filets extracellulaires (*neutrophil extracellular traps* ou NETs) par les PN après désintégration de toutes ses structures membranaires et mort de la cellule (Brinkmann et al., 2004). Ce phénomène est déclenché par l'activation des PN par différents stimuli (endotoxines bactériennes, certaines cytokines phorbol myristate acétate...) et ne nécessitent pas l'englobement des bactéries dans la vacuole de phagocytose. Ce phénomène dépend de la production de FRO par la NADPH oxydase puisque ces filets n'apparaissent pas lors de l'inhibition de la NADPH oxydase ou chez les patients atteints de Granulomatose septique chronique déficitaires dans la production de FRO ; de plus ils sont induits par l' H_2O_2 (Bianchi et al., 2009). Ces filets sont des filaments de chromatine dépliée formés d'ADN et d'histones et recouverts de nombreuses molécules bactéricides issues des granulations des PN (élastase, Cathepsine G, lactoferrine, MPO, gélatinase par exemple). Ces filets immobilisent les bactéries Gram positif et Gram négatif comme *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* mais aussi des champignons comme *Candida albicans* et maintiennent à leur contact une concentration élevée de protéines bactéricides induisant leur destruction. Les événements moléculaires reliant la production de FRO à la formation de NETs sont mal connus à ce jour (Fuchs et al., 2007). La formation de NETs augmenterait l'efficacité microbicide du PN aussi bien spatiale que temporelle puisque le PN pourrait ainsi agir sur des microorganismes présents dans son environnement mais non englobés et poursuivre sa lutte antimicrobienne en quelque sorte post-mortem.

d. Production de médiateurs par les PN

Le PN participe à la régulation des réponses immunitaires en libérant un certain nombre de médiateurs : cytokines pro et anti-inflammatoires, chimiokines, facteurs de croissance, médiateurs lipidiques (Cassatella et al., 1995). Les PN sont les premières cellules provenant du sang circulant vers le foyer inflammatoire et cette production précoce de médiateurs intervient dans l'engagement et la régulation des différentes réponses immunitaires innées et adaptatives (Arai et al., 1990). Les médiateurs lipidiques produits sont notamment le PAF et le LTB₄ qui interviennent eux-mêmes dans l'induction des fonctions des PN.

Les PN ont la capacité de synthétiser et libérer des cytokines différentes selon le ou les stimuli utilisés (Crepaldi et al., 2002). Ainsi, les PN en réponse au LPS libèrent des cytokines proinflammatoires comme l'interleukine-1 beta (IL-1 β), le TNF α et l'IL-8, mais aussi le

puissant inhibiteur de l'IL-1, l'IL-1ra (Yoshimura et al., 1997). Le LPS associé à l'IFN γ induit la production d'IL-12 par les PN. L'IL-4 augmente la production de l'IL-1ra et inhibe la production d'IL-1 β induites par le LPS (Malyak et al., 1994). Une production différentielle de multiples isoformes d'IL-1ra en réponse à la stimulation des PN par le LPS est notée. Ainsi, la même équipe en 1998 a montrée que des PN stimulés par le LPS peuvent produire l'isoforme sIL-1ra (sécrétoire), celui-ci joue un rôle important dans la régulation des effets de l'IL-1 dans le milieu extracellulaire (Malyak et al., 1998). Les PN produisent des chimiokines pour la plupart des cellules immunitaires (Figure 5). Les PN produisent notamment l'IL-8 et le GRO α , appartenant à la famille des C-X-C chimiokines, les MIP-1 α et MIP-1 β , appartenant à la famille des C-C chimiokines (Tableau II). Parmi les cytokines produites par les PN, l'IL-8 est la cytokine synthétisée de façon majoritaire (Bazzoni et al., 1991). L'induction de sa synthèse par les PN peut être observée après la phagocytose de particules opsonisées, mais également sous l'action de nombreux stimulants tels que le LPS, le fMLF, le C5a, le TNF- α , le LTB $_4$, le calcium ionophore et le PAF (Cassatella et al., 1993; Arnold et al., 1994; McCain et al., 1994).

Tableau II. Production de cytokines et chimiokines par le PN. (Cassatella., 2010)

C-X-C chemokines	Proinflammatory cytokines	Colony-stimulating factors
IL-8/CXCL8	TNFα	G-CSF
GROα, GROβ, GROγ	IL-1α, IL-1β	M-CSF(?)
ENA-78/CXCL5	IL-16(?), IL-17(?)	GM-CSF(?)
CINC-1*, CINC-2α	IL-18	IL-3(?)
CINC-3/MIP-2/CXCL1	MIF	SCF*(?)
PF4/CXCL4	IL-6(?), IL-7, IL-9	
GCP-2/CXCL6		Angiogenic and fibrogenic factors
IP-10/CXCL10	Anti-inflammatory cytokines	VEGF
MIG/CXCL9	IL-1ra	HB-EGF
I-TAC/CXCL11	TGFβ₁, TGFβ₂	FGF-2
	IL-4(?), IL-10(?)	TGFα
		HGF
C-C chemokines	Immunoregulatory cytokines	TNF superfamily members
MCP-1/CCL2	IFN β *, IFN β , IFN γ (?)	FasL
MIP-1α, CCL3	IL-12	CD30L
MIP-1β, CCL4	IL-23(?)	TRAIL
MIP-3α, CCL20		LIGHT*
MIP-3β, CCL19		Lymphotoxin-β*
PARC/CCL18	Other cytokines	APRIL, BAFF/BLyS
MDC/CCL22*	Oncostatin M	RANKL
	GDF (?)	
	NGF*, BDNF*, NT4*	

* ARNm uniquement

? pas encore confirmé

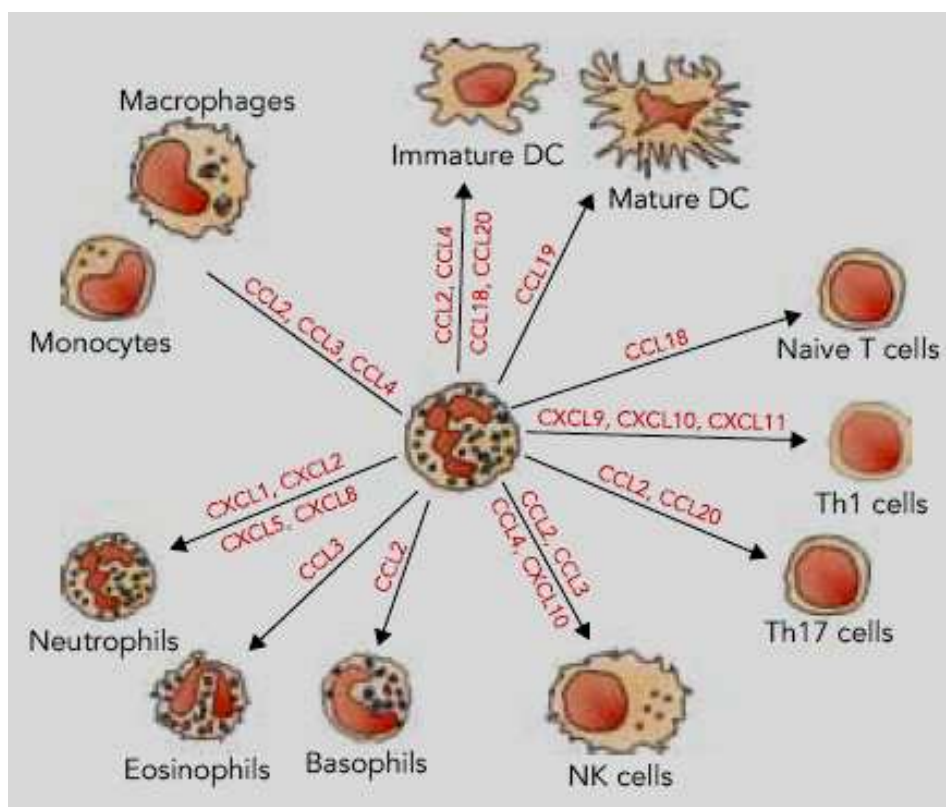


Figure 5. Production de chimiokines par le PN. (Cassatella., 2010)

e. Résolution de l'inflammation et apoptose des polynucléaires neutrophiles

Une fois l'agent agresseur éliminé, la réponse inflammatoire s'autolimité, et démarre en même temps le processus de réparation tissulaire. Cette phase de résolution est fondamentale pour la protection des tissus, l'établissement d'une mémoire immunitaire adéquate ainsi que pour le retour à un état d'homéostasie. Pour les PN ceci implique la diminution de leur accumulation dans le site inflammatoire, la suppression de leur activation, la production de protéines anti-inflammatoires, l'induction de leur apoptose et leur élimination par les macrophages (Kennedy et al., 2009). Les principaux facteurs déterminant l'arrêt de la migration et de l'activation des PN au niveau du site inflammatoire sont :1) Le changement du profil d'expression des cytokines et de leurs antagonistes (IL-1/IL-1Ra, TNF/TNF-R soluble) ainsi que de la balance entre cytokines pro- et anti-inflammatoires (IL-10, IL-4 et IL-13) sécrétées par les cellules du foyer inflammatoire (macrophages, neutrophiles et cellules endothéliales) (Nathan et al., 2006). La dégradation des facteurs chimioattractants et les phénomènes de désensibilisation des PN vis-à-vis des chimiokines jouent également un rôle important ; 2) les dérivés lipidiques comme les lipoxines, les résolvines et les protectines, considérés comme des vrais agonistes de la résolution de l'inflammation (Serhan et al., 2010) ; 3) les molécules qui régulent l'apoptose du PN. Comme déjà mentionné, les PN ont

une demi-vie courte mourant spontanément par apoptose en quelques heures. Cette demi-vie courte pourrait être interprétée comme un mécanisme de contrôle strict du renouvellement et du nombre de PN dans l'organisme. Une dérégulation de l'entrée en apoptose peut induire différents phénomènes. pathologiques : une mort accélérée du PN peut participer à différentes causes de neutropénie favorisant le risque infectieux alors qu'un retard de l'entrée en apoptose peut participer à la physiopathologie de différentes maladies inflammatoires et auto-immunes. On distingue une apoptose spontanée constitutive du PN (Luo et al., 2008) et une apoptose induite par la phagocytose (Gilroy et al., 2004) qui sont régulées par l'environnement notamment cytokinique. Finalement, les PN apoptotiques sont reconnus et phagocytés par les macrophages résidents (Erwig et al., 2007). La phagocytose des PN apoptotiques fait basculer les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire favorisant encore la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire (Ravichandran et al., 2007). Une agression extrême des PN peut conduire à une nécrose dite primaire avec une perte rapide et irréparable de l'intégrité de la membrane plasmique conduisant à la libération dans l'environnement des composants toxiques du PN induisant des lésions tissulaires.

II. Généralités sur les monocytes/macrophages

Les monocytes/macrophages appartiennent au système des phagocytes mononucléés qui comprend les monocytes sanguins et les macrophages tissulaires (van Furth et al., 1973). Il faut distinguer les macrophages récemment dérivés des monocytes sanguins dans un contexte inflammatoire (cellules activées) des macrophages résidents, participant à l'homéostasie dans les tissus. Ces cellules acquièrent certaines particularités en fonction du microenvironnement tissulaire. Ainsi, les macrophages alvéolaires pulmonaires, les cellules microgliales du cerveau, les cellules ostéoclastiques des os, les cellules de Küppfer du foie ou encore les cellules macrophagiques des organes hématopoïétiques ont des capacités qui leur sont propres mais garderont des propriétés communes comme la capacité de produire de grandes quantités de médiateurs de l'inflammation notamment certaines cytokines pro-inflammatoires. Les monocytes ont longtemps été considérés comme les précurseurs directs des macrophages tissulaires résidents participant à l'homéostasie, la défense immunitaire et la réparation tissulaire (Well et al., 2006) bien que leur origine semble moins claire aujourd'hui (Geissmann et al., 2010 ; Landsman et al., 2007). Contrairement aux polynucléaires neutrophiles, les macrophages ont une demi-vie longue de plusieurs jours à plusieurs mois. Certains peuvent se multiplier.

Les monocytes sanguins dérivent des monoblastes médullaires. La première cellule souche différenciée est le CFU-GM qui est commune au monocyte et au polynucléaire. La CFU-GM donnera le CFU-M puis le monoblaste, le promonocyte et le monocyte. Les monocytes sont de grandes cellules de 15 à 20 µm de diamètre. Le noyau est irrégulier, réniforme parfois lobé mais non segmenté. Le cytoplasme est de forme très irrégulière et contient de nombreuses et fines granulations, il peut être vacuolisé (Figure 6).

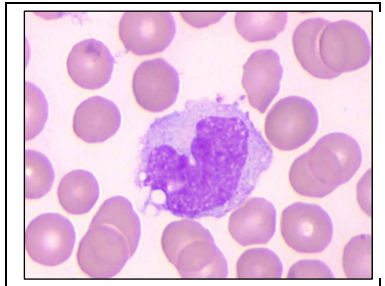


Figure 6. Photo d'un monocyte et de plusieurs hématies colorées au MGG.

Les monocytes représentent 2 à 10 % des leucocytes sanguins chez l'homme soit 100 à 1000 monocytes par mm³ (0,1 à 1 x 10⁹/l). Chez les humains, il existe deux sous-populations discrètement distinctes morphologiquement et phénotypiquement par l'expression de CD14 et CD16 : les cellules CD14⁺⁺CD16⁻ appelées monocytes classiques représentant 90% des monocytes humains, et les monocytes non classiques CD14⁺CD16⁺⁺ représentant 10% des monocytes humains (Yona et Jung., 2010). Après un transit sanguin de 3 jours environ chez l'homme, les monocytes passent dans les tissus et se transforment en macrophages, grande cellule à cytoplasme abondant et mal limité qui peut contenir des particules phagocytées. Sous l'influence de différentes cytokines, les monocytes peuvent se différencier en cellules dendritiques qui font le lien entre immunité innée et adaptative.

Les monocytes/macrophages et les polynucléaires neutrophiles partagent des caractéristiques communes en raison de leur descendance d'un progéniteur commun mais leur différenciation les conduit à s'individualiser sur le plan phénotypique et fonctionnel (Iwasaki et Akashi., 2007). Les monocytes/macrophages sécrètent des quantités importantes de cytokines (environ 10 à 100 fois plus par cellule que le PN) et de différents médiateurs de l'inflammation jouant un rôle majeur dans la régulation des réponses immunitaires et l'homéostasie tissulaire. Les macrophages jouent un rôle majeur dans l'élimination des PN apoptotiques, des cellules mortes, des débris cellulaires favorisant la résolution du processus inflammatoire et le retour à l'homéostasie. A la différence des polynucléaires neutrophiles, les monocytes/macrophages ne meurent pas rapidement après la phagocytose.

Les monocytes migrent du sang vers le foyer inflammatoire quelques heures après les PN (Figure 2, page 18). Les mécanismes de migration transendothéliale sont similaires, certaines molécules d'adhérence étant cependant différentes. Les mécanismes de reconnaissance font intervenir comme pour le PN, les PRRs (pattern recognition receptors), les récepteurs pour les dérivés du complément et pour les fragments Fc des Immunoglobulines avec certaines particularités comme l'expression constitutive du Fc γ RI (CD64) de forte affinité. Les capacités microbicides des monocytes/macrophages diffèrent de celles des PN. Ainsi, les monocytes/macrophages contiennent des granulations moins bien individualisées que celles des PN et équipées d'un arsenal de peptides anti-microbiens moins puissants : ils manquent par exemple de défensines et de BPI (bactericidal permeability-increasing protein) contenue dans les granulations azurophiliques des PN (Weiss et al., 1987). De plus, si la myéloperoxydase est présente dans le monocyte, elle disparaît progressivement lors de la maturation macrophagique en parallèle avec une diminution de l'activité bactéricide. L'explosion oxydative des monocytes est moins intense que celle des PN. A l'inverse, les macrophages dérivés des monocytes ont une durée de vie beaucoup plus longue que les PN. Alors que les PN vont rapidement détruire les bactéries à multiplication extracellulaire et les champignons, les monocytes/macrophages tuent les bactéries à multiplication intracellulaire après activation par l'IFN γ (Martinez et al., 2011). Très schématiquement, sous l'influence de l'environnement en cytokines, les macrophages récemment dérivés des monocytes dans le foyer inflammatoire se polarisent en deux sous-populations de macrophages: 1) sous l'influence de l'IFN γ , des macrophages de types pro-inflammatoires sécrètent des quantités très importantes de cytokines pro-inflammatoires. Ces macrophages sont capables de tuer les bactéries à multiplication intra-macrophagique ; 2) Sous l'influence de l'IL-4 et l'IL-13, des macrophages de type anti-inflammatoire ne tuent pas les bactéries à multiplication intracellulaire, produisent moins de cytokines proinflammatoires et plus de cytokines anti-inflammatoires que les précédents (Martinez et al., 2011). La phagocytose des PN apoptotiques fait basculer les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire. *In vivo*, la polarisation des macrophages selon l'environnement et les fonctions exercées est complexe et reste encore mal connus.

III. Les cellules COS-phox

La COS-7 est une cellule fibroblastique de rein de singe facilement cultivable et transfectable avec un taux d'expression protéique important. L'expression transgénique des protéines recombinantes de la NADPH oxydase (gp91phox, p22phox, p47phox et p67phox) dans les cellules COS-7 leur confère un niveau élevé de production de l'anion superoxyde en réponse à l'activation par le PMA ou l'acide arachidonique (Price et al., 2002). Ces cellules baptisées COS-phox constituent un outil précieux pour tester l'effet de l'expression de différents mutants des composants de la NADPH oxydase. Par exemple, l'expression d'une protéine mutée sur un site potentiel de phosphorylation de la p47phox (Ser303Ala/Ser304Ala ou Ser379Ala) dans ces cellules exprimant par ailleurs les autres composants sauvages de la NADPH oxydase induit une diminution significative de la production des FRO (Price et al., 2002). De même, l'expression d'une Rac T17N mutante ou RhoGDI inhibe significativement la production de l'anion superoxyde induite par le PMA. De plus, les cellules COS-7, exprimant Rac1 et p22phox, ont été utilisées pour étudier la maturation du cytochrome *b*₅₅₈ (Yu et al. 1997 ; De Leo et al., 2000), le canal à protons (Maturana et al., 2001 ; Murillo et al., 2004), et les homologues de p47phox (NoxO1) et de p67phox (NoxA1) (Takeya et al., 2003).

IV. Structure de la NADPH oxydase phagocytaire

La NADPH oxydase (Babior et al., 1999) est un complexe enzymatique multi-protéique, initialement découvert dans les phagocytes (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, monocytes et macrophages). Elle catalyse le transfert d'électrons de son substrat, le NADPH, à l'accepteur final l'oxygène, entraînant la production d'anions superoxyde précurseurs des autres FRO qui sont toxiques pour les micro-organismes préalablement phagocytés. Lorsque les PN sont au repos, la NADPH oxydase est inactive et ses composants sont dispersés entre différents compartiments cellulaires, membranaires et cytosoliques. La NADPH oxydase est formée de protéines membranaires : la gp91phox et la p22phox constituant le cytochrome *b*₅₅₈ et de quatre protéines cytosoliques : p67phox, p47phox, p40phox et Rac (Rac2 dans les PN, Rac1 dans les monocytes) (Figure 7). Les composants membranaires se trouvent à la fois dans les membranes des granulations spécifiques et la membrane plasmique (Borregaard et al., 1983), et les composants cytosoliques forment un complexe d'environ 240 kDa dans le cytosol (Park et al., 1992).

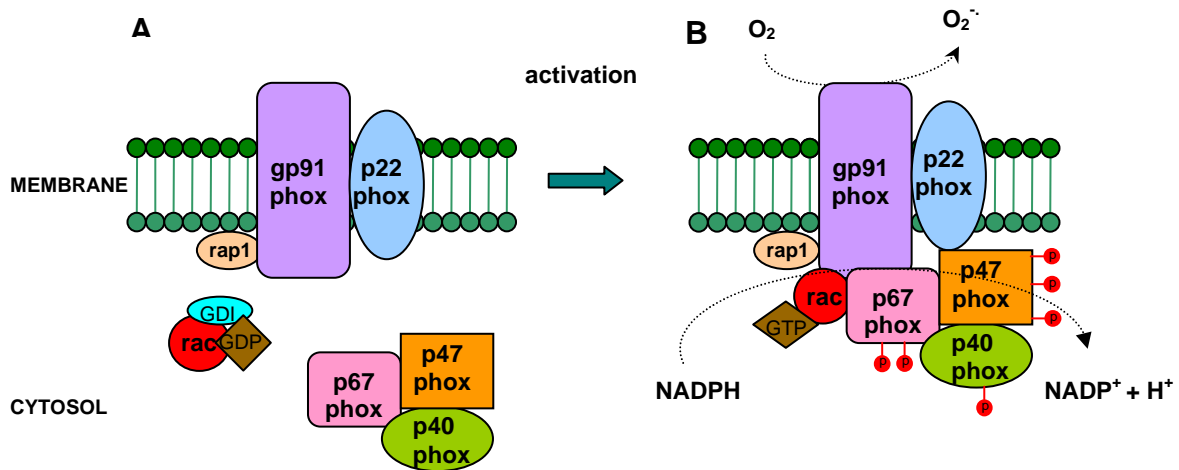


Figure 7: La NADPH oxydase dans les cellules au repos et les cellules activées. (A) La NADPH oxydase dans les cellules au repos. Elle est constituée de protéines cytosoliques (la p67phox, la p47phox, la p40phox et Rac2 (ou Rac1)) et de protéines membranaires (la gp91phox et la p22phox qui forment le cytochrome b₅₅₈). (B) Après l'activation, les composants cytosoliques migrent vers la membrane pour s'associer avec le cytochrome b₅₅₈ et stimuler son activité enzymatique.

Les facteurs essentiels à l'activité de cette enzyme ont été mis en évidence grâce à une pathologie liée à un dysfonctionnement de l'enzyme, la granulomatose septique chronique ou **Chronic Granulomatous Disease** en anglais (CGD) (Segal et al., 1987; Volpp et al., 1988) et grâce à des études en système acellulaire : système constitué *in vitro* de membrane et de cytosol ou mettant en contact des protéines purifiées ou recombinantes permettant de générer l'anion superoxyde (Abo et al., 1992). Les protéines nécessaires à l'activité NADPH oxydase sont le cytochrome b₅₅₈ (gp91phox et p22phox) et les protéines cytosoliques p47phox, p67phox et Rac 1 ou 2 (Figure 7).

1. Structure

a. Les composants membranaires de la NADPH oxydase phagocytaire

Le composant membranaire, centre catalytique de l'enzyme, est le flavocytochrome b₅₅₈. Il s'agit d'un complexe hétérodimérique transmembranaire qui doit son nom à son spectre d'absorption comprenant une bande α à 558 nm. Il contient le système entier de transport d'électrons. C'est une hémoflavoprotéine constituée de deux sous-unités : la p22phox (sous-

unité α) et la gp91phox (nommée aussi NOX2 ou sous-unité β) assemblées de façon non covalente. Les études en densitométrie et de «Cross-linking» effectuées sur des phagocytes ont montré un rapport stœchiométrique de 1:1 pour NOX2 et p22phox (Wallach et al., 1996). Cette hémoflavoprotéine a un potentiel d'oxydoréduction très bas (-245 mV) ce qui lui permet de réduire directement l'oxygène de l'air (Rotrosen et al., 1992). Le cytochrome b₅₅₈ est également le point d'ancrage sur lequel se fixent les autres composants de la NADPH oxydase au cours de l'activation. Il intervient dans l'organisation du complexe actif par interaction de ses domaines intracellulaires avec les sous-unités cytosoliques de la NADPH oxydase, en particulier la p47phox (Rotrosen et al., 1990), la p67phox et Rac2 (Babior et al., 2002).

i. La gp91phox/NOX2

C'est une protéine de 91 kDa, très glycosylée (60 kDa correspondent à la protéine et 31 kDa aux glucides), composée de 570 acides aminés (aa) et ayant un point isoélectrique (pI) \approx 9. La gp91phox possède une courte séquence N-terminale cytosolique, 6 régions transmembranaires, 3 sites de glycosylation dans les boucles extramembranaires et une longue séquence cytosolique de 275 aa qui contient deux séquences de liaison l'une pour le NADPH et l'autre pour le FAD (Vignais et al., 2002 ; Paclet et al., 2007) (Figure 8). Le gène *CYBB* codant pour cette protéine est situé sur le chromosome X dans la région Xp21.1, de taille de 30 kb, il contient 13 exons et est transcrit en ARNm de taille 5kb. Cette protéine est exprimée essentiellement dans les cellules myéloïdes, mais elle est exprimée faiblement dans d'autres cellules comme les neurones, les cellules endothéliales, les cellules hépatiques... (Bedard et al., 2007)

La gp91phox/NOX2 catalyse le transfert des électrons du substrat NADPH à l'oxygène moléculaire O₂, par l'intermédiaire de la flavine FAD et des groupements hémiques prosthétiques, pour générer l'anion superoxyde «O₂^{•-}». Dans l'enzyme active, le transfert des électrons du NADPH à l'oxygène moléculaire (O₂) se fait dans l'ordre suivant :



Ce transfert d'électrons est stimulé par les protéines cytosoliques p67phox (par son domaine d'activation) et par Rac-GTP. Le cytochrome b₅₅₈ contient deux hèmes non identiques (Cross et al., 1995a), avec une stœchiométrie hème/cytochrome b : 2/1 (Taylor et al., 2003). Ainsi les données obtenues par potentiométrie d'oxydo-réduction sur les mutants R54S de NOX2

indiquent que le cytochrome b558 de type sauvage contiendrait deux hèmes séparés non équivalents avec des potentiels d'oxydo-réduction -225 mV et -265 mV (Cross et al., 1995). Notre équipe a récemment montré que la gp91phox est phosphorylée dans les PN humains activés et que son activité enzymatique est augmentée par cette phosphorylation (Raad et al., 2009). Dans les PN au repos, le cytochrome b558 est présent, majoritairement dans les membranes des granulations spécifiques, une faible quantité étant retrouvée dans la membrane plasmique. Lors d'une stimulation des PN, la plus grande partie du cytochrome b_{558} associée à la petite protéine G Rap1A est transférée à la membrane cytoplasmique et intervient dans l'organisation du complexe oxydasique actif, Le flavocytochrome b558 est l'élément essentiel du transfert d'électrons et constitue le site de l'arrimage des autres composants de l'oxydase comme nous l'avons mentionné ci-dessus. Il semble que son interaction avec la p47phox et la p67phox induit un changement dans sa conformation qui permettrait la liaison du NADPH et l'initiation du flux d'électrons (Leusen et al., 1996). La petite protéine G Rap1 A forme un complexe avec le cytochrome b_{558} (Quinn et al., 1989). Son rôle exact dans l'activation du système oxydasique est encore mal déterminé.

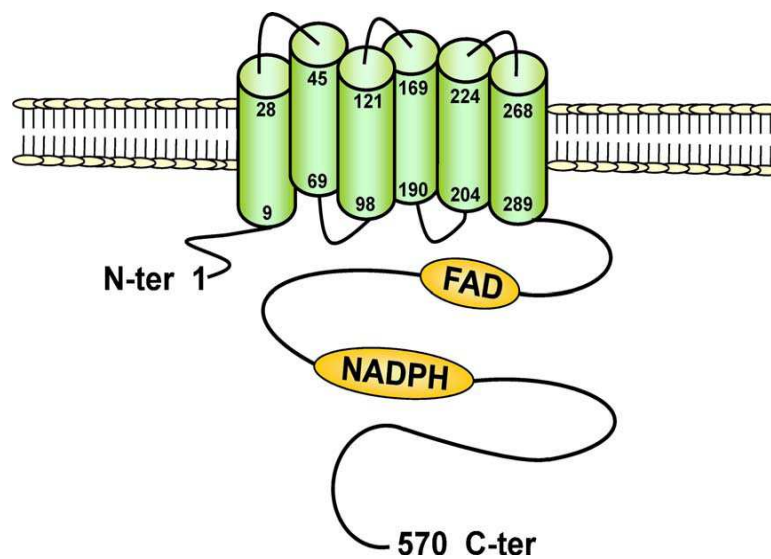


Figure 8. Structure de la gp91phox/NOX2. NOX2 comporte 570 acides aminés. Les domaines -NH₂ et -COOH terminaux sont cytosoliques, séparés par six hélices α transmembranaires. La partie C-terminale fixe le FAD et le NADPH. (D'après El Benna et al., 2010)

ii. La p22phox

La p22phox est une protéine dont le poids moléculaire est de 22 kDa, composée de 195 aa et possède un pI de 10 (Roos et al., 1994). Elle contient 2 régions transmembranaires

(Davis et al., 1998), une région cytosolique riche en prolines (de type PXXP). La séquence riche en proline s'étend des positions 151 à 160 et est essentielle à la liaison avec la p47phox (Zhu et al., 2006). La p22phox est phosphorylée lors de l'activation de l'enzyme. Le gène *CYBA* codant pour la p22phox, est localisé sur le chromosome 16 dans la région 16q24, a une taille de 8,5 kb, est formé de 6 exons et est transcrit en un ARNm de taille 0,8 kb (Roos et al., 2003). La p22phox est essentielle à la maturation et la stabilité de la gp91phox ainsi qu'à la formation du complexe NADPH oxydase actif (De Leo et al., 2000). La région riche en proline (PRR) se fixe aux domaines SH3 de la p47phox.

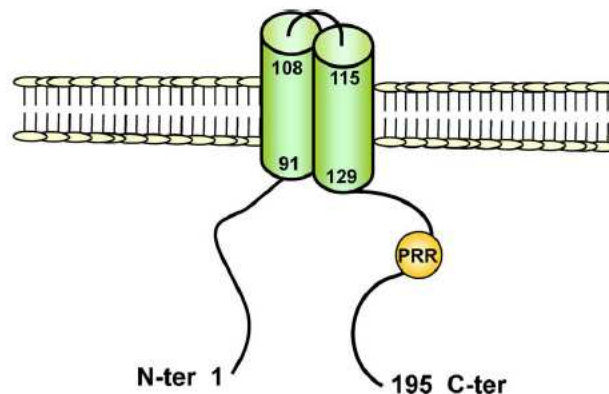


Figure 9: Structure de la p22phox. PRR: Domaine riche en proline. (D'après El Benna et al., 2010)

b. Les composants cytosoliques de la NADPH oxydase phagocytaire

i. La p47phox

C'est une protéine de 390 aa et de poids moléculaire 47 kDa, elle est hautement basique ($pI \approx 10.4$) car elle possède de nombreux résidus arginines et lysines. La p47phox contient 10 sites potentiels de phosphorylation (aa 303-379) et quatre domaines fonctionnels: 1 domaine PX (phox homology) en N-terminal (aa 4-128), 2 domaines SH3 (Src homology domain 3) en tandem (aa 159-213) et (aa 229-283), 1 domaine auto-inhibiteur AIR (auto-inhibitory region) (aa 292-340), 1 domaine riche en proline PRR (proline-rich region) : (aa 360-369) (Figure 10). La p47phox existe au repos sous forme libre ou associée à la p67phox et à la p40phox (Roos et al., 1994), sous la forme d'un complexe de 240 kDa (Park et al., 1994). L'activation des PN entraîne la phosphorylation de la p47phox, cette phosphorylation est nécessaire à la formation du complexe NADPH oxydase actif.

Le gène qui code pour cette protéine s'appelle *NCF1*, de taille 17-18 kb, contenant 9 exons et situé au niveau de chromosome 7 dans la région 7q11.23. Le transcrit est un ARNm de taille 1.4 kb et exprimé essentiellement dans les cellules phagocytaires.



Figure 10. Structure de la p47phox. (D'après Marcoux et al., 2010)

ii. La p67phox

La p67phox est composée de 526 aa avec un $pI \approx 6$, elle contient quatre domaines TPR "Tetratricopeptide Repeat", un domaine activateur EAD, un domaine PB1 « Phox and Bem 1 » et deux domaines SH3 (un au milieu de la protéine et l'autre près de l'extrémité C-terminale), et une région riche en prolines. La quantité de la p67phox est inférieure de 2 à 3 fois à celle de la p47phox. La majorité de la p67phox semble être liée à la p47phox et la p40phox. Elle est phosphorylée pendant l'activation et migre avec la p47phox au niveau de la membrane. Elle est capable de lier Rac2 au niveau de sa partie N-terminale et d'activer la gp91phox pour le transfert d'électrons par le domaine d'activation EAD.

Le gène codant pour cette protéine s'appelle *NCF2*, situé au niveau du chromosome 1 dans la région 1q25, de taille égale à 40 kb, contient 16 exons et donne un ARNm de taille 2.4 kb (Francke et al., 1990).



Figure 11. Structure de la p67phox. (D'après Durand et al., 2010)

iii. La p40phox

C'est une protéine de 337 aa et de $PM \approx 40$ kDa, elle possède un domaine SH3 et un domaine PX (figure 12). Elle est fortement associée à la p67phox dans le cytosol. Le gène humain de la p40phox est une simple copie de 18 kb comportant 10 exons et localisé sur le chromosome 22q13.1. L'expression des ARNm est limitée aux cellules hématopoïétiques à l'exception des cellules érythrocytaires (Zhan et al., 1996). La fonction exacte de la p40phox reste à

déterminer. De nombreuses hypothèses ont été émises sur un rôle stimulateur ou inhibiteur de la NADPH oxydase ; son rôle stimulateur semble maintenant admis (Chessa et al., 2010).

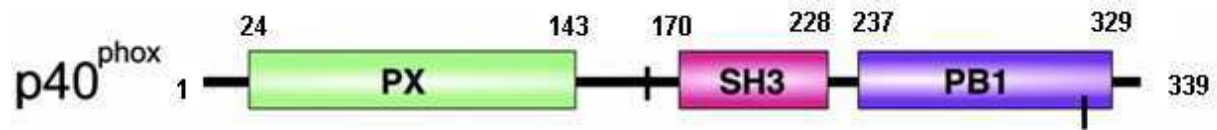


Figure 12 : Domaines structuraux de p40phox. (D'après Groemping et al., 2005)

iv. La petite protéine G Rac 2

Elle est composée de 192 acides aminés, et a un poids moléculaire de 21 kDa. Elle est codée par le gène *RAC2* situé sur le chromosome 22q13.1. C'est une petite protéine G monomérique, elle appartient à la famille de GTPases de la sous-famille Rho qui sont impliquées dans la régulation d'une grande variété de processus cellulaires importants comme l'organisation du cytosquelette, l'orientation et la migration cellulaire. Il existe 3 protéines Rac: Rac1 est exprimée ubiquitairement (Moll et al., 1991), Rac2 est spécifique des cellules hématopoïétiques (Didsbury et al., 1989; Moll et al., 1991) et Rac3 est trouvée dans le cerveau mais aussi dans le cœur, le placenta et le pancréas (Haataja et al., 1997). Rac1 et Rac 2 ont 92% d'identité de séquence d'acides aminés (Didsbury et al., 1989), jouent un rôle très important dans la formation d'un complexe NADPH oxydase actif (Heyworth et al., 1993). *In vivo* et *in vitro*, Rac1 ou Rac2 sont essentielles pour la reconstitution et/ou la fonction d'un complexe oxydasique actif (Abo et al., 1991; Knaus et al., 1991; Gabig et al., 1995). La protéine Rac2 possède un domaine RHO (Ras homology domain) (6-179) qui renferme toutes les séquences nécessaires à l'activité des protéines de la famille Ras-like qui sont : un domaine effecteur (a.a. 143-192), un domaine appelé «Insert region» (a.a. 124-135) et un troisième appelé «effecteur Ras-Like» (a.a. 26-45). Dans les PN humains, Rac2 est la forme prédominante (Knaus et al., 1991; Heyworth et al., 1993), elle joue un rôle critique dans la régulation du cytosquelette d'actine (Cassimeris et al., 1992) et un rôle important dans la génération de l'anion superoxyde par la NADPH oxydase (Heyworth et al., 1994; Dorseuil et al., 1996). Pendant l'activation de cette enzyme, elle transloque à la membrane sous sa forme active: Rac-GTP, après sa dissociation de la protéine GDI (GDP-Dissociation-Inhibitor) (Geiszt et al., 2001). Sa translocation est indépendante de celle des composants cytosoliques de la NADPH oxydase. Il a été suggéré qu'elle interagit avec le cytochrome b_{558} (Heyworth et al., 1994) et la p67phox qui interagit préférentiellement avec Rac2 plutôt qu'avec Rac1 (Dorseuil et al., 1996).

2. La granulomatose septique chronique

Des mutations dans l'un des gènes qui codent pour les principales protéines de la NADPH oxydase (gp91phox/NOX2, p22phox, p47phox, p67phox, p40phox) peuvent conduire à un déficit immunitaire sévère appelé la granulomatose septique chronique ou chronic granulomatous disease «CGD» en anglais (Roos et al., 1996). Il s'agit d'une maladie génétique dans laquelle les phagocytes ne produisent pas de FRO. La CGD est caractérisée par des infections bactériennes et fongiques graves et récidivantes. Les formes les plus fréquentes (2/3 des cas) sont dues à des mutations dans le gène *CYBB* codant pour NOX2 (Teahan et al., 1987; Dinauer et al., 1987; Roos et al., 1996 ; Morel., 2007). Ce gène se trouve sur le chromosome X. De telles mutations entraînent le plus souvent l'absence du cytochrome b₅₅₈ (Segal et al., 1987) ; en effet, NOX2 et la p22phox sont coexprimées et l'absence de NOX2 est accompagnée de l'absence de la p22phox et vice versa. Certaines formes rares de CGD liées à l'X expriment une protéine NOX2 non fonctionnelle (Cross et al., 1995). Les autres formes connues de CGD sont autosomales récessives et résultent de l'absence de la p47phox (25% des cas), de la p67phox (<5% des cas) ou de la p22phox (<5% des cas) (Volpp et al., 1988; Nuno et al., 1988). Une patiente déficiente en p40phox a récemment été décrite se caractérisant par un déficit de production de FRO intracellulaire par les stimuli particuliers phagocytés (Matute et al., 2009). En général, le diagnostic de la CGD repose sur l'incapacité des PN du malade à produire des FRO en réponse à différents stimuli. La caractérisation de ces mutations et l'étude des dysfonctionnements qu'elles provoquent dans l'assemblage du complexe ou dans son activation apportent des données complémentaires aux études *in vitro* dans la compréhension des mécanismes d'activation de la NADPH oxydase.

3. Les NADPH oxydases non phagocytaires

Durant les années 90, l'amélioration de la sensibilité des techniques de mesures des FRO a permis la détection de faibles quantités dans différents types cellulaires autres que les cellules phagocytaires (épithéliales, musculaires, endothéliales, neuronales...).

Leur production a d'abord été attribuée à la respiration mitochondriale mais l'utilisation d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire et des flavoenzymes a prouvé qu'une flavoprotéine similaire à NOX2 en était responsable. La première enzyme homologue de NOX2 a ainsi été décrite en 1999 (Suh et al., 1999). Ces enzymes sont définies par leur homologie avec la gp91phox renommée NOX2. Actuellement, six enzymes homologues de NOX2 ont été

découvertes et répertoriées dans deux sous-familles : NOX 1-5 (pour NADPH oxidase) et DUOX 1-2 (pour Dual oxidase)

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

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

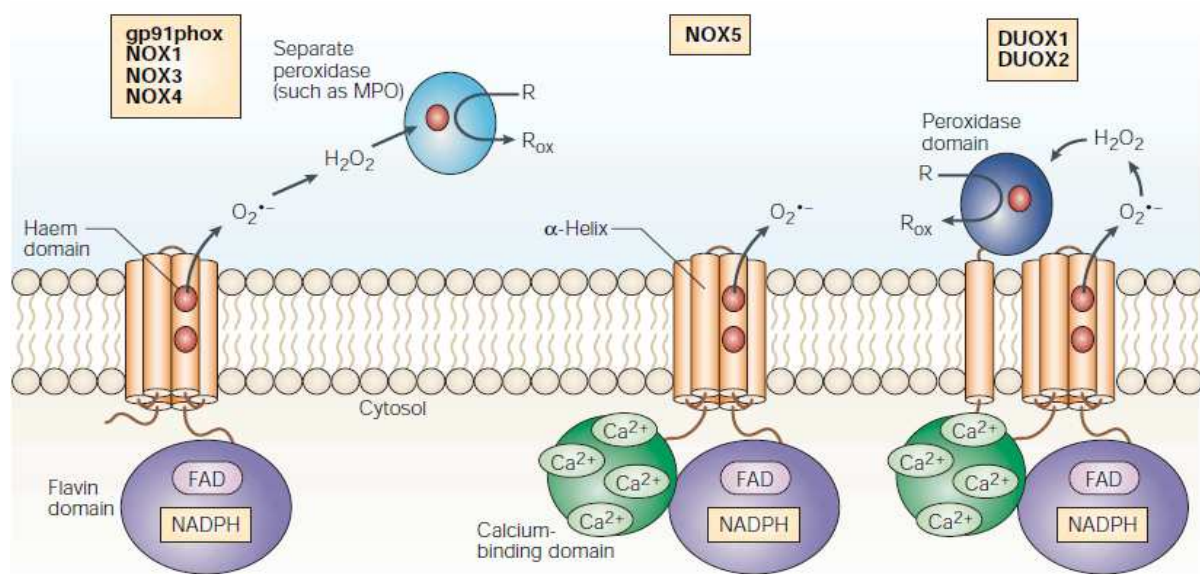


Figure 13. Représentation schématique des enzymes NOX et DUOX. Toutes les NADPH oxydases sont des protéines à plusieurs passages transmembranaires possédant un flavo domaine cytosolique leur permettant de lier le FAD et le NADPH. Nox5 et les Duox possèdent de plus un domaine de liaison du calcium alors que ces dernières possèdent de plus un domaine peroxydase luminal. (D'après Lambeth et al., 2004)

Les Nox1, 3 et 4, tout comme Nox2, forment un hétérodimère avec p22phox, une association qui est absolument requise pour qu'elles soient fonctionnelles. La régulation de Nox1 est la plus proche de celle de Nox2. Nox1 a besoin d'un facteur « organisateur », d'un facteur « activateur » et de Rac. Des analogues de p47phox et de p67phox ont été identifiés : respectivement NoxO1 (Nox organizer 1) et NoxA1 (Nox activator 1) (Banfi et al., 2003 ; Takeya et al., 2003). Nox1 produit l' $O_2^{\cdot-}$ en présence de ces deux analogues de p47phox et p67phox. Contrairement à Nox1 et Nox2, Nox3 est capable de produire des $O_2^{\cdot-}$ en absence d'un « organisateur » ou d'un « activateur ». Cependant, son activité est fortement améliorée par p47phox, p67phox, Noxo1 et/ou Noxa1, cette amélioration étant variable selon la combinaison de facteurs cytosoliques choisie (Cheng et al., 2004).

V. Les différents états d'activation de la NADPH oxydase dans les PN: Rôle de la phosphorylation de la p47phox et des interactions moléculaires

En passant de la circulation sanguine au site infectieux, la NADPH oxydase des PN passe d'un état de repos total ou dormant à un état activé. Cependant il est clair aujourd'hui, que

dans de nombreuses situations physiologiques, ce passage ne se fait pas de façon brutale, mais qu'une étape intermédiaire prépare à l'activation c'est le « priming ». De plus après l'activation une étape d'arrêt et d'inhibition est nécessaire pour limiter l'activation dans le temps et aider à la résolution de l'inflammation.

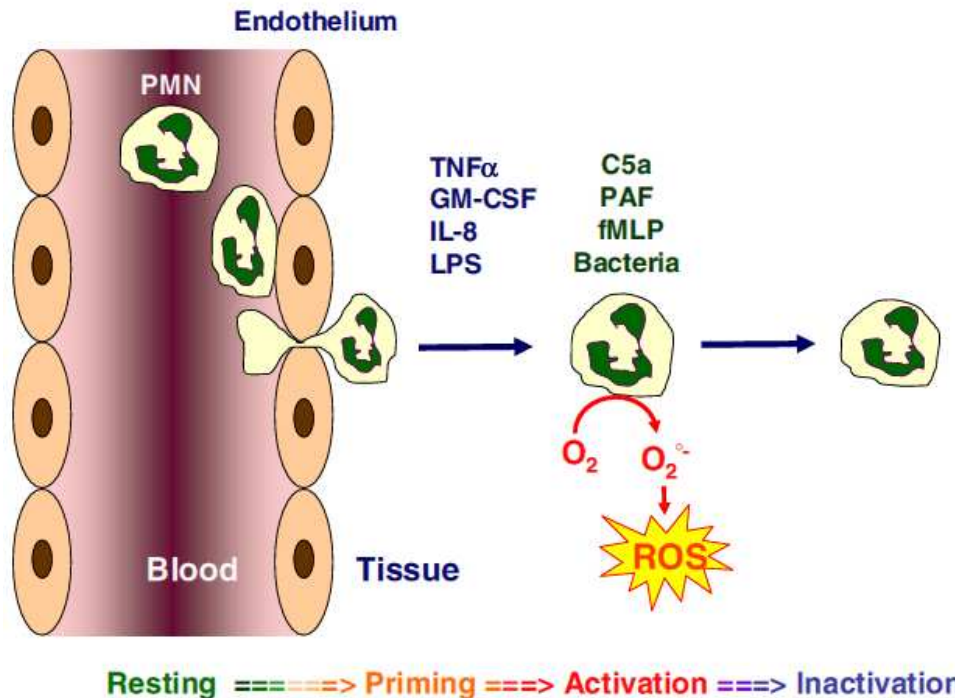


Figure 14. Les différents états d'activation des PN. (D'après El Benna et al., 2008)

Les mécanismes d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire sont complexes. Comme je l'ai décrit ci-dessus, la NADPH-oxydase est formée de différents composants protéiques dispersés entre les membranes et le cytosol dans le PN au repos. Sous l'influence de différents stimuli déclenchant différentes voies transductionnelles, ces composants transloquent vers la membrane où leur regroupement déclenche le transfert d'électrons à partir du NADPH sur l'oxygène moléculaire, source des différentes FRO. L'activation est contrôlée principalement par des événements de phosphorylation, d'activation de petites protéines G et d'interactions moléculaires entre les sous-unités de la NADPH oxydase et avec d'autres composants cellulaires comme le cytosquelette.

La sous-unité p47phox joue le rôle « d'organisateur » ou « d'adaptateur » en permettant la translocation de p67phox et p40phox à la membrane, la régulation de l'activation de la NADPH oxydase est sous l'effet, en général, de la régulation de la phosphorylation de cette sous-unité.

1. La NADPH oxydase au repos

Dans les PN non stimulés, la NADPH oxydase est en état de repos et ses composants cytosoliques forment un complexe dans le cytosol. Ils interagissent entre eux via leurs domaines structuraux. En absence de stimulation, la p47^{phox} est non phosphorylée, elle est maintenue sous une conformation auto-inhibée (Yuzawa et al., 2004 ; Durand et al., 2006 ; Marcoux et al., 2009). Dans cette conformation, le domaine PX et la région auto-inhibitrice AIR interagissent simultanément avec le tandem SH3 de la protéine. Cette interaction intramoléculaire prévient le recrutement de la p47^{phox} à la membrane en absence de stimulation. D'un autre côté, la p67^{phox} se lie à la fois à la p40^{phox} par les domaines PB1/PB1 et la p47^{phox} par une interaction SH3/PRR (Lapouge et al., 2002 ; Leto et al., 1994). Rac2 est aussi localisée dans le cytosol, elle se trouve liée à son inhibiteur RhoGDI (Rho Guanosine-5'-diphosphate dissociation inhibitor) (Kwong et al., 1993).

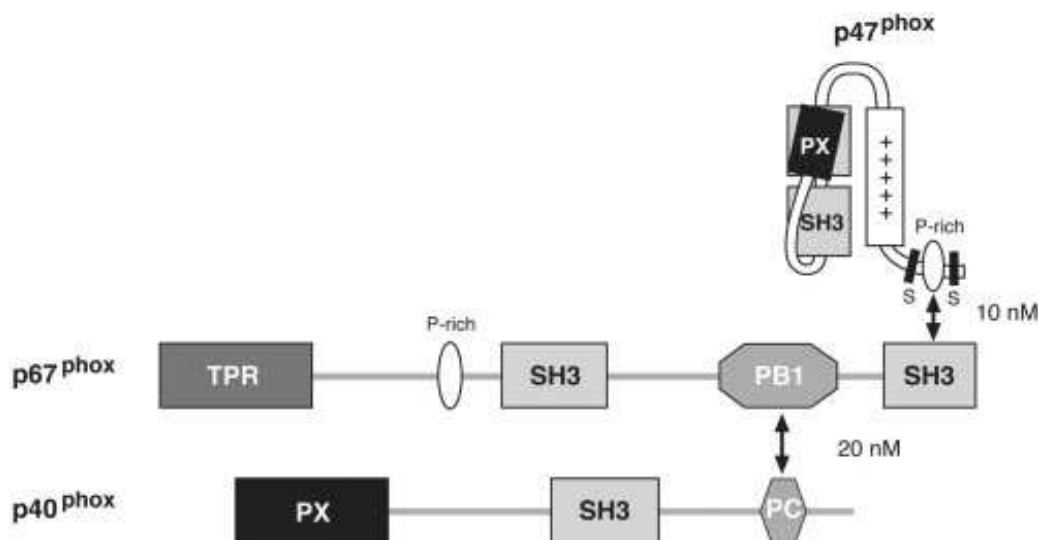


Figure 15. Les interactions moléculaires des sous unités de la NADPH oxydase à l'état non stimulé. (D'après Lapouge et al., 2002)

Le cytochrome b558 est localisé en grande partie (~ 80%) dans les granules (spécifiques), et seulement 5 à 20 % sont retrouvés au niveau de la membrane plasmique (Ginsel et al., 1990). Lors de l'activation du neutrophile, les granules fusionnent à la fois avec la membrane de la vacuole phagocytaire mais aussi avec la membrane plasmique (Smith et al., 1982).

2. Le priming de la NADPH oxydase

Le priming peut être traduit par amorçage, il est défini *in vitro* par le fait qu'un prétraitement par un premier stimulus ne déclenchant pas lui-même la production de FRO, augmente la

réponse à un second stimulus ajouté ultérieurement. Les premières observations d'un tel effet « primant » ont été faites en mettant en évidence une potentialisation de la production de FRO par prétraitement des PN par des facteurs chimioattractants. Différents agents peuvent induire le priming de la NADPH oxydase : certaines cytokines telles que le $TNF\alpha$, le « granulocyte-macrophage colony stimulating factor » (GM-CSF), le « granulocyte colony stimulating factor » (G-CSF), l'IL-8, (Elbim et al., 1994; Downey et al., 1995), certains agonistes de TLRs comme le LPS (El Benna et al., 2008) (Tableau 3, page 43). Ces conditions de pré-activation augmentent la réponse à différents stimuli tels les N-formyl-peptides, le C5a ou encore le PAF ou le LTB4. Ces phénomènes de « priming » sont aussi observés *ex vivo* après traitement de certains patients par du G- ou GM-CSF (Khwaja et al., 1992).

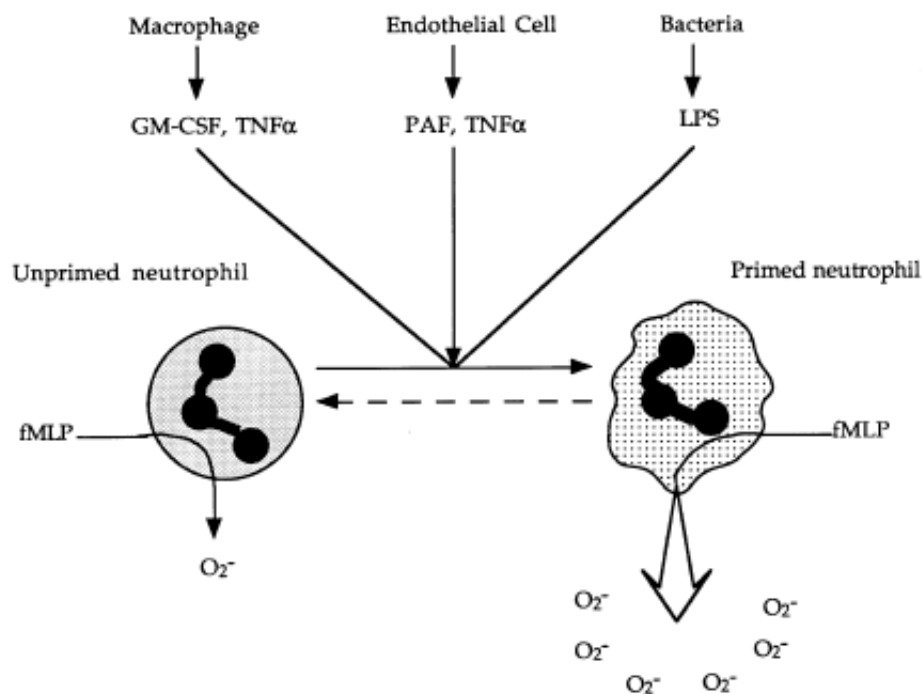


Figure 16 : Le phénomène de priming des PN. Les PN stimulés par le fMLF produisent une faible quantité d'anion superoxyde. En présence d'agents primants tels que le $TNF\alpha$, le GM-CSF, le PAF ou le LPS les PN produisent une quantité beaucoup plus importante d'anion superoxyde en réponse au fMLF. (D'après Condliffe et al., 1998)

Tableau 3: Les différents agents primants et activateur des PN (El Benna et al., 2008)

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

Au cours du priming de l'explosion oxydative induite par le TNF α ou le GM-CSF, l'expression du récepteur fMLF à la surface du PN est augmentée (McColl et al., 1990) et les voies phosphoinositides 3-kinase (PI3K) et la phospholipase D (PLD) sont activées (Cadwallader et al., 2002 ; Bourgoïn et al., 1990). D'un autre coté, ces cytokines induisent l'activation de la phospholipase A2 (PLA2) (Bauldry et al., 1991). Toutes ces voies sont impliquées en amont dans le priming et l'activation de la NADPH oxydase.

Les conséquences du priming sur les composants de la NADPH oxydase, en particulier sur l'état de phosphorylation de la p47phox ont été étudiés par mon équipe d'accueil qui a montré que le GM-CSF ainsi que le TNF induisaient une phosphorylation partielle de la p47phox sur une sérine (Ser345) présente au sein d'une séquence consensus de reconnaissance pour les

MAPKs (de type –PXSP-) (Dang et al., 1999; Dewas et al., 2003, Dang et al., 2006). Les résultats suggéraient que différentes MAPK convergent pour phosphoryler la Ser345 de la p47phox, permettant ainsi une potentialisation de la production des FRO par les PN. Notre équipe a récemment montré qu'une proline isomérase (Pin1) se fixant sur la sérine 345 phosphorylée lors du priming par le TNF α induisait un changement de conformation de la p47phox facilitant sa phosphorylation par d'autres kinases notamment les PKC. Une accessibilité plus facile de ces kinases, complétant la phosphorylation de la p47phox, permettrait une translocation plus rapide à la membrane des protéines cytosoliques. (Boussetta et al., 2010).

Le priming des PN par le TNF α ou le LPS induit la mobilisation du cytochrome b_{558} à partir de granules spécifiques à la membrane plasmique par le biais de l'activation de la p38MAPK (De Leo et al., 2000 ; Ward et al., 2000). Toutefois, l'activation ultérieure par le fMLF induit une translocation rapide et forte des composants cytosoliques à la membrane plasmique où ils se lient au cytochrome b_{558} déjà mobilisé (El Benna et al., 2008).

3. Activation de la NADPH oxydase

La production des FRO par les PN peut être induite par des agents solubles et particuliers. Les agonistes solubles qui induisent cette production sont le fragment du complément C5a, les N-formyl peptides d'origine bactérienne dont le prototype est le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLF), le leucotriène B4 (LTB4), le «platelet activating factor» (PAF), les endotoxines bactériennes, les ionophores calciques (comme le A23187), les esters de phorbol comme le phorbol myristate acétate (PMA), un activateur direct de plusieurs isoformes de la PKC (Tableau 3). Les agonistes particuliers qui stimulent la production des FRO sont les agents pathogènes, le zymosan ou des particules de latex plus ou moins opsonisées. Ces stimulants induisent une cascade de signaux faisant intervenir des protéines G, des phospholipases et des kinases qui aboutissent à une forte phosphorylation de la p47phox dans la région C-terminale, à une faible phosphorylation de la p67phox et de la p40phox et à la libération de la protéine G Rac2 de son inhibiteur Rho-GDI à la suite d'une substitution du GDP par GTP. Le tout (p47phox, p67phox, p40phox et Rac2) migre vers la membrane pour former avec le cytochrome b_{558} la NADPH oxydase active (El Benna et al., 2010).

a. Phosphorylation des sous unités de la NADPH oxydases

Bien qu'il existe différents mécanismes moléculaires intervenant dans l'activation de la NADPH oxydase, les mécanismes de phosphorylation des différentes sous-unités jouent un rôle essentiel dans cette activation et nous les décrivons dans les paragraphes suivants.

i. Phosphorylation de la p47phox

La p47phox est la sous-unité la plus largement phosphorylée et la plus étudiée. Elle possède 10 sites de phosphorylation actuellement identifiés, situés dans la région C-terminale dans les domaines AIR et PRR (Figure 17). Les acides aminés phosphorylés sont les sérines 303, 304, 315, 320, 328, 345, 348, 359, 370 et 379 (El Benna et al., 1994, 2009 ; Faust et al., 1995; Fontayne et al., 2002). Il n'est pas encore clairement établi si toutes ces sérines sont phosphorylées lorsque la protéine est encore cytosolique ou lors de son assemblage à la membrane plasmique au niveau du cytochrome b558.

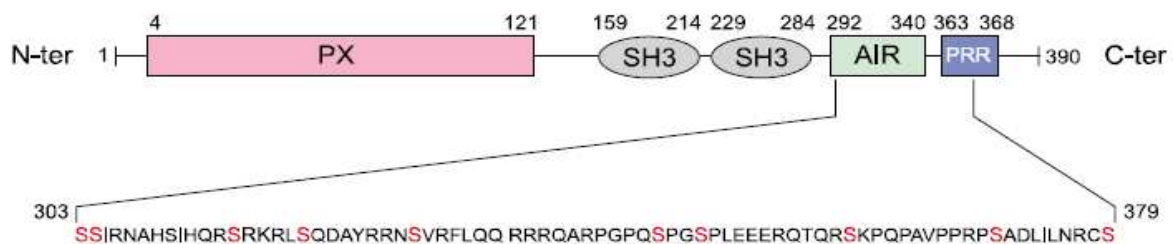


Figure 17: Structure de la p47phox. Les sites potentiels de phosphorylation dans la région C-terminale sont en rouge. (D'après El Benna et al., 2009)

De plus, l'ordre de succession des phosphorylations n'est que partiellement connu. La principale fonction de la p47phox est de permettre la translocation de l'hétérotrimère p40phox-p67phox-p47phox à la membrane et de le positionner correctement au niveau du cytochrome b558. Au cours de la stimulation du neutrophile par des agonistes de l'oxydase, la p47phox subit des événements de phosphorylation, notamment au niveau des sérines localisées dans la région AIR (Sérines 303 à 328) (Figure 17). La phosphorylation simultanée des sérines 303, 304 et 328 dans le domaine AIR, en coopération avec d'autres agents comme l'acide arachidonique (AA), induit une ouverture de la structure de la p47phox, exposant les domaines SH3 et le domaine PX (Ago et al., 1999 ; Shiose et al., 2000 ; Marcoux et al., 2009) (Figure 18). La p47phox peut alors s'associer à la p22phox et aux phosphatidylinositides membranaires par le domaine PX. Les trois derniers sites de phosphorylation de la p47phox

sont localisés dans la région de fixation au domaine SH3B de la p67phox. Les sérines 359 et 370 entourent la région PRR (362- 369) et la sérine 379 se trouve dans le coude entre les deux hélices α du motif non-PxxP impliqué dans la fixation de la p67phox. La substitution des sérines 359 et 370 en alanines réduit radicalement la phosphorylation globale de la p47phox, ce qui conduit à un défaut de translocation et à une inhibition sévère de la production d' $O_2^{\cdot-}$. La phosphorylation de ces deux sérines précède et initie la phosphorylation des autres résidus sérines de p47phox (Johnson et al., 1998). Lors de l'activation, p47phox se présente sous différentes formes plus ou moins phosphorylées, ce qui confirme l'hypothèse d'une phosphorylation graduelle de p47phox. Concernant la phosphorylation de Ser379, localisée dans la zone d'interaction avec p67phox, son rôle prète plus à débat. Il a été clairement établi que la substitution de cette sérine par une alanine provoquait une perte de translocation de p47phox et inhibait la fixation de p67phox à la séquence C-terminale de la p47phox (Faust et al., 1995; Massenet et al., 2005; Mizuki et al., 2005). Certains auteurs suggèrent que la phosphorylation de Ser379 lors de l'explosion oxydative stopperait l'activité oxydase en entraînant la dissociation de la p67phox (Mizuki et al., 2005).

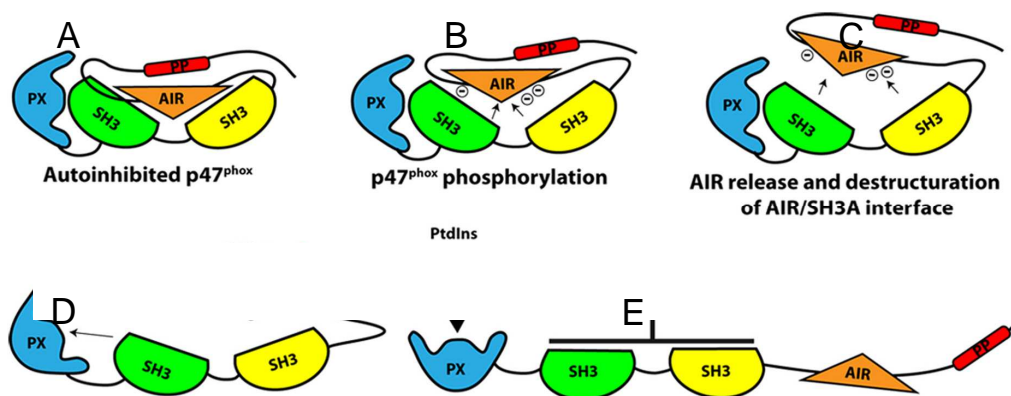


Figure 18: Représentation schématique du changement de conformation de la p47phox au cours de l'activation de la NADPH oxydase. (A) La p47phox est en conformation auto-inhibée, le domaine AIR interagit avec les deux domaines SH3A et SH3B (en vert et jaune), SH3 interagit avec le domaine PX (en bleu). (B) Au cours de l'activation, les sérines au niveau c-terminale de la p47phox sont phosphorylées. (C) et (D) La phosphorylation des sérines induit la libération des domaines SH3 par les domaines AIR et PX. (E) Les domaines PX et SH3 interagissent respectivement avec les phosphoinositol-3,4-biphosphate (PtdIns (3,4)P₂) et la p22phox respectivement. (D'après Marcoux et al., 2010)

ii. Phosphorylation de p67phox

Le facteur cytosolique p67phox subit quelques phosphorylations mais leur rôle n'est pas encore clairement établi. Indépendamment de la p47phox, la p67phox est phosphorylée durant l'activation de l'oxydase (Dusi et al., 1993; El Benna et al., 1997 ; Forbes et al., 1999). La signalisation responsable de cette phosphorylation peut emprunter plusieurs voies : elle est intégralement PKC-dépendante avec le PMA mais partiellement PKC indépendante lors d'une stimulation par le fMLF (El Benna et al., 1997). Le site majeur de phosphorylation de la p67phox est la Thr233 (Forbes et al., 1999) mais la présence d'autres sites a été mise en évidence, notamment au niveau de sérines (El Benna et al., 1997 ; Dang et al., 2003). P67phox est ciblée par les MAPKs ERK1/2 et p38 lors d'une stimulation au PMA et au fMLF (Dang et al., 2003). L'effet de ces kinases est additif et certains de leurs sites cibles semblent différer.

Tout comme la p47phox, il se pourrait que la p67phox ait une conformation auto-inhibée au repos. En effet, un site de phosphorylation de la portion C-terminale de la p67phox (244-526) semble masqué par la portion N-terminale dans la protéine intacte, et ne devenir accessible qu'après un changement de conformation de la protéine (Dang et al., 2003 ; Durand et al., 2010). En outre, cette moitié C-terminale a un effet négatif sur l'activation de l'oxydase *in vitro* en système acellulaire (Hata et al., 1998).

iii. Phosphorylation de p40phox

Le facteur p40phox subit des phosphorylations lors de la stimulation de l'oxydase, ces événements se produisant en corrélation avec la production d'O₂⁻ (Fuchs et al., 1997). P40phox est phosphorylée sur des résidus sérine et thréonine dont au minimum les résidus Thr154 et Ser315 (Bouin et al., 1998). Ces phosphorylations semblent être effectuées directement par la PKC durant l'activation du neutrophile. Or, au repos, une interaction intramoléculaire du domaine PX (résidus 24-143) avec le domaine PB1 (résidus 237-329) semble empêcher la liaison de p40phox au PI(3)P dans la membrane phagosomale (Ueyama et al., 2007). Il est envisageable que certains des événements de phosphorylation de p40phox lèvent cette interaction intramoléculaire, notamment la phosphorylation de la Ser315 dans le domaine PB1.

iv. Phosphorylation de p22phox

La sous-unité p22phox subit une phosphorylation sur les résidus thréonines durant l'activation de la NADPH oxydase par le PMA, fMLF et le zymosan opsonisé (Regier et al., 2000). *In vitro*, la p22phox est le substrat d'une kinase activée par l'acide phosphatidique (kinase PAAK) et le substrat des isoformes conventionnelles de PKC α et β (Regier et al., 1999). Deux thréonines sont localisées dans un motif consensus de phosphorylation : Thr132 dans un motif de phosphorylation par la caséine kinase II, et Thr147 dans un motif de phosphorylation par la PKC.

v. Phosphorylation de NOX2

Récemment, notre équipe a mis en évidence la phosphorylation de NOX2 dans le neutrophile humain lors d'une activation par le PMA, le fMLF et l'OpZ (Raad et al., 2009). Cette phosphorylation de NOX2, qui est médiée par la PKC, favorise l'interaction avec la p47phox, p67phox et Rac2, et améliore l'activité diaphorase. NOX2 est phosphorylée dans sa région cytosolique C-terminale au niveau des séquences 321-405 et 466-570. Ces séquences contiennent trois sites potentiels de phosphorylation par la PKC : Ser333, Thr309 et Ser550.

b. Activation de Rac2

L'activation du PN induit la dissociation de RhoGDI et la translocation de Rac à la membrane (Quinn et al., 1993 ; Abo et al., 1994). En liant le GTP, rac est convertie sous sa forme active, sous l'action d'une protéine GEF (GDP/GTP exchange factor). Rac va alors s'associer à la p67phox et au cytochrome b558 et permettre l'activation de l'oxydase.

c. Interactions moléculaires des sous-unités de la NADPH oxydase lors de son activation

Dans les cellules au repos, différentes interactions entre les trois facteurs cytosoliques p47phox, p67phox et p40phox ont été mises en évidence. La combinaison exacte de ces interactions n'est cependant pas totalement établie. L'ensemble de ces interactions est résumé dans la figure ci-dessous.

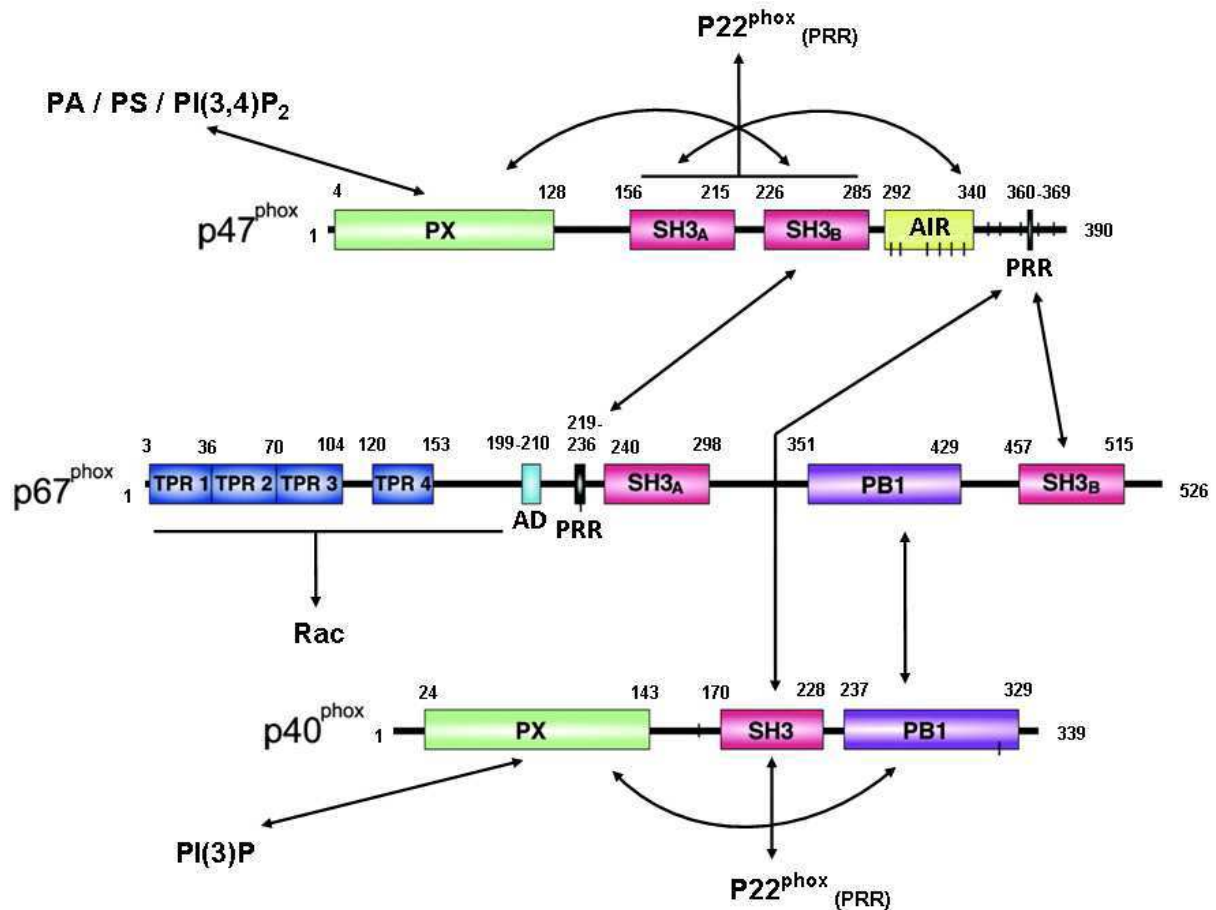


Figure 19: Représentation schématique des interactions possibles entre les facteurs cytosoliques p47phox, p67phox et p40phox selon les modèles structuraux de Groemping et al., 2005. Les flèches indiquent toutes les interactions démontrées expérimentalement. Les interactions des facteurs cytosoliques avec p22phox et les lipides de la membrane plasmique sont aussi présentées.

Pendant l'activation de l'oxydase, la p47phox est phosphorylée sur plusieurs résidus sérine ; elle change alors de conformation et ses domaines SH3 en tandem se dévoilent pour interagir avec le domaine riche en proline de la p22phox (Huang et al., 1999; Hata et al., 1998; Groemping et al., 2003) ; le domaine SH3 en C-terminal de la p67phox interagit alors à la fois avec la région riche en proline PRR (a.a. 360-369) et une région flanquée en C-terminal de la p47phox (Mizuki et al., 2005). De plus, le domaine PX de la p47phox interagit avec des phospholipides comme les phosphatidylinositols, pour contribuer en partie à l'accrochage de l'enzyme à la membrane plasmique. Le domaine PX n'est accessible aux phosphatidylinositols qu'au moment de l'activation (Stahelin et al., 2002); il assure un rôle crucial dans l'assemblage d'une oxydase fonctionnelle (Ago et al., 2003). En plus de ces interactions, De Leo et collaborateurs ont montré par la technique de «phage display» la

présence de deux régions d'interaction entre la p47phox et la p67phox, qui sont : les résidus 323-332 et les résidus 361-370 du domaine d'interaction SH3 de la p47phox comme sites d'interaction de la p47phox avec la p67phox (De Leo et al., 1996). Il a été montré que cette même région (323-332) est un site d'interaction pour le flavocytochrome b (De Leo et al., 1995). De plus, en utilisant les techniques d'interaction par affinité, ils ont montré que la p67phox et le cytochrome b₅₅₈ entrent en compétition pour interagir avec cette région, ce qui suggère qu'il y a une sorte d'échange d'interaction entre les deux protéines pour cette même région en fonction des étapes d'activation de la NADPH oxydase et que cette région assure un rôle important dans la régulation des interactions entre les deux protéines. De plus, un domaine situé dans la région N-terminale de la p67phox dit «domaine d'activation» (a.a. 199-210) interagit avec le cytochrome b₅₅₈ pour réguler l'étape 1 du transfert d'électrons (du NADPH au FAD) (Nisimoto et al., 1998). Ensuite les motifs TRR de la p67phox s'engagent en une interaction avec Rac-GTP (Koga et al., 1999).

d. Les kinases qui contrôlent la phosphorylation des composants de l'oxydase et son activation

i. La protéine kinase C

La protéine kinase C (PKC) est une sérine/thréonine kinase, qui phosphoryle les protéines au niveau des séquences consensus: -R/KXS/T- ou S/TXR/K-. La PKC est une famille de 11 isoformes classées en 3 groupes sur la base de leur structure et leur mode d'activation : 1) les PKC classiques ou conventionnelles (cPKC) (α , β I, β II, et γ), celles-ci requièrent le Ca²⁺, le diacyl glycérol (DAG) et la phosphatidylsérine pour leur activation, les PKC nouvelles (nPKC) (δ , ϵ , η , et θ) qui utilisent le DAG mais pas le Ca²⁺ pour leur activation, et les PKC atypiques (aPKC) ($M\zeta$, ι et λ) qui ne requièrent ni le Ca²⁺, ni le DAG pour leur activation (Mellor et al., 1998; Nishizuka et al., 1995, 1986; Dekker et al., 1994). La PKC est impliquée dans de nombreux processus de signalisation. Le rôle de la PKC dans la transduction du signal a été étudié grâce au fait que cette kinase est un récepteur aux esters de phorbol (Castagna et al., 1982) qui sont largement utilisés pour une activation directe des PKC. Quand les PN sont stimulés par le PMA, celui-ci active directement la PKC et induit une forte production d'O₂⁻, ainsi qu'une forte phosphorylation de la p47phox et de la p67phox. Les inhibiteurs de PKC (staurosporine, GF109203X) inhibent fortement la production d'O₂⁻, le transfert à la membrane et la phosphorylation de la p47phox et de la p67phox (Nauseef et al., 1991). Les PN expriment constitutivement 3 formes de PKCs conventionnelles α , β I, β II, une

isoforme de PKC nouvelle δ et une isoforme atypique ζ (Kent et al., 1996). Plusieurs données dans la littérature ont traité les fonctions des PKCs dans les PN et suggéré qu'elles jouent un rôle dans l'activation de l'oxydase. En effet, les isoformes de PKC α , β 1, β 2, ζ et δ s'activent lors de la stimulation par le fMLF ou le PMA et migrent à la membrane de façon corrélée avec l'activation de la NADPH oxydase (Curnutte et al., 1994; Nixon et al., 1999). Cependant, l'isoforme de PKC la mieux caractérisée est la PKC β qui est l'isoforme la plus abondante dans le PN. Ainsi celle-ci peut phosphoryler la p47phox. Une interaction directe entre la PKC et la partie C-terminale de la p47phox a été mise en évidence (Reeves et al., 1999). Notre équipe a montré que la PKC ζ est impliquée dans les voies de signalisation conduisant à l'activation de la NADPH oxydase en phosphorylant la p47phox via les récepteurs du fMLF et par la suite joue un rôle dans la régulation de la fonction bactéricide du PN (Dang et al., 2001). Notre équipe a montré aussi que toutes les PKC exprimées dans le PN phosphorylent la p47phox en système acellulaire, induisent une liaison de celle-ci avec le cytochrome b558 et sont capables par conséquent d'induire la production d'O₂⁻ *in vitro* (Fontayne et al., 2002). Fuchs a montré une phosphorylation de la p40phox par la PKC (Fuchs et al., 1997). D'ailleurs, d'autres auteurs ont montré que dans les monocytes stimulés par le zymosan opsonisé, la p67phox est phosphorylée par la PKC (plus précisément la PKC δ) jouant par la suite un rôle important dans la génération d'anion superoxyde (Zhao et al., 2005).

ii. Les MAP kinases

Les MAP kinases (Mitogen Activated Protein kinases) sont des protéines ubiquitaires impliquées dans des fonctions cellulaires variées. Trois grandes familles de MAP kinases (ERK1/2, p38, c-Jun N-terminal kinase ou JNK) ont été identifiées, qui correspondent à des voies de signalisation en cascade. Ces voies de signalisation jouent des rôles importants dans les fonctions cellulaires : de l'apoptose à la prolifération, différenciation, voire même la plasticité neuronale. La p38MAPK et les ERK1/2 sont les plus impliquées dans l'activation de la NADPH oxydase. Les données de la littérature montrent que ces kinases sont impliquées dans le priming de l'explosion oxydative (McLeish et al., 1998) mais aussi dans l'activation de la NADPH oxydase (El Benna et al., 1996a, b; Krump et al., 1997) et la production des FRO. Notre équipe a montré que ERK1/2 jouent un rôle prédominant dans la phosphorylation de la p47phox lorsque les PN sont activés par du fMLF (Dewas et al., 2000) et que ERK1/2 et p38 sont aussi impliquées dans la phosphorylation de la p67phox (Dang et al., 2003).

iii. Les PI3 kinases

Les PI3K forment une famille d'enzymes hétérodimériques phosphorylant des phosphoinositides membranaires (PI), sur la position 3 du groupement inositol. Les PI3 kinases sont ubiquitaires et jouent un rôle pivot dans la régulation de nombreux processus cellulaires. Elles sont réparties en trois classes majeures sur la base de leur structure et de la spécificité de leurs substrats, et sont généralement constituées d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice : La classe I, les enzymes de cette classe sont sensibles à la wortmannin et peuvent utiliser le PI, le PI(4)P et le PI(4,5)P₂ comme substrats *in vitro*. Le substrat majeur *in vivo* apparaît être le PI(4,5)P₂ - La classe II, les enzymes de cette classe peuvent phosphoryler le PI et le PI(4)P *in vitro* et montrent des réponses variables à la wortmannin. Cette classe d'enzymes contient un domaine C2 en C-terminal qui lie les phospholipides d'une manière Ca²⁺ dépendante. La classe III : Les PI3 kinases de la classe III comprennent le Vps34 qui phosphoryle le PI(3)P. L'homologue humain de Vps34 est sensible à la wortmannin et participe à la régulation du trafic membranaire endocytaire. Activées, les PI3-kinase phosphorylent le phosphoinositol (PI) pour produire le PI(3)P, PI(3,4)P₂, et le PI(3,4,5)P₃. Ces molécules agissent comme des seconds messagers et recrutent la PDK1 (une serine/thréonine kinase PI3K-dépendant) et l'Akt du cytoplasme à la membrane plasmique (Dong et al., 1999; Lawlor et al., 2001; Scheid et al., 2003). Les PN possèdent deux classes de PI3Ks : l'hétérodimère classique p85/110 et une nouvelle PI3K régulée par la sous- unité βγ de la protéine G : La PI3Kγ (Stephens et al., 1994). Grâce à l'utilisation de leurs inhibiteurs sélectifs comme la wortmannine et le LY294002, Curnutte et collaborateurs ont mis en évidence l'implication et le rôle assuré par cette kinase dans l'activation de la NADPH oxydase et la dégranulation par les chimioattractants (Curnutte et al., 1994). Karlsson a montré que le PMA pouvait induire une production d'O₂⁻ intracellulaire d'une façon dépendante de la PI3K (Karlsson et al., 2000). D'autre part, des PN de souris PI3K^{-/-} ne produisent pas l'O₂⁻ lors d'une activation de l'oxydase par des facteurs chimiotactiques (Sasaki et al., 2000). La PI3Kγ est très rapidement activée dans les PN incubés avec l'IL-8 ou le fMLF (Naccache et al., 2000). La PI3Kγ et la production de PtdIns 3,4,5-P₃ sont impliquées dans les phénomènes de priming du PN par le TNFα et le GM-CSF (Cadwallader et al., 2002) et ceci pourrait agir en augmentant la liaison à la membrane de la p40phox par son domaine PX (Ellson et al., 2001). Enfin, une corrélation existe entre

l'activation des PI3K, la production d'O₂⁻ et la phosphorylation de la p47phox dans les PN stimulés par du fMLF et primés avec du GM-CSF (Kodama et al., 1999).

iv. La protéine kinase A

La protéine kinase A (PKA) est une kinase dont l'activation est dépendante de l'AMP cyclique (AMPC) (Smith et al., 1993). C'est une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle au niveau des séquences consensus: -RRXS- ou -RRXT-. Elle a été impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires, y compris la transcription, le métabolisme, la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. Elle est composée de 4 sous-unités : deux sous-unités catalytiques et deux sous-unités régulatrices. Les sous-unités régulatrices inhibent l'activité de l'enzyme. Elles ont une affinité pour l'AMPC qui entraîne la dissociation des sous-unités catalytiques, qui sont alors libérées de l'inhibition par les sous-unités régulatrices. Si le taux d'AMPC diminue, les sous-unités régulatrices perdent leur ligand et reprenant leur liaison avec les sous-unités catalytiques, les inhibent à nouveau. Les données dans la littérature ont montré que la p47phox est un substrat pour la PKA. Ainsi, sa phosphorylation peut être induite par l'addition de dibutyryl-AMPC aux cytoplastes (PN sans noyau) ou au cytosol des PN (Kramer et al., 1988). Cependant, l'élévation de l'AMPC du PN inhibe la production de FRO (Tyagi et al., 1991). La PKA en activant des phosphatases modulerait la phosphorylation de la p47phox, en accélérant sa déphosphorylation. Il a été montré en système acellulaire que l'addition de la p47phox recombinante phosphorylée par la PKA n'induit pas l'activation de l'oxydase *in vitro* (Park et al., 1997). Les données de Hwang montrent que la voie de l'AMPC/PKA joue un important rôle modulateur de l'explosion oxydative et la dégranulation dans les PN activés par du fMLF (Hwang et al., 2003).

e. Désensibilisation de la production des FRO par les PN

La régulation de la NADPH oxydase implique une désactivation du système afin d'aboutir à la résolution du phénomène inflammatoire. Il faut donc un système de régulation stricte de la NADPH oxydase. Les phénomènes de désensibilisation font appel à différents mécanismes: internalisation des récepteurs, "shedding" de certains récepteurs comme ceux du TNF α , phosphorylation des récepteurs à sept domaines transmembranaires suivie d'un découplage des signaux transductionnels par l'arrestine ou encore par l'intervention de protéines RGS (regulatory G protein signaling) à activité GTPase (Ferguson et al., 2001). Une élévation de la concentration intracellulaire de l'AMPC ainsi que l'intervention de la Protéine Kinase A

inhibent l'activation de l'oxydase et la phosphorylation de la p47phox en réponse au fMLF (Bengis-Garber et al., 1996). Par ailleurs, la transduction du signal fait intervenir des phénomènes de phosphorylation, eux-mêmes régulés par des phénomènes de déphosphorylation. Ainsi de nombreuses phosphatases existent dans le PN (CD45, Protéine Phosphatases 1 et 2A) qui permettent une déphosphorylation des composants du système conduisant ainsi à l'arrêt de son activité (Harbecke et al., 1997). Cependant, un autre mécanisme d'arrêt de l'activation de la NADPH oxydase a été suggéré: l'arrêt de l'activité oxydasique serait corrélé avec une perte du complexe p47phox/p67phox accroché au cytochrome b558 à la suite d'une hyperphosphorylation de la p47phox (Yamaguchi et al., 1995).

VI. La PAT1 (protein interacting with APP tail)

L'interaction de la région cytosolique de la p22phox avec la p47phox constitue un mécanisme majeur de l'activation de la NADPH oxydase. Cependant, d'autres protéines pourraient interagir avec la partie cytosolique de la p22phox et intervenir dans la régulation de la NADPH oxydase. L'objectif de mon travail défini dans l'introduction était de chercher une ou des protéines interagissant avec la partie cytosolique de la p22phox et susceptible(s) de moduler l'activité de la NADPH oxydase.

Mes résultats que je détaillerai plus loin dans la partie « Résultats » de ce mémoire, montrent que la partie cytosolique de la p22phox interagit avec une protéine appelée PAT1. Dans cette partie de l'introduction, je présente cette protéine.

1. Structure de PAT1

PAT1 pour « protein interacting with APP tail (APP : Amyloid precursor protein) », appelée ultérieurement APPBP2 pour « APP (cytoplasmic tail) binding protein 2 » ou encore ARA67 pour « Androgen Receptor Associated 67Kda), a été identifiée par Zheng et al en 1998 (Zheng et al., 1998) grâce à son interaction avec la protéine précurseur β amyloïde (APP) dans le système double hybride. La PAT1 reconnaît plus spécifiquement la séquence BaSS (KKKQYTSIHG) présente sur la queue de l'APP, la tyrosine de l'APP-BaSS étant critique dans cette interaction.

La PAT1 est une protéine de 585 acides aminés, avec un poids moléculaire de ~ 67 kDa et un point isoélectrique (pI) prédit à 6.9.

L'analyse du profil d'hydrophobicité de la séquence montre que la PAT1 est une protéine hydrophile. Il n'y a pas de séquence signal ni de domaines transmembranaires. L'analyse de la séquence prédit une structure globulaire pour les régions N-terminale et C-terminale de la PAT1 et une extension de 35 acides aminés (aa) sous forme de 5 « heptad repeats » qui a très probablement la forme d'une super hélice (Figure 20)

La séquence de la PAT1 montre qu'elle possède 4 séquences répétées en tandems imparfaits retrouvées dans les chaînes légères de la kinésine (CLK). La région d'homologie maximale entre la PAT1 et les CLK contient les 4 séquences de 42 aa conservées dans toutes les séquences des CLK.

a)

1 MAAVELEWIPETLYNTAISAVVDNYIRSRRDIRSLPENIQ
41 FDVYYKLYQQGRLCQLGSEFCELEVFAKVLRALDKRLLH
81 HCFQALMDHGVKVASVLAYSFSRRCSYIAESDAAVKEKAI
121 QVGFVLGGFLSDAGWYSDAEKVFLSCLQLCTLHDEMLHWF
161 RAVECCVRLRHVRNGNCKYHLGEETF[.]FKLAQTYMDKLSKHG
201 QQANKAALYGELCALLFAKSHYDEAYKWCIEAMKEITAGL
241 PVKVVVDVLRQASKACVVKREFKKAEO[.]L[.]IKHAVYLARDHF
281 GSKHPKYSDTLLDYGLYLLNVDNICQSVAIYQAALDIRQS
321 VFGGRNIHVATAHEDLAYS[.]CV[.]VHQYS[.]SGKFDNAVFHAERA
361 IGIITHILREDHLLASSKRVKALILEEIAIDCHNKETE[.]Q
401 RLLQEAHDLHLSS[.]LQLAKKAFGEFNVQTAKHYGNLGRLYQ
441 SMRKFKEAEMHIKAIQIKEQLLGQEDYEVALSVGHLASL
481 YNYDMNQYENA[.]EKLYI[.]RSIAIGKKLFGEGYSGLEYDYRGL
521 IKLYNSIGNYEKVFEYHN[.]VLSKWNRLRDRQYSVTDAL[.]EDV
561 STSPQSTEEVVQSFLISQ[.]NVEGPSC

Figure 20. Présentation de la séquence peptidique de la PAT1

La séquence des acides aminés de la PAT1. PAT1 est composée de 585 aa dont 35 aa sont supposés former les 5 « heptad repeats » (case grise) et 4 séquences répétées en tandems imparfaits sont retrouvées dans les chaînes légères de la kinésine (case blanche). Les sites prédits pour la phosphorylation par la protéine kinase C, sont notés par des points noirs (.). Heptad repeats : de 5 répétitions de 7 acides aminés.

b)

	IITHILR	EEIAIDCHNKE	
352			411
NAVFHAERAICEDHLLLASSKRVKATILTEQRLLQEAHDLHL			PAT1
CALEDLEKTSCHDHPDVATMLNILAIVYRDQNKYKEAANLLN			C-KLC
CALEDLEKTSCHDHLDVATMLNILAIVYRDQGKYKEAANLLN			s-KLC
CALEDLERTSCHDHPDVATMLNILAIVYRDQNKYKEAANLLN			D-KLC
CALEDLEKTSCHDHPDVATMLNILAIVYRDQNKYKDAANLLN			ch-KLC
CALEDLEKTSCHDHPDVATMLNILAIVYRDQNKYKDAANLLN			h-KLC
412			453
SSLQAKKAFGEFNVQTAKHYGNI GRLYQSMRKFKEAEMHI			PAT1
EALSIREKCLGESHPAVAATLNNLAVLFGKRGKFKDAEPLCK			C-KLC
DALGTREKTLGPDHPAVAATLNNLAVLYGKRGKYKDAEPLCK			s-KLC
DALSIRGKTLGENHPAVAATLNNLAVLYGKRGKYKDAEPLCK			D-KLC
DALAIREKTLGKDHPAVAATLNNLAVLYGKRGKYKEAEPLCK			ch-KLC
DALAIREKTLGKDHPAVAATLNNLAVLYGKRGKYKEAEPLCK			h-KLC
454			496
KAIQIKKQLLGOEDYEVALSVGHILASLYNYDMNOYENA EKL YL			PAT1
RALEIREKVLGDDHPDVAKQLNNLALLCQ-NQGYEEVEKY YK			C-KLC
RALVIREKVLGKDHPDVAKQLNNLALLCQ-NQGYEEVERY YQ			s-KLC
RALEIREKVLGKDHPDVAKQLNNLALLCQ-NQGYDEVEKY YQ			D-KLC
RALEIREKVLGKDHPDVAKQLNNLALLCQ-NQGYEEVEYY YQ			ch-KLC
RALEIREKVLGKDHPDVAKQLNNLALLCQ-NQGYEEVEYY YQ			h-KLC
497			537
RSIAIGKKLFCEGYSGLEYDYRGLIKLYNSIGNYEKV-FEYH			PAT1
RALEIYESKLGDDPNVAKTKNNLSSAYLKQCKYKEAEELYK			C-KLC
RALEIYQKELGDDPNVAKTKNNLASSAYLKQCKYKQAEILYK			s-KLC
RALDIYESKLGDDPNVAKTKNNLAGCYLKQGRYTEAEILYK			D-KLC
RALEIYQTKLGDDPNVAKTKNNLASCYLKQCKFKQAEETLYK			ch-KLC
RALEIYQTKLGDDPNVAKTKNNLASCYLKQCKFKQAEETLYK			h-KLC

(b) alignement des séquences répétées des CLK. Les 4 séquences répétées de 42 aa en tandems imparfaits de la PAT1 alignées avec les séquences répétées des CLK de plusieurs organismes. Les nombres indiquent la position de l'acide aminé dans la séquence de la PAT1. C-KLC, *Caenorhabditis elegans* (accession n°. [P46822](#)); s-KLC, squid (accession n°. [P46825](#)); D-KLC, *Drosophila* (accession n°. [P46824](#)); ch-KLC, chicken (accession n°. [1208772](#)); h-KLC, human (accession n°. [Q07866](#))

(D'après Zheng et al., 1998)

La séquence de PAT1 montre également qu'elle possède plusieurs domaines impliqués dans les interactions protéine-protéine ou les autres fonctions de la protéine. La figure 21 montre les principaux domaines dans la séquence de PAT1.

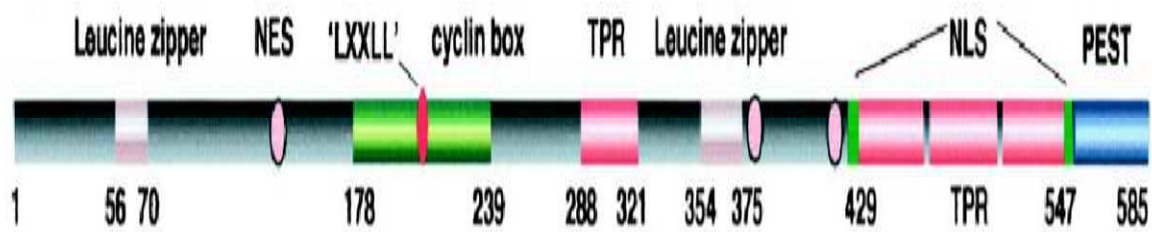


Figure. 21 Les principaux domaines de la PAT1. (D'après Gao et al., 2001)

La présence de 2 Motifs zipper à deux leucines suggère l'implication de PAT1 dans la dimérisation et la liaison à l'ADN. La séquence de PAT1 possède le domaine « cyclin box » qui est trouvé dans plusieurs kinases dépendantes de cycline (CDK), et le motif LXXLL (NR-box), présent dans les co-régulateurs de la transcription. La séquence comporte également 4 motifs TPR (tetatricopeptide repeat), présents également dans les chaînes légères de la kinésine. Le domaine PEST, impliqué dans la dégradation des protéines régulatrices ayant un « turnover » élevé, est présent à l'extrémité de la C-terminal de PAT1. De plus, la séquence de PAT1 contient des signaux de localisation nucléaire (NLS) et des signaux d'export nucléaire (NESs) ce qui suggère la capacité de PAT1 à entrer et sortir du noyau.

2. Le gène de PAT1

Fin 2006, grâce à des PCR effectuées sur une librairie d'ADNc de cerveau humain, Kuan et al identifient une séquence presque identique à celle de PAT1 précédemment identifiée et enregistrée dans la base de données sous le numéro : (GenBank accession n°. AF017782) et située sur le chromosome 17. Pour Kuan et al, il s'agit d'une séquence ayant 7 échanges de nucléotides résultant en 6 substitutions d'acides aminés par rapport à la PAT1 identifiée par Zheng et al., en 1998. Cette nouvelle séquence appelée par les auteurs PAT1a est complètement identique à une séquence qui figure dans la base de donnée sous le nom APPBP2 (APPBP2 cDNA, NM_006380; aa, NP_006371.2 ; GenBank accession n°. BC018121). Les substitutions qu'on trouve dans la séquence de l'APPBP2 par rapport à la PAT1 décrite par Zheng et al sont les suivantes : F296L, K325R, A337A, S340C, L354V, P369R, N544K. (Figure 22).

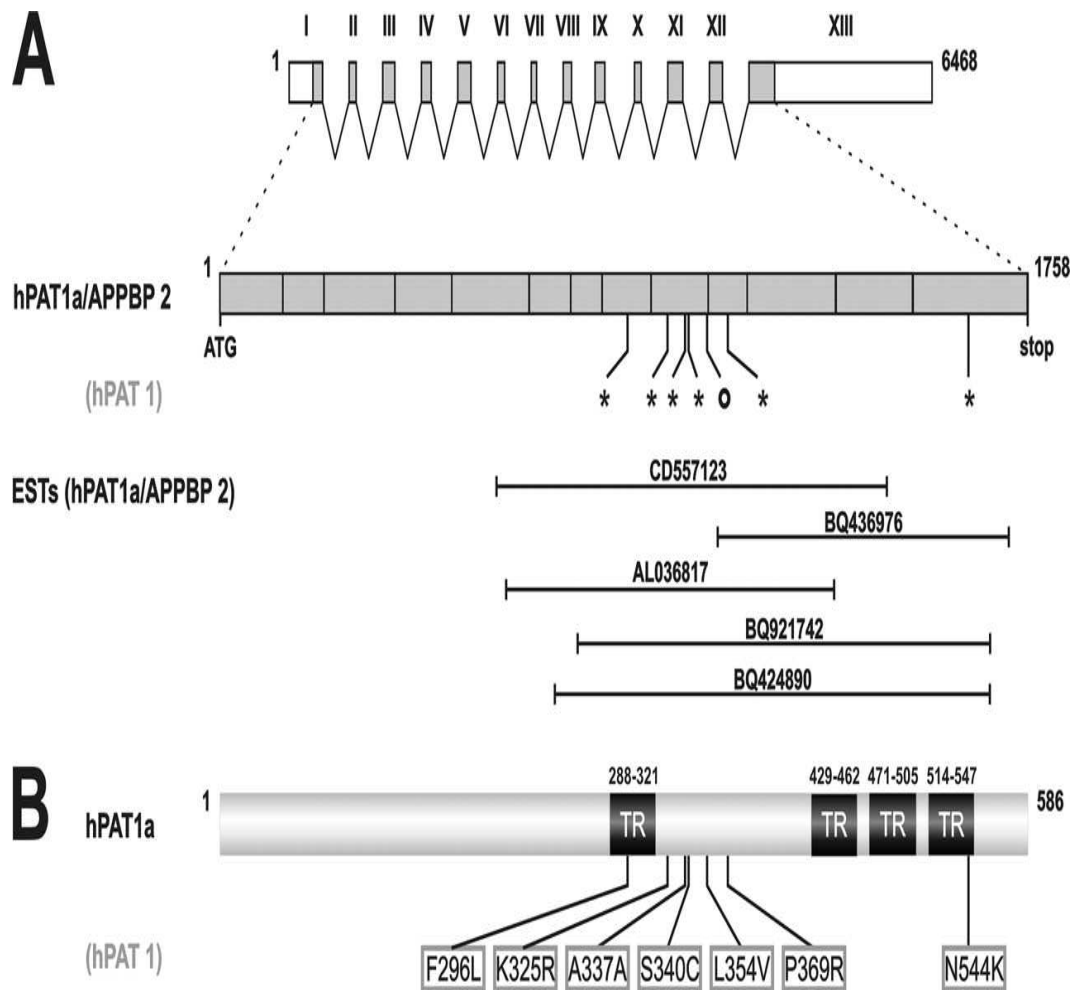


Figure 22. Représentation schématique de la structure génomique, de l'ADNc et de l'organisation de la PAT1a/APPBP2 en comparaison avec la PAT1.

(A) L'ARNm de PAT1a/APPBP2 humain (hPAT1a/APPBP2) a une longueur de 6468bp et comporte 13 exons (I-XIII). Au sein de la région codante, les exons reliés représentent 1758 bp. Les 7 échanges nucléotidiques (astérisques et un rond blanc) et les 6 aa de substitution sont indiqués. Ces échanges nucléotidiques présents dans la PAT1 et annotés comme des SNPs dans la séquence génomique sont marqués par un astérisque. (B) la structure protéique de la PAT1a/APPBP2. Les substitutions des acides aminés dans la séquence de la PAT1 en comparaison avec PAT1a/APPBP2 sont indiquées. Les positions prédites des motifs hélice-boucle-hélice avec une homologie significative au tetratricopeptide-like repeats (TR) sont montrées. (D'après Kaun et al., 2006)

En conclusion, la PAT1 précédemment étudiée par Zheng et al ou par Gao et al, est 99% identique à la APPBP2/PAT1a identifiée par Kuan et al, et dont elle constitue un variant. De plus, ARA67, un autre variant de l'APPBP2/PAT1a, lui est identique à 99.6%. Donc, PAT1, ARA67 et APPBP2/PAT1a représentent probablement plusieurs allèles du même gène, APPBP2/PAT1a étant l'allèle le plus répandu (dominant). Dans ce mémoire nous appellerons l'APPBP2, PAT1a pour une raison de simplicité.

3. Distribution de la PAT1

Zheng et al ; ont étudié l'expression de la PAT1 dans plusieurs tissus humains et lignées cellulaires. L'étude montre la présence de trois transcrits et une forte expression de ceux-ci dans les muscles, le placenta et le cœur tandis que sa présence est modérée ou faible dans les autres tissus (Figure 23-A).

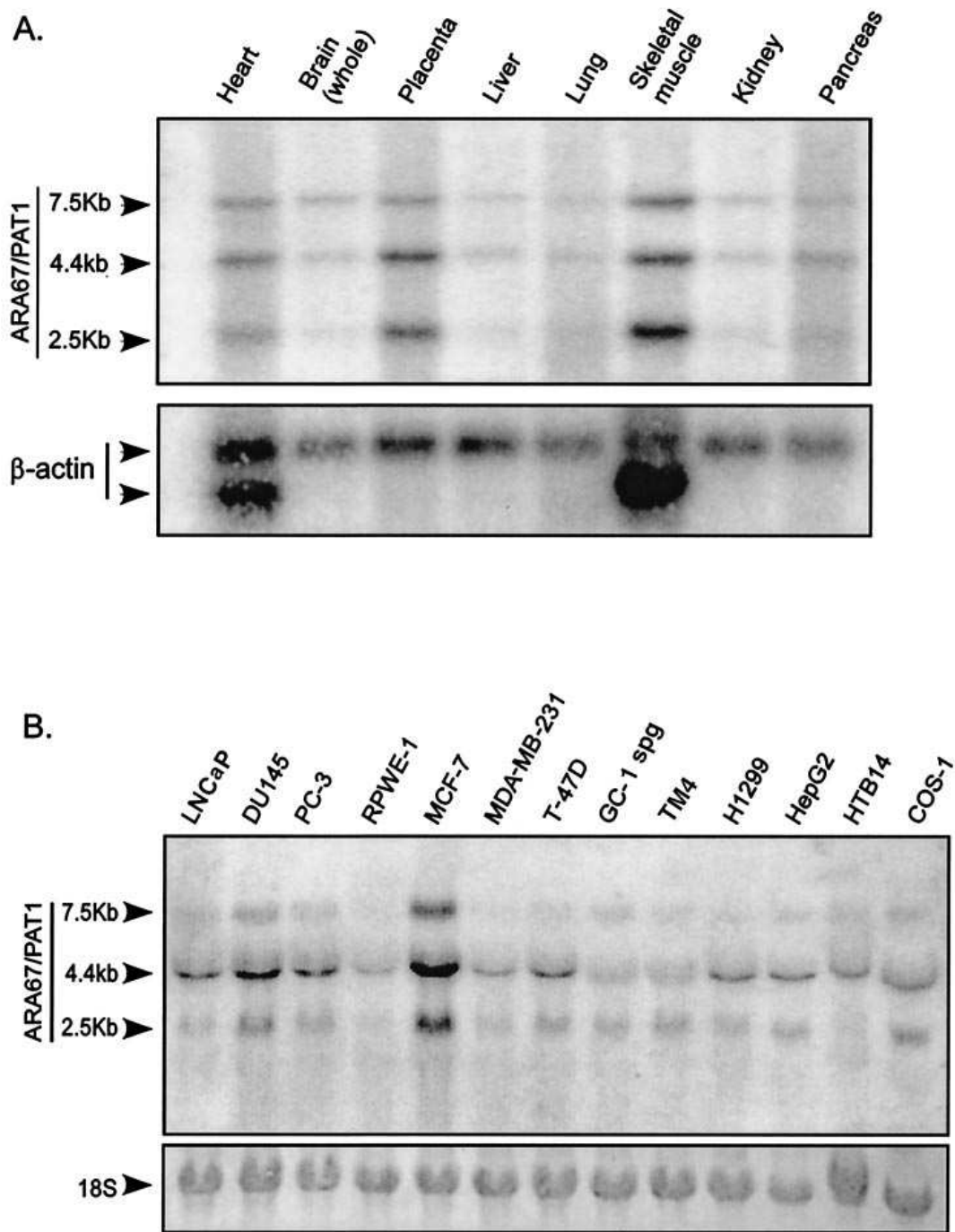


Figure 23. Distribution de la PAT1 dans différents tissus humains et lignées cellulaires. (A) l’empreinte humaine a été hybridée avec une sonde d’ADNc marquée au ^{32}P , couvrant les acides aminés 8 à 140 de la ARA67/PAT1; trois transcrits de taille différente (2.5 kb, 4.4 kb et 7.5 kb) ont été détectés. Une hybridation avec une sonde d’actine a été réalisée comme contrôle. (B) l’ARN total de 13 lignées cellulaires a été utilisées pour préparer la membrane qui a été hybridée avec la sonde mentionnée ci-dessus ; l’ARN 18S a servi comme contrôle de dépôt. (D’après Zhang et al., 2004)

Ces trois transcrits de la PAT1 sont également présents dans toutes les lignées cellulaires testées y compris dans les cellules COS-1 (originaires du rein de singe) ; le transcrit 4.4 kDa ayant le plus haut niveau d'expression (Figure 23-B). Par ailleurs, la lignée MCF originaire du sein surexprime ce transcrit. L'existence de différents niveaux d'expression de ces trois transcrits de la PAT1 résulte peut-être d'un épissage alternatif et suggère que la régulation de l'expression de la protéine est nécessaire pour assurer différentes fonctions dans des différentes cellules.

4. Localisation subcellulaire de PAT1

La présence de 5 répétitions de 7 acides aminés suggère que la PAT1 interagit avec elle-même ou avec d'autres protéines. Dans les cellules COS-1, PAT1 est localisée au niveau de la membrane et dans le cytosol où elle s'associe avec une autre protéine de 110 kDa (Zheng et al ; 1998). La présence de PAT1 dans ces deux compartiments suggère qu'elle est impliquée dans le trafic des vésicules.

Zheng et al ont montré que PAT1 est associée aux membranes par des manipulations de centrifugation- flottation sur des gradients saccharose. De plus, avec la même technique, ils ont montré que PAT1 se trouvait dans les mêmes fractions que l'APP. En microscopie confocale sur les cellules COS-1, la PAT1 est présente sous forme ponctuelle dans le cytosol. Sa présence cytosolique montre toutefois une distribution prédominante dans la région périnucléaire riche en Golgi. De plus, la PAT1 a aussi une distribution filamenteuse qui s'aligne avec les microtubules et colocalise partiellement avec l'APP ce qui laisse envisager un rôle possible dans le transport de cette protéine. La même équipe a également montré que PAT1 interagissait avec les microtubules.

Les travaux effectués par Gao et al en 2001 montrent, dans les cellules MDCK transfectées avec PAT1₁₋₅₈₅ (séquence complète), que cette dernière est localisée dans le cytosol mais aussi dans le noyau. PAT1 est même plus présente dans le noyau que dans le cytoplasme (Goa et al., 2001). Dans les cellules MDCK exprimant une forme tronquée de la PAT1₁₋₄₁₁ (MDCK₄₁₁), PAT1 est absente du noyau. Par contre, une forme plus courte de PAT1 (PAT1₁₋₂₇₀) est présente en quantité similaire dans le cytoplasme et le noyau. Secondairement à l'absence de la PAT1 du noyau, les cellules (MDCK₄₁₁) deviennent apoptotiques et le fragment C_γ59 s'accumule dans le cytoplasme et n'exerce plus un effet de signalisation nucléaire (voir ci-dessous) (Goa et al., 2001).

5. Fonctions connues de la PAT1 et son effet sur le « processing » de l'APP

PAT1 interagit avec la partie C-terminale de l'Amyloïd precursor protein (APP) et cette interaction a des conséquences sur le transport de cette protéine.

L'APP est composée d'un grand domaine extracellulaire N-terminal, d'un domaine unique transmembranaire, et d'un petit domaine intracellulaire. Elle subit plusieurs processus protéolytiques au niveau de la membrane plasmique avec la libération du grand domaine externe, la génération de deux longs peptides A β de 40 et 42 résidus, constituants majeurs de la plaque amyloïde, la marque de la maladie d'Alzheimer, et la libération dans le cytoplasme de longs fragments intracellulaires de 57 et 59 résidus (C γ ; clivé par γ -sécrétase) (figure 24). En effet, après clivage du domaine extracellulaire par les β -sécrétases (appelée aussi BACE 1 pour β -site APP cleaving enzyme 1), les γ -sécrétases clivent à leur tour les fragments C-terminaux retenus dans la membrane (Kuan et al., 2006). De ce clivage β et γ consécutif résulte la libération des A β peptides à l'extérieur de la cellule et celle des domaines intracellulaires correspondants pour lesquels un effet de signalisation nucléaire impliquant la répression de la transcription du gène sous contrôle de l'acide rétinoïque « RA-responsive gene » a été suggéré (Gao et al., 2001). Par ailleurs, les deux paralogues mammaliens de l'APP, les « β -amyloid precursor-like protein (APLP) 1 et 2 », subissent le même type de clivage libérant les peptides A β -like correspondants.

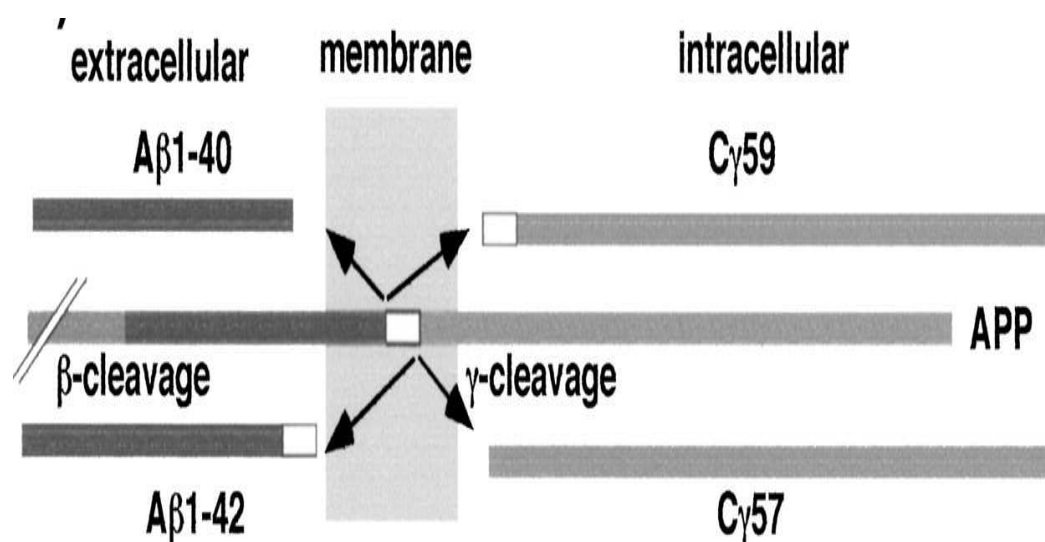


Figure 24. Processing de l'APP : l'APP, initialement clivée par le β -sécrétase près de la surface externe de la membrane, peut être clivée par les γ -sécrétase sur deux sites au niveau de la membrane plasmique. Le site majeur du coupure (90-95%) produit A β 1-40 plus le C γ 59, alors que le site mineur donne lieu aux A β 1-42 et C γ 57. (D'après Gao et al., 2001)

Le fragment C γ 59 de l'APP contient la séquence reconnue par la PAT1 qui joue un rôle important dans la localisation nucléaire de ce fragment. Cet effet de PAT1 est spécifique et sélectif. Par ailleurs, le fragment C γ 59 affecte le niveau d'expression de la PAT1 en provoquant sa dégradation protéosomale et en diminuant le niveau de sa présence dans le noyau (Gao et al., 2001).

L'altération de l'expression de PAT1 affecte le transport intracellulaire de la protéine de fusion rapporteur APP-HRP. Dans cette expérience, l'activité de l'HRP mesurée dans le milieu reflète la sécrétion de l'APP et corrèle positivement avec le niveau d'expression de la PAT1. Ceci suggère l'implication de la PAT1 dans le trafic et le transport de l'APP (Zheng et al.; 1998).

Les travaux de Yung-Hui Kuan et al ont également montré que la PAT1a interagissait avec l'APP, l'APLP1 et l'APLP2. En effet, 50 % de la PAT1a co-fractionnait avec les membranes contenant l'APP, l'APLP1 et l'APLP2, ce qui a été confirmé par co-immunoprécipitation. De plus, dans les neurones primaires surexprimant la PAT1a, on détecte une coloration cytosolique diffuse ainsi qu'une immuno-réactivité vésiculaire ponctuelle, suggérant que la PAT1a est associée partiellement avec les vésicules. Une co-localisation entre chacun des trois membres de la famille de l'APP et la PAT1a a été mise en évidence dans des structures vésiculaires ce qui suggère une fonction de la PAT1a dans le trafic des membres de cette famille (Kuan et al., 2006).

Le même équipe a montré « en GST pull down » que l'interaction entre la PAT1a et le domaine intracellulaire des APP, APLP1 et APLP2 (AICD, ALICD1 et ALICD2, respectivement) était directe et spécifique. L'interaction étant la plus forte avec l'ALICD2. La présence du signal BaSS dans le domaine intracellulaire pour tous les membres de la famille APP était indispensable pour l'interaction car cette dernière est absente lorsque le signal BaSS est délété, confirmant les résultats antérieurs de Zheng et al.

Le niveau d'expression de la PAT1a affecte la présence de ces trois membres de la famille APP à la surface cellulaire. En effet, dans les cellules SH-SY5Y, la surexpression de la PAT1a induit une augmentation du taux de l'APP et de l'ALPP2 à la membrane plasmique alors que l'inhibition de son expression réduit cette présence à la surface de ces deux mêmes protéines (la même chose a été constatée pour l'ALPP1 mais sans que les résultats soient statistiquement significatifs) (Kuan et al., 2006). De plus, il a été trouvé que le niveau d'expression de la PAT1a jouait sur le transport antérograde des APP/ALPP dont la sécrétion dans les cellules SH-SY5Y et COS-7 sur-exprimant la PAT1a augmente en même temps que la production des fragments C-terminal (CTFs) correspondants. De la même façon,

l'inhibition de l'expression de PAT1 dans les mêmes cellules s'associe à une baisse du transport et de sécrétion des APP/ALPP et à une diminution de production des fragments C-terminaux (CTFs) correspondants.

En conclusion, La PAT1a interagit et colocalise avec l'APP (ainsi qu'avec les APLP1 et 2) surtout dans des structures vésiculaires suggérant un rôle de PAT1a dans le trafic de l'APP. La PAT1a se lie à la séquence BaSS dans la partie cytosolique de l'APP provoquant sa relocalisation et sa redistribution, facilitant ainsi son trafic à la membrane plasmique (Kuan et al., 2006).

6. Autres interactions et fonctions de la PAT1

D'une façon intéressante, une nouvelle interaction a été mise en évidence entre PAT1 et une autre protéine que l'APP. Ainsi, les travaux de Zhang et al en 2004, ont montré, grâce à un système double hybride chez les levures que la partie N-terminale du récepteur à l'androgène (ARN), interagissait d'une façon plutôt sélective avec une protéine appelée l'ARA67 (pour « Androgen Receptor Associated 67Kda). En effet, par criblage d'une librairie d'ADNc de la prostate humaine, le clone ARA67 positif pour l'interaction était 99.6% identique à la séquence connue de la PAT1 d'où la désignation « ARA67/PAT1 » que les auteurs ont donné à cette protéine. De plus, cette interaction a été vérifiée et confirmée *in vitro* (GST- pull down) et *in vivo* (système double hybride chez les mammalien et co-immunoprécipitation). De plus, bien que l'interaction la plus forte soit entre l'ARA67/PAT1 et la partie N-terminale du récepteur à l'androgène (AR), les auteurs ont montré que l'ARA67/PAT1 interagissait aussi avec la partie du récepteur liant le ligand « ligand-binding » mais d'une façon plus modérée, et avec la partie liant l'ADN (DNA- binding domain) d'une façon encore plus faible.

Sur le plan fonctionnel, la même équipe a pu montrer, dans un système de gène rapporteur, que l'activité de transactivation de l'AR induite par le déhydrotestostérone (DHT) était réprimée par l'ARA67/PAT1 qui, de plus, contrarie la potentialisation de celle-ci. Cet effet réprimant de l'ARA67/PAT1 était relativement sélectif du récepteur à l'androgène. L'inhibition de l'expression de l'ARA67/PAT1 (siRNA-H spécifique) a amélioré l'induction par le DHT confirmant l'effet réprimant de l'ARA67/PAT1 sur l'activité transactivatrice de l'AR. Plusieurs expériences ont été réalisées par la suite par la même équipe pour déterminer les éventuels domaines critiques nécessaires à cette interaction (PAT-AR) et à l'effet qui en résulte en utilisant plusieurs formes tronquées de l'ARA67/PAT1. En conclusion, aucun

domaine testé n'était indispensable à lui seul à l'interaction PAT-AR ou à l'effet réprimant de cette interaction sur l'activité transactivatrice de l'AR. Le taux d'expression de l'AR n'a pas été modifié non plus (Zhang et al., 2004). En revanche, l'ARA67/PAT1 influence la distribution sub-cellulaire de l'AR qui est normalement présent dans le cytoplasme et le noyau. En effet, la présence de l'ARA67/PAT1 diminue fortement la localisation nucléaire de l'AR sous l'effet du DHT et par conséquent l'AR reste majoritairement dans le cytoplasme ce qui diminue fortement son activité transactivatrice. Ces données obtenues en immunofluorescence (cellules COS-1) ont été consolidées et confirmées en vérifiant la quantité de l'AR des deux fractions (cytoplasme et noyau) par western blot (Zhang et al., 2004).

Plus récemment, Briand et al ont montré en 2009, que PAT1 se liait au peptide Jcasp (domaine cytoplasmique juxta membranaire de l'APP après clivage par la caspase) internalisée dans les neurones primaires corticaux. Cette interaction a comme effet l'augmentation du taux d'APP et d'APLP2 à la membrane plasmique, laquelle entraîne la translocation de SET (également appelé template activating factor 1 β ou protein phosphatase 2A inhibitor) du noyau vers le cytoplasme induisant la mort cellulaire. Comme dans le cas de l'interaction PAT1-APP, la liaison PAT-Jcasp est tyrosine dépendante.

En conclusion, les différentes isoformes de PAT1 : PAT1, PAT1a et ARA67 interagissent avec des protéines : séquence BaSS de l'APP, récepteur aux androgènes et semblent jouer un rôle important dans le trafic intra cellulaire de ces protéines.

RESULTATS

Régulation de la NADPH oxydase phagocytaire par une nouvelle interaction entre la partie cytosolique de la p22phox et PAT1 (Protein interacting with Amyloid Precursor Protein Tail)

Comme cela a été décrit dans la première partie de ce manuscrit, les PN jouent un rôle majeur dans l'immunité innée. Les PN migrent vers le foyer infectieux où ils reconnaissent, englobent et phagocytent les agents pathogènes. Une fois englobé dans le phagosome, l'agent pathogène est détruit par différents moyens, parmi lesquels la production rapide et massive de FRO par la NADPH oxydase. Le transfert d'électrons du NADPH cytosolique vers l'oxygène dissout dans le phagosome est assuré par un flavocytochrome *b₅₅₈* membranaire (formé de la gp91phox/NOX2 et de la p22phox), dont l'activation et la régulation sont contrôlées par l'association de différents composants de la NADPH oxydase (p47phox, p67phox, p40phox et la petite protéine G Rac). Cette régulation doit être fine et précise pour permettre une production des FRO qui assure la microbicidie sans entraîner de lésions tissulaires pathologiques. Après sa translocation à la membrane, la p47phox se lie à la partie cytosolique de la p22phox et organise l'assemblage du complexe enzymatique. Nous avons émis l'hypothèse qu'une protéine pourrait interagir avec la p22phox et éventuellement réguler l'assemblage et l'activation du complexe NADPH oxydase et par conséquent la production de FRO.

Nous avons cherché par double hybride, dans une banque d'ADNc de rate humaine, en utilisant une séquence dite « appât » constituée de la partie cytosolique C-terminale de la p22phox (acides aminés 132 à 195), les éventuelles protéines qui interagissaient avec cette séquence de la p22phox. L'un des clones positifs identifié contenait la séquence d'une protéine appelée PAT1 pour « Protein interacting with Amyloid Precursor Protein (APP) Tail 1 ». Cette partie du travail a été réalisée par le Dr Yvonne O'Dowd, mon co-auteur dans l'article soumis pour publication. Mon travail a consisté à confirmer l'interaction identifiée par double hybride entre PAT1 et p22phox et à en étudier les conséquences sur l'activité de la NADPH oxydase phagocytaire. J'ai montré que PAT1 est exprimée, en terme d'ARNm et de protéine, dans les leucocytes (PN, monocytes, lymphocytes) et qu'elle est localisée dans le cytosol, la membrane plasmique et le noyau. PAT1 a été décrite sous 3 isoformes présentant 99% à 99,6 % d'identité. La séquence reconnue par double hybride est commune aux trois isoformes et l'anticorps que nous avons utilisé reconnaît une partie commune aux trois isoformes. Le plasmide que nous a donné le Pr Stefan Kins (Université d'Heidelberg, Allemagne) code pour une des isoformes, la PAT1a. L'interaction entre la PAT1a recombinante et la partie cytosolique de la p22phox liée à la GST a été confirmée *in vitro* par

la technique de « GST pull down » et *ex vivo* par co-immunoprécipitation en utilisant un anticorps anti-cytochrome *b₅₅₈* sur des lysats de PN au repos et stimulés par le fMLF et le PMA. De plus, par microscopie confocale, j'ai montré une colocalisation entre PAT1 et p22phox dans la région périnucléaire des PN au repos, et à leur périphérie après activation. Les données obtenues par microscopie confocale ont été confirmées par des expériences de fractionnement subcellulaire qui ont montré que PAT1 était présente en quantité plus importante dans la fraction membranaire des PN stimulés comparée à celle observée à l'état de repos. Ces résultats suggèrent que l'activation des PN par certains stimuli puisse induire une translocation de PAT1 du cytosol vers les membranes.

Les effets de PAT1 sur l'activité NADPH oxydase phagocytaire ont été étudiés *in vitro* et dans des cellules intactes. Dans un système acellulaire reconstitué par des composants de la NADPH oxydase *in vitro*, j'ai montré que PAT1a entraînait une augmentation de production des anions superoxydes mesurés par la réduction du ferricytochrome c. Dans des monocytes transfectés avec le plasmide pcDNA3.1 codant pour PAT1a et surexprimant cette protéine, la production des FRO est potentialisée aussi bien au repos qu'après stimulation des PN par le fMLF ou le PMA. De plus, une collaboration avec le Pr Richard Ye (University of Illinois, College of Medicine, Chicago, USA) a permis de montrer que la surexpression de PAT1a dans les cellules dites « COS-phox » qui expriment les composants de la NADPH oxydase ainsi que le récepteur FPR (récepteur du fMLF), donne le même type de résultats : ces cellules produisent plus de FRO que les cellules transfectées avec le vecteur vide que ce soit à l'état de repos ou après stimulation avec le PMA mais surtout avec le fMLF.

L'ensemble de ces résultats montrent que PAT1, une protéine initialement identifiée par son interaction avec l'« Amyloid Precursor Protein » (APP) et avec les microtubules, peut se lier à la partie cytosolique C-terminale de la p22phox (acides aminés 132 à 195) et augmente la production de FRO par la NADPH oxydase *in vitro* et dans des cellules intactes. Il existe trois isoformes de PAT1 ayant une identité d'au moins 99%. La séquence identifiée par double hybride et reconnue par l'anticorps étant commune aux isoformes, nous ne pouvons déterminer quelle isoforme est présente dans les neutrophiles mais leur forte identité peut faire suggérer que les trois isoformes puissent se lier au domaine C-terminale de la p22phox.

Les données obtenues sont soumises pour publication dans le manuscrit ci-dessous sous le titre : « Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by a novel interaction between p22phox and PAT1 ».

1. Article soumis pour publication: Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by a novel interaction between p22phox and PAT1

Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by a novel interaction between p22phox and PAT1

Riad Arabi-Derkawi^{1,3*}, Yvonne O'Dowd^{1,2*}, Ni Cheng⁴, Tarek Boussetta^{1,2}, Magali Fasseu^{1,2}, Houssam Raad^{1,2}, Yolande Kroviarski^{1,3}, Richard Ye⁴, Marie-Anne Gougerot-Pocidallo^{1,2,3} and Jamel El-Benna^{1,2}.

¹INSERM, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3, Paris F-75018, France.

²Université Paris 7 site Bichat, UMRS 773, Paris F-75018, France.

³AP-HP, Centre Hospitalier Universitaire Xavier Bichat, CIB Phenogen, Paris, F-75018.

⁴University of Illinois College of Medicine, Chicago, IL 60612 USA.

* Riad Arabi Derkawi and Yvonne O'Dowd contributed equally to this work.

Corresponding authors: Marie-Anne Gougerot-Pocidallo and Jamel El-Benna, INSERM, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon (CRB3), Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, Paris F-75018,
e-mails: marie-Anne.gougerot-pocidallo@inserm.fr and jamel.elbenna@inserm.fr; Tel: 33 1 57 27 77 23 ; Fax: 33 1 57 27 74 71.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) production by the phagocyte NADPH oxidase plays a crucial role in host defenses. NADPH oxidase is composed of the membranous flavocytochrome b558 and cytosolic components (p40phox, p47phox, p67phox and a small GTPase Rac1 or Rac2). The flavocytochrome b558 is composed by two membrane components p22phox and gp91phox/NOX2 which are non covalently bound. P22phox plays a crucial role in the expression/stabilization of gp91phox in phagocytes but also is a docking site for the cytosolic components during activation. In the present study we have used a yeast two-hybrid approach to identify unknown partners of p22phox. Using the cytosolic C-terminal region of p22phox as bait to screen a human spleen cDNA library, we identified PAT1 as a potential partner of p22phox. The interaction between p22phox and PAT1a was further confirmed by an *in vitro* GST pull-down assay between recombinant PAT1a and p22phox C-terminal region GST fusion protein. We have demonstrated that PAT1 mRNA and PAT1 protein are expressed in human neutrophils; the protein was found in the cytosol and plasma membranes of resting cells. PAT1 colocalizes with p22phox in neutrophils as shown by confocal microscopy and both proteins co-immunoprecipitate under resting and in stimulated conditions. Addition of recombinant PAT1a to the cell free-system enhanced NADPH oxidase activation in a concentration dependent manner. Over-expression of PAT1a in human monocytes and in COSphox cells increased ROS production in resting and fMLF-stimulated cells. These data clearly identify PAT1 as a novel regulator of NADPH oxidase activation in phagocytes. Inhibition of p22phox/PAT1 interaction could be used as new approach to limit ROS production by phagocytes at inflammatory sites.

Introduction

Human polymorphonuclear neutrophils (PMN) constitute a major defense line against pathogens such as bacteria and fungi (1). Upon infection or inflammation, pro-inflammatory mediators such as the complement fragment C5a, the N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF) peptide, interleukine 8 (IL-8), platelet activation factor (PAF), or leukotriene B4 (LTB4), create a gradients that guides neutrophils along their migration pathway (2). At the infection site, neutrophils recognize and phagocytose pathogens, a process that includes the formation of intracellular phagosomes and the destruction of the internalized pathogen (3). Activated PMNs release antibacterial substances into the phagosome and produce reactive oxygen species (ROS) that are thought to play an important role in both the direct and indirect killing of pathogens (3,4). Superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) is the precursor of other ROS molecules such as hydrogen peroxide (H_2O_2), the hydroxyl radical (OH^{\cdot}), and hypochlorous acid (HOCl). The enzyme responsible for the generation of ROS is the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase complex or respiratory burst oxidase (4,5).

In phagocytes, the NADPH oxidase which is a multicomponent enzyme comprises several subunits: p22phox, p40phox, p47phox, p67phox, gp91phox and a small GTPase Rac1 or Rac2 (6,7). In the resting cell, p40phox, p47phox, p67phox exist in the cytosol as a complex and Rac1 (in monocytes) or Rac2 (in neutrophils) exist in the GDP-bound form, complexed to rho-GDI. The other two components p22phox and gp91phox form a non covalently bound complex known as flavocytochrome b558 (8-10). They are located in the membranes of specific granules (60-70%), gelatinase granules (20-25%), secretory vesicles and the plasma membrane.

Separating these two groups of components by distributing them between distinct subcellular compartments ensures that the NADPH oxidase is inactive in the resting cell. Upon cell activation by various stimuli, several events take place at the same time, phosphorylation and

migration of the cytosolic components p40phox, p47phox, p67phox to the membranes where they associate with the flavocytochrome b558. Rac2 exchanges its GDP for GTP, dissociates from its inhibitor rho-GDI and migrate to the membrane where it interacts with p67phox (11,12). When all components are assembled at the membrane, the flavocytochrome b558, mediates the transfer of electrons from cytosolic NADPH to O₂ to produce the superoxide anion (O₂^{•-}). In resting cells, p22phox interacts with gp91phox probably via the transmembrane spanning domains to stabilize the complex. During activation the intracellular cytosolic tail of p22phox interacts with p47phox via a “proline rich sequence/SH3 domains” docking site (7,8). However it is not known if other proteins interact with p22phox under resting and activated conditions. We hypothesize that the cytosolic p22phox region could interact with new yet unidentified partners.

In order to identify proteins that interact with p22phox, we used a yeast two-hybrid system using the cytosolic C-terminal region of p22phox as bait to screen a human spleen cDNA library. One of the clones identified was the human PAT1 as revealed by a sequence alignment search. PAT1 is a 585 amino acids protein; it was first identified as a “protein interacting with Amyloid Precursor Protein (APP) tail”, via the basolateral sorting signal (BaSS) site in the cytoplasmic tail of APP, a cell surface protein implicated in the pathogenesis of Alzheimer disease (13). PAT1 is 99% and 99.6% identical to PAT1a and ARA67 respectively. PAT1 is expressed in several cells such as epithelial cells and smooth muscle cells (14). PAT1 shares homology with kinesin light chain and was found to bind to microtubules, suggesting its implication in trafficking and protein secretion. Indeed the PAT1 and its isoform PAT1a were found to promote APP processing, resulting in increased secretion of beta-amyloid peptides (13,14). PAT1 was also found in the cytoplasm and the nucleus in MDCK cells and interacts with and controls the subcellular localisation of the androgen receptor modulating its function (15,16).

Here we show that PAT1 is a novel p22phox interacting protein that functions as an enhancer of NADPH oxidase activation and ROS production by phagocytes. Expression of PAT1 in phagocytes could modulate ROS production in inflammatory diseases and could be a novel target to limit ROS production.

Materials and Methods

Buffers, PMA, fMLF, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), diisopropyl fluorophosphate (DFP), diphenyleiodonium (DPI), and other chemicals were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting reagents were purchased from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Dextran T500, Ficoll, G-sepharose beads, pGEX-6p1, and glutathione sepharose were purchased from GE Healthcare (Little Chalfont, UK). Anti-p22phox , anti-gp91phox and anti-PAT1 antibodies were from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). Monoclonal anti-cytochrome b558 antibody (7D5) was from MBL. Secondary antibodies were from Jackson laboratories.

Two-hybrid Screening of human spleen cDNA library

Two-hybrid screening was performed using the method described previously (17). The cDNA encoding the C-terminal tail of p22phox (amino acid 132 - amino acid 195) was fused with the cDNA of the LexA DNA-binding protein into pLEX10 vector and introduced into the yeast. Yeast cells that expressed the LexA-p22phox(132-195) fusion protein were transformed further with cDNA from a human spleen cDNA library in pACT2 vector (Clontech, Basingstoke, UK), fused with the sequence of the activation domain of Gal4. The screen of transformants was based on monitoring the transactivation of the two reporter genes which are His3 and LacZ. Colonies from transformants which grew on selective medium lacking histidine (His⁺) were then assayed for β -galactosidase activity (LacZ⁺) by a qualitative colour filter assay (18). The pACT2 plasmids in yeast corresponding to His⁺/LacZ⁺ clones were amplified in E. Coli and sequenced.

Cloning and expression of human PAT1a and p22phox(132-195)

PAT1a cDNA contained in PKH3 plasmid (a generous gift from Stefan Kins, ZMBH, University of Heidelberg, Germany) was amplified using Pfu polymerase (Stratagene) with flanking ECOR1 and XhoI restriction sites open reading frame-flanking primers (sense, 5'-ccg gaa ttc atg gcg gcc gtg gaa cta -3'; antisense, 5'- ccg ctc gag tca gca gct cgg tcc ctc -3') and cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen). For recombinant expression of PAT1a, the encoding cDNA was subcloned into pGEX-6P1 vector (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) and sequenced to rule out unexpected mutations and to confirm the sequence, then was transformed in BL21-DE3 (pLysS) *E. coli* strain and expressed as follows. An overnight culture was diluted 10-fold in fresh Terrific Broth medium containing 100 µg/ml ampicillin and grown for one additional hour at 37°C. The culture then was induced with 0.2 mM isopropyl β-d-thiogalactoside for 18 h at 15°C. Bacteria were harvested by centrifugation (4000 g, 20 min, 4°C) and the pellet was resuspended in lysis buffer [50mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1% (v/v) Triton X-100, protease-inhibitors]. Cells were lysed by six sonications each lasting 30 s. Following ultracentrifugation (40000 rpm(15000 × g) , 30 min, 4°C), GST-recombinant proteins were affinity precipitated from supernatant by overnight incubation at 4°C with glutathione-Sepharose 4B beads (Pharmacia) . Beads were then washed in lysis buffer, and the fusion protein was cleaved by incubation with PreScission protease (Amersham Pharmacia) for 4-6 h at 4°C in 150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 7; 1 mM DTT; and 1 mM EDTA and subjected to another round of glutathione-bead adsorption. PAT1a (1-585) migrates at 70 kDa as a monomeric protein in a non denaturing gel.

Cloning and expression of p22phox(132-195) cytoplasmic tail in the pGEX-6P1 expression plasmid was performed as previously described (19).

GST pull-down assay

The assay was performed as described previously (20). Briefly, 80 pmol of GST-p22phox (132-195) and GST alone were incubated in the presence of 5 pmol of recombinant PAT1a and glutathione-Sepharose beads in interaction buffer (20 mM Hepes, pH 7.5; 1% Nonidet P-40; 50 mM NaCl; and 1 mM EGTA) for 1 h. After washing, the complex was eluted with 10 mM glutathione and analyzed by SDS-PAGE and Western blots using protein-specific antibodies.

Neutrophil preparation and fractionation

Neutrophils were isolated from the blood of healthy volunteers by dextran sedimentation and Ficoll centrifugation as described previously (21,22). The isolated cells were resuspended in phosphate-buffered saline at a concentration of 10^8 cells/ml in, treated or not with DFP (2.7 mM) for 20 min at 15°C, and washed in the same buffer. Neutrophil fractionation was performed by nitrogen cavitation and density gradient centrifugation (23).

Monocyte and lymphocyte isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were freshly isolated from the whole blood of healthy volunteers by Ficoll-Paque separation (Pharmacia, Uppsala, Sweden) as previously described (21,22). PBMC were subjected to an additional Percoll separation step to isolate monocytes (24). The purity of the resulting cells suspension was randomly tested by a Sysmex XE-2100 automated blood cell counter (Sysmex, Kobe, Japan) and yielded more than 75 % monocytes. The Dynabeads[®] Untouched[™] Human Monocytes kit (Invitrogen) was used for monocyte mRNA expression and transfection assays. It yielded more than 90 % monocytes.

COSphox cells

COS-phox cell line transfected with NADPH oxidase components and fMLF receptor, (FPR) were used to study the effect of PAT1 on NADPH oxidase activity in the resting state and under stimulation with fMLF and PMA (25). The cDNA for PAT1a fused to a hemagglutinin (HA) tag was subcloned in pKR5 vector and transfected to reconstituted COSphox cells.

Cell lysate preparation for western blotting analysis

In order to perform western blotting analysis for PAT1 detection in leucocytes, the cells were pretreated. This consisted of firstly lysing cells in a lysis buffer (50 mM Tris-HCL buffer (pH 7.4), 1% Triton X-100, 2 mM β -glycerophosphate, 25 mM NaF, 150 mM NaCl, 10 μ g/ml Leupeptine, Pepstatine, and Aprotinine), then diluting twice with the same lysis buffer without triton, sonicating for 3 times for 3 seconds each and centrifugating for 5 min at 4000 rpm at +4°C. Finally, the protein concentration in the supernatant was determined prior to denaturation of equal quantity using Laemmli sample buffer (26) and boiling at 100°C for 3 min.

mRNA expression of PAT1 in human blood leukocytes

Total RNAs were isolated by lysing the cells with TRIzol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Afterwards, 1 μ g of total RNAs were reverse transcribed and PAT1a mRNA was quantified by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) using the Light cycler Technology (Roche, Mannheim, Germany) and PAT1 (covering a common part of the three isoforms) specific forward 5'- tgc aaa aag tca cta tga tga gg -3' and reverse 5'- tcc acc aca act ttc act gg -3' primers (Eurogentec). Detection of PCR product was based on SYBR green fluorescence signal. GAPDH house-keeping gene expression was used to normalise the results.

Immunoprecipitation

The technique used for cell lysis and cytochrome b558 immunoprecipitation was adapted from previously described protocols (22,23). Cells were lysed by resuspending (5×10^7 cells/ml) in lysis buffer [50 mM Tris-HCL buffer (pH 7.4), 1% Triton X-100, 25 mM NaF, 2 mM β -glycerophosphate, P8340 protease inhibitor cocktail (1:1000 dilution), 150 mM NaCl, and 1 mM DFP]. Following sonication on ice and mixing by rotation, the lysates were centrifuged at 114,000 *g* for 30 min at 4°C. The supernatants were diluted twice in the same buffer without Triton. Immunoprecipitation was performed by addition of anti-gp91phox or anti-p22phox (1/200: dilution) monoclonal antibodies and protein A/G beads (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) saturated in BSA and incubating for 4 h. Beads were then washed 4 times, and proteins were denatured in Laemmli sample buffer (26) by boiling at 100°C for 3 min.

NADPH oxidase activation in the cell-free system

Cytosol and membranes are purified from resting neutrophils by nitrogen cavitation and percoll density gradient centrifugation as described above. The reaction mix consists of 5×10^6 cell eq of cytosol, 2×10^6 cell eq of sucrose-solubilized membrane suspension, 2 μ M of GTP γ S, in relaxation buffer. The reaction was incubated at room temperature for 10 min in the presence or absence of PAT1a, then 0.1 mM cytochrome *c*, 0.16 mM NADPH and 90 μ M SDS were added and cytochrome *c* reduction was followed at 550 nm for 10 min at room temperature in a Uvikon 941 dual-beam recording spectrophotometer (22) reading against a reference containing the same components plus DPI (10 μ M final concentration).

PAT1a overexpression in monocytes

Transfection of human blood monocytes was performed using the Amaxa (Lonza, Cologne, Germany) system using a routine protocol. In brief, monocytes were centrifuged at 1800 rpm for 8 min and thereafter resuspended in supplemented human monocytes nucleofector® Solution (Amaxa) to a final concentration of 5×10^6 cells/100 μ L; 100 μ L of cell suspension was mixed with either 2 μ g of pcDNA3.1-PAT1a plasmid or with the empty vector, and transferred to an Amaxa certified cuvette. For transfection, we used the program Y-001. Monocytes were seeded in 24-well plates at a density of 5×10^6 cells per well in 2-ml supplemented medium and analysed after 24-36 hours of culture. Transfection efficiency was between 40% and 60% as verified by immunofluorescence.

SDS-PAGE and Western Blotting.

Gel electrophoresis and protein transfer to nitrocellulose membranes were performed with classical techniques (26,27). Nitrocellulose membranes were blocked with 5% non fat dry milk in borate-buffered saline, pH 8.4 (100 mM boric acid/25 mM borax/75 mM NaCl) for 1 h at room temperature and then incubated with 1:1,000 mouse monoclonal anti-gp91phox antibody overnight. The membranes were then washed extensively and incubated with horseradish peroxidase-conjugated 1:5,000 anti-mouse IgG for 1 h at room temperature. Blots were visualized by using enhanced chemiluminescence Western blotting reagents (Amersham Pharmacia).

Measurement of ROS production by luminol-amplified chemiluminescence

Neutrophils or Monocytes (5×10^5) were suspended in 0.5 ml HBSS containing 10 μ M luminol at 37°C. ROS production was then measured before (Resting) and after the addition of stimuli (10^{-6} M fMLF or 100 nM PMA) to the cells. Chemiluminescence was recorded with a luminometer (Berthold-Biolumat LB937) (21, 22).

Confocal microscopy

Following treatment with fMLF or PMA, neutrophils were spotted using round gaped filter paper on poly-L-lysine-coated glass slides and allowed to dry in a humid chamber by gravity sedimentation, then fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized with 0.2% Tween 20 for 15 min at 37°C and blocked with 5% BSA in PBS. Cells were then incubated overnight at 4°C with rabbit anti-p22phox polyclonal antibody (1:200) and mouse anti-PAT1 monoclonal antibody (1:200) diluted in 1% BSA/PBS. After washing, cells were incubated with Alexa Fluor 488-(green)-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:200) and Alexa Fluor 568 (red)-conjugated goat antimouse (1:200) for 1 h at room temperature in the dark. Stained cells were examined with a Zeiss LSM510 confocal microscope (63/1.4 numerical aperture objective) and the images were imported into an LSM image browser for analysis. Merge corresponds to colocalisation of PAT1 and p22phox.

Statistical analysis

All results are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Significant differences ($p < 0.05$) were identified using the Student's *t* test.

Results

The cytosolic C-terminal tail of p22phox interacts with PAT1 in the yeast two hybrid system and *in vitro*

To identify potential p22phox-interacting proteins, we used a yeast two-hybrid approach with the cytosolic C-terminal region of p22phox (132-195) (Figure 1A), fused with the LexA protein, as bait to screen a human spleen cDNA library. Among the histidine and β -galactosidase positive clones, one contained 886 kb insert and has passed all the non specific interaction controls (Figure 1B and C). The clone was sequenced and results showed that the sequence matched the human PAT1 sequence.

To confirm the p22phox/PAT1a interaction we performed a GST pull-down assay using recombinant human PAT1a and GST-p22phox(132-195). Results show that GST-p22phox was able to pull-down PAT1a while GST alone was not (Figure 2). These results show that the association between PAT1a and p22phox could occur directly without the need for any other protein or agent.

PAT1 is expressed in human neutrophils

The presence of PAT1 in human neutrophils and leukocytes was not known. To determine whether PAT1 is expressed in human blood cells, neutrophils, monocytes and lymphocytes were isolated and extraction of the total RNA was performed. PAT1 mRNA expression was analysed using specific primers and RT-PCR cDNA quantification. Results show that PAT1 mRNA was expressed in the three types of blood cells at variable levels (Figure 3A). Higher expression was seen in neutrophils and lymphocytes, while less mRNA expression was observed in monocytes. To see the expression of PAT1 protein, equal amounts of cells were

analysed by SDS PAGE and Western Blot using a specific antibody against human PAT1. Results show that PAT1 protein is expressed in the three cell types at relatively equal levels (Figure 3B). Subcellular fractionation of resting neutrophils and protein analysis show that PAT1 is localized in the cytosol and plasma membranes of the cells (Figure 3C).

PAT1 and p22phox colocalize and interact in human neutrophils

To determine whether p22phox and PAT1 interact in intact neutrophils, we first explored the possibility of colocalization. To investigate this we used a confocal microscopy technique, using an anti-PAT1 mouse polyclonal antibody raised against the last 100 amino acids (486 a.a ~ 586 a.a), and a rabbit anti-p22phox antibody. Results show that in resting neutrophil PAT1 showed a cytoplasmic and nuclear distribution while p22phox showed granular localisation (Figure 4A). PAT1 colocalised partially with p22phox especially in the perinuclear region. Interestingly, upon stimulation with fMLF (10^{-6} M) or PMA (100 ng/ml), neutrophils demonstrated a peripheral localization of PAT1 colocalized with p22phox at the membrane periphery. The same distribution was also found in human monocytes (supplementary Figure 1). These results suggest that a translocation of the PAT1 to membranes takes place following stimulation. Resting and stimulated neutrophils were then lysed and membranes and cytosol were separated. Results show that stimulation of neutrophils indeed induced PAT1 translocation to the membranes (Figure 4B), as regards the confocal microscopy results, fMLF induced more translocation than PMA.

To determine whether if PAT1 interacts with p22phox in intact neutrophils we used a co-immunoprecipitation assay. Cell lysates from resting or fMLF- or PMA-stimulated neutrophils were immunoprecipitated with anti-cytochrome b558 (7D5) which recognizes extracellular gp91phox/p22phox without interfering with intracellular interactions and were analyzed by Western blotting. Indeed, as shown in Figure 5, PAT1 was detected in the

cytochrome b558 complex containing gp91phox and p22phox, while PAT1 was not detected in beads with control IgG isotype.

Effect of PAT1 on ROS production in a free cell system and in intact cells

The results described above show that p22phox interacts with PAT1 *in vitro* and in intact neutrophils but whether this interaction has a functional role in NADPH oxidase activation remains unknown. To assess the effect of PAT1 on NADPH oxidase activation we used the cell-free system which allows to test the effect of various macromolecules on NADPH oxidase activation. Membranes and cytosol were isolated from resting neutrophils, activation was induced by SDS and superoxide anion production was measured using the cytochrome c reduction assay. Results show that recombinant PAT1 enhances NADPH oxidase activation in a concentration dependent manner (Figure 6) (Supplementary Figure 2).

Because neutrophils have a short life span and are resistant to transfection experiences, we used alternative cells for PAT1 over-expression. Firstly, we over-expressed PAT1 in human monocytes using an Amaxa transfection system. As shown in Figure 7A, transfection of human monocytes with a plasmid encoding PAT1 resulted in overexpression of PAT1. GFP expression was also used to check the transfection efficiency of monocytes (Supplemental Figure 3). Monocytes overexpressing PAT1 showed enhanced ROS production as measured by luminol-amplified chemiluminescence (Figure 7B). This increased ROS production, seen previously in resting monocytes, was maintained upon stimulation with fMLF and PMA. Interestingly, fMLF (10^{-6} M) induced a significantly higher ROS production than PMA (100 ng/ml).

To confirm these results we used COSphox cell lines which are transfected with the oxidase components and with the fMLF receptor, FPR (27). Transfection of HA-tagged PAT1 in these

cells resulted in PAT1 overexpression (Figure 8A). Immunoprecipitation of cytochrome *b*₅₅₈ using an anti-gp91phox or anti-p22phox antibody showed that PAT1 co-immunoprecipitated with the complex (Figure 8B), while the use of control IgG did not demonstrate the presence of PAT1. Transfection of PAT1 in COSphox cells clearly increased fMLF-induced ROS production. Interestingly, constitutive and PMA-induced ROS production was only slightly enhanced.

Discussion

ROS production by the phagocyte NADPH oxidase is a crucial process for host defense against pathogens. However excessive NADPH oxidase activation is believed to be involved in inflammatory reactions (28,29). Tight regulation of NADPH oxidase activation is important to ensure that ROS are produced when and where required. Several mechanisms such as protein phosphorylation, GTPase activation and protein/protein interactions regulate NADPH oxidase activation (11,12). Results presented in this study uncover a new p22phox/PAT1 interaction which controls NADPH oxidase activation and ROS production. We used different approaches to show the interaction between p22phox and PAT1; the yeast two hybrid system, the GST pull-down assay, confocal microscopy and a co-immunoprecipitation technique. Recombinant PAT1 increased NADPH oxidase-derived ROS production in the cell-free system as well as in intact monocytes and in COSphox cells.

It had been proposed that p22phox protein sequence consisted of up to 4 transmembrane domains (28). However experimental data indicated that there are only two domains and a long cytosolic region (29,30). It is known that the p22phox cytosolic tail serves as a docking site for p47phox tandem SH3 domains during NADPH oxidase activation (31-33). Indeed the p22phox C-terminal sequence has a polyproline sequence necessary for this interaction as shown by site directed mutagenesis (34) and in a CGD patient who has a mutation at proline 156 (35). As the PAT1 sequence does not have an SH3 domain, it is unlikely that PAT1 binds to the p22phox via a proline rich region. Further investigation is necessary to narrow down the binding sequences on both proteins. P22phox is phosphorylated in the cytosolic region when cells are stimulated (35). Whether this phosphorylation inhibits or stimulates PAT1 binding needs to be explored.

PAT1 mRNA is expressed in different tissues such as heart, brain, placenta, skeletal muscle, kidney and pancreas (16). At least three isoforms of PAT1 have been described in the literature; they are almost identical differing by only a few amino acids. These isoforms comprise PAT1 itself, ARA67 which is 99,6% identical to PAT1 and PAT1a which is 99% identical to PAT1 (14). The sequence identified in this study is a common sequence for all three isoforms and we are not able to say which isoform is expressed in human neutrophils. Since the three isoforms are 99% identical, and the common yeast double-hybrid-identified the N-terminal domain as interacting with p22phox, all three isoforms could potentially interact with p22phox(132-195).

PAT1 binds microtubules and is involved in intracellular trafficking of several proteins including β -amyloid precursor protein (APP) (13,14), Us11 virus protein (37), and androgen receptor (16). It is not excluded that PAT1 could play a role in p22phox production or in the trafficking of p22phox rich granules in phagocytes. We have confirmed that PAT1 binds to microtubules *in vitro* and was able to mediate p22phox binding (data not shown). Interestingly, cytochrome b558 was shown to undergo conformational changes and to bind to cytoskeleton with activated NADPH oxidase (38). PAT1 may facilitate the conformational changes of cytochrome b558 and its binding to cytoskeleton. Thus PAT1 could control localization of NADPH oxidase activation in the cell.

P22phox expression is not restricted to phagocytes; it is expressed in several tissues and cells such as vascular smooth muscle cells, epithelial cells, endothelial cells and neurons. In addition p22phox is associated with other NOX enzymes such as NOX1, NOX3 and NOX4 (39). Using the yeast two-hybrid system and a vascular smooth muscle cell cDNA library Lyle et al, (40) have identified Poldip2 protein as a partner of p22phox. Poldip2 increased NOX4 enzymatic activity in vascular smooth muscle cells and modulated cytoskeletal remodeling and cell migration. Our results and those reported by Lyle et al, suggest that

p22phox could have several partners which probably depend on p22phox tissue localization and NOX-controlled function.

In conclusion, we show here that PAT1 is able to bind to p22phox cytosolic tail composed of aminoacids 132 to 195 and is capable of enhancing NADPH oxidase activation *in vitro* and in intact cells. PAT1 was first identified in human cells as binding to APP and to microtubules. Here we describe a novel function of PAT1 in phagocytic cells. Several other cells express p22phox in association with other NOX enzymes. PAT1 may also regulate ROS production in these cells too.

AKNOWLEDGEMENTS

Dr Dang, Dr Lecompte, Dr Kins.

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR), Arthritis Fondation Courtin, INSERM and CNRS.

Dr Dang and Dr Lecompte for their fruitful discussion and Dr Kins for the PAT1a cDNA containing plasmid generous gift

References

1. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:173-82.
2. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000; 80:617-53. Review.
3. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev.* 2007; 219:88-102. Review.
4. El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53:199-206.
5. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998; 92 :3007-17.
6. Babior BM. NADPH Oxidase: an update. *Blood* 1999, 93: 1464-76.
7. Chanock, S.J., El-Benna, J., Smith, R.M., and Babior, B.M. (1994). The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 269: 24519-24522.
8. Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase : a structural perspective. *Biochem J.* 2005; 386: 401-16.

- 9.** Nauseef WM. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *J Biol Chem.* 2008; 283:16961-5.
- 10.** Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59:1428-59.
- 11.** El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* 2008; 30:279-89.
- 12.** El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA, Marie JC, Braut-Boucher F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med* 2009; 41:217-25.
- 13.** Zheng P, Eastman J, Vande Pol S, Pimplikar SW. PAT1, a microtubule-interacting protein, recognizes the basolateral sorting signal of amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:14745-50.
- 14.** Kuan YH, Gruebl T, Soba P, Eggert S, Nesic I, Back S, Kirsch J, Beyreuther K, Kins S. PAT1a modulates intracellular transport and processing of amyloid precursor protein (APP), APLP1, and APLP2. *J Biol Chem.* 2006; 281:40114-23.
- 15.** Gao Y, Pimplikar SW. The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:14979-84

- 16.** Zhang Y, Yang Y, Yeh S, Chang C. ARA67/PAT1 functions as a repressor to suppress androgen receptor transactivation. *Mol Cell Biol.* 2004; 24:1044-57. Erratum in: *Mol Cell Biol.* 2004; 24:5635.
- 17.** Rotter B, Kroviarski Y, Nicolas G, Dhermy D, Lecomte MC. AlphaII-spectrin is an in vitro target for caspase-2, and its cleavage is regulated by calmodulin binding *Biochem J.* 2004; 378:161-8.
- 18.** Van Aelst L, Barr M, Marcus S, Polverino A, Wigler M. Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:6213-6217.
- 19.** Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry.* 2002; 41:7743-50.
- 20.** Dang PM, Cross AR, Babior BM. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:3001-5.
- 21.** Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest* 2006; 116: 2033-2043.
- 22.** Raad H, Paclet MH, Boussetta T, Kroviarski Y, Morel F, Quinn MT, Gougerot-Pocidalo MA, Dang PM, El-Benna. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity:

phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J* 2009; 23: 1011-22.

23. Boussetta T, Gougerot-Pocidal MA, Hayem G, Ciappelloni S, Raad H, Arabi Derkawi R, Bournier O, Kroviarski Y, Zhou XZ, Malter JS, Lu PK, Bartegi A, Dang PM, El-Benna J. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood*. 2010; 116:5795-802.

24. de Almeida MC, Silva AC, Barral A, Barral Netto M. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95:221-3.

25. He R, Nanamori M, Sang H, Yin H, Dinauer MC, Ye RD. Reconstitution of chemotactic peptide-induced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced) oxidase activation in transgenic COS-phox cells. *J Immunol*. 2004; 173:7462-70

26. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.

27. Towbin, H., Staehlin, T., and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*.1979; 76: 4350-4354.

28. Babior, B.M. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.*2000; 109: 33-44.

29. Nauseef WM. Nox enzymes in immune cells. *Semin Immunopathol*. 2008; 30:195-208.
Review.

- 30.** Groemping, Y., Lapouge, K., Smerdon, S.J., Rittinger, K. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell*.2003; 113: 343-355.
- 31.** Quinn, M.T., Gauss, K.A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 76: 760-781.
- 32.** Leto TL, Adams AG, de Mendez I. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:10650-4.
- 33.** Regier, D.S., Greene, D.G., Sergeant, S., Jesaitis, A.J., McPhail, L.C. Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 28406-288412.
- 34.** Lewis EM, Sergeant S, Ledford B, Stull N, Dinauer MC, McPhail LC. Phosphorylation of p22phox on threonine 147 enhances NADPH oxidase activity by promoting p47phox binding. *J Biol Chem.* 2010; 285 :2959-67
- 35.** Dinauer MC, Pierce EA, Erickson RW, Muhlebach TJ, Messner H, Orkin SH, Seger RA, Curnutte JT. Point mutation in the cytoplasmic domain of the neutrophil p22-phox cytochrome b subunit is associated with a non functional NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11231-11235.

- 36.** Regier DS, Waite KA, Wallin R, McPhail L.C.: A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22(phox), an NADPH oxidase component. *J Biol Chem* 1999; 274:36601-08.
- 37.** Benboudjema L, Mulvey M, Gao Y, Pimplikar SW, Mohr I. Association of the herpes simplex virus type 1 Us11 gene product with the cellular kinesin light-chain-related protein PAT1 results in the redistribution of both polypeptides. *J Virol*. 2003; 77:9192-203.
- 38.** Paclet MH, Berthier S, Kuhn L, Garin J, Morel F. Regulation of phagocyte NADPH oxidase activity: identification of two cytochrome b558 activation states. *FASEB J*. 2007; 21:1244-55.
- 39.** Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87:245-313.
- 40.** Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, Seidel-Rogol B, Pounkova L, Du P, Papaharalambus C, Lassegue B, Griendling KK. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2009; 105:249-59.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic representation of p22phox cytosolic tail and its interaction with PAT1 in the yeast two-hybrid system.

(A) P22phox is a transmembrane protein with at least 2 transmembrane domains and a long cytosolic carboxy terminal sequence predicted from amino acid 132 to 195.

(B) Summary of results obtained from the two hybrid system. The p22phox cytosolic C-terminal region (132-195) was fused to the LexA protein (pLex10 vector), as bait to screen a human spleen cDNA library in pACT2 vector. The histidine and β -galactosidase positive clone was designed as (+). It was sequenced and identified as the human PAT1 sequence.

(C) Specificity of p22phox(132-195)/PAT1 interaction. The pACT2-PAT1 clone was used to check its interaction with the empty pLex vector and with pLex10-p22phox(132-195). The histidine and β -galactosidase positive clones were designed as (+).

Figure 2. Recombinant p22phox(132-195) interacts with recombinant PAT1 in the GST pull-down assay.

Recombinant PAT1 was incubated with GST-p22phox(132-195) or with GST protein and then with GSH-agarose beads which were washed three times and proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western Blot using anti-GST and anti-PAT1 antibodies. Experiment representative of three.

Figure 3. PAT1 is expressed in human neutrophils.

(A) PAT1 mRNA expression: Neutrophils and lymphocytes were isolated by Dextran sedimentation and Ficoll centrifugation then monocytes were isolated from PBMC using Dynabeads kit as described in methods. 1 μ g of mRNA was retrotranscribed into cDNA which was quantified by Real Time PCR using specific primers amplifying common regions of the 3 isoforms of PAT1. Arbitrary units were attributed based on $E^{\Delta CT}$ calculation (mean \pm SEM, n=4). (B) PAT1 protein expression: Recombinant PAT1 (0.5 μ g) and resting human neutrophil, lymphocyte and monocyte lysates (2 x 10⁶ cells) were analyzed by SDS-PAGE and western blot with an anti-PAT1 antibody. (C) Resting human neutrophils were lysed by nitrogen cavitation and fractions were isolated on a percoll gradient. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and western blot with an anti-PAT1 antibody. For the western blots, one representative of four experiments.

Figure 4. PAT1 colocalization with p22phox in human neutrophils.

(A) Neutrophils in a resting state or treated with fMLF (10⁻⁶ M) or PMA (100 ng/ml), were prepared for confocal microscopy. Cells were incubated with a rabbit anti-p22phox antibody and a mouse anti-PAT1 antibody followed by incubation with Alexa Fluor 488-(green) conjugated goat anti-rabbit and Alexa Fluor 568 (red) conjugated goat anti-mouse. Stained cells were examined with a confocal microscope and the images were analyzed. The overlap of PAT1 and p22phox is clearly seen as the white signal in the merged image and is enriched in the perinuclear region in resting neutrophils and at the membrane periphery in the activated cells (B) Neutrophils in a resting state or treated with fMLF (10⁻⁶ M) or PMA (100 ng/ml), were lysed. Membranes and cytosol were separated by ultracentrifugation on a sucrose gradient. Membrane proteins were analyzed by SDS-PAGE and western blot with anti-PAT1, anti-p22phox and anti-p47phox antibodies (representative of four experiments).

Figure 5. Co-immunoprecipitation of PAT1 with the neutrophil cytochrome b558 .

Neutrophils in a resting state or treated with fMLF (10^{-6} M) or PMA (100 ng/ml), were lysed. Cytochrome b558 was immunoprecipitated using the 7D5 antibody. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western Blot using anti-gp91phox and anti-PAT1 antibodies.

Experiment representative of three.

Figure 6. Recombinant PAT1-increased superoxide production in the cell-free system.

(A) Human recombinant PAT1a was expressed in E. Coli, purified and 50 μ g/ml was added to the reaction mixture consisting of cytosol, membranes and GTP γ S. The reaction was started by adding SDS and the substrate and measuring superoxide anion using the cytochrome c reduction assay. (B) The reaction was performed in the presence of different PAT1a concentrations (μ g/ml). O $_2^{\bullet-}$ production is expressed as nmol/min/ 10^7 cells. (mean \pm SEM, n=4) * p<0.05 as compared to ROS production in the absence of PAT1a.

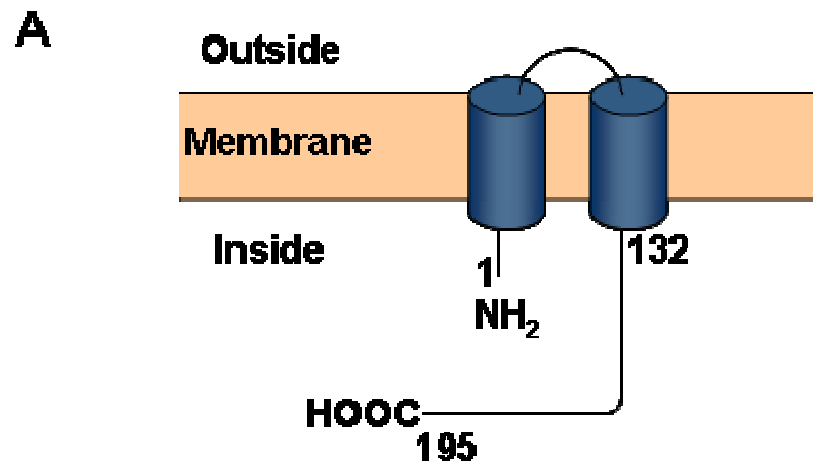
Figure 7. Over-expression of PAT1 in human monocytes induced an increase of ROS production.

(A) Human monocytes were freshly prepared and transfected with either a plasmid expressing PAT1a (pcDNA3.1-PAT1a) or with an empty pcDNA3.1 plasmid. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and western blot with anti-PAT1 and anti-gp91phox antibodies. One experiment representative of three. (B) ROS production was measured using luminol-amplified chemiluminescence in resting cells, fMLF- and PMA-stimulated cells. Results are expressed as percentage of empty pcDNA3.1 plasmid (mean \pm SEM, n=5) * p<0.05 as compared to empty pcDNA3.1 plasmid. # p<0.05 fMLF (10^{-6} M) vs PMA (100 ng/ml).

Figure 8. Over-expression of PAT1 in COSphox cells induced an increase of ROS production.

(A) COSphox cells were transfected with a plasmid expressing PAT1a and lysed in lysis buffer. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and western blot with anti-PAT1, anti-p22phox and anti-p47phox antibodies. (B) Proteins were immunoprecipitated with anti-YY antibody and analyzed by SDS-PAGE and western blot with anti-PAT1, anti-p22phox and anti-gp91phox antibodies. (C) ROS production was measured using luminol-amplified chemiluminescence in resting cells, fMLF- and PMA-stimulated cells. Experiments representative of three.

Figure 1



B

	β Gal	His
pLex10-empty	-	-
pLex10-p22phox (132-195)	+	+
	pACT2 library	

C

	pACT2-empty	pACT2-PAT1
pLex10-empty	-	-
pLex10-p22phox (132-195)	-	+
	β Gal	

Figure 2

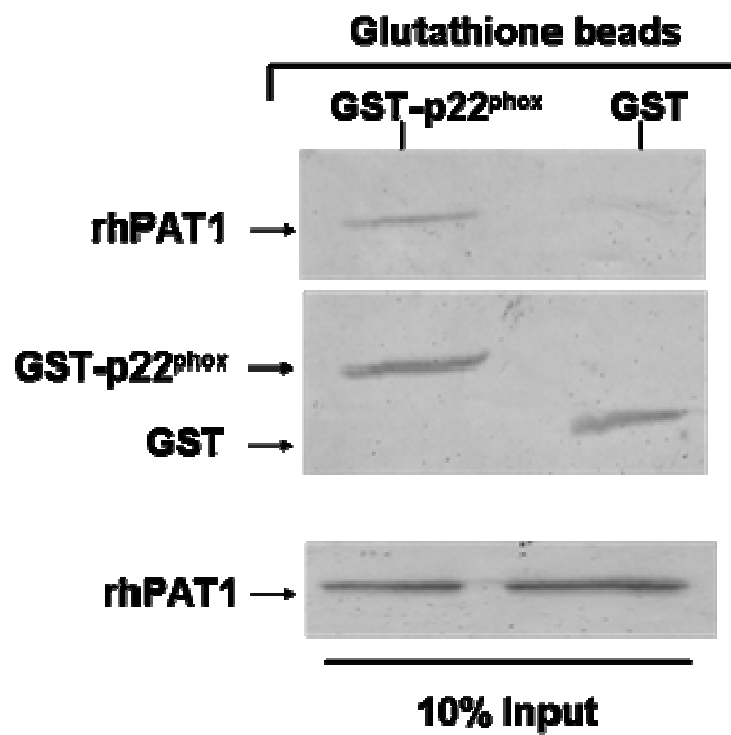


Figure 3

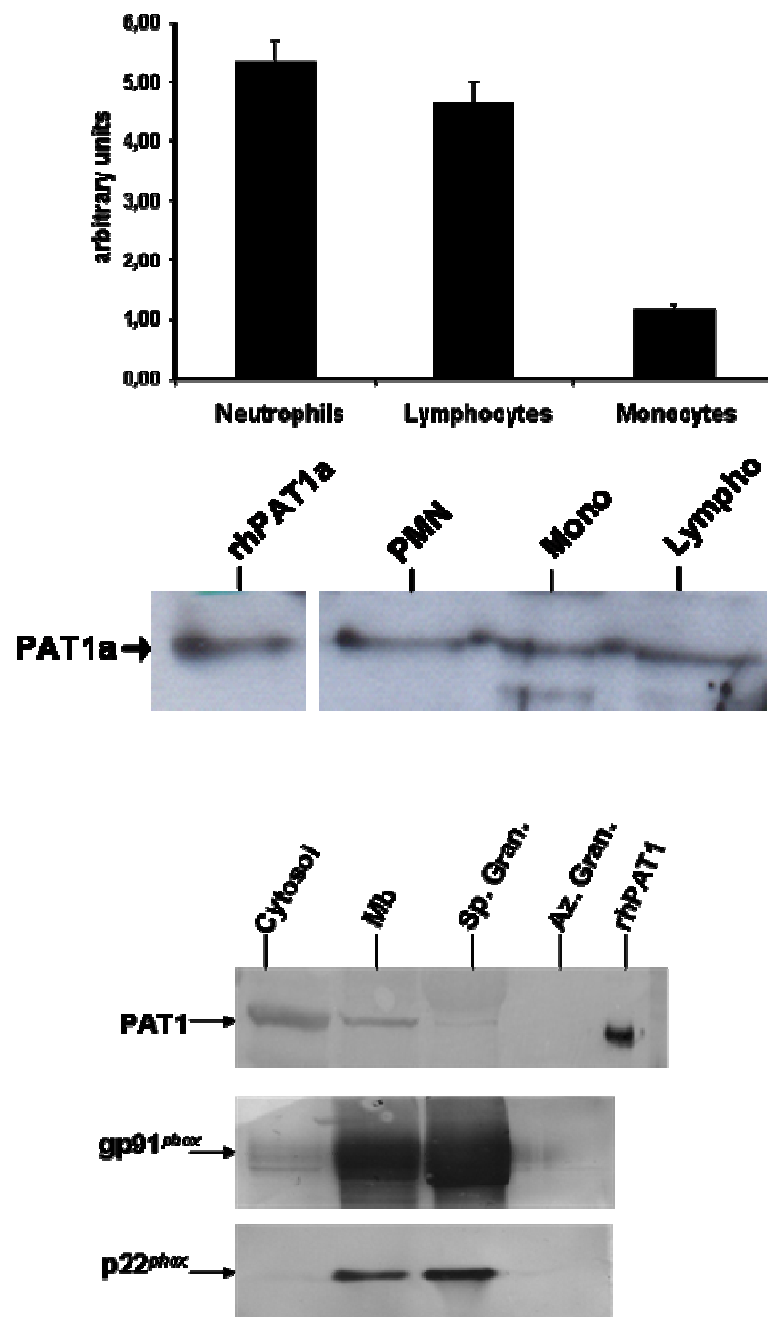


Figure 4

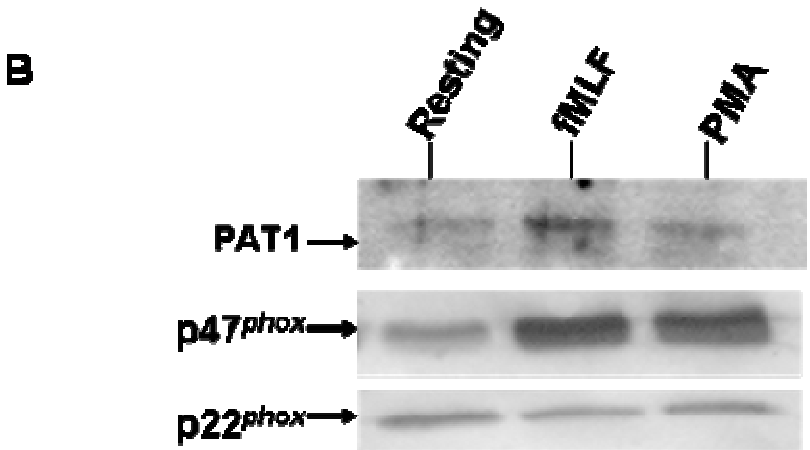
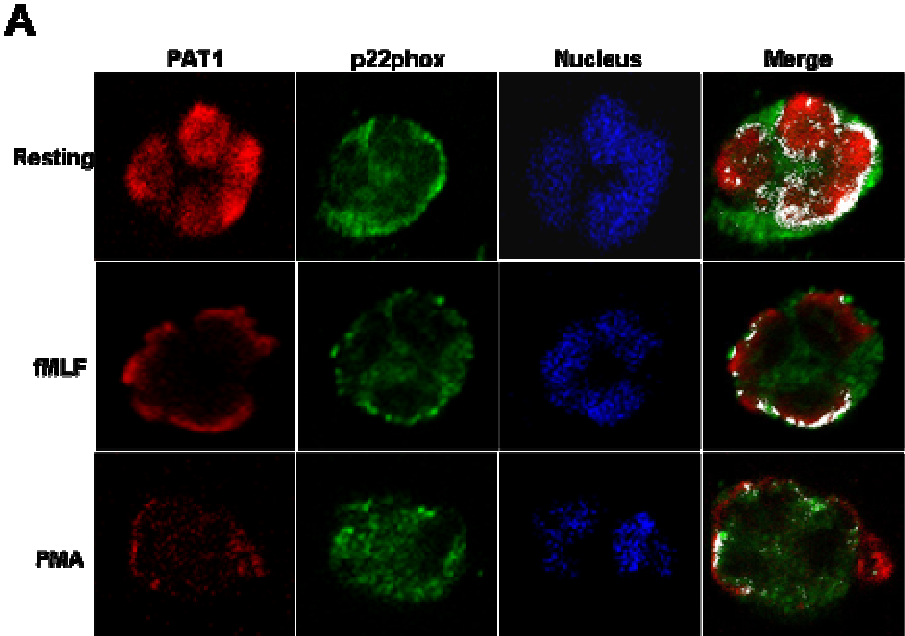


Figure 5

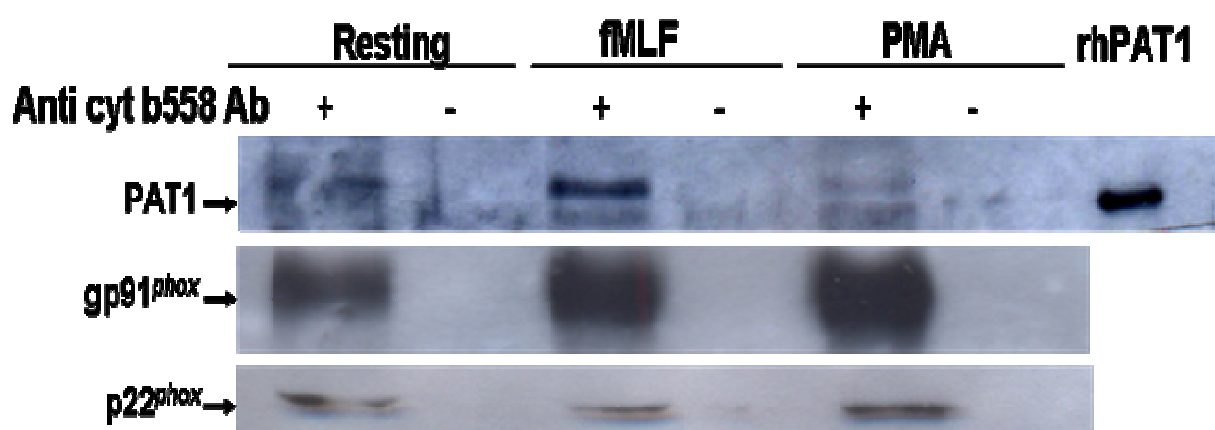


Figure 6

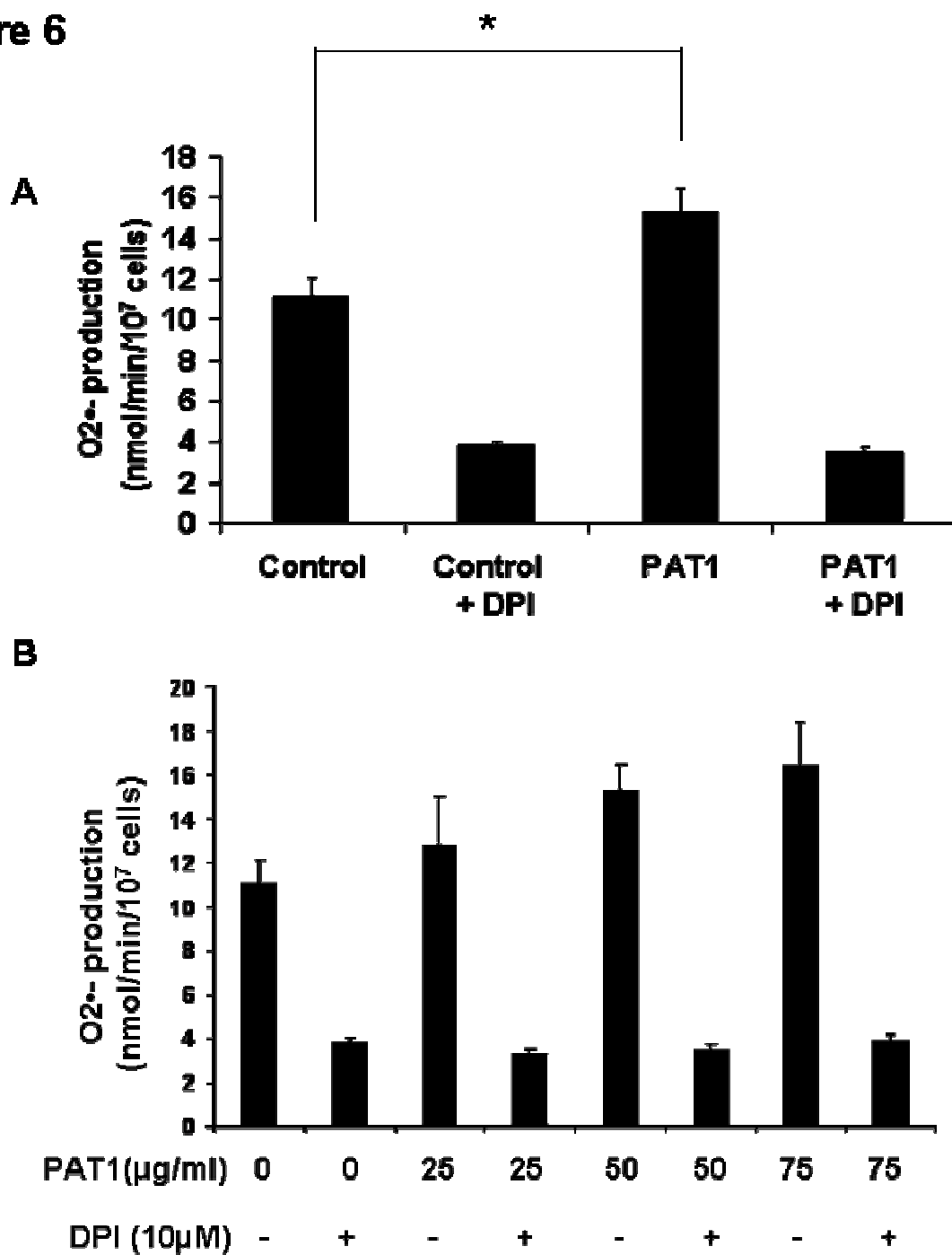


Figure 7

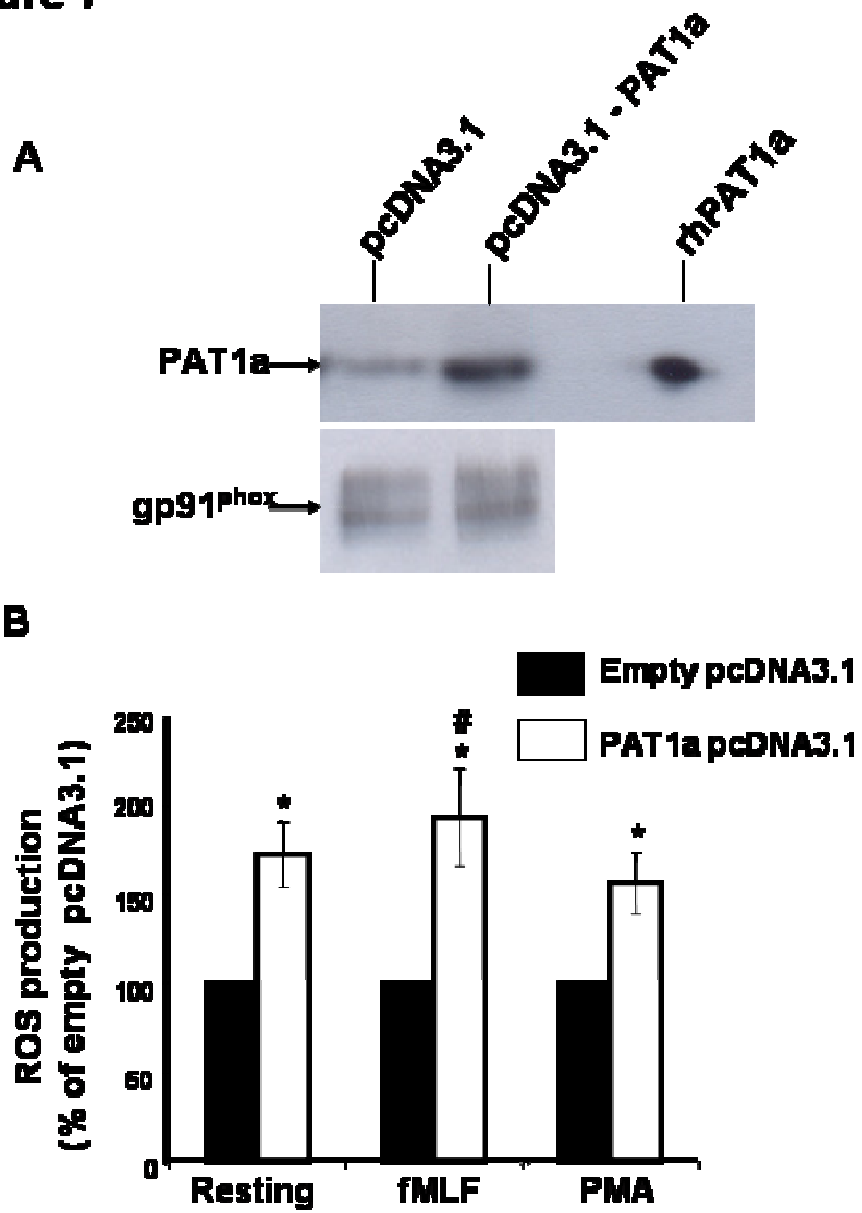


Figure 8

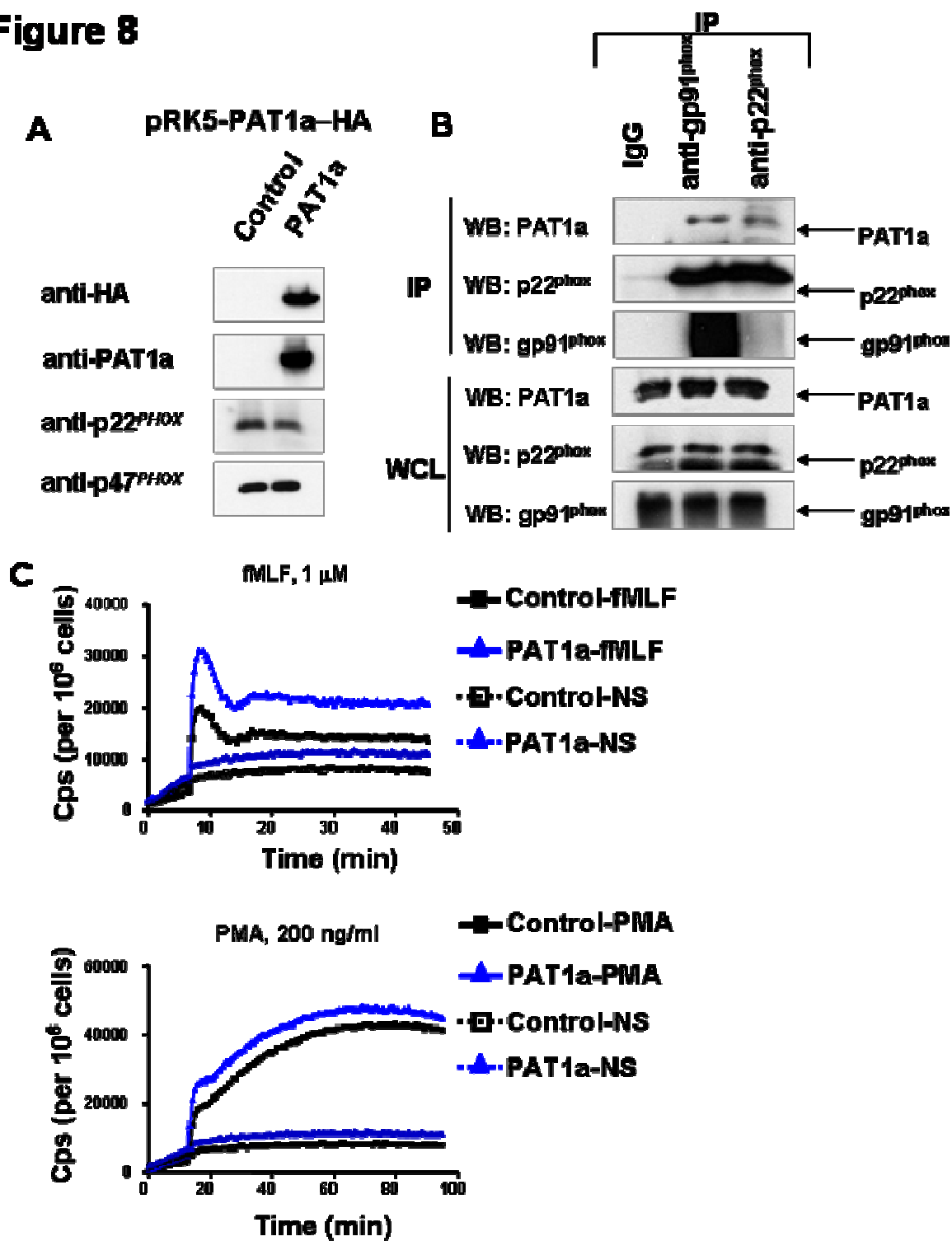


Figure 1 supplementary

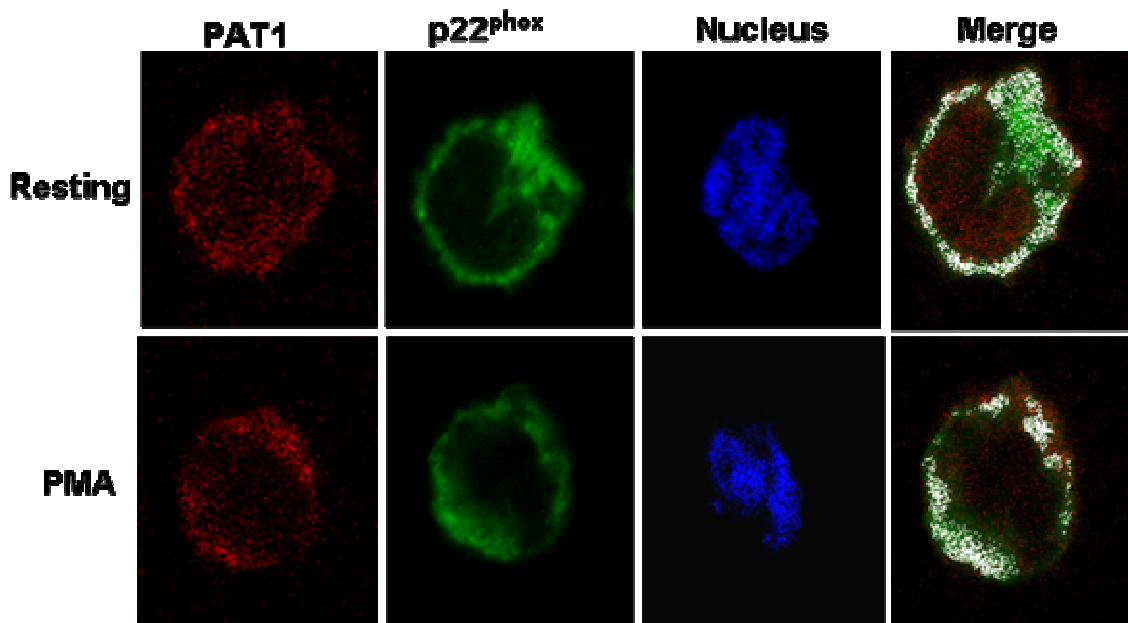


Figure 1 (supplementary) . PAT1 colocalization with p22phox in human monocytes.

(A) Monocytes in a resting state or treated with PMA (100 ng/ml), were prepared for confocal microscopy. Cells were incubated with a rabbit anti-p22phox antibody and a mouse anti-PAT1 antibody followed by incubation with Alexa Fluor 488-(green) conjugated goat anti-rabbit and Alexa Fluor 568 (red) conjugated goat anti-mouse. Stained cells were examined with a confocal microscope and the images were analyzed. The overlap of PAT1 and p22phox is clearly seen as the white signal in the merged image.

Figure 2 supplementary

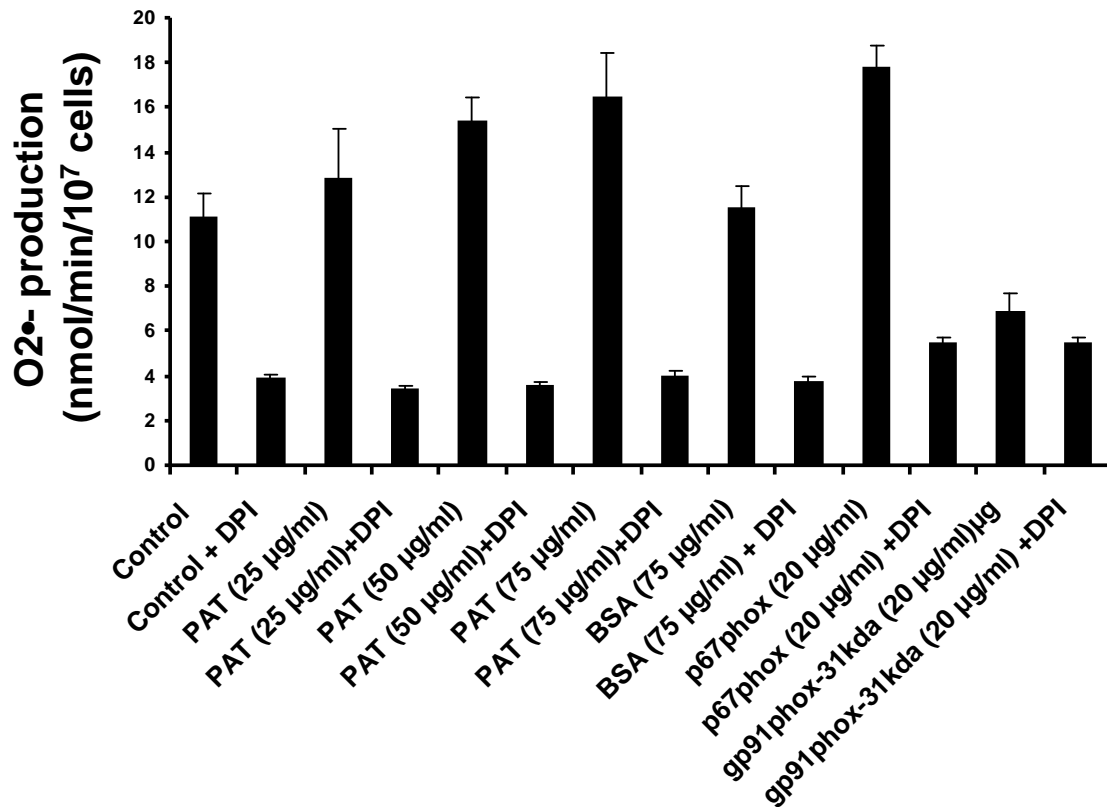


Figure 2 (supplementary). Recombinant PAT1a, but not BSA, increased superoxide production in the cell-free system.

Recombinant PAT1a was added at different concentrations ($\mu\text{g/ml}$) to the reaction mixture consisting of cytosol, membranes and $\text{GTP}\gamma\text{S}$. Control: without any protein. BSA ($75\mu\text{g/ml}$) served as a control. Recombinant p67phox served as a positive control. Cytosolic portion of gp91phox (291-570 aa) served as a negative competitive control. The reaction was started by adding SDS and the substrate and measuring superoxide anion production using the cytochrome c reduction assay. $\text{O}_2^{\bullet-}$ production is expressed as $\text{nmol/min}/10^7$ cells.

Figure 3 supplementary

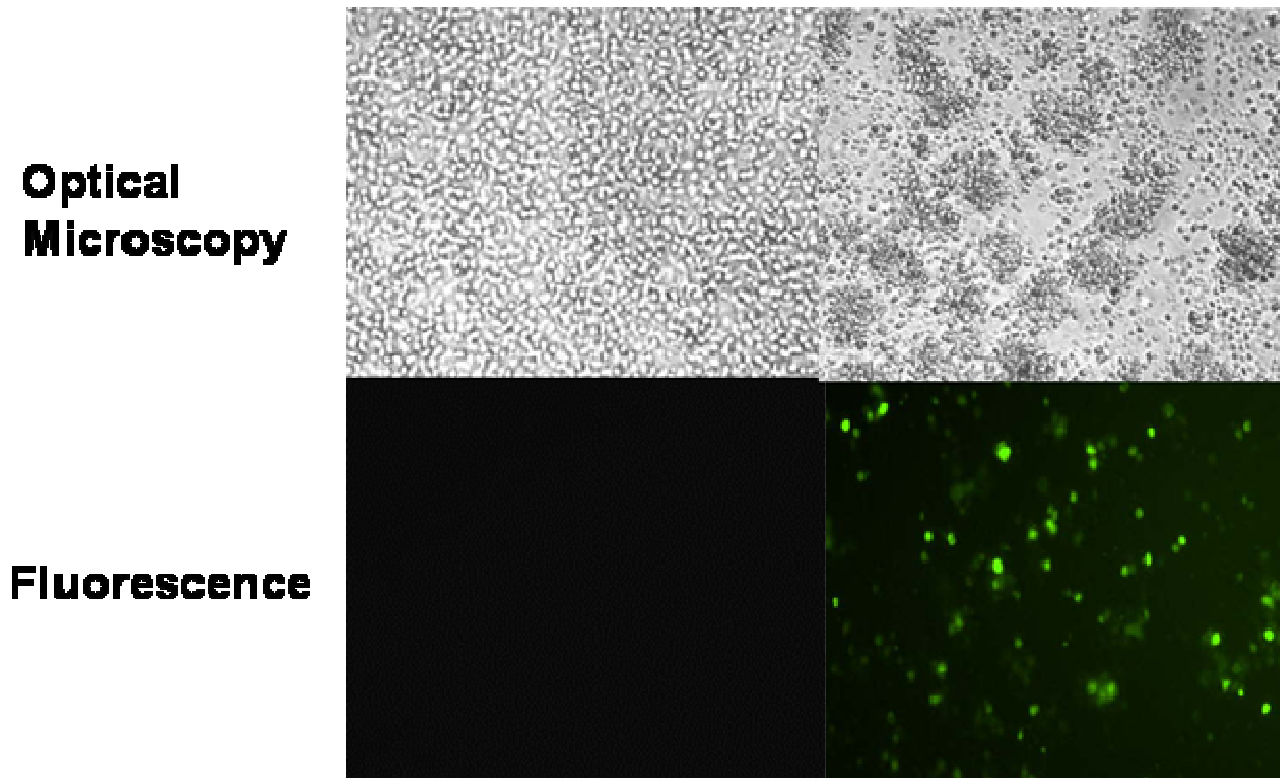


Figure 3 (supplementary). Monocytes were transfected with pCDNA3.1-PAT1a (the two up and down left squares) or with GFP control plasmid (the two up and down right squares). Cells were observed with light and fluorescent microscopy.

2. Résultats supplémentaires

Interaction de PAT1a/p22phox avec les microtubules

Nos résultats suggérant une translocation de PAT1 à la membrane lors de l'activation des cellules et l'équipe de Zheng ayant montré une association aux microtubules (Zheng et al., 1998), nous avons cherché une interaction entre le complexe PAT1/p22phox et les microtubules.

Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de « spin down assay » dont le principe repose sur le fait qu'après incubation de la protéine à tester *in vitro* avec les microtubules polymérisés suivie par une centrifugation, la protéine associée aux microtubules précipite dans le culot tandis que la protéine non associée aux microtubules reste dans le surnageant. Le « spin down assay » a été réalisé selon les instructions du fournisseur du kit utilisé « Cytoskeleton Denever USA ». Brièvement, les microtubules polymérisés (5-10 μ m) ont été préparés à partir de la protéine Tubuline incubée dans un tampon GTB (General tubulin buffer) 20 minutes à 35°C, et dilués par la suite dans le Taxol à 2%. Des quantités équimolaires des protéines recombinantes PAT1a et GST-p22phox(132-195) (5 μ g et 2.4 μ g, respectivement) ont été incubées avec les microtubules polymérisés dans 50 μ l final du tampon (GTB + Taxol) pendant 30 minutes à température ambiante. Le volume de la réaction est déposé sur 100 μ l d'un tampon « cushioning » et centrifugé à 100000g pendant 40 minutes. Le surnageant et le culot sont dénaturés dans le Lammeli et analysés par immuno-empreinte.

Les résultats montrent que la quantité de PAT1a qui précipite dans le culot en présence de microtubules est significativement plus élevée qu'en l'absence de microtubules (Figure 4 supplémentaire). Ce résultat montre que PAT1a se lie aux microtubules *in vitro*, confirmant les résultats de Zheng et al obtenu *ex vivo* à partir de lysat cellulaire (Zheng et al., 1998).

Les mêmes expériences ont été réalisées pour tester l'association p22phox-microtubules. Le taux de GST-p22phox(132-195) recombinante qui précipite dans le culot est le même, indépendamment de la présence ou non de microtubules polymérisés (Figure 5 supplémentaire). Ces résultats suggèrent que la partie C-terminale de la p22phox(132-195) ne s'associe pas directement aux microtubules.

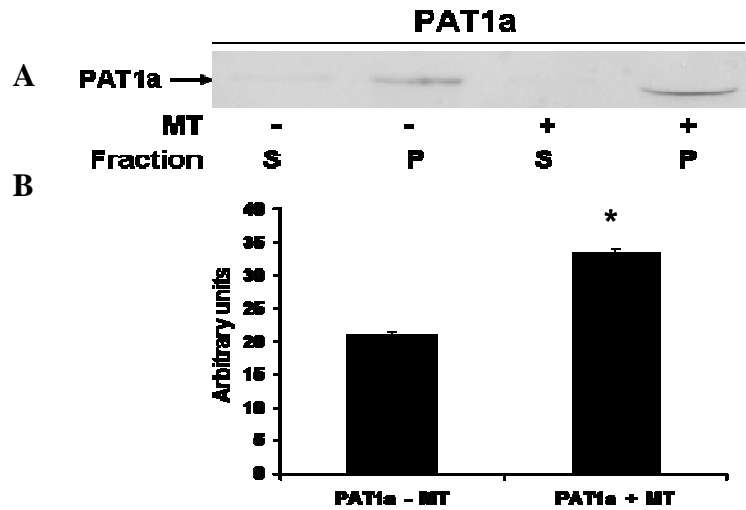


Figure supplémentaire 4. PAT1a se lie aux microtubules polymérisés *in vitro*. La PAT1a recombinante a été incubée avec ou sans microtubules polymérisés pendant 30 minutes à température ambiante. **(A)** Après centrifugation, la détection de PAT1a dans le surnageant et le culot a été effectuée par immuno-empainte avec un anticorps spécifique anti-PAT1. **(B)** Quantification de la PAT1a dans le culot en présence et en l'absence des microtubules. MT : microtubules. S : surnageant. P : culot. Arbitrary units : unités arbitraires. * $p < 0.05$: comparaison entre la quantité de PAT1a dans le culot en présence ou en absence de microtubules. Résultats présentés en termes de moyenne \pm SEM, $n=5$.

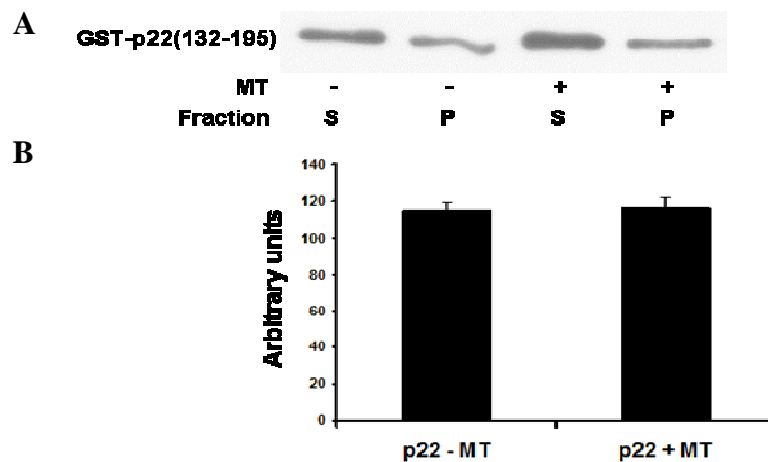


Figure supplémentaire 5. La p22phox ne se lie pas aux microtubules *in vitro* La p22phox(132-195) recombinante liée à la GST (GST-p22(132-195)) a été incubée avec ou sans microtubules polymérisés pendant 30 minutes à température ambiante. **(A)** Après centrifugation, la détection de p22phox dans le surnageant et le culot a été effectuée par immuno-empainte avec un anticorps spécifique anti-p22phox. **(B)** Quantification de la p22phox dans le culot en présence et en l'absence des microtubules. p22 : p22phox. MT : microtubules. S : surnageant. P : culot. Arbitrary units : unités arbitraires. Résultats présentés en termes de moyenne \pm SEM, $n=3$.

Cependant, de façon intéressante, en présence de PAT1a, la quantité de GST-p22phox (132-195) recombinante qui précipite dans le culot est significativement plus importante en présence de microtubules qu'en leur absence suggérant que la p22phox(132-195) s'associe aux microtubules via la PAT1a (Figure 6 supplémentaire).

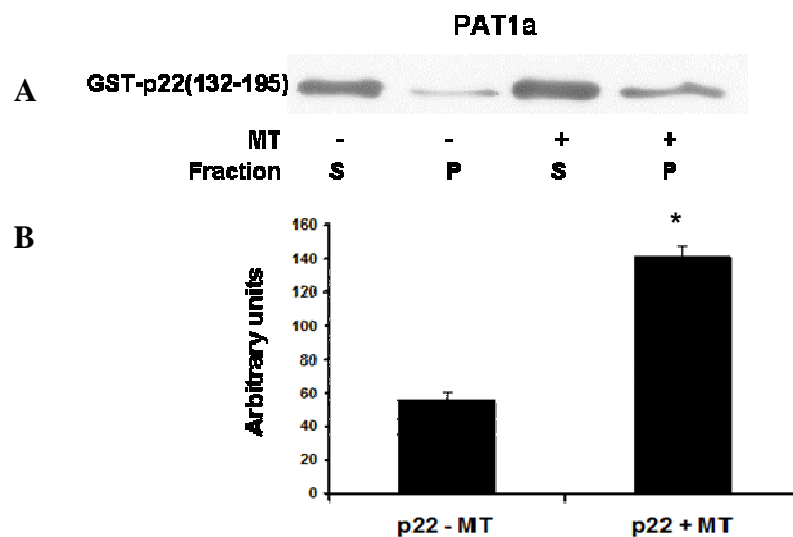


Figure supplémentaire 6. La p22phox s'associe aux microtubules via la PAT1a *in vitro*

La p22phox (132-195) recombinante liée à la GST (GST-p22(132-195)) a été incubée avec ou sans microtubules polymérisés en présence de PAT1a recombinante pendant 30 minutes à température ambiante. (A) Après centrifugation, la détection de p22phox dans le surnageant et le culot a été effectuée par immuno-empreinte avec un anticorps spécifique anti-p22phox. (B) Quantification de la p22phox dans le culot en présence et en l'absence des microtubules.

p22 : p22phox. MT : microtubules. S : surnageant. P : culot. Arbitrary units : unités arbitraires. * $p < 0.05$: comparaison entre la quantité de GST-p22phox (132-195) dans le culot en présence ou en absence de microtubules. Résultats présentés en termes de moyenne \pm SEM, $n=3$.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les polynucléaires neutrophiles humains (PN) sont une des premières barrières de défense contre l'introduction d'un agent pathogène dans l'organisme (Witko-Sarsat et al., 2000, Nathan et al., 2006). Ils sont un des pivots de l'immunité innée et constituent un puissant système de défense de l'homme contre les agents pathogènes principalement les bactéries et les champignons mais aussi les parasites et les virus qui ont franchi les barrières cutanéomuqueuses, et des structures reconnues comme étrangères telles que les cellules et les molécules endogènes altérées. Les activités microbicides des PN dépendent de différents mécanismes qui sont d'ailleurs intriqués : libération de protéines à activité anti-microbienne et production rapide de formes réactives de l'oxygène (FRO), c'est ce que l'on appelle l'explosion oxydative des PN (Nauseef, 2007). La production des FRO dépend de l'activation d'un système enzymatique complexe, la NADPH oxydase (Babior., 1999 ; Vignais., 2002 ; El Benna et al., 2005). Celle-ci est faite de différents composants distribués entre la membrane et le cytoplasme dans le PN au repos : le flavocytochrome b_{558} qui est membranaire et constitué de deux sous unités (gp91phox et p22phox; phox pour phagocyte oxidase), des composants cytosoliques (p47phox, p67phox, p40phox et une petite protéine G, de type Rac 2 dans le PN humain). Sous l'influence de différents stimuli, induisant l'activation de signaux transductionnels et particulièrement de mécanismes de phosphorylation, les composants cytosoliques transloquent vers la membrane aboutissant à la formation d'un complexe moléculaire actif responsable du transfert d'électrons à partir du NADPH sur l'oxygène moléculaire. Ce transfert d'électron génère la production d'anion superoxyde précurseur des différentes FRO (Chanock et al., 1994 ; Babior, 2004). La NADPH oxydase joue un rôle essentiel dans la microbicidie comme le montre l'apparition d'infections graves et/ou répétées dans la granulomatose septique familiale, déficit génétique de production des FRO par le système NADPH oxydase des phagocytes (Segal et al., 2000 ; Heyworth et al., 2003). Cependant, les PN sont des armes à double tranchant, car une activation excessive, prolongée ou encore dans un lieu inapproprié peut conduire à des lésions tissulaires sévères impliquées dans la physiopathologie de différentes maladies inflammatoires aiguës ou chroniques, comme dans la polyarthrite rhumatoïde, certaines maladies inflammatoires pulmonaires, les maladies inflammatoires chroniques intestinales, le syndrome d'ischémie/reperfusion... (Babior, 1984 ; Smith, 1994 ; Weiss, 1989 ; Witko-Sarsat et al., 2000 ; Lambeth., 2007). Ceci souligne donc la nécessité d'une régulation fine et précise de l'activité de la NADPH oxydase. De nombreux mécanismes sont impliqués dans cette régulation que ce soit dans l'environnement du PN par les médiateurs de l'inflammation induisant des signaux

intracellulaires ou au niveau de la NADPH oxydase elle-même dont les composants vont subir différentes modifications notamment des phosphorylations induisant des changements conformationnels, permettant de nouvelles interactions moléculaires telles que des interactions protéine/protéine ou protéine/lipide. Lors de l'activation de la NADPH oxydase, la p47phox subit une phosphorylation sur plusieurs sites et transloque, avec les autres composants cytosoliques, à la membrane où elle se lie à la partie C-terminale cytosolique de la p22phox (El Benna et al., 2009). La liaison p47phox-p22phox est essentielle pour l'assemblage de la NADPH oxydase. En effet, la p22phox possède deux domaines transmembranaires et une longue portion cytosolique C-terminale (Davis et al., 1998 ; Taylor et al., 2004). La partie cytosolique C-terminale de la p22phox contient les acides aminés 132-195 et son poids moléculaire est d'environ 7 kDa (Fontayne et al., 2002). Elle possède une séquence riche en proline qui sert de site d'ancrage aux deux domaines SH3 de la p47phox lors de l'activation de la NADPH oxydase (Chanock et al., 1994 ; Groemping et al., 2005). Le rôle de cette séquence riche en proline dans l'arrimage de la p47phox a été montré par mutagenèse dirigée de ces sites et chez un patient atteint de granulomatose septique ayant une mutation de la proline 156 (Lewis et al., 2010 ; Dinauer et al., 1991).

Dans ce travail, nous montrons qu'une protéine non encore décrite dans les phagocytes, la PAT1, interagit avec la partie cytosolique de la p22phox. Cette nouvelle interaction régule l'activation de la NADPH oxydase et la production des FRO. Nous décrivons donc dans ce travail une nouvelle fonction de la PAT1 dans les cellules phagocytaires.

Nous avons utilisé différentes approches pour montrer cette interaction entre la PAT1 et la p22phox : le système double hybride dans les levures, la technique de GST-pull down *in vitro*, la microscopie confocale et la technique de co-immunoprécipitation. De plus, nous avons montré que la PAT1 recombinante a un effet positif sur l'activité de la NADPH oxydase, *in vitro* dans un système acellulaire reconstitué, et dans les cellules intactes (monocytes et cellules COS-phox).

Au cours de l'activation de la NADPH oxydase, la région riche en proline de la partie cytosolique de la p22phox sert de site d'ancrage pour les deux domaines SH3 en tandem sur la p47phox. PAT1 n'a pas de domaine SH3 mais elle dispose dans sa séquence de plusieurs domaines qui sont susceptibles de servir dans les interactions protéine/protéine comme les séquences de 5 répétitions de 7 acides aminés, le domaine LXXLL et les 4 motifs TPR. Bien que Zhang et ses collaborateurs aient produit plusieurs formes tronquées de PAT1/ARA67, ils n'ont pas réussi à démontrer l'implication d'un domaine particulier dans la liaison avec le récepteur à l'androgène (Zhang et al., 2004). D'autre part, notre clone positif obtenu grâce à la

technique de double hybride code pour une séquence d'environ 278 acides aminés dans la partie N-terminale (N-ter) de PAT1 ce qui suggère que cette partie de PAT1 serait plus particulièrement impliquée dans la liaison avec la p22phox. Il faut noter que les 5 séquences répétées de 7 acides aminés ainsi que le domaine LXXLL sont contenus dans ces 278 acides aminés. La détermination du ou des site(s) de liaison entre PAT1 et la p22phox demandera des investigations plus approfondies.

Zheng et ses collaborateurs ont déterminé sur la séquence de PAT1 des sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C (figure 20). Nos données préliminaires obtenues *in vitro* montre que PAT1a recombinante est phosphorylée par la PKC β et plus modérément par un mélange purifié de PKC α , β , γ et δ , ζ . Par contre, nous n'avons pas mis en évidence de phosphorylation avec les ERK1/2 (Résultats non montrés). Ces données sont bien sûr à confirmer *in vitro* et dans des cellules intactes ainsi que la nature des résidus phosphorylés. Au sein du complexe NADPH oxydase, les phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation jouent un rôle majeur dans la régulation de cette enzyme (El Benna et al., 2005 ; Fontayne et al., 2002). La partie cytosolique de la p22phox est phosphorylée lors de l'activation de la cellule par les PKC conventionnelles (Regier et al., 1999). De plus, les PKC phosphorylent la p22phox sur un seul site, la thréonine 147, régulant l'interaction p22phox-p47phox dans les cellules stimulées, potentialisant ainsi l'activité de la NADPH oxydase (Lewis et al., 2009). La PKC β existe dans les neutrophiles ainsi que les autres isoformes de PKC (El Benna et al., 2009). Ainsi, peut-on se demander si la phosphorylation de la p22phox et éventuellement celle de PAT1 aurait un effet sur leur interaction, et par conséquent sur l'activité de la NADPH oxydase.

L'ARNm de PAT1 est exprimé dans différents tissus comme le cœur, le cerveau, les muscles squelettiques et le placenta. Trois isoformes quasi identiques (quelques acides aminés de différences) ont été décrits dans la littérature ; PAT1 elle-même, ARA67 qui est 99.6% identique à PAT1, et PAT1a qui est 99% identique à PAT1. J'ai effectué mon travail en utilisant PAT1a dont l'équipe de Stefan Kins (Kuan et al., 2006) nous a envoyé le plasmide contenant sa séquence. Puisque ces trois isoformes sont identiques à 99%, ils pourraient tous interagir avec la partie C-ter cytosolique de la p22phox formée des acides aminés 132 à 195.

PAT1 lie les microtubules dans les cellules COS-1 et est impliquée dans le trafic et la localisation subcellulaire de plusieurs protéines comme la β Amyloïd precursor protein (APP) (Zheng et al., 1998), la protéine virale Us11 (Benboudjema et al., 2003) et le récepteur à l'androgène (AR) (Zhang et al., 2004). Nous avons étudié et confirmé la liaison PAT1-microtubules *in vitro* confortant les résultats de Zheng et al (Figure 4 supplémentaire de la

section Résultats supplémentaires). De plus, nous avons testé l'effet de la présence de PAT1 sur la liaison p22phox-microtubules. En effet, la p22phox seule ne s'associe pas aux microtubules *in vitro* (Figure 5 supplémentaire de la section Résultats supplémentaires). L'addition de PAT1 dans la réaction permet à la p22phox de co-précipiter avec les microtubules (Figure 6 supplémentaire de la section Résultats supplémentaires), suggérant que PAT1 pourrait participer indirectement à l'association de la p22phox aux microtubules et donc à des structures du cytosquelette. De plus, nous avons montré que PAT1 transloque du cytosol à la membrane après stimulation des PN ce qui est concordant avec un rôle possible de PAT1, entre autres, dans le trafic des composants de la NADPH oxydase à la membrane plasmique lors de l'activation de la cellule. Ces résultats peuvent conduire à l'hypothèse que PAT1 pourrait jouer un rôle dans le trafic des granulations riches en p22phox pendant l'activation du phagocyte.

En effet, il est admis que la p22phox transloque de ses sites de stockage intracellulaire vers le phagosome après l'activation de la cellule (Jesaitis et al., 1990). De plus, il a été montré que le cytochrome b558 subit un changement de conformation et se lie aux protéines du cytosquelette (moesin et Ezrin) pendant l'activation de la NADPH oxydase (Paclet et al., 2007). PAT1 pourrait faciliter la liaison du cytochrome b558 au cytosquelette contrôlant ainsi la localisation des composants de la NADPH oxydase dans la cellule. Des études complémentaires seront nécessaires pour tester cette hypothèse.

L'expression de p22phox n'est pas restreinte aux phagocytes : elle est exprimée dans plusieurs tissus et cellules comme les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les neurones, ...etc. P22phox est associée à d'autres NOX (NOX1, NOX2, NOX3, et NOX4) et est responsable de leur stabilité. Ainsi, p22phox est présente dans les cellules endothéliales coronaires où elle colocalise avec NOX2 (Bayraktutan et al., 2000), dans les neurones de l'hippocampe où elle colocalise avec NOX2 au niveau des synapses (Tejada-Simon et al., 2005) et dans les cellules musculaires lisses vasculaires où elle colocalise avec NOX1 (Hanna et al., 2004). Récemment, en utilisant un système de double hybride dans les levures criblant ainsi une librairie de cellules musculaire lisses vasculaires, Lyle et ses collaborateurs ont montré que la protéine Poldip2 « POLymerase Delta Interacting Protein 2 » était un nouveau partenaire de la p22phox (Lyle et al., 2009). En effet, Poldip2 co-immunoprécipite avec la p22phox et NOX4. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, Poldip2 colocalise avec NOX4 et p22phox et elle est capable d'augmenter l'activité enzymatique basale de NOX4 dans ces cellules. De plus, Poldip2 module le remodelage du cytosquelette et contrôle la migration cellulaire. Nos

résultats ainsi que ceux de Lyle et al, suggèrent que la p22phox pourrait avoir plusieurs partenaires dans des cellules différentes avec des fonctions différentes. PAT1 est présente dans différents types cellulaires originaires de différents tissus comme la lignée cellulaire LNCap originaire de la prostate, la lignée cellulaire de gliome (ligne cellulaire HTB14) et les neurones corticaux primaires de souris (Zhang et al., 2004 ; Briand et al., 2009). Il n'est donc pas exclu que PAT1 puisse avec son partenaire, la p22phox, jouer un rôle dans la régulation de NOX2 ou d'autres NOX en fonction de leur localisation cellulaire et tissulaire.

PAT1 détient un domaine de localisation nucléaire « NLS » et des signaux d'export nucléaire (NESs). Une localisation nucléaire a été observée dans plusieurs types cellulaires (Gao et al., 2001). Nous avons constaté dans les PN et les monocytes au repos que PAT1 était présente dans le cytosol mais aussi dans le noyau (Figure 4 et Figure 1 supplémentaire de la publication soumise). Nous disposons de données préliminaires par microscopie confocale qui montrent que la colocalisation PAT1-noyau est plus importante au repos qu'après stimulation avec le fMLF ou le PMA, suggérant une translocation de PAT1 du noyau vers le cytosol lors de l'activation des cellules. Ces données seraient à compléter par des techniques de fractionnement subcellulaire afin d'être confirmées. L'éventuelle exportation de PAT1 du noyau pourrait ainsi renforcer son pool cytosolique en vue de remplacer la PAT1 cytosolique transloquée à la membrane plasmique et dégradée par la suite lors de la restauration de l'état normale de la cellule. La translocation de PAT1 du noyau vers le cytosol lors de l'activation des PN ou des monocytes pourrait ainsi participer à la potentialisation de la production des FRO par la NADPH oxydase que nous avons montrée dans ce travail. Par ailleurs, il a été montré que PAT1 entraînait la translocation de l'oncogène SET (template activating factor 1 β ou phosphatase 2A inhibitor 2) du noyau vers le cytosol induisant la mort cellulaire des neurones corticales primaires (Briand et al., 2009). SET a comme fonction, entre autres, l'inhibition de la phosphatase 2A (PP2A) (Vera et al., 2006), ce qui peut intervenir dans la régulation de la NADPH oxydase. En effet, les PN expriment bien les phosphatases PP1 et PP2A et leur inhibiteur, la calyculine A, potentialise la production des FRO et la phosphorylation de la p47phox (Kawakami et al., 1999). De plus, PP2A est un régulateur négatif de la voie des ERK dans les fibroblastes (Satoshi et al., 2002). Ici nous émettons l'hypothèse que PAT1, en augmentant le taux de SET dans le cytosol, pourrait inhiber la PP2A, et par conséquent potentialiser la production des FRO par la NADPH oxydase. Cependant, la présence et la fonction de SET dans les phagocytes n'ont pas encore été étudiées.

Par ailleurs, PAT1 dispose d'un domaine PEST à l'extrémité C-terminale impliquée, comme je l'ai précisé dans l'introduction, dans la dégradation de protéines régulatrices ayant un « turnover » élevé. Son éventuel rôle dans la dégradation de protéines impliquées dans l'activité de la NADPH oxydase pourrait être exploré.

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune inflammatoire. Au cours de cette maladie, les PN activés infiltrent le liquide synovial des articulations des patients. La production en excès de FRO par les PN du liquide synovial a été montrée par des membres de notre équipe et peut participer à la dégradation ostéo-articulaire (Dang et al., 2006). Ayant montré que PAT1 potentialisait la production des FRO par la NADPH oxydase phagocytaire, nous avons étudié l'expression de PAT1 dans les PN isolés du liquide synovial de patients atteints de PR. Nos résultats montrent une expression beaucoup moins importante de l'ARNm dans ces PN comparée à celle des PN témoins. D'une façon surprenante, le niveau d'expression de la protéine ne semble pas significativement modifié : chez 2 des trois patients étudiés on constatait plutôt une augmentation d'expression. L'étude de l'expression de PAT1 dans les PN isolés de liquide synoviaux de patients atteints de PR devra être poursuivie sur un plus grand nombre de patients en tenant compte de l'état clinique et des traitements en cours. L'étude des mécanismes qui régulent l'expression de PAT1 dans des contextes inflammatoires et ceux par lesquels PAT1 potentialise la production de FRO dans les phagocytes humains pourrait conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'espérer diminuer les lésions tissulaires dues à l'hyperactivation de la NADPH oxydase au niveau du site inflammatoire.

En conclusion, mon travail de thèse montre que la partie cytosolique de la p22phox interagit avec PAT1, une protéine non décrite dans les cellules phagocytaires. Cette interaction potentialise l'activation de la NADPH et la production des FRO par les phagocytes. PAT1 pourrait réguler la réponse immunitaire inflammatoire chez l'homme.

REFERENCES

- Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature*. 1991; 353:668-70.
- Abo A, Boyhan A, West I, Thrasher AJ, Segal AW. Reconstitution of neutrophil NADPH oxidase activity in the cell-free system by four components: p67phox, p47phox, p21rac1, and cytochrome b-245. *J Biol Chem*. 1992; 267:16767-70.
- Ago T, Nunoi H, Ito T, Sumimoto H. Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47phox. Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47phox, thereby activating the oxidase. *J Biol Chem*. 1999; 274:33644-53.
- Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H and Iida M. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NADPH oxidase. *Circulation*. 2004; 109:227-33.
- Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, Sumimoto H. Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:4474-79.
- Arai, K. I., F. Lee, A. Miyajima, S. Miyatake, N. Arai and T. Yokota. "Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses." *Annu Rev Biochem*. 1990; 59: 783-836.
- Arnold R, Werner F, Humbert B, Werchau H, König W. Effect of respiratory syncytial virus-antibody complexes on cytokine (IL-8, IL-6, TNF-alpha) release and respiratory burst in human granulocytes. *Immunology*. 1994;82:184-91.
- Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*. 1973; 52:741-4.
- Babior BM. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood*, 1984; 64: 959-966
- Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999; 93:1464-76.
- Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*. 2000; 109:33-44. *Revue*.
- Babior BM. The activity of leukocyte NADPH oxidase: regulation by p47phox cysteine and serine residues. *Antioxid Redox Signal*. 2002; 4:35-8.
- Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 2004; 16:42-7. *Revue*
- Bainton DF, Miller LJ, Kishimoto TK, Springer TA. Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils. *J Exp Med*. 1987; 166:1641-53.
- Banfi, B., G. Molnar, A. Maturana, K. Steger, B. Hegedus, N. Demaurex and K. H. Krause "A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes." *J Biol Chem* 2001 276: 37594-37601

Banfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem.* 2003; 278:3510-3.

Bauldry, S. A., R. L. Wykle and D. A. Bass. "Differential actions of diacyl- and alkylacylglycerols in priming phospholipase A2, 5-lipoxygenase and acetyltransferase activation in human neutrophils." *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1084:178-184.

Bayraktutan U, Blayney L, Shah AM. Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1903-1911.

Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med.* 1991;173:771-774.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007; 87:245-313. *Revue.*

Benboudjema L, Mulvey M, Gao Y, Pimplikar SW, Mohr I. Association of the herpes simplex virus type 1 Us11 gene product with the cellular kinesin light-chain-related protein PAT1 results in the redistribution of both polypeptides. *J Virol.* 2003; 77:9192-203.

Bengis-Garber C, Gruener N. Protein kinase A downregulates the phosphorylation of p47phox in human neutrophils: a possible pathway for inhibition of the respiratory burst. *Cell Signal.* 1996; 8:291-6.

Bianchi, M., A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler, R. A. Seger, A. Zychlinsky and J. Reichenbach "Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis." *Blood* 2009; 114: 2619-2622.

Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol.* 1983; 97:52-61.

Borregaard, N. "[Cellular biology of neutrophil granulocytes]." *Ugeskr Laeger* 1996; 158: 3908-3912.

Borregaard N. Current concepts about neutrophil granule physiology. *Curr Opin Hematol.* 1996; 3:11-8. *Revue.*

Borregaard, N. and J. B. Cowland "Granules of the human neutrophilic. polymorphonuclear leukocyte." *Blood.* 1997; 89:3503-3521.

Bouin AP, Grandvaux N, Vignais PV, Fuchs A. p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem.* 1998; 273:30097-103.

Bourgoin, S., E. Plante, M. Gaudry, P. H. Naccache, P. Borgeat and P. E. Poubelle . "Involvement of a phospholipase D in the mechanism of action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): priming of human neutrophils in vitro with GM-CSF is

associated with accumulation of phosphatidic acid and diradylglycerol." *J Exp Med* 1990; 172: 767-777.

Boussetta T, Gougerot-Pocidal MA, Hayem G, Ciappelloni S, Raad H, Arabi Derkawi R, Bournier O, Kroviarski Y, Zhou XZ, Malter JS, Lu PK, Bartegi A, Dang PM, El-Benna J. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood*. 2010; 116:5795-802.

Briand, S., et al., PAT1 induces cell death signal and SET mislocalization into the cytoplasm by increasing APP/APLP2 at the cell surface. *Neurobiol Aging*. 2009; 32:1099-113

Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch and A. Zychlinsky "Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303:1532-1535.

Cadwallader KA, Condliffe AM, McGregor A, Walker TR, White JF, Stephens LR, Chilvers ER. Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation by neutrophil priming agents. *J Immunol*. 2002 Sep 15; 169(6):3336-44.

Cassimeris L, Safer D, Nachmias VT, Zigmond SH. Thymosin beta 4 sequesters the majority of G-actin in resting human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol*. 1992; 119:1261-70.

Cassatella MA, Guasparri I, Ceska M, Bazzoni F, Rossi F. Interferon-gamma inhibits interleukin-8 production by human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*. 1993 Feb;78(2):177-84.

Cassatella, M. A. "The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils." *Immunol Today*. 1995; 16: 21-26.

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*. 1982; 257:7847-51.

Chanock, S.J., El-Benna, J., Smith, R.M., and Babior, B.M. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem*. 1994; 269:24519-24522.

Cheng G, Ritsick D, Lambeth JD. NOX3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem*. 2004a; 279:34250-5.

Cheng G, Lambeth JD. NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. *J Biol Chem*. 2004b; 279:4737-42.

Chessa, T. A., K. E. Anderson, Y. Hu, Q. Xu, O. Rausch, L. R. Stephens and P. T. Hawkins .Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Blood*. 2010; 116:6027-36.

Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 1998; 94:461-71.

Cross AR, Rae J, Curnutte JT. Cytochrome b-245 of the neutrophil superoxide-generating system contains two nonidentical hemes. Potentiometric studies of a mutant form of gp91phox. *J Biol Chem.* 1995a; 270:17075-7.

Cross AR, Heyworth PG, Rae J, Curnutte JT. A variant X-linked chronic granulomatous disease patient (X91+) with partially functional cytochrome b. *J Biol Chem.* 1995b Apr 7; 270(14):8194-200. Erratum in: *J Biol Chem.* 1995b; 270:17056.

Cross AR, Curnutte JT. The cytosolic activating factors p47phox and p67phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 1995c; 270:6543-8.

Curnutte JT, Erickson RW, Ding J, Badwey JA. Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with a phorbol ester. *J Biol Chem.* 1994; 269:10813-9.

Damiano VV, Kucich U, Murer E, Laudenslager N, Weinbaum G. Ultrastructural quantitation of peroxidase- and elastase-containing granules in human neutrophils. *Am J Pathol.* 1988; 131:235-45.

Dang PM, Hakim J, Perianin A. Immunochemical identification and translocation of protein kinase C zeta in human neutrophils. *FEBS Lett.* 1994; 349:338-42.

Dang PM, Dewas C, Gaudry M, Fay M, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidal MA, El Benna J. Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47(phox). *J Biol Chem.* 1999; 274:20704-8.

Dang PM, Fontayne A, Hakim J, El Benna J, Périanin A. Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol.* 2001; 166:1206-13.

Dang PM, Cross AR, Babior BM. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:3001-5.

Dang PM, Morel F, Gougerot-Pocidal MA, El Benna J. *Biochemistry.* Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. 2003; 42:4520-6.

Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidal MA, El-Benna J. A specific p47phox serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest.* 2006a; 116:2033-43.

Dang PM, Elbim C, Marie JC, Chiandotto M, Gougerot-Pocidal MA, El-Benna J. Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47phox phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity. *FASEB J.* 2006b; 20:1504-6.

Davis AR, Mascolo PL, Bunger PL, Sipes KM, Quinn MT. Cloning and sequencing of the bovine flavocytochrome b subunit proteins, gp91-phox and p22-phox: comparison with other known flavocytochrome b sequences. *J Leukoc Biol.* 1998; 64:114-23.

de Almeida MC, Silva AC, Barral A, Barral Netto M. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95:221-3.

De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem.* 2000; 275:23227-33.

De Leo FR, Nauseef WM, Jesaitis AJ, Burritt JB, Clark RA, Quinn MT. A domain of p47phox that interacts with human neutrophil flavocytochrome b558. *J Biol Chem.* 1995; 270:26246-51.

De Leo FR, Ulman KV, Davis AR, Jutila KL, Quinn MT. Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67phox and flavocytochrome b to a common functional domain in p47phox. *J Biol Chem.* 1996a; 271:17013-20.

De Leo FR, Quinn MT. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol.* 1996b; 60:677-91.

De Leo FR, Allen LA, Apicella M, Nauseef WM. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J Immunol.* 1999; 163:6732-40.

De Leo FR, Burritt JB, Yu L, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Nauseef WM. Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem.* 2000; 275:13986-93.

Dekker, L. V. and P. J. Parker. "Protein kinase C--a question of specificity." *Trends Biochem Sci.* 1994; 19: 73-77.

Dewas C, Fay M, Gougerot-Pocidal MA, El-Benna J. The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol.* 2000; 165 :5238-44.

Dewas, C., P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidal and J. El-Benna "TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *J Immunol* 2003; 171: 4392-4398.

Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem.* 1989; 264:16378-82.

Diez-Fraile A, Meyer E, Burvenich C. Regulation of adhesion molecules on circulating neutrophils during coliform mastitis and their possible immunomodulation with drugs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002; 86:1-10. *Revue.*

Dinauer MC, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ, Parkos CA. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature*. 1987; 327:717-20.

Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*. 1990; 86 :1729-37.

Dinauer MC, Pierce EA, Erickson RW, Muhlebach TJ, Messner H, Orkin SH, Seger RA, Curnutte JT. Point mutation in the cytoplasmic domain of the neutrophil p22-phox cytochrome b subunit is associated with a non functional NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 11231-11235.

Dong Z, Huang C, Ma WY. PI-3 kinase in signal transduction, cell transformation, and as a target for chemoprevention of cancer. *Anticancer Res*. 1999 ; 19:3743-7. *Revue*.

Dorseuil, O., L. Reibel, G. M. Bokoch, J. Camonis and G. Gacon "The Rac target NADPH oxidase p67phox interacts preferentially with Rac2 rather than Rac1." *J Biol Chem* 1996; 271: 83-88.

Downey GP, Takai A, Zamel R, Grinstein S, Chan CK. Okadaic acid-induced actin assembly in neutrophils: role of protein phosphatases. *J Cell Physiol*. 1993; 155:505-19.

Downey, G. P., T. Fukushima, L. Fialkow and T. K. Waddell. "Intracellular signaling in neutrophil priming and activation. " *Semin Cell Biol*. 1995; 6: 345-356.

Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noël-Hudson MS, Dème D, Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem*. 1999; 274:37265-9.

Dupuy C, Pomerance M, Ohayon R, Noël-Hudson MS, Dème D, Chaaoui M, Francon J, Virion A. Thyroid oxidase (Thox2) gene expression in the rat thyroid cell line FRTL-5. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 277:287-92.

Durand D, Cannella D, Dubosclard V, Pebay-Peyroula E, Vachette P, Fieschi F. Small-angle X-ray scattering reveals an extended organization for the autoinhibitory resting state of the p47(phox) modular protein. *Biochemistry*. 2006; 45:7185-93.

Durand, D., C. Vives, D. Cannella, J. Perez, E. Pebay-Peyroula, P. Vachette and F. Fieschi "NADPH oxidase activator p67(phox) behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers." *J Struct Biol* 2010; 169: 45-53.

Dusi S, Rossi F. Activation of NADPH oxidase of human neutrophils involves the phosphorylation and the translocation of cytosolic p67phox. *Biochem J*. 1993; 296:367-71.

Dusi S, Donini M, Rossi F. Mechanisms of NADPH oxidase activation:translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox. *Biochem J*. 1996; 314:409-12.

Egesten A, Breton-Gorius J, Guichard J, Gullberg U, Olsson I. The heterogeneity of azurophil granules in neutrophil promyelocytes: immunogold localization of myeloperoxidase, cathepsin G, elastase, proteinase 3, and bactericidal/permeability increasing protein. *Blood*. 1994; 83:2985-94.

El Benna J, Faust LP, Babior BM. The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem*. 1994; 269:23431-6.

El Benna J, Park JW, Ruedi JM, Babior BM. Cell-free activation of the respiratory burst oxidase by protein kinase C. *Blood Cells Mol Dis*. 1995; 21:201-6.

El Benna J, Faust RP, Johnson JL, Babior BM. The Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1996a; 271:6374-8.

El Benna J, Han J, Park JW, Schmid E, Ulevitch RJ, Babior BM. Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch Biochem Biophys*. 1996b; 334:395-400.

El Benna J, Dang PM, Andrieu V, Vergnaud S, Dewas C, Cachia O, Fay M, Morel F, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA. p40phox associates with the neutrophil Triton X-100-insoluble cytoskeletal fraction and PMA-activated membrane skeleton: a comparative study with P67phox and P47phox. *J Leukoc Biol*. 1999; 66:1014-20.

El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53:199-206. *Revue*.

El-Benna, J., P. M. Dang and M. A. Gougerot-Pocidal. "Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane." *Semin Immunopathol*. 2008; 30: 279-289.

El-Benna, J., P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidal, J. C. Marie and F. Braut-Boucher. "p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases." *Exp Mol Med*. 2009; 41: 217-225.

El-Benna, J., P. M. Dang and A. Perianin . "Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase." *Biochem Pharmacol*. 2010; 80: 778-785.

El Hassani, R. A., N. Benfares, B. Caillou, M. Talbot, J. C. Sabourin, V. Belotte, S. Morand, S. Gnidehou, D. Agnandji, R. Ohayon, J. Kaniewski, M. S. Noel-Hudson, J. M. Bidart, M. Schlumberger, A. Virion and C. Dupuy . "Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 288: G933-942

Elbim, C., S. Bailly, S. Chollet-Martin, J. Hakim and M. A. Gougerot-Pocidal. "Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides." *Infect Immun*. 1994; 62: 2195-2201.

- Ellson, C. D., S. Gobert-Gosse, K. E. Anderson, K. Davidson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. W. Thuring, M. A. Cooper, Z. Y. Lim, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, J. Coadwell, E. R. Chilvers, P. T. Hawkins and L. R. Stephens. "PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox)." *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 679-682.
- Erwig, L. P. and P. M. Henson. "Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis." *Am J Pathol.* 2007; 171(1): 2-8.
- Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003; 5:1317-27. Revue.
- Faust LR, el Benna J, Babior BM, Chanock SJ. The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest.* 1995; 96:1499-505.
- Feldhaus MJ, Weyrich AS, Zimmerman GA, McIntyre TM. Ceramide generation in situ alters leukocyte cytoskeletal organization and beta 2-integrin function and causes complete degranulation. *J Biol Chem.* 2002; 277:4285-93.
- Ferguson, S. S. "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." *Pharmacol Rev.* 2001; 53: 1-24.
- Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA, El-Benna J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry.* 2002; 41:7743-50.
- Forbes LV, Moss SJ, Segal AW. Phosphorylation of p67phox in the neutrophil occurs in the cytosol and is independent of p47phox. *FEBS Lett.* 1999; 449:225-9.
- Francke, U., C. L. Hsieh, B. E. Foellmer, K. J. Lomax, H. L. Malech and T. L. Leto. "Genes for two autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease assigned to 1q25 (NCF2) and 7q11.23 (NCF1)." *Am J Hum Genet.* 1990; 47: 483-492.
- Fuchs A, Bouin AP, Rabilloud T, Vignais PV. The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells. *Eur J Biochem.* 1997; 249:531-9.
- Gabig TG, Crean CD, Mantel PL, Rosli R. Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation. *Blood.* 1995; 85:804-11.
- Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Pharmacol Ther.* 1995; 66:191-205. Revue.
- Gao Y, Pimplikar SW. The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:14979-84
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010;327:656-61.

- Geiszt M, Dagher MC, Molnar G, Havasi A, Faure J, Paclet MH, Morel F, Ligeti E. Characterization of membrane-localized and cytosolic Rac-GTPase-activating proteins in human neutrophil granulocytes: contribution to the regulation of NADPH oxidase. *Biochem J.* 2001; 355:851-8.
- Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J.* 2003; 17:1502-4.
- Gilroy, D. W., T. Lawrence, M. Perretti and A. G. Rossi. "Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery." *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3: 401-416
- Ginsel, L. A., J. J. Onderwater, J. A. Fransen, A. J. Verhoeven and D. Roos. "Localization of the low-Mr subunit of cytochrome b558 in human blood phagocytes by immunoelectron microscopy." *Blood.* 1990; 76: 2105-2116.
- Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell.* 2003; 113:343-55.
- Groemping, Y. and K. Rittinger. "Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective." *Biochem J.* 2005; 386: 401-416.
- Gullberg U, Bengtsson N, Bülow E, Garwicz D, Lindmark A, Olsson I. Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *J Immunol Methods.* 1999; 232:201-10. *Revue.*
- Haataja L, Groffen J, Heisterkamp N. Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem.* 1997; 272:20384-8.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998; 92:3007-17. *Revue.*
- Hanna IR, Hilenski LL, Dikalova A, Taniyama Y, Dikalov S, Lyle A, Quinn MT, Lassegue B, Griendling KK. Functional association of nox1 with p22phox in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 1542-1549.
- Harbecke O, Liu L, Karlsson A, Dahlgren C. Desensitization of the fMLP-induced NADPH-oxidase response in human neutrophils is lacking in okadaic acid-treated cells. *J Leukoc Biol.* 1997;61:753-8.
- Hata K, Ito T, Takeshige K, Sumimoto H. Anionic amphiphile-independent activation of the phagocyte NADPH oxidase in a cell-free system by p47phox and p67phox, both in C terminally truncated forms. Implication for regulatory Src homology 3 domain-mediated interactions. *J Biol Chem.* 1998; 273:4232-6.
- He R, Nanamori M, Sang H, Yin H, Dinauer MC, Ye RD. Reconstitution of chemotactic peptide-induced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced) oxidase activation in transgenic COS-phox cells. *J Immunol.* 2004; 173:7462-70
- Heyworth PG, Knaus UG, Settleman J, Curnutte JT, Bokoch GM. Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Mol Biol Cell.* 1993; 4:1217-23.

Heyworth PG, Bohl BP, Bokoch GM, Curnutte JT. Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *J Biol Chem.* 1994; 269:30749-52.

Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15:578-84.

Huang J, Kleinberg ME. Activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Phosphorylation controls SH3 domain-dependent binding to p22(phox). *J Biol Chem.* 1999; 274:19731-7.

Hwang TL, Hung HW, Kao SH, Teng CM, Wu CC, Cheng SJ. Soluble guanylyl cyclase activator YC-1 inhibits human neutrophil functions through a cGMP-independent but cAMP-dependent pathway. *Mol Pharmacol.* 2003; 64:1419-27.

Iwasaki, H., Akashi, K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell *Immunity.* 2007; 26:726-740

Jesaitis AJ, Buescher ES, Harrison D, Quinn MT, Parkos CA, Livesey S, Linner J. Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. *J Clin Invest.* 1990; 85:821-35.

Johnson JL, Park JW, Benna JE, Faust LP, Inanami O, Babior BM. Activation of p47 (phox), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. *J Biol Chem.* 1998; 273:35147-52.

Karlsson A, Nixon JB, McPhail LC. Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol.* 2000; 67:396-404.

Kawakami N, Takemasa H, Okamura N, Hayakawa T, Shimohama S, Fujimoto S. Participation of cytosolic protein phosphatase in regulation of NADPH oxidase in polymorphonuclear leukocytes. *Biol Pharm Bull.* 1999; 22:556-60.

Kennedy, A. D. and F. R. De Leo. "Neutrophil apoptosis and the resolution of infection." *Immunol Res.* 2009; 43: 25-61.

Kent JD, Sergeant S, Burns DJ, McPhail LC. Identification and regulation of protein kinase C-delta in human neutrophils. *J Immunol.* 1996; 157:4641-7.

Khwaja, A., J. E. Carver and D. C. Linch. "Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor alpha in the priming of the neutrophil respiratory burst." *Blood.* 1992; 79: 745-753.

Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science.* 1991; 254:1512-5.

Kodama T, Hazeki K, Hazeki O, Okada T, Ui M. Enhancement of chemotactic peptide-induced activation of phosphoinositide 3-kinase by granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor and its relation to the cytokine-mediated priming of neutrophil superoxide-anion production. *Biochem J.* 1999; 337:201-9.

Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H. 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.* 1999; 274:25051-60.

Kramer IM, van der Bend RL, Verhoeven AJ, Roos D. The 47-kDa protein involved in the NADPH:O₂ oxidoreductase activity of human neutrophils is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase without induction of a respiratory burst. *Biochim Biophys Acta.* 1988; 971:189-96.

Krump E, Sanghera JS, Pelech SL, Furuya W, Grinstein S. Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. *J Biol Chem.* 1997; 272:937-44.

Kuan YH, Gruebl T, Soba P, Eggert S, Nestic I, Back S, Kirsch J, Beyreuther K, Kins S. PAT1a modulates intracellular transport and processing of amyloid precursor protein (APP), APLP1, and APLP2. *J Biol Chem.* 2006; 281:40114-23.

Kvietys PR, Sandig M. Neutrophil diapedesis: paracellular or transcellular? *News Physiol Sci.* 2001; 16:15-9. *Revue.*

Kwong, C. H., H. L. Malech, D. Rotrosen and T. L. Leto. "Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins." *Biochemistry.* 1993; 32: 5711-5717.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.

Lambeth, J. D. "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen." *Nat Rev Immunol.* 2004 4: 181-189.

Landsman L, Varol C, Jung S. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol.* 2007;178:2000-7.

Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y, Rittinger K. Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem.* 2002; 277:10121-8.

Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci.* 2001; 114:2903-10.

Lehrer, R. I., A. K. Lichtenstein and T. Ganz. "Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells." *Annu Rev Immunol.* 1993; 11: 105-128.

Leto TL, Adams AG, de Mendez I. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:10650-4.

Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family. *J Lab Clin Med.* 1996;128:461-76.

Luo, H. R. and F. Loison. "Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation." *Am J Hematol.* 2008; 83: 288-295.

Levy, O. "Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes." *Eur J Haematol.* 1996; 56: 263-277.

Lewis EM, Sergeant S, Ledford B, Stull N, Dinauer MC, McPhail LC. Phosphorylation of p22phox on threonine 147 enhances NADPH oxidase activity by promoting p47phox binding. *J Biol Chem.* 2010; 285 :2959-67

Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, Seidel-Rogol B, Pounkova L, Du P, Papaharalambus C, Lassegue B, Griendling KK. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2009; 105:249-59.

Malyak M, Smith MF JR, Abel AA, Arend WP. Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta. *J Clin Immunol.* 1994; 14:20-30.

Malyak M, Smith MF JR, Abel AA, Hance KR, Arend WP. The differential production of three forms of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils and monocytes. *J Immunol.* 1998; 161:2004-10.

Marcoux, J., P. Man, M. Castellan, C. Vives, E. Forest and F. Fieschi. "Conformational changes in p47(phox) upon activation highlighted by mass spectrometry coupled to hydrogen/deuterium exchange and limited proteolysis." *FEBS Lett.* 2009; 583: 835-840.

Marcoux, J., P. Man, I. Petit-Haertlein, C. Vives, E. Forest and F. Fieschi. "p47phox molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex." *J Biol Chem.* 2010; 285: 28980-28990.

Massenet, C., S. Chenavas, C. Cohen-Addad, M. C. Dagher, G. Brandolin, E. Pebay-Peyroula and F. Fieschi. "Effects of p47phox C terminus phosphorylations on binding interactions with p40phox and p67phox. Structural and functional comparison of p40phox and p67phox SH3 domains." *J Biol Chem.* 2005; 280: 13752-13761.

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

Matute, J. D., A. A. Arias, N. A. Wright, I. Wrobel, C. C. Waterhouse, X. J. Li, C. C. Marchal, N. D. Stull, D. B. Lewis, M. Steele, J. D. Kellner, W. Yu, S. O. Meroueh, W. M. Nauseef and M. C. Dinauer. "A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity." *Blood.* 2009; 114: 3309-3315.

McCain RW, Holden EP, Blackwell TR, Christman JW. Leukotriene B4 stimulates human polymorphonuclear leukocytes to synthesize and release interleukin-8 in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;10:651-7.

McCull, S. R., D. Beauseigle, C. Gilbert and P. H. Naccache. "Priming of the human neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor

necrosis factor-alpha involves regulation at a post-cell surface receptor level. Enhancement of the effect of agents which directly activate G proteins." *J Immunol.* 1990; 145: 3047-3053.

McLeish, K. R., C. Knall, R. A. Ward, P. Gerwins, P. Y. Coxon, J. B. Klein and G. L. Johnson. "Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF." *J Leukoc Biol.* 1998; 64: 537-545.

Mellor, H. and P. J. Parker. "The extended protein kinase C superfamily." *Biochem J.* 1998; 332: 281-292.

Mizuki K, Takeya R, Kuribayashi F, Nobuhisa I, Kohda D, Nunoi H, Takeshige K, Sumimoto H. A region C-terminal to the proline-rich core of p47phox regulates activation of the phagocyte NADPH oxidase by interacting with the C-terminal SH3 domain of p67phox. *Arch Biochem Biophys.* 2005; 444:185-94.

Moll J, Sansig G, Fattori E, van der Putten H. The murine rac1 gene: cDNA cloning, tissue distribution and regulated expression of rac1 mRNA by disassembly of actin microfilaments. *Oncogene.* 1991; 6:863-6.

Morel, F. "[Molecular aspects of chronic granulomatous disease. "the NADPH oxidase complex"]." *Bull Acad Natl Med.* 2007; 191: 377-390; discussion 390-372.

Murillo I, Henderson LM. Expression of gp91phox/Nox2 in COS-7 cells: cellular localization of the protein and the detection of outward proton currents. *Biochem J.* 2005; 385:649-57.

Naccache PH, Levasseur S, Lachance G, Chakravarti S, Bourgoin SG, McColl SR. Stimulation of human neutrophils by chemotactic factors is associated with the activation of phosphatidylinositol 3-kinase gamma. *J Biol Chem.* 2000; 275:23636-41.

Nathan, C. "Neutrophils and immunity: challenges and opportunities." *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 173-182.

Nauseef WM, Volpp BD, McCormick S, Leidal KG, Clark RA. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J Biol Chem.* 1991; 266:5911-7.

Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev.* 2007; 219:88-102. Review.

Nauseef WM. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *J Biol Chem.* 2008; 283:16961-5.

Nauseef WM. Nox enzymes in immune cells. *Semin Immunopathol.* 2008; 30:195-208. Review.

Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science.* 1986; 233:305-12.

Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 1995; 9:484-96. Review.

- Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD. The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem.* 1999; 274:22999-3005.
- Nixon JB, McPhail LC. Protein kinase C (PKC) isoforms translocate to Triton-insoluble fractions in stimulated human neutrophils: correlation of conventional PKC with activation of NADPH oxidase. *J Immunol.* 1999; 163:4574-82.
- Nunoi H, Rotrosen D, Gallin JI, Malech HL. Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science.* 1988; 242:1298-301.
- Paclat, M. H., S. Berthier, L. Kuhn, J. Garin and F. Morel. "Regulation of phagocyte NADPH oxidase activity: identification of two cytochrome b558 activation states." *FASEB J.* 2007; 21: 1244-1255.
- Park JW, Ma M, Ruedi JM, Smith RM, Babior BM. The cytosolic components of the respiratory burst oxidase exist as a M(r) approximately 240,000 complex that acquires a membrane-binding site during activation of the oxidase in a cell-free system. *J Biol Chem.* 1992; 267:17327-32.
- Park JW, Benna JE, Scott KE, Christensen BL, Chanock SJ, Babior BM. Isolation of a complex of respiratory burst oxidase components from resting neutrophil cytosol. *Biochemistry.* 1994; 33:2907-11.
- Park JW, Hoyal CR, Benna JE, Babior BM. Kinase-dependent activation of the leukocyte NADPH oxidase in a cell-free system. Phosphorylation of membranes and p47(PHOX) during oxidase activation. *J Biol Chem.* 1997; 272:11035-43.
- Price MO, McPhail LC, Lambeth JD, Han CH, Knaus UG, Dinayer MC. Creation of a genetic system for analysis of the phagocyte respiratory burst: high-level reconstitution of the NADPH oxidase in a nonhematopoietic system. *Blood.* 2002; 99:2653-61.
- Prossnitz, E. R. "Desensitization of N-formylpeptide receptor-mediated activation is dependent upon receptor phosphorylation." *J Biol Chem.* 1997; 272: 15213-15219.
- Quinn MT, Parkos CA, Walker L, Orkin SH, Dinayer MC, Jesaitis AJ. Association of a Ras-related protein with cytochrome b of human neutrophils. *Nature.* 1989; 342:198-200.
- Raad, H., M. H. Paclat, T. Boussetta, Y. Kroviarski, F. Morel, M. T. Quinn, M. A. Gougerot-Pocidalo, P. M. Dang and J. El-Benna . "Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox." *FASEB J.* 2009; 23: 1011-1022.
- Reeves EP, Dekker LV, Forbes LV, Wientjes FB, Grogan A, Pappin DJ, Segal AW. Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils. *Biochem J.* 1999; 344:859-66. Erratum in: *Biochem J* 2000; 345:767.
- Ravichandran, K. S. and U. Lorenz. "Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal." *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 964-974.

Reeves, E. P., L. V. Dekker, L. V. Forbes, F. B. Wientjes, A. Grogan, D. J. Pappin and A. W. Segal. "Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils." *Biochem J.* 1999; 344: 859-866.

Regier, D. S., K. A. Waite, R. Wallin and L. C. McPhail. "A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22(phox), an NADPH oxidase component." *J Biol Chem.* 1999; 274: 36601-36608.

Regier DS, Greene DG, Sergeant S, Jesaitis AJ, McPhail LC. Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation. *J Biol Chem.* 2000; 275:28406-12.

Rice WG, Ganz T, Kinkade JM Jr, Selsted ME, Lehrer RI, Parmley RT. Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood.* 1987; 70:757-65.

Roos, D. "The genetic basis of chronic granulomatous disease." *Immunol Rev.* 1994; 138: 121-157.

Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, Ahlin A, Nemet K, Hossle JP, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Middleton-Price H. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood.* 1996 Mar 1; 87(5):1663-81. *Review.*

Roos, D., R. van Bruggen and C. Meischl. "Oxidative killing of microbes by neutrophils." *Microbes Infect.* 2003; 5: 1307-1315.

Rossary A, Arab K, Steghens JP. Polyunsaturated fatty acids modulate NOX 4 anion superoxide production in human fibroblasts. *Biochem J.* 2007; 406:77-83.

Rotrosen D, Kleinberg ME, Nunoi H, Leto T, Gallin JI, Malech HL. Evidence for a functional cytoplasmic domain of phagocyte oxidase cytochrome b558. *J Biol Chem.* 1990a; 265:8745-50.

Rotrosen D, Leto TL. Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events. *J Biol Chem.* 1990b; 265:19910-5.

Rotrosen D, Yeung CL, Leto TL, Malech HL, Kwong CH. Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science.* 1992; 256:1459-62.

Rotrosen D, Yeung CL, Katkin JP. Production of recombinant cytochrome b558 allows reconstitution of the phagocyte NADPH oxidase solely from recombinant proteins. *J Biol Chem.* 1993; 268:14256-60

Rotter B, Kroviarski Y, Nicolas G, Dhermy D, Lecomte MC. AlphaII-spectrin is an in vitro target for caspase-2, and its cleavage is regulated by calmodulin binding. *Biochem J.* 2004; 378:161-8.

Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A, Penninger JM. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science.* 2000; 287:1040-6.

Scheid MP, Woodgett JR. Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett.* 2003; 546:108-12.

Satoshi Ugi, Takeshi Imamura, William Ricketts, and Jerrold M. Olefsky. Protein Phosphatase 2A Forms a Molecular Complex with Shc and Regulates Shc Tyrosine Phosphorylation and Downstream Mitogenic Signaling. *Molecular and Cellular Biology.* 2002; 22: 2375-2387.

Segal AW. Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease. *Nature.* 1987; 326:88-91.

Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine.* 2000; 79:170-200

Serhan, C. N. "Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not?" *Am J Pathol.* 2010; 177: 1576-1591.

Shiose, A. and H. Sumimoto. "Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase." *J Biol Chem.* 2000; 275: 13793-13801.

Smith, G. P. and T. J. Peters. "The release of granule components from human polymorphonuclear leukocytes in response to both phagocytic and chemical stimuli." *Biochim Biophys Acta.* 1982; 719: 304-308.

Smith CW. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993a; 71:76-87. *Revue.*

Smith JA, Francis SH, Corbin JD. Autophosphorylation: a salient feature of protein kinases. *Mol Cell Biochem.* 1993b; 127-128:51-70. *Revue.*

Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol.* 1994; 56:672-86.

Spicer SS, Hardin JH. Ultrastructure, cytochemistry, and function of neutrophil leukocyte granules. *Lab Invest.* 1969; 20:488-97. *Revue.*

Stahelin RV, Burian A, Bruzik KS, Murray D, Cho W. Membrane binding mechanisms of the PX domains of NADPH oxidase p40phox and p47phox. *J Biol Chem.* 2002; 278:14469-79.

Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TR, Sternweis PC, Hawkins PT. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell.* 1994; 77:83-93.

Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature.* 1999; 401:79-82.

Lambeth JD. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med* 2007; 43:332-47.

Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem.* 2003; 278:25234-46.

Taylor RM, Burritt JB, Foubert TR, Snodgrass MA, Stone KC, Baniulis D, Gripentrog JM, Lord C, Jesaitis AJ. Single-step immunoaffinity purification and characterization of dodecylmaltoside-solubilized human neutrophil flavocytochrome b. *Biochim Biophys Acta.* 2003 ; 1612: 65-75.

Taylor RM, Burritt JB, Baniulis D, Foubert TR, Lord CI, Dinauer MC, Parkos CA, Jesaitis AJ. Site-specific inhibitors of NADPH oxidase activity and structural probes of flavocytochrome b: characterization of six monoclonal antibodies to the p22phox subunit. *J Immunol.* 2004; 173: 7349-7357.

Teahan C, Rowe P, Parker P, Totty N, Segal AW. The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. *Nature.* 1987; 327:720-1.

Tejada-Simon MV, Serrano F, Villasana LE, Kanterewicz BI, Wu GY, Quinn MT, Klann E. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci.* 2005; 29: 97-106.

Towbin, H., Staehlin, T., and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1979; 76: 4350-4354.

Tyagi SR, Olson SC, Burnham DN, Lambeth JD. Cyclic AMP-elevating agents block chemoattractant activation of diacylglycerol generation by inhibiting phospholipase D activation. *J Biol Chem.* 1991; 266:3498-504.

Ueyama, T., T. Tatsuno, T. Kawasaki, S. Tsujibe, Y. Shirai, H. Sumimoto, T. L. Leto and N. Saito. "A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox." *Mol Biol Cell.* 2007; 18: 441-454.

Van Aelst L, Barr M, Marcus S, Polverino A, Wigler M. Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:6213-6217.

van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 1968 ;128:415-35.

Vera J, Jaumot M, Estanyol JM, Brun S, Agell N, Bachs O. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 is a SET-binding protein and a PP2A inhibitor. *Oncogene.* 2006; 25:260-70.

Vestweber D. Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; 14:587-93. *Revue.*

Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59:1428-59. *Revue.*

Volpp BD, Nauseef WM, Clark RA. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science*. 1988; 242:1295-7.

Wallach TM, Segal AW. Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b558 of the NADPH oxidase of phagocytes. *Biochem J*. 1996; 320:33-8.

Wang, J. F., T. R. Jerrells and J. J. Spitzer. "Decreased production of reactive oxygen intermediates is an early event during in vitro apoptosis of rat thymocytes." *Free Radic Biol Med*. 1996; 20: 533-542.

Ward, R. A., M. Nakamura and K. R. McLeish. "Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 mitogen-activated protein kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome b558-containing granules." *J Biol Chem*. 2000; 275: 36713-36719.

Weiss J, Olsson I. Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils. *Blood*. 1987; 69:652-9.

Weiss, S. J. "Tissue destruction by neutrophils." *N Engl J Med*. 1989; 320: 365-376

Wells CA, Chalk AM, Forrest A, Taylor D, Waddell N, Schroder K, Himes SR, Faulkner G, Lo S, Kasukawa T, Kawaji H, Kai C, Kawai J, Katayama S, Carninci P, Hayashizaki Y, Hume DA, Grimmond SM. Alternate transcription of the Toll-like receptor signaling cascade. *Genome Biol*. 2006; 7:R10.

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*. 2000; 80:617-53. Review.

Yamaguchi M, Oishi H, Araki S, Saeki S, Yamane H, Okamura N, Ishibashi S. Respiratory burst and tyrosine phosphorylation by vanadate. *Arch Biochem Biophys*. 1995; 323:382-6.

Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol*. 2010;17:53-9.

Yoshimura A, Hara Y, Kaneko T, Kato I. Secretion of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res*. 1997; 32:279-86.

Yu L, Zhen L, Dinauer MC. Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits. *J Biol Chem*. 1997; 272:27288-94.

Yu L, De Leo FR, Biberstine-Kinkade KJ, Renee J, Nauseef WM, Dinauer MC. Biosynthesis of flavocytochrome b558 . gp91 (phox) is synthesized as a 65-kDa precursor (p65) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1999; 274:4364-9.

Yu L, Quinn MT, Cross AR, Dinauer MC. Gp91 (phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:7993-8.

Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol*. 2010 ;17:53-9.

Yuzawa, S., N. N. Suzuki, Y. Fujioka, K. Ogura, H. Sumimoto and F. Inagaki. "A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase." *Genes Cells*. 2004; 9: 443-456.

Zhan S, Vazquez N, Zhan S, Wientjes FB, Budarf ML, Schrock E, Ried T, Green ED, Chanock SJ. Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *Blood*. 1996; 88:2714-21.

Zhang Y, Yang Y, Yeh S, Chang C. ARA67/PAT1 functions as a repressor to suppress androgen receptor transactivation. *Mol Cell Biol*. 2004; 24:1044-57. Erratum in: *Mol Cell Biol*. 2004; 24:5635.

Zhao X, Xu B, Bhattacharjee A, Oldfield CM, Wientjes FB, Feldman GM, Cathcart MK. Protein kinase Cdelta regulates p67phox phosphorylation in human monocytes. *J Leukoc Biol*. 2005; 77:414-20.

Zhen L, King AA, Xiao Y, Chanock SJ, Orkin SH, Dinauer MC. Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90:9832-6.

Zhen L, Yu L, Dinauer MC. Probing the role of the carboxyl terminus of the gp91phox subunit of neutrophil flavocytochrome b558 using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 1998; 273:6575-81.

Zheng P, Eastman J, Vande Pol S, Pimplikar SW. PAT1, a microtubule-interacting protein, recognizes the basolateral sorting signal of amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:14745-50.

Zu YL, Ai Y, Gilchrist A, Labadia ME, Sha'afi RI, Huang CK. Activation of MAP kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils after phorbol ester or fMLP peptide stimulation. *Blood*. 1996; 87:5287-96.

Zhu Y, Marchal CC, Casbon AJ, Stull N, von Löhneysen K, Knaus UG, Jesaitis AJ, McCormick S, Nauseef WM, Dinauer MC. Deletion mutagenesis of p22phox subunit of flavocytochrome b558: identification of regions critical for gp91phox maturation and NADPH oxidase activity. *J Biol Chem*. 2006; 281:30336-46.

ANNEXE

Article 2:

The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A

Pham My-Chan Dang^{a,b}, Houssam Raad^{a,b}, Riad Arabi Derkawi^{a,b}, Tarek Boussetta^{a,b}, Marie-Hélène Paclét^d, Sahra Amel Belambri^{a,b}, Karama Makni-Maalej^{a,b}, Yolande Kroviarski^{a,c}, Françoise Morel^d, Marie-Anne Gougerot-Pocidaló^{a,c}, Jamel El-Benna^{a,b,*}

^aINSERM, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3, Paris F-75018, France

^bUniversité Paris 7 site Bichat, UMRS 773, Paris F-75018, France

^cAP-HP, Centre Hospitalier Universitaire Xavier Bichat, CIB Phenogen, Paris F-75018, France

^dGREPI TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, Laboratoire d'Enzymologie, Centre Hospitalier Universitaire, 38043 Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 March 2011

Accepted 7 July 2011

Available online xxx

Keywords:

Neutrophils
NADPH oxidase
p67phox
ROS
Inflammation
Phosphorylation

ABSTRACT

Neutrophils play a key role in host defense and inflammation through the production of superoxide anion and other reactive oxygen species (ROS) by the enzyme complex NADPH oxidase. The cytosolic NADPH oxidase component, p67phox, has been shown to be phosphorylated in human neutrophils but the pathways involved in this process are largely unknown. In this study, we show that p67phox is constitutively phosphorylated in resting human neutrophils and that neutrophil stimulation with PMA further enhanced this phosphorylation. Inhibition of the constitutively active serine/threonine phosphatases type 1 and type 2A (PP1/2A) by calyculin A resulted in the enhancement of p67phox phosphorylation. Constitutive and calyculin A-induced phosphorylation of p67phox was completely inhibited by the protein tyrosine kinase inhibitor genistein and partially inhibited by the MEK1/2 inhibitor PD98059, but was unaffected by GF109203X, wortmannin and SB203580, inhibitors of PKC, PI3K and p38MAP kinase, respectively. Two-dimensional phosphopeptide mapping revealed that constitutive and calyculin A-induced p67phox phosphorylation occurred on the same major sites. Interestingly, calyculin A enhanced formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)-induced superoxide production, while genistein inhibited this process. Taken together, these results suggest that (i) p67phox undergoes a continual cycle of phosphorylation/dephosphorylation in resting cells; (ii) p67phox phosphorylation is controlled by MEK1/2 and an upstream tyrosine kinase; (iii) PP1/2A directly or indirectly antagonize this process. Thus, these pathways could play a role in regulating ROS production by human neutrophils at inflammatory sites.

© 2011 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Neutrophils play a key role in host innate immune responses and inflammation [1–4]. After phagocytosis of the pathogen, they produce superoxide anion, a precursor of anti-bacterial reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide, hydroxyl radical and hypochloric acid [3,4]. The enzyme responsible for superoxide anion production is called the NADPH oxidase [5,6]. In resting cells, the NADPH oxidase is inactive and its components are distributed between the cytosol and membranes. When cells are activated, the

cytosolic components (p47phox, p67phox, p40phox and Rac2) migrate to the membranes, where they associate with the membrane-bound component (flavocytochrome b558) to assemble the catalytically active oxidase [7,8]. Cytochrome b558 is a heterodimeric membranous protein composed of a large subunit (gp91phox, now called NOX2) and a small subunit (p22phox).

The predicted amino-acid sequence of p67phox contains two SH3 domains, four tetratricopeptide-rich regions (TPR), one PB1 domain and at least one proline-rich region [7,8]. P67phox associates tightly with the cytoskeleton [9–11], interacts with p40phox and p47phox in resting cells, and interacts with rac1/2 and with cytochrome b558 in activated cells [7,8]. In addition, p67phox can regulate cytochrome b558 catalytic activity by a sequence called the activation domain [12].

Upon neutrophil stimulation, p47phox [13–15], p67phox [16,17], p40phox [18] p22phox [19], and gp91phox/NOX2 [20],

* Corresponding author at: INSERM, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon (CRB3), Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, Paris F-75018, France. Tel.: +33 1 57 27 77 23; fax: +33 1 57 27 74 71.

E-mail address: jamel.elbenna@inserm.fr (J. El-Benna).

38 become phosphorylated through the engagement of a multitude of
39 transductional pathways leading to NADPH oxidase activation
40 [21–23]. Several stimuli, such as phorbol myristate acetate (PMA),
41 formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), and opsonized
42 zymosan, induce NADPH oxidase activation in neutrophils. It is
43 now clear that the activation of the NADPH oxidase requires the
44 assembly of phosphorylated p47phox [24–26] and p67phox and
45 their translocation from the cytosol to the membrane, followed by
46 their interaction with cytochrome b558 [27,28].

47 The intracellular signaling pathways involved in p47phox
48 phosphorylation have been extensively studied in human neu-
49 trophils and other cells [29–31], but those involved in p67phox
50 phosphorylation remain to be defined. We and others have shown
51 that p67phox can be phosphorylated on serine and threonine
52 residues by PKC- and ERK/p38MAPK-dependent pathways in
53 stimulated human neutrophils [16,32,33], although other protein
54 kinases are also able to phosphorylate p67phox *in vitro* and in
55 intact cells [34,35]. P67phox is known to be phosphorylated on
56 threonine 233 but the phosphorylation of other sites has not been
57 entirely ruled out [33]. The phosphorylation state of p67phox in
58 resting neutrophil has not been clearly defined yet.

59 In this study, we analyzed the status of p67phox phosphoryla-
60 tion in neutrophils. We clearly show that p67phox is constitutively
61 phosphorylated in resting human neutrophils, a process that was
62 enhanced by stimulation. We further show that the constitutive
63 phosphorylation is the net result of a balance between the activity
64 of genistein-sensitive protein tyrosine kinases/MEK1/2 and that of
65 PP1/2A phosphatases.

66 2. Materials and methods

67 2.1. Reagents

68 Phorbol myristate acetate (PMA), formyl-methionyl-leucyl-
69 phenylalanine (fMLP), phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), di-
70 isopropyl fluorophosphate (DFP), Triton X-100, bovine serum
71 albumin (BSA), Tween-20, para-nitrophenylphosphate (pNPP)
72 and other chemicals were purchased from Sigma–Aldrich Chemi-
73 cal Co (Saint Louis, Missouri, USA). Dextran T500, Ficoll, [³²P]-
74 orthophosphoric acid (H₃PO₄), and Gamma-bind sepharose beads
75 were purchased from GE-Healthcare (Orsay, France). Diisopropyl-
76 fluorophosphate (DFP), kinases and phosphatases inhibitors were
77 from Calbiochem–Merck (Nottingham, UK). Endotoxin-free buffers
78 and salt solutions were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France).
79 Reagents for SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide
80 gel electrophoresis), two-dimensional gel electrophoresis and
81 Western blotting were purchased from Bio-Rad (Richmond, CA,
82 USA). Rabbit polyclonal antibodies against the C-terminal se-
83 quence of p67phox were prepared as previously described [16,36].

84 2.2. Neutrophil preparation

85 Human neutrophils were obtained by Dextran sedimentation
86 and Ficoll centrifugation under LPS-free conditions [16,31,32] and
87 resuspended in phosphate-free buffer (10 mM Hepes pH 7.4,
88 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.6 mM D-glucose, 0.8 mM MgCl₂, and
89 0.025% bovine serum albumin). For protein preservation, neu-
90 trophils were treated with the serine protease inhibitor diisopro-
91 pylfluorophosphate (DFP) (2.7 mM) for 20 min at 4 °C before use.

92 2.3. Labeling of neutrophils and immunoprecipitation of p67phox and 93 p47phox

94 Cells were incubated in phosphate-free buffer containing 0.5 mCi
95 [³²P]-orthophosphoric acid/10⁸ cells/ml for 60 min at 30 °C, as
96 previously reported [16,32]. Neutrophils were then incubated at

37 °C for 30 min for constitutive phosphorylation, or treated with
10⁻⁶ M fMLP for 1 min or with 200 ng/ml PMA for 8 min. The
reaction was stopped by adding ice-cold buffer, followed by
centrifugation at 400 × g for 6 min at 4 °C. The cells were lysed
by suspension in lysis buffer (20 mM Tris–HCl pH 7.4, 150 mM NaCl,
0.5% Triton X-100, 0.25 M sucrose, and protease and phosphatase
inhibitors), as previously described [16,32]. The suspension
was sonicated on ice for 3 × 15 s and the lysate was centrifuged
at 100,000 × g for 30 min at 4 °C in a TL100 ultracentrifuge
(Beckman Inc.).

The cleared supernatant was incubated overnight either with
anti-p67phox antibody (1/200) or with anti-p47phox antibody (1/
200) and each protein was then immunoprecipitated by incubation
with Gamma-bind G-sepharose beads (GE-Healthcare Orsay,
France) that were then washed with lysis buffer, as previously
described [16,32]. The proteins were denatured in Laemmli
sample buffer and analyzed by electrophoresis [37].

2.4. Electrophoresis and blotting

The samples were subjected to SDS-PAGE in 10% polyacryl-
amide gels, using standard techniques [37]. The separated proteins
were electro-transferred to nitrocellulose membranes [38] and
detected by means of autoradiography or Western blotting with a
specific antibody as described elsewhere [16,32]. In brief,
membranes were saturated for 30 min with 5% non-fat dry milk
in Tris buffered saline with 0.1% tween-20 (TBST). Membranes
were then probed with the anti-p67phox or p47phox antibody
(1:5000 dilution) for 1 h at room temperature and washed 3 times
with the TBST. Membranes were then incubated with horseradish
peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies for 1 h at room
temperature (1:5000 dilution) and washed three times. Bound
antibody was visualized using Enhanced chemiluminescence (ECL)
(GE-Healthcare Orsay, France). Alternatively, the membranes were
incubated with an alkaline phosphatase-conjugated goat-anti-
mouse or goat anti-rabbit and proteins were revealed with the
NBT/BCIP reagents (Saint Louis, Missouri, USA) in the carbonate
buffer (0.1 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, pH 9.8).

2.5. Quantification of p67phox and p47phox

³²P-radioactivity quantification (cpm) of phosphorylated
p67phox and p47phox, was determined in an Instant Imager
apparatus (Packard) equipped with Instant Imager software.
Radioactivity counts were corrected for protein content assessed
by densitometric analysis of the intensity of the p67phox and
p47phox protein bands revealed by Western blotting using the
Scion Image analysis program from NIH (USA). Alternatively
p67phox phosphorylation was quantified by densitometry using
the same program.

2.6. Two-dimensional gel electrophoresis

Neutrophils were incubated in Hanks buffer at 37 °C for 10 min
in the absence or presence of 200 ng/ml PMA for 8 min, and the
reaction was then stopped by adding ice-cold PBS buffer followed
by centrifugation at 400 × g for 6 min at 4 °C. Resting and activated
neutrophils were lysed in 2-D sample buffer (9.8 M urea, 2% NP-40,
2% ampholines, 1% 2-mercaptoethanol) and analyzed by isoelec-
trofocusing and SDS-PAGE as previously described [39–41].

2.7. Two-dimensional tryptic phosphopeptide mapping of p67phox

Tryptic digestion of p67phox on nitrocellulose, thin-layer
electrophoresis (TLE) and thin-layer chromatography (TLC) were
performed as previously described [16,32]. The nitrocellulose area

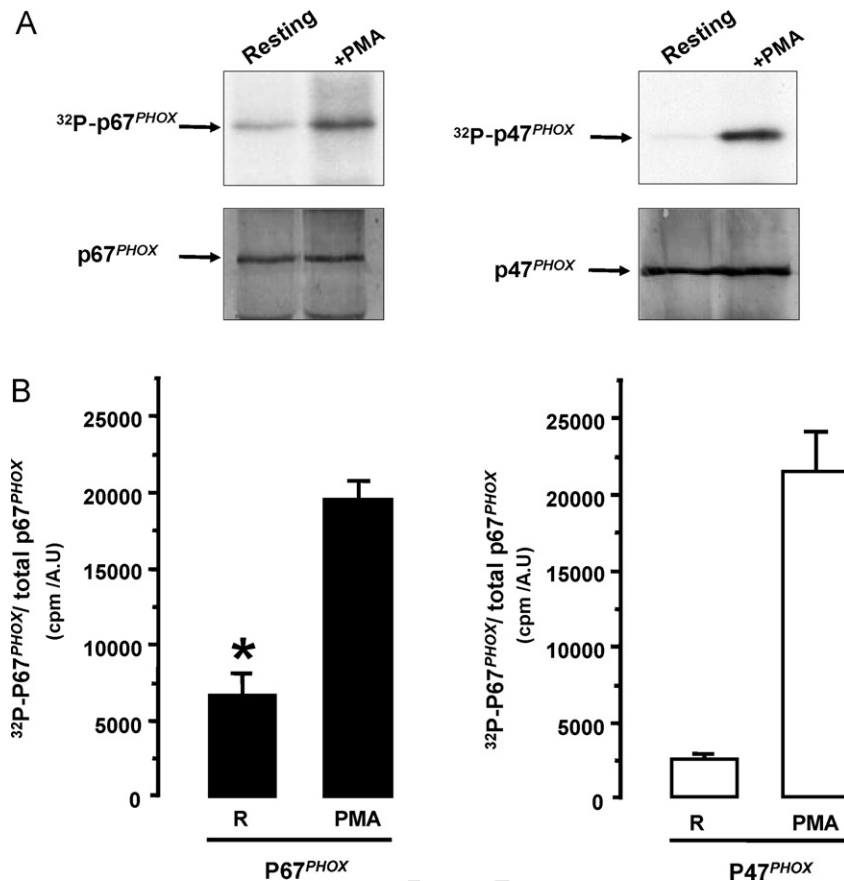


Fig. 1. Phosphorylation of p67phox and p47phox in resting and activated neutrophils. (A) ^{32}P -labeled neutrophils (50×10^6 cells/ml) were incubated at 37°C (resting), then stimulated with PMA ($0.2 \mu\text{g/ml}$) for 6 min. P67phox and p47phox were immunoprecipitated and the immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, electro-transferred and revealed by autoradiography (^{32}P -p67phox and ^{32}P -p47phox) and immunoblotting with anti-p67phox and anti-p47phox antibodies. (B) Quantitative analysis of phosphorylated p67phox and p47phox proteins in human neutrophils: phosphorylated p67phox and p47phox from resting (R) or stimulated (PMA) neutrophils from different experiments were quantified by phospho-Imager analysis. Results are expressed as the ratio of radioactivity over the amount (cpm/A.U.) of immunoprecipitated p67phox and p47phox determined by densitometry of the blots, as described in Section 2 (mean \pm SEM, $n = 5$).

containing ^{32}P -labeled p67phox was incubated for 30 min at 37°C with polyvinylpyrrolidone, washed, and then incubated overnight with trypsin ($50 \mu\text{g/ml}$) in carbonate buffer. Released peptides were washed three times in a Speed-Vaac, dissolved in electrophoresis buffer (17 vol water/3 vol 88% formic acid) and applied to one corner of a cellulose thin-layer plate (Merck). After electrophoresis (1000 V for 20 min), chromatography was performed as previously described [16,32]. The plates were autoradiographed for one week at -75°C .

2.8. Statistical analysis

All results are expressed as means \pm SEM. Significant differences were demonstrated using Student's *t* test (significance for $p < 0.05$).

3. Results

3.1. Constitutive phosphorylation of p67phox in resting human neutrophils

To study the phosphorylation of p67phox in human neutrophils, cells were labeled with ^{32}P , incubated at 37°C in the absence (Resting) or presence of PMA (200 ng/ml for 8 min) and lysed. P67phox was immunoprecipitated from neutrophil lysates using a specific polyclonal antibody and the immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE, transfer to nitrocellulose and autoradiography. The immunoprecipitated protein was further identified by the anti-p67phox antibody. As shown in Fig. 1 (left panel)

p67phox was clearly phosphorylated in resting cells while less ^{32}P incorporation was observed in p47phox, which was similarly immunoprecipitated from the same lysate, (right panel). Stimulation with PMA greatly increased the phosphorylation of both proteins as previously reported [16,24]. Western blotting analysis showed equal amount of immunoprecipitated proteins for each condition. Immunoprecipitation with the control IgG showed no phosphorylated proteins by autoradiography of the gel (data not shown). Phosphorylated p67phox and p47phox from different experiments were quantified by phospho-Imager analysis and the results were expressed as the ratio of immunoprecipitated radioactivity to the amount of immunoprecipitated p67phox or p47phox that was quantified by densitometry as described in Section 2. The mean of these experiments is shown in the lower panels. Altogether, these results demonstrate that, while stimulation with PMA can increase phosphorylation of both p67phox and p47phox, only p67phox is consistently phosphorylated in resting cells. These phosphorylations were also increased by fMLP (data not shown).

To rule out the possibility that the observed constitutive phosphorylation of p67phox might occur during ^{32}P cell labeling, we compared the phosphorylation of p67phox and p47phox in the same preparation by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting with anti-p67phox and anti-p47phox specific antibodies, a technique that does not require ^{32}P labeling and that we and others have used in the past [14,41]. Indeed, phosphorylation can be followed by the change in the isoelectric point of proteins that shifts to a more acidic range, giving rise to several

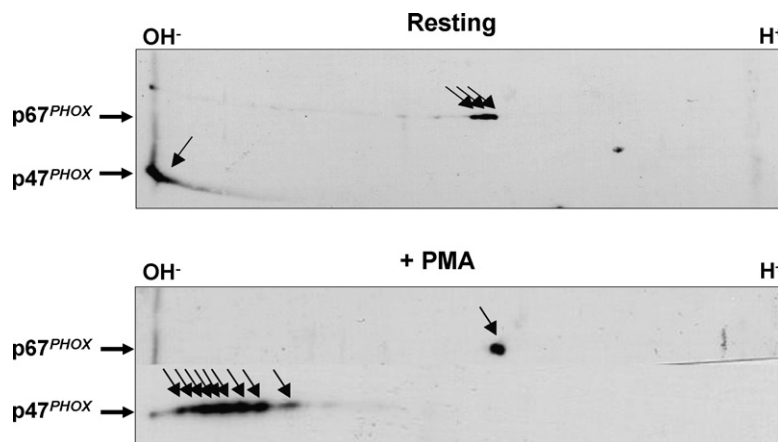


Fig. 2. Two-dimensional gel electrophoresis of resting and PMA-activated neutrophils, and Western blotting of p67phox and p47phox. Resting (top) and PMA-stimulated (bottom) neutrophils were lysed and analyzed by two dimensional gel electrophoresis and Western blotting with specific p67phox and p47phox antibodies. Data are representative of three experiments.

206 phosphorylated isoforms. In resting cells, p67phox migrated as
207 three spots, indicating the presence of three isoforms (probably
208 due to different phosphorylation states of the protein), while
209 p47phox migrated as one very basic spot (Fig. 2), indicating the
210 absence of phosphorylated isoform. In PMA-activated cells,
211 p67phox slightly shifted to a very acidic isoform resulting from
212 its complete phosphorylation while p47phox shifted to several

213 more acidic phosphorylated isoforms, as previously demonstrated
214 [14,41]. Thus, these results confirm those obtained with ^{32}P
215 labeling, demonstrating that, in contrast to p47phox, p67phox is
216 constitutively and partially phosphorylated in resting human
217 neutrophils.

3.2. Constitutive p67phox phosphorylation is controlled by a genistein-sensitive tyrosine kinase and MEK1/2

220 To understand the pathways involved in constitutive p67phox
221 phosphorylation, ^{32}P -labeled neutrophils were incubated with
222 different protein kinase inhibitors and p67phox phosphorylation
223 was analyzed as described above. Preincubation of neutrophils
224 with the tyrosine kinase inhibitor genistein inhibited the
225 constitutive phosphorylation of p67phox (Fig. 3). In contrast,
226 preincubation of neutrophils with the PKC inhibitor GF109203X, or
227 the PI3K inhibitor wortmannin, or the p38MAPKinase inhibitor
228 SB203580 did not inhibit p67phox phosphorylation in resting cells.
229 The MEK1/2 inhibitor PD98059 only partially reduced p67phox
230 phosphorylation.

3.3. Inhibition of the constitutive active phosphatase PP1/2A by calyculin A resulted in the enhancement of p67phox phosphorylation, a process controlled by a tyrosine kinase and MEK1/2

234 Phosphorylation is a dynamic process and the phosphorylation
235 state of proteins at any point in time is the result of a balance
236 between the activities of kinases and phosphatases. The results
237 obtained above showing that incubation of resting neutrophils with
238 genistein inhibits p67phox phosphorylation suggests that in resting
239 cells when a tyrosine kinase is inhibited, p67phox is dephos-
240 phosphorylated over time by an active phosphatase. Thus, to determine
241 the potential role of phosphatases in the constitutive phosphoryla-
242 tion of p67phox in resting neutrophils, ^{32}P -labeled neutrophils were
243 treated with calyculin A, an inhibitor of phosphatase 1 and
244 phosphatase 2A (PP1/2A). Results show (Fig. 4) that calyculin A
245 induced a time- and concentration-dependent increase in p67phox
246 phosphorylation. These results suggest that PP1/2A may regulate the
247 phosphorylation of p67phox in resting cells.

248 To further characterize the constitutive phosphorylation of
249 p67phox, we performed tryptic phosphopeptide maps of p67phox
250 isolated from resting and calyculin A-treated neutrophils. Fig. 5
251 shows that in resting neutrophils, p67phox is phosphorylated on
252 one major peptide and one minor peptide (designated peptides a
253 and b) Calyculin A induced the phosphorylation of one major
254 peptide (peptide a) and two minor peptides (peptides b and c).

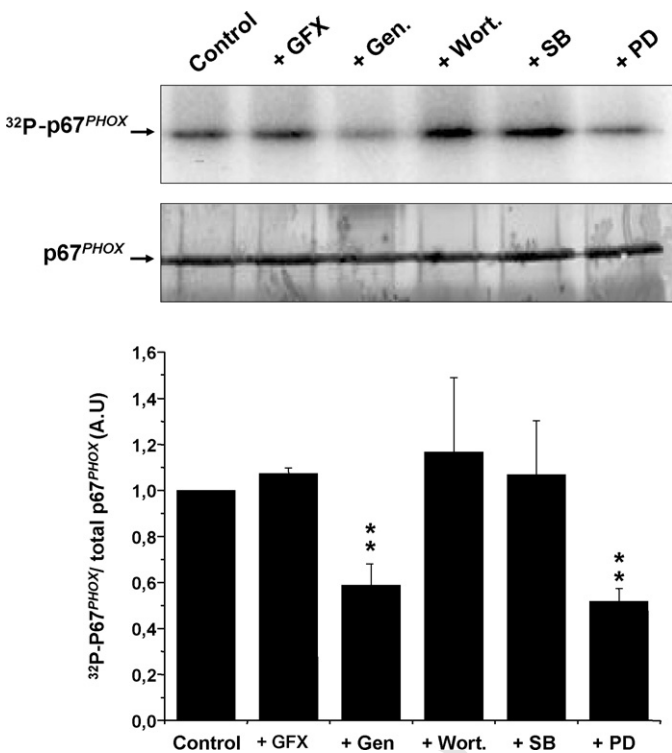


Fig. 3. Effect of protein kinase inhibitors on constitutive p67phox phosphorylation. ^{32}P -labeled neutrophils (50×10^6 cells/ml) were incubated in the presence or absence of GFX109203X (GFX; $5 \mu\text{M}$), genistein (Gen.; $100 \mu\text{M}$), Wortmannin (Wort.; 100 nM), SB203580 (SB; $10 \mu\text{M}$) and PD98059 (PD; $50 \mu\text{M}$) at 37°C for 30 min. P67phox was immunoprecipitated and the immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE, followed by electro-transfer and autoradiography (^{32}P -p67phox) or Western blotting with anti-p67phox antibody. Quantitative analysis of phosphorylated p67phox proteins in human neutrophils (lower panel): phosphorylated p67phox and total p67phox from different experiments were quantified by densitometry of the film and the blot respectively. Results are expressed as the ratio of phosphorylated over the amount of immunoprecipitated p67phox (A.U./A.U.) (mean \pm SEM, $n = 3$) (** $p < 0.05$ compared to control).

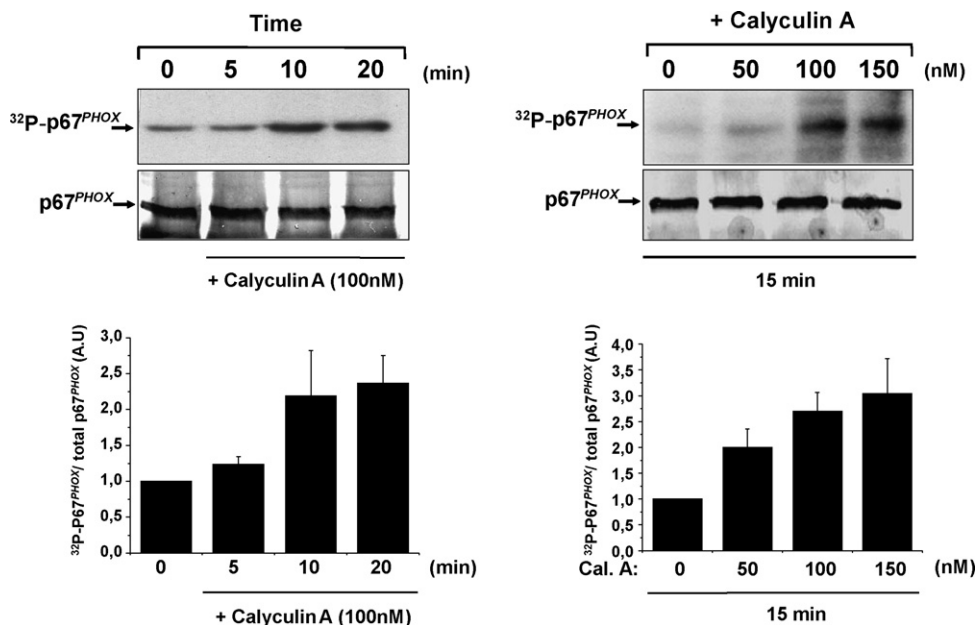


Fig. 4. Effect of the phosphatase 1/2A inhibitor calyculin A on p67phox phosphorylation. ³²P-labeled neutrophils (50×10^6 cells/ml) were incubated in the presence or absence of calyculin A at 37 °C for indicated times and concentrations. P67phox was immunoprecipitated and the immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE, followed by electro-transfer and autoradiography (³²P-p67phox). Quantitative analysis of phosphorylated p67phox proteins in human neutrophils (lower panel): phosphorylated p67phox and total p67phox from different experiments were quantified by densitometry of the film and the blot respectively. Results are expressed as the ratio of phosphorylated over the amount of immunoprecipitated p67phox (A.U./A.U) (mean \pm SEM, $n = 3$).

Taken together, these results suggest that p67phox is constitutively phosphorylated on its major sites and these sites are targeted by phosphatases PP1/2A.

To further check if the genistein-sensitive tyrosine kinase controls calyculin A-induced p67phox phosphorylation, we tested the effect of genistein on this process. Preincubation of ³²P-labeled neutrophils (15 min) with genistein completely inhibited the calyculin A-induced phosphorylation of p67phox (Fig. 6). The effect of genistein was concentration dependent starting at 25 μ M (Supplementary data 1). However, preincubation of neutrophils with the PKC inhibitor GF109203X, the PI3K inhibitor wortmannin, and the p38MAPKinase inhibitor SB203580 did not result in inhibition of calyculin A-induced p67phox phosphorylation. MEK1/2 inhibitor PD98059, partially inhibited calyculin A-induced p67phox phosphorylation. Western blotting analysis showed equal amount of immunoprecipitated proteins for each condition. These data strongly suggest that p67phox undergoes a continual cycle of phosphorylation/dephosphorylation in resting cells controlled by a genistein-inhibitable tyrosine kinase, MEK1/2 and by the PP1/2A phosphatases.

Human neutrophils, express several tyrosine kinases such as Lyn, Syk and JAK [42–48]. In order to identify the protein tyrosine kinase involved in p67phox phosphorylation, we have tested the

effect AG490 a JAK2 inhibitor, PP1 a src tyrosine kinase inhibitor and Piceatannol a syk inhibitor on the phosphorylation of p67phox. Results show (Fig. 7), that although genistein completely inhibited Calyculin A-induced p67phox phosphorylation, none of the inhibitors tested at a concentration know to inhibit the corresponding kinase had a clear effect.

3.4. Inhibition of the constitutively active phosphatase PP1/2A by calyculin A resulted in the enhancement of superoxide production, a process inhibited by genistein

Inhibition of the phosphatase PP1/2A by calyculin A resulted in the enhancement of fMLP-induced superoxide production due to NADPH oxidase upregulation in human neutrophils. As genistein completely inhibited calyculin A-induced p67phox phosphorylation, we wanted to see if this pathway is involved in calyculin A-induced NADPH oxidase upregulation.

Our results show that in resting conditions and in the presence of calyculin A alone, neutrophils produced a basal low level of superoxide as measured by cytochrome c reduction assay (Fig. 8) and genistein inhibited this response. FMLP alone stimulated superoxide production. As expected, subsequent addition of fMLP to neutrophils exposed to calyculin A resulted in increased superoxide production. Treatment of neutrophils with genistein, resulted in the inhibition of fMLP-induced superoxide production and more interestingly inhibited the enhancing effect induced by calyculin A.

4. Discussion

Unlike p47phox phosphorylation, p67phox phosphorylation has not been extensively investigated. We [16,32] and others [33–35] have shown that p67phox becomes phosphorylated upon stimulation of human neutrophils, monocytes and lymphoblasts but the characteristics of this phosphorylation and the pathways involved in this process are largely unknown. In the course of our previous studies, we had noted incorporation of ³²P into p67phox from resting cells [16]. Thus, we decided to further

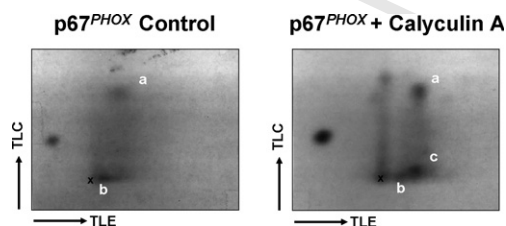


Fig. 5. Two-dimensional phosphopeptide mapping of constitutive and calyculin A-induced p67phox phosphorylation. Phosphorylated p67phox isolated from resting and calyculin A-treated neutrophils was cleaved by trypsin and analyzed by thin-layer electrophoresis (TLE) and thin-layer chromatography (TLC). The phosphopeptides were detected by autoradiography. Peptides are designated: a, b and c. Data are representative of three experiments.

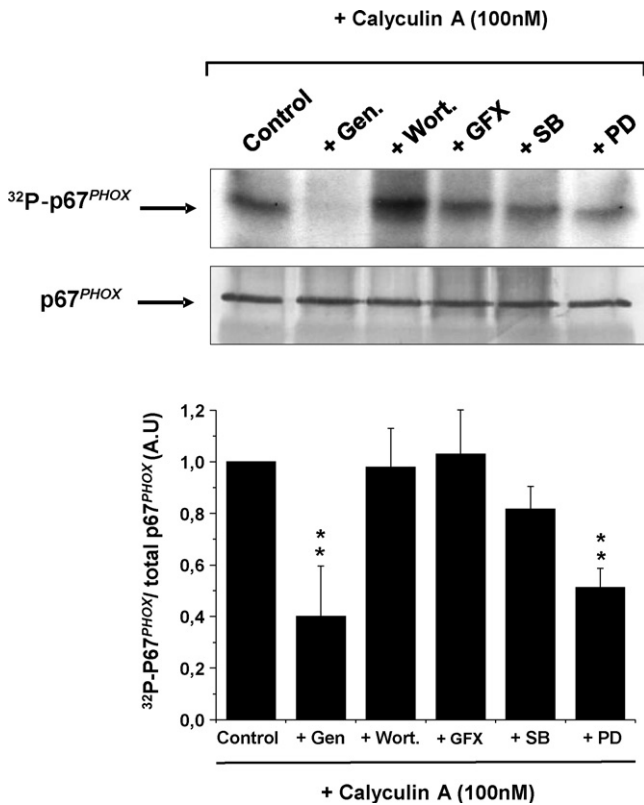


Fig. 6. Effect of protein kinase inhibitors on calyculin A induced-p67phox phosphorylation. ^{32}P -labeled neutrophils (50×10^6 cells/ml) were incubated in the presence or absence of genistein (Gen.; 100 μM), Wortmannin (Wort.; 100 nM), GFX109203X (GFX; 5 μM), SB203580 (SB; 10 μM) and PD98059 (PD; 50 μM) at 37 $^\circ\text{C}$ for 15 min then cells were treated by calyculin A. P67phox was immunoprecipitated and the immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE, followed by electro-transfer and autoradiography (^{32}P -p67phox). Quantitative analysis of phosphorylated p67phox proteins in human neutrophils (lower panel): phosphorylated p67phox and total p67phox from different experiments were quantified by densitometry of the film and the blot respectively. Results are expressed as the ratio of phosphorylated over the amount of immunoprecipitated p67phox (A.U./A.U.) (mean \pm SEM, $n = 3$) (** $p < 0.05$ compared to control).

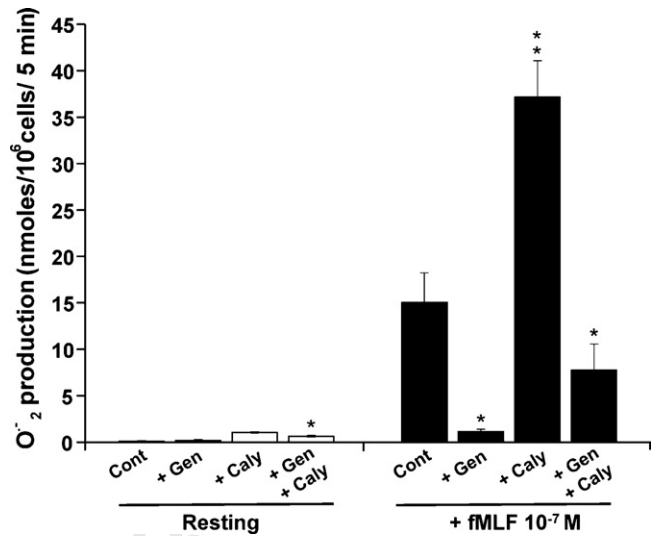


Fig. 8. Effect of calyculin A and genistein on superoxide production by human neutrophils. Neutrophils (1×10^6 cells/ml) were incubated in the presence or absence of genistein (Gen.; 50 μM) or calyculin A (Caly) (100 nM) or both then stimulated by fMLP (10^{-7} M). Superoxide production was measured by the SOD-inhibitable cytochrome c reduction assay. Data are representative of three experiments (* $p < 0.01$ for genistein compared to control, ** $p < 0.05$ for calyculin A + fMLP compared to fMLP alone).

investigate this process. In this study, we clearly show that, contrary to p47phox, p67phox is constitutively phosphorylated in resting human neutrophils and that this phosphorylation is further enhanced by cell stimulation with PMA or fMLP (data not shown). In addition, we show that constitutive p67phox phosphorylation is controlled by a tyrosine kinase-dependent pathway and by PP1/2A phosphatases.

The basal p67phox phosphorylation observed here was constitutive, and was not due to stimulation during cell handling, as p47phox, isolated from the same lysates, was not phosphorylated, even though it possesses several serines that could be phosphorylated [15,24]. The two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting experiments further confirmed the constitutive nature of the phosphorylation, and suggested that at least two phosphorylated isoforms were present under basal conditions, indicating that p67phox could be phosphorylated on at least two different residues. In keeping with these data, the two-dimensional phosphopeptide mapping showed that p67phox isolated from resting neutrophils migrated as one major phosphorylated peptide and one minor peptide. Calyculin A enhanced the phosphorylation of these peptides. These results suggest that p67phox is constitutively phosphorylated on its major and two minor sites, and that these sites are targeted by phosphatases PP1/2A. At this point, it is unclear whether the sites phosphorylated in resting neutrophils are identical to those identified in stimulated cells. Forbes et al. [33] reported that threonine 233, which is located in a proline-rich region, is a major phosphorylated site for p67phox isolated from stimulated neutrophils and we previously demonstrated that fMLP and PMA induce phosphorylation of p67phox on serine residues [16].

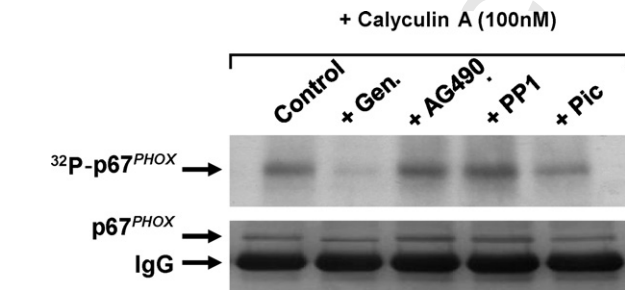


Fig. 7. Effect of protein tyrosine kinase inhibitors on calyculin A induced-p67phox phosphorylation. ^{32}P -labeled neutrophils (50×10^6 cells/ml) were incubated for 30 min in the presence or absence of genistein (Gen.; 100 μM), AG490 (100 μM), PP1 (5 μM) or Piceatannol (50 μM), incubated with 100 ng/ml of Calyculin A, lysed and p67phox was immunoprecipitated by a specific antibody. P67phox was analyzed by SDS-PAGE transfer autoradiography (^{32}P -p67phox) and Western blot (p67phox). Data are representative of three experiments.

We have previously shown that p67phox is phosphorylated by a PKC-dependent pathway in fMLP- and PMA-stimulated human neutrophils [12,32] and others have shown that PKC δ phosphorylates p67phox in opsonized-zymosan stimulated monocytes [35]. PKC does not appear to be involved in the constitutive phosphorylation of p67phox as the general PKC inhibitor GF109203X had no effect, although it inhibited PMA-induced p47phox phosphorylation (Supplemental Data 2). We also reported that ERK1/2 and p38MAPK phosphorylated p67phox *in vitro* and in fMLP- and PMA-stimulated neutrophils [32]; however, only ERK1/2 are involved in constitutive p67phox phosphorylation since PD98059, the MEK1/2 inhibitor, partially inhibited p67phox phosphorylation.

Our previous studies demonstrated the involvement of a PKC-independent pathway in p67phox phosphorylation [16,32]. Here, we provide evidence that a protein tyrosine kinase-dependent pathway is involved in basal phosphorylation of p67phox. It is well

known that genistein inhibits superoxide production in fMLP-stimulated neutrophils [42,43], and prevents rac translocation [44]. Our data add p67phox as a target for a protein tyrosine kinase-dependent pathway. Interestingly, PMA-induced phosphorylation was not inhibited by genistein, consistent with the lack of effect of genistein on PMA-stimulated superoxide production [45]. Several tyrosine kinases are expressed in neutrophils, such as Lyn, Syk and JAK, and they are activated by fMLP and other stimuli in human neutrophils [46–49]. In order to identify the protein tyrosine kinase involved in p67phox phosphorylation, we have tested the effect AG490 a JAK2 inhibitor, PP1 a src tyrosine kinase inhibitor and Piceatannol a syk inhibitor on the phosphorylation of p67phox. Results showed that although genistein completely inhibited Calyculin A-induced p67phox phosphorylation, none of the inhibitors tested had a comparable effect. One possible explanation is that an other protein tyrosine kinase is involved in this process or that genistein could have a non-specific effects at the concentration used here, genistein was not toxic at the concentrations tested but it could inhibit other targets. More investigation will be necessary to identify the protein tyrosine kinase involved. However these tyrosine kinases might not directly phosphorylate p67phox but rather regulate downstream kinases such as ERK1/2.

It is well known that calyculin A potentiates the respiratory burst of neutrophils and macrophages [44,50–54]. Calyculin A was also shown to enhance the translocation to membranes of all cytosolic components of the NADPH oxidase [44] and to increase and prolong the phosphorylation of p47phox in stimulated cells [51,55]. Here, we show that calyculin A enhanced the constitutive phosphorylation of p67phox and NADPH oxidase activation, and genistein inhibited both process, suggesting that phosphorylated p67phox is a target for PP1/PP2A and this pathway could regulate NADPH oxidase activation.

How this constitutive phosphorylation of p67phox could regulate NADPH oxidase activation is not known. This phosphorylation could have a role in maintaining the oxidase inactive in the cytosol or it could prepare p67phox to a better activation of this oxidase. This phosphorylation did not alter binding of p67phox to the p40phox and p47phox complex (data not shown). The fact that p67phox is phosphorylated on the same sites in resting and in PMA and fMLP-stimulated neutrophils [16,32], and the fact that p67phox phosphorylation was found in plasma membranes [17] suggest that this phosphorylation rather plays a positive role in activating cytochrome b 558. Identification of the phosphorylated sites, site directed mutagenesis of these sites and transfection in p67phox-deficient cells will allow us to answer this question in the future.

In summary, we demonstrated that p67phox is constitutively phosphorylated in resting human neutrophils and that the state of p67phox phosphorylation is controlled by an upstream tyrosine kinase, MEK1/2 and the serine/threonine phosphatases PP1/2A. Dysregulation of the balance between these two activities could play a role in ROS production by human neutrophils at inflammatory sites.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale), CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer). Houssam Raad is a recipient of the FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bcp.2011.07.070](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.070).

References

- [1] Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 1994;56:672–86. 421
- [2] Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005;23:197–223. 422
- [3] Babior BM. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 1984;64:959–66. 423
- [4] El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005;53:199–206. 424
- [5] Chanock SJ, El-Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 1994;269:24519–22. 425
- [6] Wientjes FB, Segal AW. NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin Cell Biol* 1995;6:357–65. 426
- [7] Quinn MT, Gauss KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* 2004;76:760–81. 427
- [8] Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 2005;386:401–16. 428
- [9] Nauseef WM, Volpp BD, McCormick S, Leidal KG, Clark RA. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J Biol Chem* 1991;266:5911–7. 429
- [10] Woodman RC, Ruedi JM, Jesaitis AJ, Okamura N, Quinn MT, Smith RM, et al. Respiratory burst oxidase and three of four oxidase-related polypeptides are associated with the cytoskeleton of human neutrophils. *J Clin Invest* 1991;87:1345–51. 430
- [11] El Benna J, Dang PM, Andrieu V, Vergnaud S, Dewas C, Cachia O, et al. P40phox associates with the neutrophil Triton X-100-insoluble cytoskeletal fraction and PMA-activated membrane skeleton: a comparative study with P67phox and P47phox. *J Leukoc Biol* 1999;66:1014–20. 431
- [12] Han CH, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* 1998;273:16663–8. 432
- [13] Segal AW, Heyworth PG, Cockcroft S, Barrowman MM. Stimulated neutrophils from patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease fail to phosphorylate a Mr-44,000 protein. *Nature* 1985;316:547–9. 433
- [14] Okamura N, Curnutte JT, Roberts RL, Babior BM. Relationship of protein phosphorylation to the activation of the respiratory burst in human neutrophils. Defects in the phosphorylation of a group of closely related 47-kDa proteins in two forms of chronic granulomatous disease. *J Biol Chem* 1988;263:6777–82. 434
- [15] El Benna J, Faust LP, Babior BM. The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem* 1994;269:23431–6. 435
- [16] El-Benna J, Dang PMC, Gaudry M, Fay M, Morel F, Hakim J, et al. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67phox during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. *J Biol Chem* 1997;272:17204–8. 436
- [17] Dusi S, Rossi F. Activation of NADPH oxidase of human neutrophils involves the phosphorylation and the translocation of cytosolic p67phox. *Biochem J* 1993;296:367–71. 437
- [18] Bouin AP, Grandvaux N, Vignais PV, Fuchs A. p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem* 1998;273:30097–103. 438
- [19] Regier DS, Greene DG, Sergeant S, Jesaitis AJ, McPhail LC. Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation. *J Biol Chem* 2000;275:28406–12. 439
- [20] Raad H, Pacllet MH, Boussetta T, Kroviarski Y, Morel F, Quinn MT, et al. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J* 2009;23:1011–22. 440
- [21] Sergeant S, McPhail LC. Opsonized zymosan stimulates the distribution of protein kinase C isoforms in human neutrophils. *J Immunol* 1997;159:2877–85. 441
- [22] Dang PM, Fontayne A, Hakim J, El Benna J, Perianin A. Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol* 2001;166:1206–13. 442
- [23] Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Knall C, Gerwins P, Johnson GL, et al. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and fMLP. *J Clin Invest* 1997;99:975–86. 443
- [24] El Benna J, Faust LP, Johnson JL, Babior BM. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996;271:6374–8. 444
- [25] Faust LP, El Benna J, Babior BM, Chanock SJ. The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest* 1995;96:1499–505. 445
- [26] Dewas C, Fay M, Gougerot-Pocidallo MA, El-Benna J. The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol* 2000;165:5238–44. 446

- [27] Clark RA, Volpp BD, Leidal KG, Nauseef WM. Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest* 1990;85:714–21.
- [28] Dang PM, Cross AR, Babior BM. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3001–5.
- [29] Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA, El-Benna J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 2002;41:7743–50.
- [30] El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA, Marie JC, Braut-Boucher F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med* 2009;41:217–25.
- [31] Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, et al. A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest* 2006;116:2033–43.
- [32] Dang PM, Morel F, Gougerot-Pocidal MA, El Benna J. Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry* 2003;42:4520–6.
- [33] Forbes LV, Truong O, Wientjes FB, Moss SJ, Segal A. The major phosphorylation site of the NADPH oxidase component p67phox is Thr233. *Biochem J* 1999;338:99–105.
- [34] Ahmed S, Prigmore E, Govind S, Veryard C, Kozma R, Wientjes FB, et al. Cryptic Rac-binding and p21(Cdc42Hs/Rac)-activated kinase phosphorylation sites of NADPH oxidase component p67(phox). *J Biol Chem* 1998;273:15693–701.
- [35] Zhao X, Xu B, Bhattacharjee A, Oldfield CM, Wientjes FB, Feldman GM, et al. Protein kinase Cdelta regulates p67phox phosphorylation in human monocytes. *J Leukoc Biol* 2005;77:414–20.
- [36] Vergnaud S, Pacllet MH, El Benna J, Pocidal MA, Morel F. Complementation of NADPH oxidase in p67-phox-deficient CGD patients p67-phox/p40-phox interaction. *Eur J Biochem* 2000;267:1059–67.
- [37] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [38] Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350–4.
- [39] O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007.
- [40] Duncan R, Hershey JWB. Evaluation of isoelectric focusing conditions during two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: variation of gel patterns with changing conditions and optimized isoelectric conditions. *Anal Biochem* 1984;138:144.
- [41] El Benna J, Ruedi JM, Babior BM. Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac 2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. transfer of Rac 2 and the cytosolic oxidase components p47phox and p67phox to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation. *J Biol Chem* 1994;269:6729–34.
- [42] Kusunoki T, Higashi H, Hosoi S, Hata D, Sugie K, Mayumi M, et al. Tyrosine phosphorylation and its possible role in superoxide production by human neutrophils stimulated with FMLP and IgG. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;183:789–96.
- [43] Torres M, Hall FL, O'Neill K. Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein-kinases. *J Immunol* 1993;150:1563–77.
- [44] Dorseuil O, Quinn MT, Bokoch GM. Dissociation of Rac translocation from p47phox/p67phox movements in human neutrophils by tyrosine kinase inhibitors. *J Leukoc Biol* 1995;58:108–13.
- [45] Azuma EK, Kitagawa S, Yuo A, Mizoguchi H, Umezawa K, Takaku F, et al. Activation of the respiratory burst and tyrosine phosphorylation of proteins in human neutrophils: no direct relationship and involvement of protein kinase C-dependent and -independent signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1993;1179:213–23.
- [46] Corey S, Eguinoa A, Puyana-Theall K, Bolen JB, Cantley L, Mollinedo F, et al. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulates both association and activation of phosphoinositide 3OH-kinase and src-related tyrosine kinase(s) in human myeloid derived cells. *EMBO J* 1993;12:2681–90.
- [47] Al-Shami A, Naccache PH. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Involvement of Jak2 in the stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1999;274: 5333–8.
- [48] Al-Shami A, Mahanna W, Naccache PH. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Selective activation of Jak2, Stat3, and Stat5b. *J Biol Chem* 1998;273: 1058–63.
- [49] Brizzi MF, Aronica MG, Rosso A, Bagnara GP, Yarden Y, Pegoraro L. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates JAK2 signaling pathway and rapidly activates p93fes, STAT1 p91, and STAT3 p92 in polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1996;271:3562–7.
- [50] Djerdjouri B, Combadiere C, Pedruzzi E, Hakim J, Perianin A. Contrasting effects of calyculin A and okadaic acid on the respiratory burst of human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 1995;288:193–200.
- [51] Bengis-Garber C, Gruener N. Involvement of protein kinase C and of protein phosphatases 1 and/or 2A in p47phox phosphorylation in formylmet-Leu-Phe stimulated neutrophils: studies with selective inhibitors RO 31-8220 and calyculin A. *Cell Signal* 1995;7:721–32.
- [52] Yamaguchi M, Sasaki J, Kuwana M, Sakai M, Okamura N, Ishibashi S. Cytosolic protein phosphatase may turn off activated NADPH oxidase in guinea pig neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 1993;306:209–14.
- [53] Forman HJ, Zhou H, Gozal E, Torres M. Modulation of the alveolar macrophage superoxide production by protein phosphorylation. *Environ Health Perspect* 1998;106:1185–90.
- [54] Gay JC, Raddassi K, Truett 3rd AP, Murray JJ. Phosphatase activity regulates superoxide anion generation and intracellular signaling in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1997;1336:243–53.
- [55] Yamaguchi M, Saeki S, Yamane H, Okamura N, Ishibashi S. Involvement of several protein kinases in the phosphorylation of p47-phox. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220:891–5.

554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603

Article 3:

The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF α -induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils

blood

2010 116: 5795-5802
Prepublished online October 18, 2010;
doi:10.1182/blood-2010-03-273094

The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF- α -induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils

Tarek Boussetta, Marie-Anne Gougerot-Pocidallo, Gilles Hayem, Silvia Ciappelloni, Houssam Raad, Riad Arabi Derkawi, Odile Bournier, Yolande Kroviarski, Xiao Zhen Zhou, James S. Malter, Ping K. Lu, Aghleb Bartegi, Pham My-Chan Dang and Jamel El-Benna

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/116/26/5795.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Plenary Papers](#) (294 articles)

[Phagocytes, Granulocytes, and Myelopoiesis](#) (226 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.

Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF- α -induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils

Tarek Bousetta,^{1,2} Marie-Anne Gougerot-Pocidallo,^{1,3} Gilles Hayem,⁴ Silvia Ciappelloni,¹ Houssam Raad,¹ Riad Arabi Derkawi,¹ Odile Bournier,^{1,3} Yolande Kroviarski,^{1,3} Xiao Zhen Zhou,⁵ James S. Malter,⁶ Ping K. Lu,⁵ Aghleb Bartegi,² Pham My-Chan Dang,¹ and Jamel El-Benna¹

¹Inserm U773, Paris, France and Université Paris 7 Denis Diderot, Faculté de Médecine, Bichat, Paris, France; ²Unité de Recherche de Biochimie et Interaction Moléculaire, Institut Supérieur de Biotechnologie, Monastir, Tunisia; ³Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, CIB phenogen, Paris, France; ⁴Rheumatology Department, Centre Hospitalier Universitaire Xavier Bichat, Paris, France; ⁵Cancer Biology Program and Biology of Aging Program, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA; and ⁶Department of Pathology and Laboratory Medicine and the Waisman Center for Developmental Disabilities, University of Wisconsin, Madison, WI

Neutrophils play a key role in host defense by releasing reactive oxygen species (ROS). However, excessive ROS production by neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase can damage bystander tissues, thereby contributing to inflammatory diseases. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), a major mediator of inflammation, does not activate NADPH oxidase but induces a state of hyperresponsiveness to subsequent stimuli, an action known as priming. The molecular mechanisms by which TNF- α primes the NADPH oxidase are

unknown. Here we show that Pin1, a unique *cis-trans* prolyl isomerase, is a previously unrecognized regulator of TNF- α -induced NADPH oxidase hyperactivation. We first showed that Pin1 is expressed in neutrophil cytosol and that its activity is markedly enhanced by TNF- α . Inhibition of Pin1 activity with juglone or with a specific peptide inhibitor abrogated TNF- α -induced priming of neutrophil ROS production induced by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine peptide (fMLF). TNF- α enhanced fMLF-induced Pin1 and p47phox translocation to the

membranes and juglone inhibited this process. Pin1 binds to p47phox via phosphorylated Ser345, thereby inducing conformational changes that facilitate p47phox phosphorylation on other sites by protein kinase C. These findings indicate that Pin1 is critical for TNF- α -induced priming of NADPH oxidase and for excessive ROS production. Pin1 inhibition could potentially represent a novel anti-inflammatory strategy. (*Blood*. 2010; 116(26):5795-5802)

Introduction

Neutrophils play an important role in host defense against invading pathogens and in inflammation. In response to stimulating agents, such as the bacterial peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF), neutrophils release large amounts of superoxide anions and other reactive oxygen species (ROS) in a phenomenon called the respiratory burst. ROS produced by the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase play a key role in host defenses,¹⁻³ but excessive ROS production can damage healthy bystander tissues, thereby contributing to inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel diseases, and acute respiratory distress syndrome.^{4,5}

Neutrophil ROS production is mediated by the phagocyte NADPH oxidase, also called NOX2. NADPH oxidase is a multi-component enzyme system that catalyzes NADPH-dependent reduction of oxygen to superoxide anion.^{6,7} In resting cells, the NADPH oxidase is inactive and its components are distributed between the cytosol and membranes. When cells are activated, the cytosolic components (p47phox, p67phox, p40phox, and Rac2) migrate to the membranes, where they associate with the membrane-bound components (p22phox and gp91phox/NOX2, which form the flavocytochrome b558) to assemble the catalytically active oxidase.^{7,8} During NADPH oxidase activation, p47phox, p67phox,

p40phox, p22phox, and gp91phox/NOX2 become phosphorylated.⁹⁻¹³ p47phox phosphorylation on several serines plays a pivotal role in oxidase activation in intact cells.^{14,15}

Neutrophil ROS production is enhanced or primed by a variety of mediators, including proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α). In vitro, TNF- α induces a very weak oxidative response by neutrophils but strongly enhances ROS release on exposure to a secondary stimulus, such as the bacterial peptide fMLF.¹⁶⁻¹⁸ This “priming” of neutrophil ROS production plays a detrimental role in a variety of human inflammatory diseases, in which ROS hyperproduction by primed neutrophils is thought to cause direct tissue insult.¹⁸⁻²⁰ The molecular mechanisms by which TNF- α primes the NADPH oxidase are poorly understood. We have previously shown that phosphorylation of the NADPH oxidase cytosolic subunit p47phox by p38MAPKinase on Ser345 is a key event in TNF- α -induced priming of ROS production by neutrophils, as TNF- α -induced priming is abrogated by Ser345 mutagenesis and by a competitive inhibitory peptide containing the Ser345 sequence.²¹ Precisely how this phosphorylation potentiates NADPH oxidase activation and ROS production is unknown, and the factor(s) linking p47phox Ser345 phosphorylation to the NADPH oxidase hyperactivation remain(s) to be

Submitted March 4, 2010; accepted September 6, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, October 18, 2010; DOI 10.1182/blood-2010-03-273094.

An Inside *Blood* analysis of this article appears at the front of this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

identified. As phospho-Ser345 is located in a proline-rich region (—PX-phosphoSP—) that can exist in the *cis* or *trans* conformation, we suspected a role of Pin1, a unique prolyl isomerase that specifically recognizes phosphorylated serine or threonine residues located immediately N-terminal to a proline, and then isomerizes the peptide bond.^{22,23} Phosphorylated Ser or Thr adjacent to proline cannot be isomerized by other peptidyl-prolyl isomerase, such as cyclophilin A and FK506 binding protein.

Pin1-dependent isomerization can modulate enzyme activity and protein phosphorylation/dephosphorylation and induce protein degradation.^{24,25} Pin1 plays important roles in several diseases, including cancer²⁶ and Alzheimer disease.²⁷ Pin1 has been implicated in the control of cytokine expression by activated eosinophils and T lymphocytes.^{28,29} Very recently, Pin1 overexpression was described in lymphocytes, chondrocytes, and fibroblasts from arthritic mice.³⁰ However, Pin1 expression in neutrophils and its possible role in regulating NADPH oxidase activation and ROS production at inflammatory sites have not been studied. The aim of this study was to investigate the role of Pin1 in the process leading to TNF- α -induced priming of the phagocyte NADPH oxidase and to ROS overproduction by neutrophils. We show that TNF- α induces both Pin1 activation and its colocalization with p47phox in neutrophils. Pin1 inhibitors abrogated TNF- α -induced priming of neutrophil ROS production. In TNF- α -primed neutrophils, Pin1 binds to p47phox via phosphorylated Ser345, thereby inducing conformational changes that facilitate p47phox phosphorylation on other sites by protein kinase C (PKC), resulting in NADPH oxidase hyperactivation. Thus, Pin1-catalyzed prolyl isomerization is a novel mechanism regulating TNF- α -induced neutrophil NADPH oxidase priming.

Methods

Reagents and antibodies

Recombinant human TNF- α was from PeproTech. fMLF, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), protease, and phosphatase inhibitors were from Sigma-Aldrich. Endotoxin-free buffers and salt solutions were from Invitrogen. The rabbit polyclonal antibodies against phospho-Ser345-p47phox and p47phox have been described elsewhere.²¹ Anti-Pin1 was from Santa Cruz Biotechnology. To raise antibodies against phospho-Ser315, phospho-Ser320, and phospho-Ser328, rabbits were injected with the ovalbumin-crosslinked phosphopeptide sequences of these serines by PolyPeptide Laboratories. The Pin1-peptide inhibitor sequence (Ac-Phe-D-Thr(PO3H2)-Pip-Nal-Gln-NH2)³¹ was synthesized by PolyPeptide Laboratories.

Ethics statement

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers with their written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. All experiments were approved by the Inserm Institutional Review Board and ethics committee. Data collection and analyses were performed anonymously.

Neutrophil preparation

Circulating neutrophils were isolated by Polymorphprep gradient centrifugation.^{21,32} Briefly, blood was diluted 2-fold in sterile phosphate-buffered saline and cells were isolated by one-step Polymorphprep gradient centrifugation at 500g for 30 minutes at 22°C. The neutrophil band was collected, and the cells were washed in phosphate-buffered saline and counted.

Neutrophil fractionation

Fractionation was performed by nitrogen cavitation and gradient centrifugation.^{32,33}

Measurement of ROS production by luminol-amplified chemiluminescence

Neutrophils (5×10^5) were suspended in 0.5 mL of Hanks balanced salt solution containing 10 μ M luminol at 37°C with or without 250 nM juglone or Pin1-peptide inhibitor (PPI; 50 μ M)³¹ for 30 minutes. TNF- α (20 ng/mL) was added for 20 minutes; then the cells were stimulated with 10^{-7} M fMLF. Chemiluminescence was recorded with a luminometer (Berthold-Biolumat LB937).

Bacterial expression of p47phox and Pin1

GST-Pin1 and GST-p47phox were expressed in *Escherichia coli* (BL21) grown at 37°C and then induced for 3 hours with 0.1 mM or 0.2 mM isopropylthiogalactoside at 37°C. Cells were harvested by centrifugation (4000g, 20 minutes, 4°C), and the pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol [DTT], 1% [vol/vol] Triton X-100, and protease inhibitors). Cells were lysed by 6 sonications, each lasting 30 seconds. After centrifugation (3200g, 20 minutes, 4°C), GST-recombinant proteins were purified with glutathione-Sepharose 4B beads (Pharmacia) and recombinant proteins (p47phox and Pin1) were prepared by GST cleavage.

Pin1 activity assay

Pin1 activity was measured using a previously described technique, with some modifications.^{22,34} Briefly, neutrophils were lysed by sonication, twice for 10 seconds at 4°C, in lysis buffer containing 50 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 100 mM NaCl, 0.25% 3-cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propanesulfonate, 5 mM NaF, 1 mM β -glycerophosphate, and 1 mM ethyleneglycoltetraacetic acid. The assay mixture consisted of 93 μ L of N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid buffer (50 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, pH 7.8, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.04 mg/mL bovine serum albumin), 5 μ L of cell lysate (10^5 cells; or 0.25 nmol of recombinant Pin1) and 2 μ L (20 mg/mL) of trypsin solution (Sigma-Aldrich). The reaction was started by adding 50 μ L (720 μ M) of peptide Trp-Phe-Tyr-Ser(PO3H2)-Pro-Arg-pNA (NeoMPS), and *p*-nitroaniline absorbance was followed at 390 nm for 4 minutes.

GST pull-down assay

A total of 1 μ g each of GST-Pin1 and p47phox (phosphorylated or not with p38MAPK) was incubated with glutathione-Sepharose beads in interaction buffer (phosphate-buffered saline; 1% 3-cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propanesulfonate; 0.1 mM DTT; 5 mM NaF, and 1 mM β -glycerophosphate) for 2 hours. After washing, the complex was released by cleavage with thrombin protease overnight at 4°C and analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot, using specific antibodies.

In vitro p47phox phosphorylation

p47phox was phosphorylated with p38MAPK and PKC in the presence or absence of Pin1. The reaction mixture contained 2.5 μ g of p47phox, 100 mU of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in 40 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 μ g/mL diacylglycerol, 150 μ g/mL phosphatidylserine, 3 mM CaCl₂, and 50 μ M adenosine triphosphate (ATP, containing 1 μ Ci [γ -³²P]-ATP) in a total volume of 50 μ L. After 25 minutes of incubation, 1 μ g of Pin1 was added for 5 minutes and 2.5 ng of PKC for 2 minutes. The reaction was terminated by adding 1 μ M staurosporine, and proteins were denatured by boiling in Laemmli sample buffer³⁵ for 3 minutes.

Dot-blot

Unphosphorylated and phosphorylated peptides corresponding to the Ser345 sequence of p47phox were coupled to ovalbumin (Neosysteme) and

dissolved in 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) at 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A total of 1 μL of this solution was spotted on a nitrocellulose membrane. After drying, the membrane was blocked for 1 hour at room temperature in Tris-buffered saline containing 3% bovine serum albumin and then incubated with Pin1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 hour in 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, and 1% Triton X-100. After washing, Pin1 was detected with an anti-Pin1 monoclonal antibody followed by a secondary horseradish peroxidase-conjugated antimouse antibody, using an enhanced chemiluminescence method.

Conformational changes of p47phox

p47phox was phosphorylated with p38MAPK for 1 hour, and 25 μg of phosphorylated or nonphosphorylated p47phox was incubated with 2 μg of Pin1, in the absence or presence of juglone, in 100mM Tris buffer for 10 minutes. Digestion was started by adding 0.2 μg of trypsin at 30°C for 1 hour and stopped by adding Laemmli sample buffer.³⁵ Proteins were analyzed with standard SDS-PAGE and Western blot methods.

Statistical analysis

All results are expressed as mean plus or minus SEM. Significant differences ($P < .05$) were identified with Student *t* test and one-way analysis of variance followed by a post-hoc test when multiple variables were analyzed. Significance was assumed at P less than .05.

Results

Pin1 is localized in human neutrophil cytosol and TNF- α markedly enhances its activity

Pin1 is expressed in several immune cells, but its presence in neutrophils has not yet been described. As shown in Figure 1A, a specific antibody against Pin1 protein revealed recombinant Pin1 expressed in *E. coli* as well as endogenous Pin1 present in human neutrophil lysates. Subcellular fractionation showed that, in resting cells, Pin1 is only present in the neutrophil cytosol (Figure 1B). To investigate the role of Pin1 in TNF- α -primed neutrophils, we studied the effect of TNF- α and fMLF on Pin1 activity in the absence and presence of juglone,³⁶ a selective Pin1 inhibitor. We first checked that juglone 250nM was able to inhibit recombinant Pin1 activity (Figure 1C). We then showed (Figure 1D) that resting human neutrophils possess constitutive basal Pin1 activity, which was markedly enhanced by TNF- α ($P < .01$ compared with resting cells). fMLF also stimulated Pin1 activity ($P < .01$). TNF- α induced significantly more Pin1 activity than fMLF ($P < .01$), although the 2 agents induced more Pin1 activity. Furthermore, incubation of neutrophils for 30 minutes with 250nM juglone inhibited both constitutive and stimulated endogenous Pin1 activity ($P < .001$; Figure 1D).

Pin1 inhibitors inhibit TNF- α -induced priming of ROS production by human neutrophils

To examine the role of Pin1 in TNF- α -induced priming of ROS production, we first examined the effect of juglone on TNF- α -induced neutrophil priming of ROS production, in the aforementioned conditions that inhibited Pin1 activity. Neutrophils were incubated with juglone (250nM) for 30 minutes, and then treated with TNF- α (20 ng/mL) and stimulated with fMLF (10^{-7}M) before measuring ROS production with a luminol-amplified chemiluminescence method. Resting and TNF- α -treated cells exhibited weak activity, close to baseline (Figure 2A). As expected, TNF- α primed fMLF-induced ROS production by neutrophils in control experiments performed without juglone. However, pretreatment of neutro-

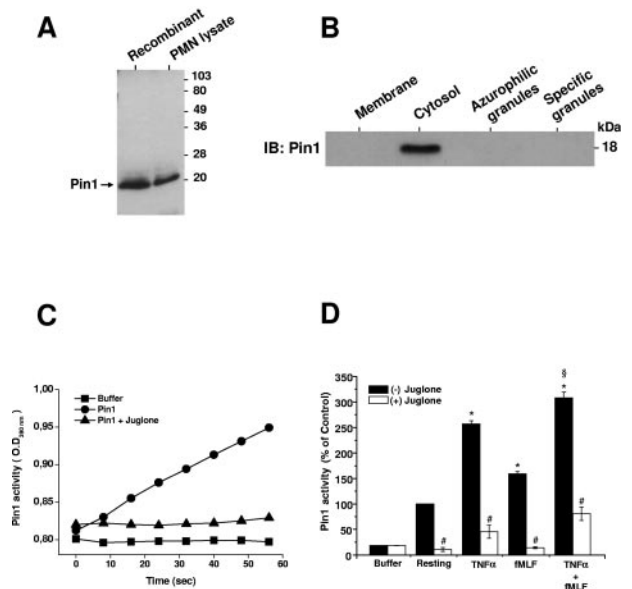


Figure 1. Pin1 is expressed in human neutrophils and is activated by TNF- α and fMLF. (A) Recombinant Pin1 (0.5 μg) and a resting human neutrophil (PMN) lysate (2×10^6 cells) were analyzed by SDS-PAGE and Western blot with an anti-Pin1 antibody. (B) Resting human neutrophils were lysed by nitrogen cavitation, and fractions were isolated on a Percoll gradient. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blot with an anti-Pin1 antibody. IB indicates immunoblot. (C) Recombinant Pin1 (0.25 nmol) was used to measure activity by recording the absorbance (at 390 nm) of free *p*-nitroaniline (pNA) cleaved by trypsin from Trp-Phe-Tyr-Ser(PO3H2)-Pro-Arg-pNA in the absence and presence of juglone (250nM). (D) Neutrophils were incubated in the absence and presence of juglone (250nM for 30 minutes) and then treated with TNF- α (20 ng/mL), fMLF (10^{-7}M), or TNF- α , followed by fMLF (TNF- α + fMLF), before lysis. Pin1 activity was determined by measuring the absorbance of free pNA cleaved from Trp-Phe-Tyr-Ser(PO3H2)-Pro-Arg-pNA. Data are mean plus or minus SEM of 6 experiments. * $P < .01$ compared with resting neutrophils. § $P < .01$ TNF- α + fMLF compared with fMLF. # $P < .001$ with versus without juglone.

phils with juglone completely abrogated the priming effect of TNF- α (Figure 2A-B). fMLF-induced activation was also inhibited, although somewhat less strongly, possibly because of neutrophil priming during the isolation procedure itself. Juglone did not affect neutrophil viability at the concentrations tested (data not shown). To rule out a nonspecific effect of juglone, we used a more specific Pin1 inhibitor consisting of a competitive peptide containing a Pin1-binding sequence able to inhibit Pin1 both in vitro and in intact cells.³¹ This PPI also abrogated TNF- α -induced priming of ROS production in response to fMLF (Figure 2C-D), whereas its effect on fMLF stimulation alone was not significant. Importantly, neither juglone nor PPI inhibited neutrophil ROS production triggered by PMA, a PKC direct activator (Figure 2E-F), suggesting that these agents do not inhibit NADPH oxidase activity or the PKC-dependent activation pathway, and that they do not scavenge ROS.

TNF- α enhances fMLF-induced Pin1 and p47phox translocation to the membrane fraction and juglone inhibits this process

As the NADPH oxidase cytosolic subunit p47phox could be phosphorylated on Ser345,²¹ a site located in a Pin1 consensus binding sequence, we examined p47phox and Pin1 localization in human neutrophils in different conditions. The subcellular fractionation experiments show that, in resting neutrophils, Pin1 and the NADPH oxidase component p47phox were mainly localized in the cytosol (Figure 3A, Resting). Pin1 and p47phox remained localized in the cytosol in TNF- α -treated cells (Figure 3A). Contrary to

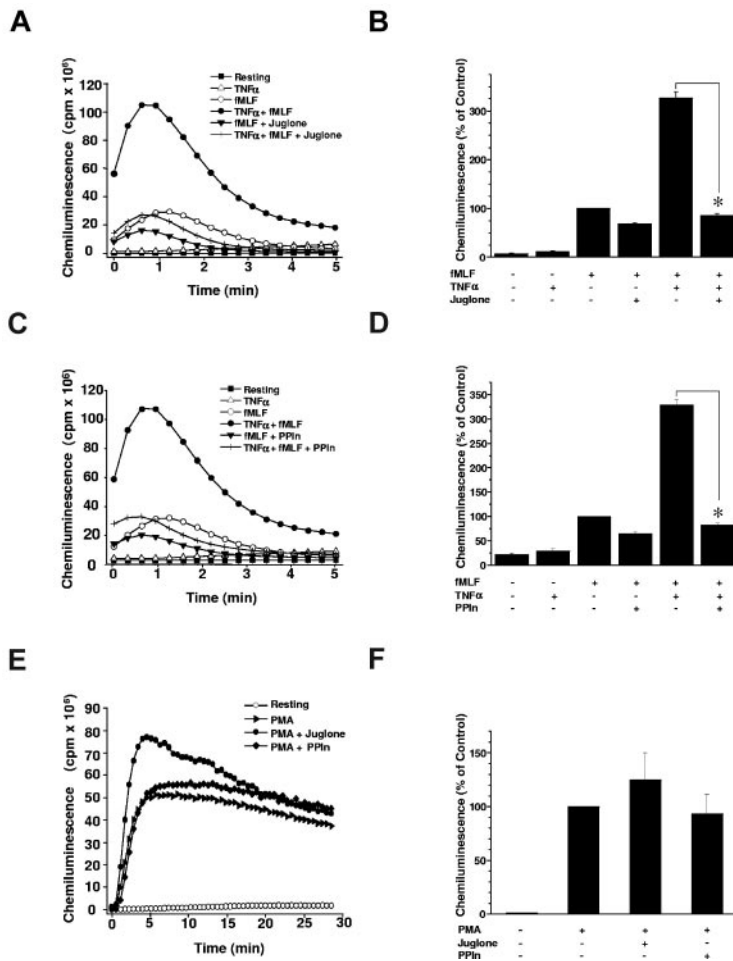


Figure 2. Pin1 is required for TNF- α -induced priming of ROS production. (A) Neutrophils were incubated in Hanks buffer containing juglone (250nM) for 30 minutes; then TNF- α (20 ng/mL) was added for 20 minutes before stimulation with fMLF (10^{-7} M). ROS production was measured with a luminol-amplified chemiluminescence technique. (B) Total chemiluminescence in each experimental condition is expressed as mean plus or minus SEM of 6 experiments. (C) PPIin (50 μ M) was tested in the same conditions as juglone. (D) Data are mean plus or minus SEM of 6 experiments. (E) Neutrophils were incubated with juglone or PPIin and then stimulated with PMA (100 ng/mL) before measuring ROS production with a luminol-amplified chemiluminescence technique (one experiment representative of 3). (F) Total chemiluminescence in each experimental condition is expressed as mean plus or minus SEM of 3 experiments. * $P < .01$ compared with inhibitor-free conditions.

TNF- α , fMLF (at 10^{-7} M) induced Pin1 clear translocation and a weak p47phox translocation to the membrane fraction. However, pretreatment with TNF- α enhanced fMLF-induced Pin1, p47phox, and phospho-Ser345-p47phox translocation to the membrane fraction. Interestingly, juglone inhibited p47phox and Pin1 translocation in TNF- α + fMLF-stimulated neutrophils (Figure 3B). These results show that TNF- α enhanced fMLF-induced Pin1 and p47phox translocation to the membranes and that Pin1 activity is required for this process.

TNF- α triggers Pin1 binding to p47phox

These latter findings suggested that TNF- α , which induces phosphorylation of p47phox on Ser345²¹ (Figure 4A, p-Ser345), might thereby trigger Pin1 binding to p47phox. To test this possibility directly, we used a GST pull-down assay with GST-Pin1 and cytosol from resting, TNF- α -, fMLF-, and TNF- α + fMLF-treated neutrophils. We found that p47phox from TNF- α - and TNF- α + fMLF-treated neutrophils bound to GST-Pin1 (Figure 4A), whereas p47phox from resting and fMLF-treated neutrophils did not. Exogenous recombinant GST-Pin1 might bind to free phosphorylated p47phox in primed neutrophils or might compete with endogenous Pin1 bound to phosphorylated p47phox.

To confirm a direct interaction between Pin1 and p47phox phosphorylated on Ser345, the GST-pull down assay was repeated with GST-Pin1 and recombinant human p47phox phosphorylated on Ser345 by active p38MAPK in vitro. Pin1 effectively bound to phosphorylated p47phox but not to the nonphosphorylated protein

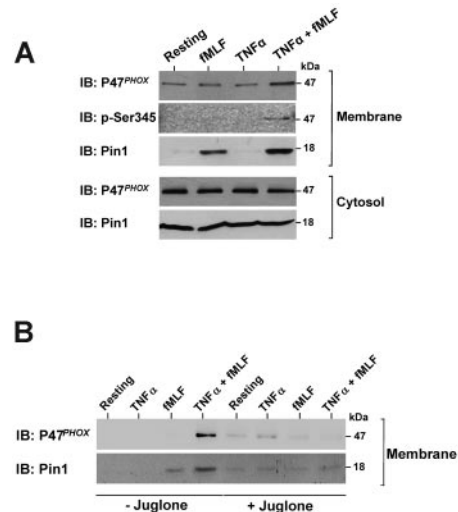


Figure 3. TNF- α enhances fMLF-induced Pin1 and p47phox translocation to the membranes in human neutrophils and the effect of juglone. (A) Neutrophils were treated with TNF- α (20 ng/mL), fMLF (10^{-7} M), or TNF- α followed by fMLF (TNF- α + fMLF) and then lysed by nitrogen cavitation. Membranes and cytosols were separated by ultracentrifugation on a sucrose gradient. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-Pin1, anti-p47phox, and anti-pSer345 antibodies. (B) Neutrophils were treated with TNF- α , fMLF, or TNF- α + fMLF in the absence or presence of 250nM juglone and then lysed. Membranes were separated by ultracentrifugation on a sucrose gradient, and proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting (IB). (representative of 7 experiments).

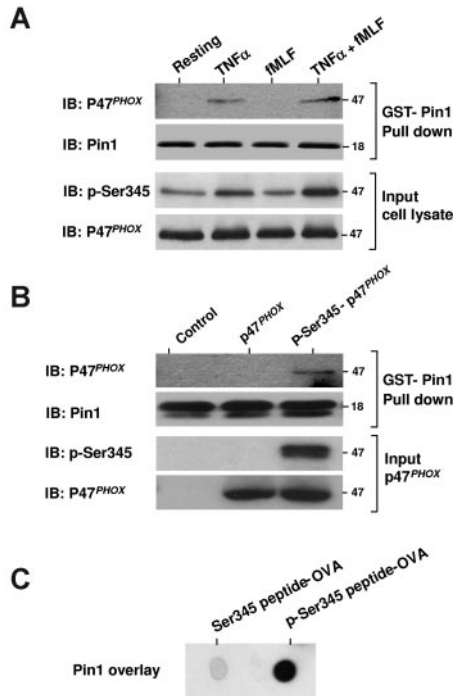


Figure 4. Pin1 interacts with p47phox via phosphorylated Ser345. (A) Neutrophils were treated with TNF- α alone, fMLF alone, or TNF- α followed by fMLF (TNF- α + fMLF), and then lysed and incubated with GST-Pin1 in the presence of glutathione beads. The beads were then washed, Pin1 was released by thrombin cleavage, and proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blot (IB). (B) Recombinant p47phox was phosphorylated with p38MAPK and then rephosphorylated and incubated with GST-Pin1 and glutathione-agarose beads. The beads were washed 3 times, and proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting (IB). (C) p47phox peptides containing phosphorylated or nonphosphorylated Ser345 were coupled to ovalbumin, spotted on nitrocellulose membranes, and overlaid with recombinant Pin1. Pin1 was detected with a specific antibody. Experiments are representative of 3.

(Figure 4B). Furthermore, when a peptide sequence containing the phosphorylated Ser345 or a nonphosphorylated Ser345 was overlaid with Pin1, Pin1 bound to the phosphorylated Ser345 peptide sequence but not to the nonphosphorylated peptide (Figure 4C). Thus, TNF- α induces Pin1 activation and its interaction with p47phox via phospho-Ser345 in human neutrophils.

Pin1 binding to phospho-Ser345-p47phox induces p47phox conformational changes

To determine whether Ser345-phosphorylated p47phox undergoes conformational change after interacting with Pin1, we examined the effect of Pin1 on p47phox sensitivity to trypsin proteolysis because conformational changes have been shown to affect trypsin sensitivity, presumably by exposing new cleavage sites or hiding existing cleavage sites in native proteins.^{37,38} The antibody used in this experiment was directed against the whole recombinant p47phox protein and thus recognizes multiple p47phox sequences. As shown in Figure 5A-B (arrows), the abundance of some digested peptides was higher in the presence of phosphorylated p47phox and active Pin1, suggesting that p47phox undergoes conformational changes. These apparent conformational changes were inhibited when Pin1 activity was abrogated by juglone, showing that Pin1 activity is required, and ruling out Pin1 interference with the protease. Pin1 also induced significant but lesser conformational changes with nonphosphorylated p47phox, which were inhibited by juglone. This could be the result of

phosphorylation-independent Pin1 activity or to contamination of recombinant Pin1 with bacterial proline isomerase.

Pin1 facilitates p47phox phosphorylation by PKC on Ser315, Ser320, and Ser328

During neutrophil stimulation, it has been suggested that p47phox undergoes sequential phosphorylation.³⁹ We thus studied the consequences of p38MAPK-dependent phosphorylation of p47phox on Ser345 and subsequent Pin1-induced conformational changes on PKC-mediated phosphorylation of p47phox at other sites in vitro. p47phox was first phosphorylated with p38MAPK; then Pin1 was added and p47phox was further phosphorylated with PKC in the presence of [³²P]-ATP. p47phox phosphorylation by PKC was clearly enhanced when p47phox was first phosphorylated with p38MAPK in the presence of Pin1 (Figure 6A). Pin1 inhibition by juglone abrogated this effect, indicating that active Pin1 was required. Juglone did not inhibit p38MAPK or PKC activity (data not shown). To verify that Pin1 can effectively regulate PKC-dependent p47phox phosphorylation in intact neutrophils, we produced specific antibodies directed against the major PKC-phosphorylated sites of p47phox (Ser315, Ser320, and Ser328).^{9,15,39} These new antibodies specifically recognize each phosphorylated site (Figure 6B) and revealed PMA-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. In addition, PMA-induced phosphorylation of p47phox was inhibited by a selective PKC inhibitor, GF109203X (Figure 6C), as expected. We then treated neutrophils with TNF- α and fMLF, alone or sequentially, in the presence or absence of juglone, and analyzed Ser315, Ser320, and Ser328 phosphorylation status by SDS-PAGE and Western blotting with our phospho-specific antibodies (Figure 6D). TNF- α alone did not induce phosphorylation of these PKC sites (Ser315, Ser320, and Ser328), although it induced phosphorylation of Ser345, a MAPKinase site. fMLF (at 10⁻⁷M) alone induced only weak phosphorylation of Ser315, Ser328, and Ser345. However, priming with TNF- α followed by fMLF stimulation markedly increased p47phox phosphorylation on Ser315, Ser320, and Ser328, showing for the first time that phosphorylation of these sites is primed by TNF- α . Results also show that juglone inhibited this process. To analyze the effect of juglone on this priming, phosphorylated and total p47phox from 3 experiments were quantified by densitometry (using Scion image Beta 4.03 for Windows 95 to XP software) and phosphorylated p47phox corrected for the amount of p47phox. The

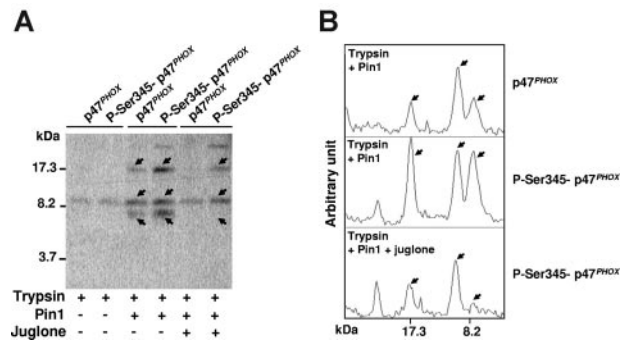


Figure 5. Pin1 induces conformational changes of p47phox via binding to phosphorylated Ser345. (A) p47phox was phosphorylated with p38MAPK, incubated with Pin1 in the presence or absence of juglone, and subjected to trypsin cleavage; peptides were analyzed with Tris-tricine gels and immunoblotting with an antibody directed against the whole recombinant p47phox protein. (B) Gels were scanned and peptides were quantified with Scion image Beta 4.03 for Windows 95 to XP software from the National Institutes of Health. Experiments are representative of 3.

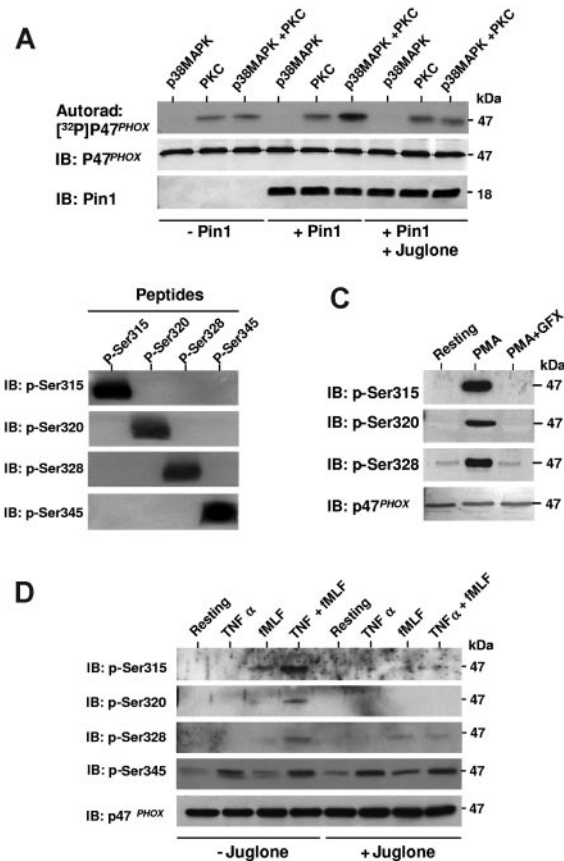


Figure 6. Pin1 facilitates phosphorylation of p47phox by PKC, both in vitro and in intact neutrophils. (A) p47phox was phosphorylated with p38MAPK and then incubated with or without Pin1 preincubated with or without juglone. Where indicated, PKC was added in the presence of ^{32}P - γ -ATP. Proteins were analyzed by SDS-PAGE, autoradiography, and immunoblotting (IB). (B) Phosphorylated p47phox peptides containing phospho-Ser315 (p-Ser315), p-Ser320, p-Ser328, or p-Ser345 were subjected to 16% SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride membranes, and revealed with anti-p-Ser315, p-Ser320, p-Ser328, or p-Ser345 antibodies. (C) Neutrophils were incubated with or without GF109203X (GFX) (5 μM) for 15 minutes, stimulated with PMA, and proteins were analyzed with SDS-PAGE and Western blotting using anti-phospho-Ser315, anti-phospho-Ser320, anti-phospho-Ser328, and anti-p47phox antibodies. (D) Neutrophils were treated with TNF- α and fMLF, alone or together, in the absence or presence of juglone. Neutrophils were then lysed, and proteins were analyzed with SDS-PAGE and Western blotting with anti-phospho-Ser315, anti-phospho-Ser320, anti-phospho-Ser328, anti-phospho-Ser345, and anti-p47phox antibodies. All experiments are representative of 3.

results show that the TNF- α -induced increase in Ser315 and Ser320 phosphorylation was completely inhibited by the Pin1 inhibitor juglone (100% inhibition TNF- α + fMLF + juglone compared with TNF- α + fMLF; $P < .01$, $n = 3$). The TNF- α -induced increase in Ser328 phosphorylation was inhibited by 40.9% plus or minus 5.7% ($P < .01$, $n = 3$), whereas Ser345 phosphorylation was not inhibited. These results suggest that Pin1 mediates TNF- α -induced PKC-dependent hyperphosphorylation of p47phox in intact neutrophils, a phenomenon required for NADPH oxidase activation.^{8,14,39}

Discussion

The molecular mechanisms by which TNF- α primes neutrophil ROS production are not fully understood. Here we show that Pin1, a unique *cis-trans* prolyl isomerase, is a previously unrecognized mediator of TNF- α -induced NADPH oxidase hyperactivation and

ROS hyperproduction by human neutrophils. Inhibition of neutrophil Pin1 activity with juglone or with a specific Pin1-peptide inhibitor abrogated TNF- α -induced priming of human neutrophil ROS production. TNF- α induced both Pin1 activation and enhanced its translocation to the membrane fraction with p47phox, a cytosolic NADPH oxidase subunit in neutrophils. We also found that Pin1 binds to p47phox via phosphorylated Ser345, thereby inducing conformational changes that facilitate p47phox phosphorylation on other sites by PKC, and results in NADPH oxidase hyperactivation. Thus, Pin1-catalyzed prolyl isomerization is a novel mechanism regulating TNF- α -induced neutrophil NADPH oxidase priming.

It is clear from our data that basal Pin1 activity exists in the resting neutrophil cytosol. TNF- α and fMLF enhanced Pin1 activity through mechanisms that are under investigation in our laboratory. It has been reported that other agents, such as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and hyaluronic acid, can induce Pin1 activation in eosinophils and T lymphocytes.^{28,29,40} Subcellular fractionation experiments showed that fMLF stimulation increased the membrane localization of Pin1, whereas TNF- α stimulation did not (Figure 3A). However, TNF- α , contrary to fMLF, induced Pin1 binding to p47phox (Figure 4A). These results suggest that Pin1 translocation and Pin1 binding to p47phox may be controlled by different pathways. fMLF is a powerful Pin1 membrane translocation inducer but a weak Pin1-p47phox interaction inducer, whereas TNF- α is a weak Pin1 translocation inducer but a powerful Pin1-interaction inducer.

During human neutrophil stimulation, the NADPH oxidase organizer subunit p47phox is heavily phosphorylated.³⁹ It is well known that, on phosphorylation, the p47phox isoelectric point (pI) shifts to the acidic range, giving rise to several phosphorylated isoforms corresponding to different phosphorylation states.⁴¹ When cells are stimulated with PMA, a PKC activator, 8 or 9 phosphorylation states of p47phox are observed in the cytosol and membranes, with the 2 most acidic forms being located in the membrane.^{41,42} These results suggest that p47phox undergoes sequential p47phox phosphorylation in the cytosol and membrane. Furthermore, we found that GM-CSF and TNF- α , which do not activate NADPH oxidase, induced partial phosphorylation of p47phox on Ser345 via ERK1/2 or p38MAPK in the cytosol of GM-CSF- and TNF- α -treated neutrophils, respectively, an event that primes NADPH oxidase assembly.^{16,21,32} Our results suggest that p47phox is first phosphorylated by a MAPKinase (ERK1/2 or p38MAPK) on Ser345 and that Pin1 then binds to this site, inducing conformational changes that facilitate subsequent phosphorylation of the remaining sites by PKC isoforms. Complete phosphorylation of p47phox allows its binding to p22phox (Figure 7). Phospho-Ser345 is located in a proline-rich region (—PX-phosphoSP—) that can exist in the *cis* or *trans* conformation, and proline isomerization has a regulatory effect involving subtle conformational changes. Prolyl *cis/trans* isomerization is a spontaneous process but can also be catalyzed by various enzymes. Pin1 is a unique prolyl isomerase that specifically recognizes phosphorylated serine or threonine residues located immediately N-terminal to a proline, and then isomerizes the peptide bond. The p38MAPKinase/p47phox(Ser345)/Pin1 axis could be essential for regulating the level of NADPH oxidase activation at inflammatory sites. It is noteworthy that this MAPKinase phosphorylation site (—SP—) is not conserved in murine p47phox, contrary to rat

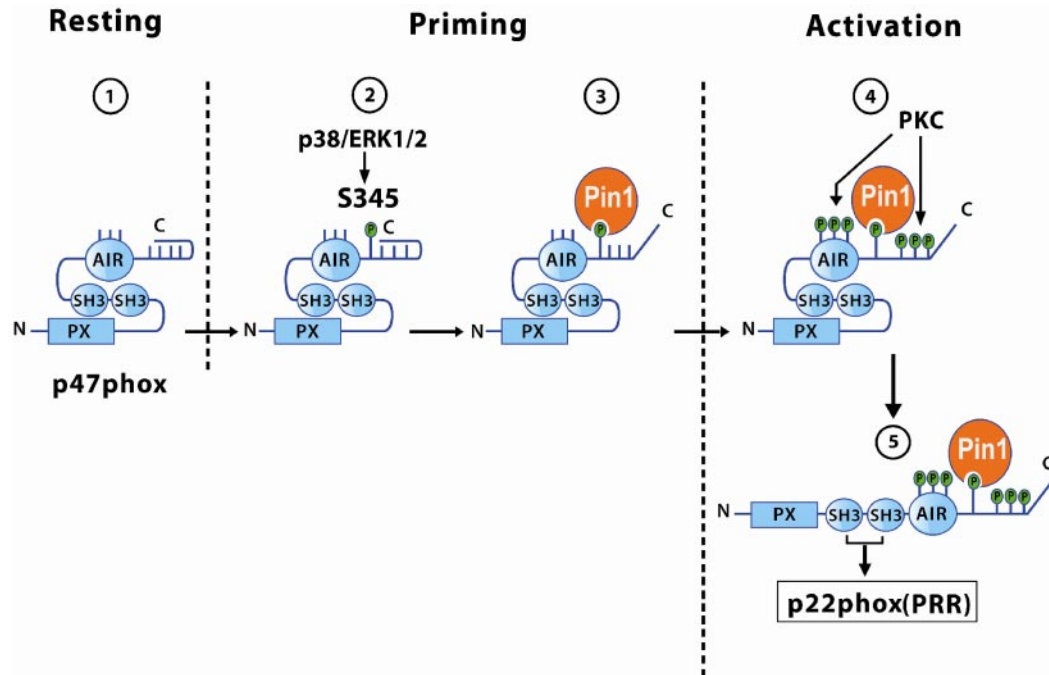


Figure 7. Models of the different conformations of p47phox in resting, primed, and activated neutrophils: role of Pin1 and phosphorylation. In resting cells, p47phox is not phosphorylated and has a constrained conformation because of the tight interaction between SH3 domains and the autoinhibitory region (AIR). (1) During priming, p47phox is first phosphorylated by a MAPKinase (ERK1/2 or p38MAPK) on Ser345, and (2) activated Pin1 then binds to this site, (3) inducing the first conformational changes that allow PKC isoforms to phosphorylate p47phox on other sites during activation. (4) Phosphorylation of p47phox on several sites at its C-terminal tail prevents the SH3/AIR interaction, allowing the cryptic SH3 domains to bind to the proline-rich region (PRR) of p22phox (5) and NADPH oxidase hyperactivation.

p47phox. Another MAPKinase site, Thr356, was recently identified in murine p47phox.⁴³ Pin1 might target Thr356 in mouse neutrophils and induce their priming.

In its nonphosphorylated state, p47phox has a constrained conformation because of the tight interaction between SH3 domains and the autoinhibitory region.⁴⁴ Phosphorylation of p47phox at its C-terminal tail relaxes this interaction, allowing the cryptic SH3 domains to bind to the proline-rich region of p22phox. This implies that phosphorylation induces conformational changes of p47phox. Several *in vitro* experiments have shown that p47phox phosphorylation induces conformational changes of the protein.^{45,46} We now show that Pin1 is the enzyme that initiates and catalyzes this reaction in intact neutrophils, in a phosphorylation-dependent manner via phospho-Ser345.

Pin1 has a key role in some neurodegenerative diseases and cancers.^{26,27} Pin1 also regulates transforming growth factor- β and GM-CSF mRNA stability in eosinophils and T lymphocytes.^{28,29} In this study, we identify a key role of Pin1 in controlling the level of NADPH oxidase activation in TNF- α -primed neutrophils. ROS production by the phagocyte NADPH oxidase complex plays a major role in host defenses, but excessive ROS production can damage healthy bystander tissues, thereby contributing to inflammatory diseases. We have previously reported increased NADPH oxidase activity and excessive ROS generation through increased p47phox(Ser345) phosphorylation in neutrophils isolated from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients, compared with those isolated from blood.²¹ The results presented here suggest that Pin1 could mediate neutrophil hyperactivation at inflammatory sites. Pharmacologic Pin1 targeting could thus dampen TNF- α -induced neutrophil hyperactivation and ROS production, a hallmark of inflammatory diseases.

TNF- α is a key cytokine in several inflammatory diseases. Here we show that Pin1 mediates TNF- α -induced neutrophil NADPH

oxidase priming and ROS hyperproduction via specific binding to phosphorylated Ser345 of p47phox. Pin1 could mediate other TNF- α -induced processes and thus be an essential player in TNF- α -induced inflammatory diseases. Pin1 inhibitors might represent an important therapeutic advance for inflammation and other diseases associated with TNF- α overproduction.

Acknowledgments

This work was supported by l'Agence Nationale de la Recherche, Arthritis Fondation Courtin, Vaincre la mucoviscidose, Comité Mixte de Coopération Universitaire franco-tunisienne, Accord Inserm/DGRST, Inserm and Centre National de la Recherche Scientifique, and the National Institutes of Health (P30 HD03352, P01 HL088594, and R01 HL087950) (J.S.M.).

Authorship

Contribution: T.B. performed experiments and analyzed the data; M.-A.G.-P., P.M.-C.D., and J.E.-B. designed the study, interpreted the results, and wrote the paper; G.H. designed the study and interpreted the results; S.C., H.R., R.A.D., Y.K., O.B., and X.Z.Z. performed experiments; and J.S.M., P.K.L., and A.B. designed the study.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Jamel El-Benna, Inserm U773, CRB3, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France; e-mail: jamel.elbenna@inserm.fr.

References

- Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev*. 2007;219(1):88-102.
- Roos D, van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect*. 2003;5(14):1307-1315.
- Leto TL, Geiszt M. Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9):1549-1561.
- Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*. 2000;109(1):33-44.
- Lambeth JD. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(3):332-347.
- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005;53(3):199-206.
- Chanock SJ, el Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem*. 1994;269(40):24519-24522.
- Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J*. 2005;386(3):401-416.
- el Benna J, Faust LP, Babior BM. The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation: phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem*. 1994;269(38):23431-23436.
- Benna JE, Dang PM, Gaudry M, et al. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation: regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. *J Biol Chem*. 1997;272(27):17204-17208.
- Bouin AP, Grandvaux N, Vignais PV, Fuchs A. p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase: implication of a protein kinase C-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem*. 1998;273(46):30097-30103.
- Regier DS, Greene DG, Sergeant S, Jesaitis AJ, McPhail LC. Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms: correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation. *J Biol Chem*. 2000;275(37):28406-28412.
- Raad H, Pacllet MH, Boussetta T, et al. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J*. 2009;23(4):1011-1022.
- Faust LR, el Benna J, Babior BM, Chanock SJ. The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase: functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest*. 1995;96(3):1499-1505.
- El Benna J, Faust RP, Johnson JL, Babior BM. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping: phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1996;271(11):6374-6378.
- Dewas C, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA, El-Benna J. TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*. 2003;171(8):4392-4398.
- Brown GE, Stewart MQ, Bissonnette SA, Elia AE, Wilker E, Yaffe MB. Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 2004;279(26):27059-27068.
- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol*. 2008;30(3):279-289.
- Jacobi J, Sela S, Cohen HI, Chezar J, Kristal B. Priming of polymorphonuclear leukocytes: a culprit in the initiation of endothelial cell injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(5):H2051-H2058.
- Omori K, Ohira T, Uchida Y, et al. Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase. *J Leukoc Biol*. 2008;84(1):292-301.
- Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, et al. A specific p47phox-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2006;116(7):2033-2043.
- Yaffe MB, Schutkowski M, Shen M, et al. Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science*. 1997;278(5345):1957-1960.
- Wulf G, Finn G, Suizu F, Lu KP. Phosphorylation-specific prolyl isomerization: is there an underlying theme? *Nat Cell Biol*. 2005;7(5):435-441.
- Lu KP, Zhou XZ. The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(11):904-916.
- Lu KP, Finn G, Lee TH, Nicholson LK. Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol*. 2007;3(10):619-629.
- Bao L, Kimzey A, Sauter G, Sowadski JM, Lu KP, Wang DG. Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. *Am J Pathol*. 2004;164(5):1727-1737.
- Balastik M, Lim J, Pastorino L, Lu KP. Pin1 in Alzheimer's disease: multiple substrates, one regulatory mechanism? *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(4):422-429.
- Shen ZJ, Esnault S, Malter JS. The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates the stability of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA in activated eosinophils. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1280-1287.
- Esnault S, Shen ZJ, Whitesel E, Malter JS. The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA stability in T lymphocytes. *J Immunol*. 2006;177(10):6999-7006.
- Jeong HG, Pokharel YR, Lim SC, et al. Novel role of Pin1 induction in type II collagen-mediated rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2009;183(10):6689-6697.
- Wildemann D, Erdmann F, Alvarez BH, et al. Nanomolar inhibitors of the peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1 from combinatorial peptide libraries. *J Med Chem*. 2006;49(7):2147-2150.
- Dang PM, Dewas C, Gaudry M, et al. Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47(phox). *J Biol Chem*. 1999;274(29):20704-20708.
- Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N. Subcellular fractionation of human neutrophils on Percoll density gradients. *J Immunol Methods*. 1999;232(1):131-143.
- Schutkowski M, Bernhardt A, Zhou XZ, et al. Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and Pin1 substrate recognition. *Biochemistry*. 1998;37(16):5566-5575.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
- Hennig L, Christner C, Kipping M, et al. Selective inactivation of parvalin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone. *Biochemistry*. 1998;37(17):5953-5960.
- Zita MM, Marchionni I, Bottos E, et al. Post-phosphorylation prolyl isomerization of gephyrin represents a mechanism to modulate glycine receptors function. *EMBO J*. 2007;26(7):1761-1771.
- Marcoux J, Man P, Castellan M, Vives C, Forest E, Fieschi F. Conformational changes in p47(phox) upon activation highlighted by mass spectrometry coupled to hydrogen/deuterium exchange and limited proteolysis. *FEBS Lett*. 2009;583(4):835-840.
- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA, Marie JC, Braut-Boucher F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med*. 2009;41(4):217-225.
- Shen ZJ, Esnault S, Schinzel A, Malter JS. The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 facilitates cytokine-induced survival of eosinophils by suppressing Bax activation. *Nat Immunol*. 2009;10(3):257-265.
- Rotrosen D, Leto TL. Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor: translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events. *J Biol Chem*. 1990;265(32):19910-19915.
- el Benna J, Ruedi JM, Babior BM. Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase: transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47phox and p67phox to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation. *J Biol Chem*. 1994;269(9):6729-6734.
- Qian F, Deng J, Cheng N, et al. A non-redundant role for MKP5 in limiting ROS production and preventing LPS-induced vascular injury. *EMBO J*. 2009;28(19):2896-2907.
- Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell*. 2003;113(3):343-355.
- Park HS, Park JW. Conformational changes of the leukocyte NADPH oxidase subunit p47(phox) during activation studied through its intrinsic fluorescence. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1387(1):406-414.
- Swain SD, Helgersson SL, Davis AR, Nelson LK, Quinn MT. Analysis of activation-induced conformational changes in p47phox using tryptophan fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem*. 1997;272(47):29502-29510.

RESUME

Ce travail montre qu'une protéine non encore décrite dans les phagocytes, la PAT1 «Protein interacting with APP Tail 1 », interagit avec la partie cytosolique de la p22phox (composant du cytochrome b₅₅₈ membranaire de la NADPH oxydase). Nous avons utilisé différentes approches pour montrer cette interaction : le système double hybride, la technique de GST-pull down, la microscopie confocale et la technique de co-immunoprécipitation. De plus, nous avons montré que la PAT1a recombinante augmente l'activité de la NADPH oxydase, *in vitro* dans un système acellulaire reconstitué, et dans les cellules intactes (monocytes et cellules COS-phox). Cette nouvelle interaction régule donc l'activation de la NADPH oxydase et la production des FRO. Par ailleurs, la liaison de PAT1 aux microtubules pourrait favoriser l'assemblage du complexe NADPH oxydase pendant son activation. Ceci pourrait conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques qui préviennent la survenue des lésions tissulaires dans les maladies inflammatoires.

Mots Clés: NADPH oxydase, Phagocytes, Formes réactives de l'oxygène, PAT1/APPBP2, p22phox.

Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by a novel interaction between p22phox and PAT1.

SUMMARY

Reactive oxygen species (ROS) production by the phagocyte NADPH oxidase plays a crucial role in host defenses. NADPH oxidase is composed of the membrane flavocytochrome b₅₅₈ components (p22phox and gp91phox/NOX2), and cytosolic components (p40phox, p47phox, p67phox and a small GTPase Rac1 or Rac2). In this work we identified PAT1 by double hybrid system as a potential partner of p22phox. The interaction between p22phox and PAT1a was further confirmed by *in vitro* GST pull-down assay, confocal microscopy and co-immunoprecipitation. Addition of recombinant PAT1a to the cell free-system enhanced NADPH oxidase activation and its over-expression in human monocytes and in COSphox cells increased ROS production in resting and fMLP-stimulated cells. These data clearly identify PAT1 as a novel regulator of NADPH oxidase activation in phagocytes. Inhibition of p22phox/PAT1 interaction could be used as new approach to limit ROS production by phagocytes at inflammatory sites.

Key words: NADPH oxidase, phagocytes, PAT1/APPBP2, p22phox, Reactive oxygen species.

INSERM U773. Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon (CRB3). Unité U773, Equipe Jamel El Benna. Faculté Xavier Bichat, 16, rue Henri Huchard, 75018; Paris. France.