



**HAL**  
open science

# La NADPH oxydase phagocytaire, régulation et implication dans la Polyarthrite Rhumatoïde

Marc-André Hograindleur

► **To cite this version:**

Marc-André Hograindleur. La NADPH oxydase phagocytaire, régulation et implication dans la Polyarthrite Rhumatoïde. Sciences du Vivant [q-bio]. 2013. hal-01735509

**HAL Id: hal-01735509**

**<https://ephe.hal.science/hal-01735509v1>**

Submitted on 17 Mar 2018

**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.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté  
par

Marc – André HOGRAINDLEUR

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE :

# La NADPH oxydase phagocytaire

*Régulation et implication dans la Polyarthrite Rhumatoïde*

Soutenu le 20 Décembre 2013

devant le jury suivant :

<b>Dr. Mireille ROSSEL</b>	– Président
<b>Dr. Marie – Hélène PACLET</b>	– Tuteur scientifique
<b>Pr. Xavier RONOT</b>	– Tuteur pédagogique
<b>Dr. Sabrina BRECHARD</b>	– Rapporteur
<b>Dr. David LAURIN</b>	– Examineur
<b>Dr. Athan BAILLET</b>	– Membre
<b>Pr. Françoise MOREL</b>	– Membre

Mémoire préparé sous la direction de :

**Dr. Marie – Hélène PACLET**

**Directeur : Pr. Christian DROUET**

Laboratoire : Université Joseph Fourier, GREPI-AGIM FRE 3405 CNRS/UJF/EPHE

Et de

**Pr. Xavier RONOT**

**Directeur : Pr. Xavier RONOT**

Laboratoire : Université Joseph Fourier, CaCys-AGIM FRE 3405 CNRS/UJF/EPHE

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

*Mes premiers remerciements vont vers le Professeur Françoise Morel pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je vous suis entièrement reconnaissant pour la confiance que vous m'avez témoigné en me donnant l'opportunité de réaliser ce diplôme. Votre expérience, Vos conseils et votre souci du détail m'ont donné l'enseignement le plus complet qu'il soit.*

*Merci également au Professeur Christian Drouet. Ses commentaires et ses remarques ont été d'une aide notable dans l'accomplissement de ce travail.*

*J'aimerais exprimer ma reconnaissance au Docteur Mireille Rossel pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant de présider le jury de ma soutenance.*

*Merci au Docteur Sabrina Brécard pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce travail. Ses conseils et ses idées ont permis d'améliorer la qualité de ce mémoire.*

*Je remercie également le Docteur David Laurin d'avoir accepté d'être membre du jury en examinant ce travail.*

*Je tenais à remercier le Professeur Xavier Ronot pour son aide et son encadrement au cours de ces trois années. J'en profite aussi pour remercier l'École Pratique des Hautes Études.*

*Un grand merci au docteur Marie-Hélène Palet pour avoir dirigé ce travail. J'ai beaucoup apprécié travailler à ses côtés non seulement pour sa très grande expertise dans le domaine de l'oxydase mais aussi pour sa gentillesse, sa patience et sa disponibilité.*

*J'exprime toute ma gratitude au Docteur Athan Baillet, toujours disponible malgré ses obligations. J'ai eu la chance de bénéficier de ses connaissances en matière de rhumatologie qui ont été une véritable mine d'or dans la réalisation de ce travail.*

*Je tenais également à remercier Sylvie Berthier. Pris sous son aile dès le début (BTS), elle m'a fait découvrir le laboratoire. Ses connaissances pratiques et théoriques couplées à sa disponibilité et sa gentillesse m'ont beaucoup apporté.*

*Merci à tous les autres membres du GREPI : Chuong, Bernard, Francis, Kathy, Bertrand, Habib, Federica, Arije et Delphine. J'ai eu la chance de travailler avec une équipe soudée et compétente. Merci également aux techniciennes du Centre de Référence de l'Angioedème : Françoise et Marion.*

*J'exprime également toutes mes amitiés aux étudiants que j'ai eu le plaisir de croiser pendant mon stage : Sibylle, Julia, Bachirou, Sophie et Clara.*

*Sur le plan administratif, j'aimerais remercier Caroline Messina Dos Santos pour sa disponibilité et la prise en charge de tous les étudiants du labo.*

*D'un point de vue plus personnel, j'aimerais remercier l'ensemble des membres de ma famille. Merci à Chantal et Pierre, mes parents. Je ne saurais comment dire à quel point je vous suis reconnaissant pour tout le soutien et l'aide que vous m'avez apporté et qui m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui.*

*Merci à René-Gilles et Jean-pascal, mes frères et colocataires. Vous avez toujours été là pour tout et n'importe quoi.*

*Merci à mes grand-mères, pour leur gentillesse et leur bonne humeur ainsi que tous les petits plats préparés soigneusement pour le gourmand que je suis.*

*Merci à tous mes cousins et cousines, en particulier Marie-Aimée, Laëtitia, Pierre et Bérangère.*

*Merci à Agnès et Joël ainsi que toute ma belle-famille. Tous ces moments passés à vos côtés ont participé au maintien de ma motivation devant la paillasse.*

*Je tenais à remercier l'ensemble de mes amis. Clément, le vieux pote, toujours présent après toutes ces années. Les traditionnelles entrevues n'ont pas manqué d'apporter la joie et la bonne humeur !*

*J'aimerais remercier tout particulièrement Rémi, le beau, le grand, l'unique ! Mon compère de l'EPHE. L'entraide et le soutien mutuel au cours de ces trois années ont créé de véritables liens d'amitié.*

*Merci à Guillaume, mon coach et ami, pour sa disponibilité et son aide. Toutes ces heures passées à la salle sont un véritable exutoire, surtout quand toute la bande est réunie : Clément, Tristan, Bruce, Thibaut, Roxanne... Merci à vous aussi.*

*Pour finir, j'aimerais remercier ma magnifique petite Clairon, dont l'attention et la gentillesse m'apportent énormément chaque jour.*

*Je dédie ce travail à la mémoire de mes grands-pères,  
Gilbert & René*

## SOMMAIRE :

<b>Introduction</b> .....	1
I. La Polyarthrite Rhumatoïde (PR).....	1
II. Les principaux acteurs de la PR : les synoviocytes et les neutrophiles.....	2
II.1. Les synoviocytes : cellules résidentes de la membrane synoviale.....	2
II.1.1. La membrane synoviale rhumatoïde.....	2
II.1.2. Le FLS dans la PR.....	2
a. Phénotype du FLS rhumatoïde .....	2
b. Interaction entre les FLS rhumatoïdes et les PMN .....	3
II.2. Les PMN : principales cellules infiltrantes de l'articulation.....	3
II.2.1. La granulopoïèse.....	3
II.2.2. Migration du PMN circulant sur le site inflammatoire.....	5
II.3. Le PMN, phagocyte au rôle majeur dans la PR .....	6
III. Rôle des ROS dans la PR .....	6
III.1. Les ROS : formes réactives de l'oxygène .....	6
III.1.1. La formation des ROS .....	6
III.1.2. La détoxification des ROS.....	7
III.2. Les ROS sont présents dans la PR .....	8
III.2.1. La NADPH oxydase phagocytaire dans la PR .....	8
III.2.2. La famille des NADPH oxydases.....	8
IV. La NADPH oxydase phagocytaire .....	10
IV.1. La granulomatose sceptique chronique, modèle d'étude de la NADPH oxydase des phagocytes.....	10
IV.2. Le cytochrome <i>b</i> <sub>558</sub> , centre catalytique membranaire de la NADPH oxydase... ..	11
IV.2.1. Nox2, cœur catalytique du cytochrome <i>b</i> <sub>558</sub> .....	11
IV.2.2. p22-phox, partenaire de Nox2 .....	13
IV.3. Les facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase.....	13
IV.3.1. p47-phox, adaptateur du complexe NADPH oxydase.....	13
IV.3.2. p67-phox, activateur du cytochrome <i>b</i> <sub>558</sub> .....	14
IV.3.3. p40-phox, partenaire d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire.....	15
IV.3.4. La protéine G monomérique Rac.....	16
V. Activation de la NADPH oxydase des phagocytes .....	17
V.1. Rôle du flux calcique dans l'activation de Nox2 .....	17
V.2. Rôle de l'acide arachidonique .....	17
V.3. Les kinases impliquées dans l'activation .....	18
V.3.1. Les protéines kinases C (PKC).....	18
V.3.2. La protéine kinase A (PKA) .....	18
V.3.3. Les MAP kinases (« Mitogen Activated Protein kinase ») .....	19
V.3.4. Les phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K).....	20
V.3.5. Les protéines-kinases B / Akt (PKB) .....	20
V.4. Phosphorylations des sous-unités de la NADPH oxydase .....	20
V.4.1. Phosphorylation du cytochrome <i>b</i> <sub>558</sub> .....	20
V.4.2. Phosphorylation de p47-phox .....	20
V.4.3. Phosphorylation de p67-phox.....	21
V.4.4. Phosphorylation de p40-phox.....	22
V.4.5. Activation de Rac par phosphorylation de RhoGDI.....	22
V.5. Mode de régulation de l'activité NADPH oxydase.....	22

V.5.1.	Régulation par phosphorylation.....	22
V.5.2.	Régulation par allostérie.....	22
V.5.3.	S100A8/S100A9, partenaires d'activation de Nox2.....	22
V.5.4.	La disponibilité du substrat.....	23
a.	La PFK-2 régule la glycolyse.....	24
b.	La glycolyse, source principale d'énergie dans les PMN.....	25
<b>Objectifs</b>	.....	<b>27</b>
<b>Matériel &amp; Méthodes</b>	.....	<b>28</b>
I.	Préparation du matériel biologique.....	28
I.1.	Matériel cellulaire.....	28
I.1.1.	Cellules PLB-985.....	28
I.1.2.	Neutrophiles humains.....	28
I.1.3.	Synoviocytes primaires humains.....	29
I.2.	Numération des cellules.....	30
II.	Matériel biochimique.....	30
II.1.	Anticorps.....	30
II.1.1.	Anticorps monoclonaux dirigés contre le cytochrome <i>b</i> <sub>558</sub> .....	30
a.	Anticorps monoclonaux de souris anti-Nox2.....	30
b.	Anticorps monoclonaux de souris anti-p22-phox.....	30
II.1.2.	Anticorps polyclonaux dirigés contre les facteurs cytosoliques de l'oxydase.....	31
a.	Anticorps polyclonaux anti-S100A8/S100A9.....	31
b.	Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la PKA.....	31
c.	Anticorps polyclonaux dirigés contre la PFK-2.....	31
II.2.	Inhibiteurs pharmacologiques de kinases.....	32
III.	Traitement des cellules.....	33
III.1.	Stimulation de l'activité NADPH oxydase phagocytaire.....	33
III.2.	Inhibition de l'activité NADPH oxydase.....	34
III.3.	Co-culture des FLS primaires et des cellules PLB-985.....	34
III.4.	Evaluation de la contamination des synoviocytes par les PLB-985.....	35
III.5.	Traitement des synoviocytes avec le TNF $\alpha$ .....	35
IV.	Fractionnement subcellulaire.....	36
IV.1.	Préparation de fractions cytosoliques et membranaires.....	36
IV.2.	Préparation de lysats cellulaires.....	36
IV.2.1.	Lyse des cellules en présence de triton X-100.....	36
IV.2.2.	Lyse des cellules en présence de nonidet P40.....	37
IV.3.	Production de la protéine chimère S100A8-A9 recombinante.....	37
V.	Méthode de biochimie.....	38
V.1.	Dosage et analyse des protéines.....	38
V.1.1.	Dosage des protéines par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).....	38
V.1.2.	Electrophorèse en gel d'acrylamide dénaturant (SDS-PAGE) (Laemmli et Favre, 1973).....	38
V.1.3.	Préparation des échantillons.....	39
V.1.4.	Migration électrophorétique.....	39
V.2.	Analyse des protéines par Western-blot (Towbin et al., 1979).....	40
V.2.1.	Transfert semi-sec des protéines.....	40
V.2.2.	Révélation des protéines par chimiluminescence.....	41

V.2.3.	Analyse densitométrique du signal émis .....	41
V.3.	Mesure de l'activité NADPH oxydase dans les cellules .....	42
V.3.1.	Par chimiluminescence .....	42
V.3.2.	Par fluorimétrie (Amplex red) .....	42
V.4.	Mesure de l'activité glycolytique des cellules .....	43
V.4.1.	Mesure de l'activité PFK-1 (ajout de substrat).....	43
V.4.2.	Mesure de la vitesse de réaction catalysée par la PFK-1 .....	44
V.5.	Mesure de la concentration d'ATP dans les cellules.....	44
VI.	Méthode de biologie moléculaire .....	45
VI.1.	Extraction des ARN totaux .....	45
VI.2.	Transcription inverse (RT) .....	46
VI.3.	Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....	46
VI.4.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	48
VII.	Analyse statistique.....	49
<b>Résultats</b>	.....	<b>50</b>
I.	Etude de la régulation de l'activité NADPH oxydase : rôle de la PFK-2 .....	50
I.1.	Expression et activation de la PFK-2 dans les PMN.....	51
I.1.1.	Expression de la PFK-2 .....	51
I.1.2.	Phosphorylation de la PFK-2 en réponse à une stimulation cellulaire .....	52
I.2.	Rôle de la PKA dans l'activation de la PFK-2 .....	53
I.2.1.	Généralités .....	53
a.	PKA et phosphorylation de la PFK-2 .....	53
b.	PKA et activation de la NADPH oxydase.....	54
I.2.2.	Expression de la PKA dans les PMN .....	54
I.2.3.	Impact de la PKA sur l'activation de la PFK-2 dans les pseudo-neutrophiles.....	54
I.2.4.	Impact de l'inhibition de la PKA sur l'activité NADPH oxydase.....	56
I.3.	Rôle d'autres kinases dans la phosphorylation de PFK-2 .....	57
I.3.1.	Généralités : autres kinases décrites .....	57
a.	PKC .....	57
b.	p70 <sup>s6k</sup> , MAPKAP kinase-1 et PKB .....	58
c.	p38 MAPK.....	58
I.3.2.	Impact de ces kinases sur la phosphorylation de la PFK-2 .....	58
a.	Inhibition de la PKC .....	58
b.	Inhibition de la PKB.....	59
c.	Inhibition de la voie MEK1/2.....	60
d.	Inhibition de la p38 MAPK.....	61
I.3.3.	Impact de l'inhibition des kinases impliquées dans la phosphorylation de la PFK-2 sur l'activité NADPH oxydase .....	63
a.	Stimulation avec le PMA.....	63
b.	Stimulation avec la ionomycine .....	64
c.	Stimulation avec le fMLP .....	64
I.4.	Etude du lien entre l'activité NADPH oxydase phagocytaire et l'activité glycolytique des cellules .....	66
I.4.1.	Généralités : la production d'énergie dans les PMN .....	66
I.4.2.	Mesure de la concentration d'ATP dans les cellules stimulées.....	66



I.4.3. Mesure de la concentration en fructose-6-phosphate dans les cellules stimulées, traitées ou non avec l'inhibiteur de la PKA .....	67
a. Test sur les cellules PLB-985 différenciées .....	67
b. Mesure de la vitesse de réaction catalysée par la PFK-1 dans les cellules PLB-985 différenciées en présence de DPI .....	69
c. Mesure de la vitesse de réaction catalysée par la PFK-1 dans les neutrophiles humains .....	70
II. Implication de la NADPH oxydase phagocytaire dans la Polyarthrite Rhumatoïde....	71
II.1. Expression des NADPH oxydases dans les FLS.....	72
II.2. Etude du milieu pro-inflammatoire sur les FLS.....	72
II.2.1. Effet du TNF $\alpha$ .....	73
a. Mesure de l'activité NADPH oxydase des FLS par chimiluminescence .....	73
b. Mesure de la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> des FLS par fluorimétrie (Amplex Red).....	74
II.2.2. Effet du liquide synovial.....	74
II.2.3. Co-culture des PLB-985 différenciées avec les FLS.....	75
II.2.4. Effet des protéines S100 sur les synoviocytes.....	76
a. Sécrétion des protéines S100 dans le milieu de la co-culture .....	77
b. Effet sur l'activité NADPH oxydase des FLS.....	77
<b>Discussion</b> .....	79
I. La PFK-2 à l'interface de l'oxydase et de la glycolyse dans le neutrophile .....	79
II. La NADPH oxydase phagocytaire au cœur de la PR.....	84
III. Conclusion et perspectives .....	88
<b>Références bibliographiques</b> .....	91
<b>Annexes</b> .....	102

## SOMMAIRE DES FIGURES :

Figure 1: Schéma des coupes d'une articulation normale et d'une articulation rhumatoïde. ....	1
Figure 2 : Schéma de la granulopoïèse.....	4
Figure 3: Migration du PMN vers le site inflammatoire.....	5
Figure 4: La famille des NADPH oxydases. ....	9
Figure 5: Les différents sites de Nox2 impliqués dans le transfert d'électrons. ....	12
Figure 6 : Le processus de transport électronique du cytochrome <i>b</i> <sub>558</sub> .....	12
Figure 7: Les domaines fonctionnels de p22-phox. ....	13
Figure 8: p47-phox, adaptateur de l'assemblage de la NADPH oxydase. ....	14
Figure 9: p67-phox, activateur de la NADPH oxydase.....	15
Figure 10: p40-phox, partenaire d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire.....	16
Figure 11: La protéine G monomérique Rac.....	16
Figure 12: Représentation schématique de l'activation de la PKA par l'AMPc.....	19
Figure 13: Phosphorylation de p47-phox lors de la pré-activation et l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire. ....	21

Figure 14: La 6-PGDH et la PFK-2, enzymes du métabolisme du glucose.....	24
Figure 15: Comparaison de l'isoforme cardiaque de la PFK-2 avec l'isoforme hépatique. ....	25
Figure 16: Schéma de la glycolyse.....	26
Figure 17: Schéma de la séparation des cellules sanguines sur un gradient de Ficoll. ....	29
Figure 18: Représentation schématique du « sandwich » utilisé pour le transfert semi-sec des protéines. ....	40
Figure 19: Principe du dosage de l'activité de la PFK-1.....	43
Figure 20: L'activation de la PFK-1 favorise la glycolyse. ....	50
Figure 21: Mise en évidence de la PFK-2 dans les cellules PLB-985 différenciées.....	52
Figure 22: Effet de la stimulation des cellules PLB-985 différenciées sur la phosphorylation de la PFK-2.....	53
Figure 23: Analyse de l'expression de la PKA dans les PMN.....	54
Figure 24: Analyse de la phosphorylation de la PFK-2 dans les cellules PLB-985 différenciées. ....	55
Figure 25: Activité NADPH oxydase mesurée par chimiluminescence dans les cellules PLB-985 différenciées et les PMN. ....	56
Figure 26: Effet de Ro-31-8221 sur la phosphorylation de la PFK-2. ....	59
Figure 27: Effet de l'inhibition de la PKB sur la phosphorylation de la PFK-2.....	60
Figure 28: Effet de PD98059 sur la phosphorylation de la PFK-2. ....	61
Figure 29: Effet de SB202190 sur la phosphorylation de la PFK-2.....	62
Figure 30: Production de ROS des cellules PLB-985 différenciées traitées aux inhibiteurs de kinases puis stimulées par le PMA.....	63
Figure 31: Production de ROS des PLB-985 différenciées traitées aux inhibiteurs de kinases en réponse à la ionomycine. ....	64
Figure 32: Production de ROS des PLB-985 différenciées traitées aux inhibiteurs de kinases en réponse au fMLP. ....	65
Figure 33: Mesure de la concentration en ATP dans les celules PLB-985 différenciées. ....	67
Figure 34: Mesure de l'activité PFK-1 dans les cellules PLB-985 différenciées. ....	68
Figure 35: Analyse de la vitesse de réaction catalysée par la PFK-1 dans les cellules PLB-985 différenciées. ....	69
Figure 36: Vitesse de réaction de la PFK-1 mesurée dans les cellules PLB-985 différenciées traitées avec le DPI.....	69
Figure 37: Mesure de la vitesse de réaction de la PFK-1 dans les neutrophiles humains.....	70
Figure 38: Analyse de l'expression des transcrits et des protéines des NADPH oxydases dans les FLS.....	72
Figure 39: Mesure de la production de ROS dans les synoviocytes par chimiluminescence. .	73
Figure 40: Mesure de la production de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par fluorimétrie dans les synoviocytes. ....	74
Figure 41: Mesure de la production de ROS dans les synoviocytes après incubation avec le liquide synovial. ....	75
Figure 42: Mesure de l'activité NADPH oxydase des synoviocytes après co-culture.....	76
Figure 43: Etude par Western blot de la sécrétion des protéines S100 dans le surnageant de pseudo-neutrophiles activés. ....	77
Figure 44: Mesure de l'activité NADPH oxydase des synoviocytes après co-incubation avec des protéines S100 recombinantes. ....	78

Figure 45: Illustration de l'implication des enzymes du métabolisme du glucose dans l'activation de la NADPH oxydase des phagocytes.....	84
Figure 46: Illustration schématique des étapes consécutives dans l'interaction des synoviocytes avec les neutrophiles. ....	88

**SOMMAIRE DES TABLEAUX :**

Tableau 1: Caractéristiques des anticorps anti-peptides utilisés.....	31
Tableau 2: Concentration des inhibiteurs de kinases utilisés dans les expériences. ....	33
Tableau 3: Préparation d'un gel de séparation.....	39
Tableau 4: Préparation d'un gel de concentration.....	39
Tableau 5: Anticorps secondaires (couplés à une peroxydase) utilisés pour la révélation des immunoblots.....	41
Tableau 6: Couples d'amorces utilisés pour les amplifications avec leur séquence, leur température d'hybridation et la taille du fragment d'ADN amplifié. ....	48
Tableau 7: Récapitulatif des résultats obtenus pour l'inhibition de la phosphorylation de PFK-2 et l'inhibition de l'activité NADPH oxydase. ....	80

## ABRÉVIATIONS :

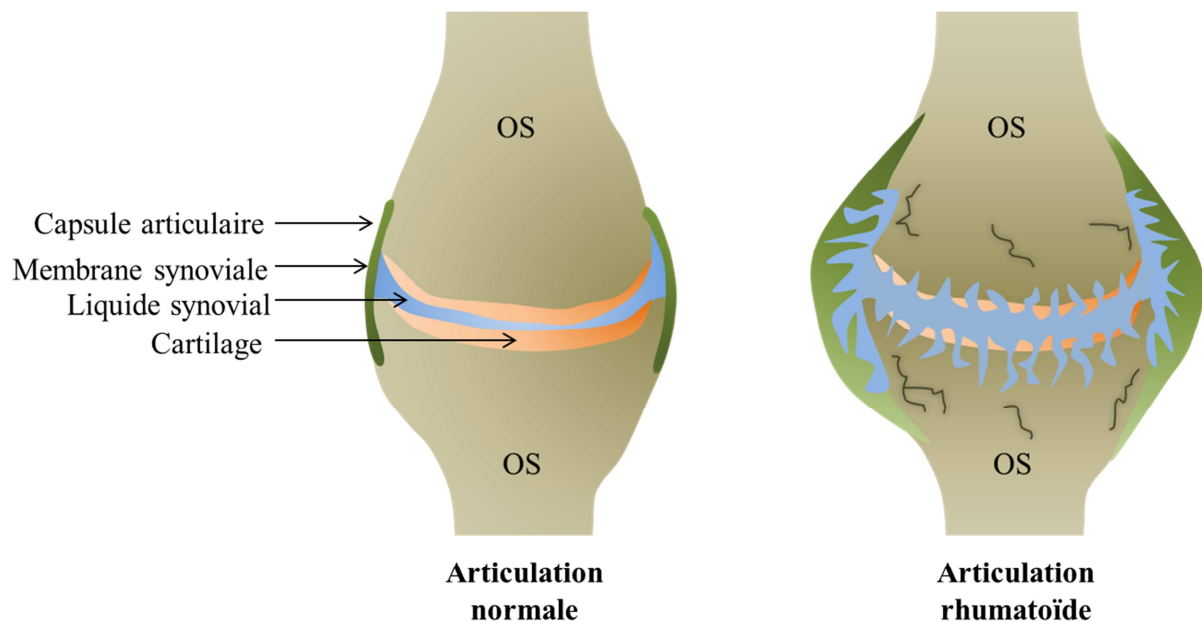
6-PGDH	6-phosphogluconate déshydrogénase
AA	Acide arachidonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AIR	Région auto-inhibitrice
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ADP/ATP	Adénosine diphosphate / Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Albumine Sérique Bovine
CGD	Granulomatose sceptique chronique
DFP	Diisopropyl fluorophosphate
DMEM	« Dulbecco's Modified Eagle Medium »
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPI	Diphénylène Iodonium
DTT	Dithiothréitol
Duox	Dual oxydase
ECL	« Enhanced Chimiluminescent »
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
F <sub>6</sub> P	Fructose-6-phosphate
F <sub>1,6</sub> P	Fructose-1,6-diphosphate
F <sub>2,6</sub> P	Fructose-2,6-diphosphate
FAD	« Flavin Adenine Dinucleotide »
FLS	Synoviocyte de type fibroblastique
fMLP	N-formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
G6P	Glucose-6-phosphate
GDH	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
GDP/GTP	Guanosine diphosphate / Guanosine triphosphate
GST	Gluthation-S-Transferase
G-CSF	« Granulocyte-Colony Stimulating Factor »
GM-CSF	« Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor »
HRPO	Peroxydase du radis noir
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
kDa	kilo Dalton
MAPK	« Mitogen Activated Protein Kinase »
MEK	« Mitogen Activated Protein Kinase Kinase »
MLS	Synoviocyte de type macrophagique

MPO	Myéloperoxydase
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
Nox	NADPH oxydase
PB1	« Phox and Bern 1 »
Pb	Paire de bases
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PFK-1	Phosphofructo-kinase-1
PFK-2	6-phosphofructo-kinase-2
phox	Phagocyte oxydase
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
PRR	Région riche en proline
PX	« Phox homology »
RAGE	« Receptor for Advanced Glycation End-products »
RFU	Unité de fluorescence relative
RLU	Unité de luminescence relative
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPMI	« Roswell Park Memorial Institute » medium
RT	Transcriptase inverse
SDS-PAGE	« Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis »
SH3	Domaine d'homologie avec Src 3
SOD	Superoxyde dismutase
SVF	Sérum de veau fœtal
TBS	Tampon tris salin
TEMED	N, N, N', N'-Tétraméthylethylènediamine
TIM	Triosephosphate isomérase
TLCK	Tosyle de lysinechlorométhylcétone
TLR	« Toll Like Receptor »
TPR	Site de répétition tétratricopeptide
TNF	« Tumor Necrosis Factor »
UV	Ultraviolet

# Introduction

## I. La Polyarthrite Rhumatoïde (PR)

La PR est une maladie inflammatoire à composante auto-immune caractérisée par la destruction structurelle de l'articulation, couplée à des gonflements articulaires appelés synovites (Figure 1). Les mécanismes de la maladie demeurent à ce jour inconnus, mais les informations récentes de la littérature impliquent les cellules de l'immunité innée dans le développement des lésions de la PR (Cedergren *et al.*, 2007 ; Lefèvre *et al.*, 2009).



**Figure 1: Schéma des coupes d'une articulation normale et d'une articulation rhumatoïde.** Une articulation est formée de deux extrémités osseuses reliées entre elles par la capsule articulaire. Les épiphyses et la capsule délimitent un espace clos, baigné par le liquide synovial. Les surfaces internes de cette cavité sont recouvertes soit par le cartilage coiffant l'os sous chondral soit par la membrane synoviale qui tapisse la capsule articulaire. Ce schéma illustre l'hypertrophie de la membrane synoviale, la destruction du cartilage ainsi que la sévère érosion du tissu osseux. Tous ces symptômes caractérisent l'articulation rhumatoïde. D'après <http://www.inserm.fr/thematiques/circulation-metabolisme-nutrition/dossiers-d-information/la-polyarthrite-rhumatoïde>.

Les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu sont similaires dans l'ensemble des réactions inflammatoires. Des leucocytes, en particulier des polynucléaires neutrophiles (PMN) vont être mobilisés pour migrer vers le site inflammatoire. Une fois sur place, les PMN activés vont produire des espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour « Reactive Oxygen Species ») issues de l'association du complexe de la NADPH oxydase. Des métalloprotéases matricielles (ou MMPs pour « Matrix Metalloproteinases ») vont contribuer à la migration cellulaire. Dans le cas du PMN, la collagénase MMP-8 et la gélatinase MMP-9 dégradent respectivement les collagènes de type I et de type IV. Les protéases et les ROS peuvent aussi exercer des effets délétères en causant des dommages irréversibles et

incontrôlés de la matrice extracellulaire des tissus cibles. Des cytokines pro-inflammatoires comme le « Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  » (TNF $\alpha$ ), l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et l'IL-6, vont intervenir en favorisant la réaction inflammatoire et en amplifiant celle-ci.

## **II. Les principaux acteurs de la PR : les synoviocytes et les neutrophiles**

Bien que la physiologie de la PR soit encore mal connue, plusieurs phases s'enchevêtrant les unes aux autres semblent caractériser l'évolution de la maladie. Un rôle primordial dans le déclenchement de la PR est reconnu aux synoviocytes (Pap *et al.*, 2000) et notamment leurs interactions avec les cellules infiltrantes phagocytaires, les PMN (Kurz *et al.*, 1999).

### **II.1. Les synoviocytes : cellules résidentes de la membrane synoviale**

#### **II.1.1. La membrane synoviale rhumatoïde**

La membrane synoviale recouvre toutes les surfaces articulaires à l'exception du cartilage. Elle enveloppe la cavité contenant le liquide synovial. Elle est divisée en deux couches :

- une couche profonde abondamment vascularisée et innervée recouvrant la capsule articulaire.
- une couche superficielle, elle-même divisée en deux couches: l'intima et la sub-intima.

La couche bordante de la membrane synoviale est formée de synoviocytes :

- Les synoviocytes de type A ou macrophagiques (MLS pour « Macrophage Like Synoviocyte »), d'origine hématopoïétique.
- Les synoviocytes fibroblastiques, ou de type B (FLS pour « Fibroblast Like Synoviocyte ») synthétisent les substances qui constituent le liquide synovial.

#### **II.1.2. Le FLS dans la PR**

##### **a. Phénotype du FLS rhumatoïde**

Au cours de la PR, les FLS prolifèrent de façon pseudo-tumorale. Ce phénomène est caractéristique de la pathologie (Lefèvre *et al.*, 2009). De plus, à l'instar des métastases, la dissémination systémique des FLS propage la maladie à d'autres articulations.



Les cytokines pro-inflammatoires sont impliquées à la fois dans l'activation et la transformation phénotypique des synoviocytes rhumatoïdes. L'IL-1 $\beta$  (Chevrel *et al.*, 2002) et le TNF $\alpha$  (Imaizumi *et al.*, 2009) augmentent la synthèse de cytokines par le FLS.

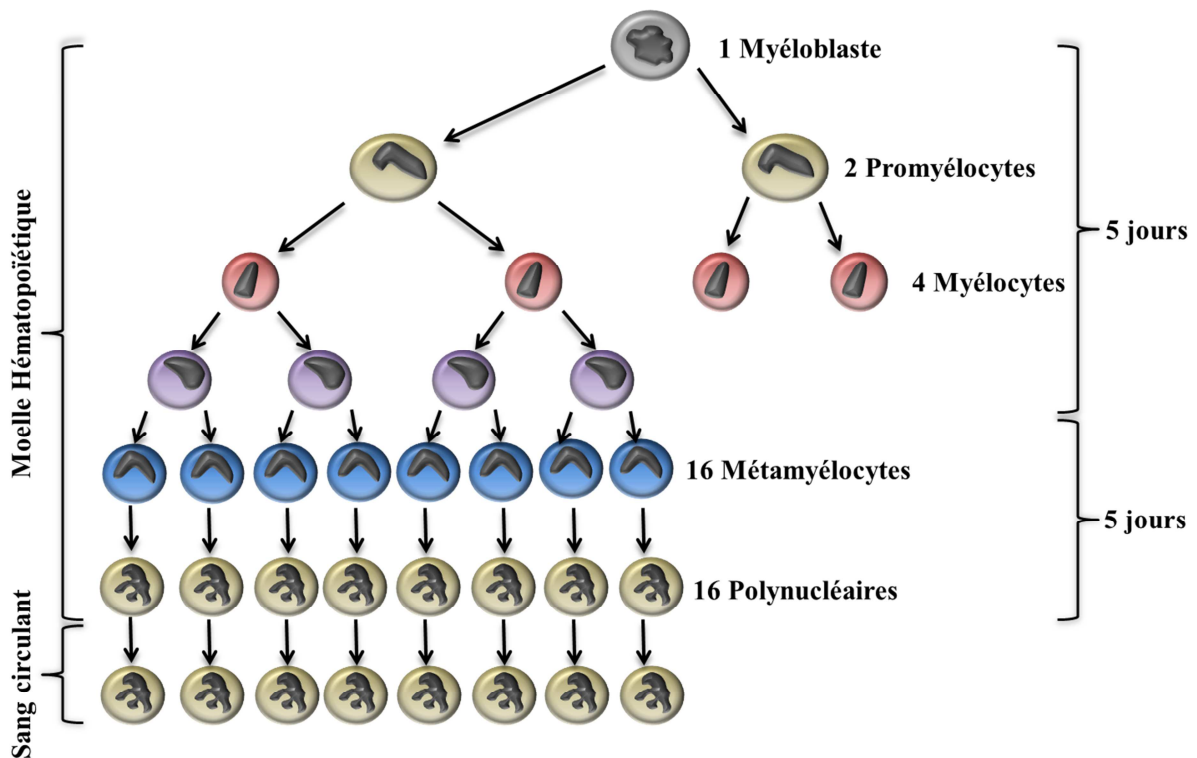
### **b. Interaction entre les FLS rhumatoïdes et les PMN**

Le rôle principal des FLS est de synthétiser et sécréter de nombreuses protéines et cytokines qui assurent le renouvellement de la matrice extracellulaire, la nutrition des autres cellules articulaires et la synthèse de l'acide hyaluronique, composant majeur du liquide synovial. Dans la PR, les FLS peuvent interagir avec des cellules impliquées dans la destruction du cartilage et l'inflammation, en particulier les PMN (Filer *et al.*, 2006). En premier lieu, les synoviocytes synthétisent des chimiokines qui attirent les leucocytes (Privat *et al.*, 2001). Les FLS produisent l'IL-8, attirant ainsi les PMN circulants (Gao *et al.*, 1995). Suite à la stimulation par les cytokines pro-inflammatoires et l'acquisition du phénotype pseudo-tumoral, les FLS activés entretiennent la réaction inflammatoire dans la membrane synoviale.

## **II.2. Les PMN : principales cellules infiltrantes de l'articulation**

### **II.2.1. La granulopoïèse**

Les granulocytes neutrophiles matures sont des cellules contenant de nombreuses granulations dans le cytoplasme ainsi qu'un noyau segmenté en plusieurs lobes : on les appelle pour cela les polynucléaires neutrophiles. Ces PMN sont le point final de la différenciation au sein de la moelle osseuse de progéniteurs (pluripotents puis spécialisés) puis de précurseurs de la lignée neutrophile. Durant la granulopoïèse de cette lignée, plusieurs types cellulaires vont se différencier : les myéloblastes, les promyélocytes et myélocytes, encore capables de proliférer. Ensuite elles vont se différencier en cellules terminales, incapables de mitose : les métamyélocytes et les PMN (Figure 2).



**Figure 2 : Schéma de la granulopoïèse.** Un myéloblaste se divise et se différencie en 2 promyélocytes qui donnent à leur tour 4 myélocytes et se divisent une fois de plus pour donner 8 cellules filles. Celles-ci se divisent et se différencient en 16 métamyélocytes qui se différencient par la suite en polynucléaires matures pouvant entrer dans le sang circulant. *D'après hematocell.univ-angers.fr.*

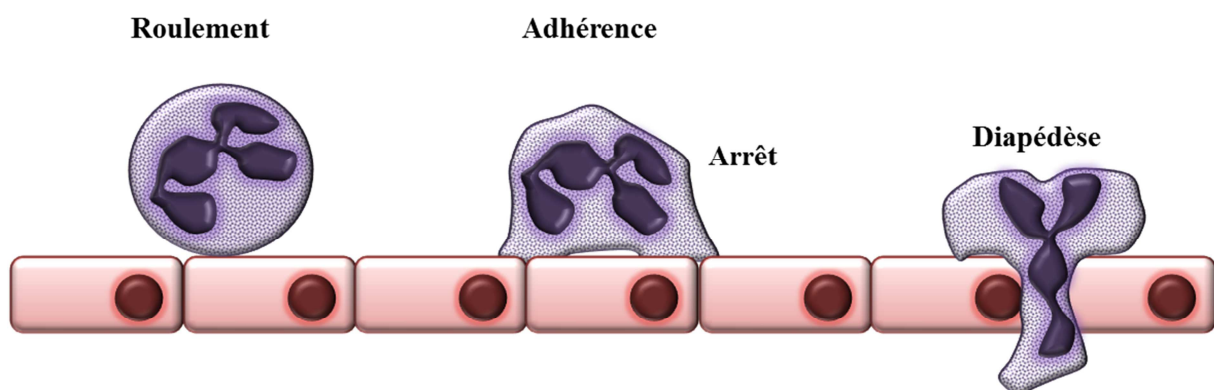
Le myéloblaste est une cellule rare de la moelle osseuse (0 à 2 % des cellules d'un frottis médullaire). Il est de forme ovale et mesure 15 à 20  $\mu\text{M}$ . Son noyau est volumineux et contient une fine chromatine ainsi que 1 à 3 nucléoles. Le cytoplasme, très restreint, est basophile et contient quelques granulations azurophiles correspondant à des lysosomes. Le promyélocyte, plus volumineux, constitue 2 à 8 % des cellules médullaires. La condensation chromatinienne est faible et il y persiste souvent un nucléole. Les granulations azurophiles se font plus nombreuses dans le cytoplasme ce qui est caractéristique de la maturation nucléoplasmique. Ces granules sont parfois dispersés dans le cytoplasme mais sont principalement positionnés autour de l'appareil de Golgi. Au stade myélocyte, la synthèse de ces granules cesse au profit des granules spécifiques contenant de la lactoferrine et des granules riches en gélatinase. Le noyau est arrondi, souvent aplati du côté du cytoplasme, la chromatine est très dense et il n'y a plus de nucléoles. Le cytoplasme, devenu acidophile, contient de nombreuses granulations primaires et secondaires « spécifiques ». Ces cellules représentent 12 à 20 % des cellules médullaires. La dernière mitose de la lignée granulocytaire du neutrophile se déroule entre le stade myélocyte et métamyélocyte donnant naissance à une cellule qui ne diffère du

myélocyte que par l'aspect réniforme du noyau, la condensation chromatinienne et la raréfaction des ribosomes et des mitochondries.

### II.2.2. Migration du PMN circulant sur le site inflammatoire

L'étude de plusieurs modèles murins de PR suggère que les PMN sont les principales cellules infiltrantes de l'articulation (Chen *et al.*, 2006). Ils parviennent au site inflammatoire en plusieurs étapes.

- *Etape de roulement* : le PMN va être retenu à la paroi vasculaire. L'adhérence des deux types cellulaires se fait par l'expression de protéines d'adhésion de faible affinité, les sélectines. La seconde étape fait intervenir des protéines d'adhésion de la famille des intégrines finalisant l'adhérence du PMN sur l'endothélium (Figure 3).
- *Etape d'adhérence* : La cellule ralentit puis adhère à l'endothélium.
- *La diapédèse* : Etape au cours de laquelle le PMN s'insère entre les cellules endothéliales pour traverser la membrane basale. Plusieurs protéases vont être sécrétées. L'élastase participe au désassemblage des complexes cadhérines/cathénines ce qui dégage les jonctions intercellulaires pendant que la MMP-9 dégrade la membrane basale. La migration vers le site inflammatoire est modulée par des chimiokines.



**Figure 3: Migration du PMN vers le site inflammatoire.** Dans un premier temps, le PMN (figuré en mauve) va rouler sur la paroi vasculaire (figurée en rose). Dans un second temps, le PMN ralentit et adhère complètement à l'endothélium. Enfin, le PMN s'insère entre les jonctions des cellules endothéliales pour atteindre le site inflammatoire : c'est la diapédèse.

### II.3. Le PMN, phagocyte au rôle majeur dans la PR

Le PMN intervient à différents stades de la PR, à savoir : la destruction cartilagineuse, les érosions osseuses et la synovite chronique. Les PMN sécrètent l'élastase dans le liquide articulaire. *In vitro*, ce phénomène est responsable d'une dégradation du collagène III, IX, X et XI mais pas le collagène II (Gadher *et al.*, 1988). Les PMN semblent également diminuer les constituants de la matrice produits par les FLS.

Le PMN participe également à l'entretien de l'inflammation en produisant des cytokines pro-inflammatoires telles que L'IL-1 $\beta$  (Lindemann *et al.*, 1988) et le TNF $\alpha$  (Djeu *et al.*, 1990).

D'autre part, le PMN est une cellule qui produit massivement des dérivés réactifs de l'oxygène en réponse à une stimulation.

## III. Rôle des ROS dans la PR

La faible demi-vie des ROS (de l'ordre de la milliseconde) et leur haute réactivité rendent difficile la démonstration directe de leur implication dans la physiopathologie de la PR. Cependant de nombreux arguments suggèrent un rôle central des ROS dans l'initiation et l'évolution de cette pathologie (Philips *et al.*, 2010).

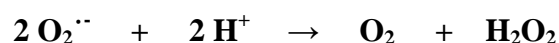
### III.1. Les ROS : formes réactives de l'oxygène

#### III.1.1. La formation des ROS

Les formes réactives de l'oxygène (« Reactive Oxygen Species », ROS) sont des espèces chimiques dérivées de l'oxygène que l'on peut distinguer en deux groupes :

- Les radicaux oxygénés présentant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe : l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, le radical hydroxyle OH<sup>•</sup>, le monoxyde d'azote NO<sup>•</sup> et le radical peroxyde (ROO<sup>•</sup> où R est une chaîne carbonée).
- Les dérivés non radicalaires : le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le peroxynitrite ONOO<sup>-</sup>, l'acide hypochlorique (HOCl), l'ozone O<sub>3</sub> et l'oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

Les ions superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, issus de la réduction monoélectronique de l'oxygène, sont des molécules instables. Ils semblent capables de traverser la membrane plasmique (Mao et Poznansky, 1992), mais leur toxicité directe est limitée du fait de leur dismutation en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:



$\text{H}_2\text{O}_2$  est relativement stable. La toxicité de cette molécule provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle, hautement réactif, en présence de cations métalliques par la réaction de Fenton ou par réaction avec l'anion superoxyde dans la réaction d'Haber-Weiss.

➤ Réaction de Fenton :



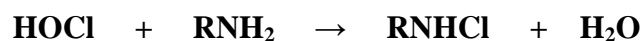
➤ Réaction d'Haber-Weiss:



La myéloperoxydase, contenue dans les granulocytes azurophiles, catalyse également la transformation du peroxyde d'hydrogène en ion hypochlorite ( $\text{ClO}^-$ ), oxydant très puissant au pouvoir bactéricide, en présence d'ion chlorure :



L'acide hypochloreux ( $\text{HOCl}$ ) qui en découle peut réagir avec des amines et former des chloramines dont la toxicité particulièrement élevée résulte de leur durée de vie prolongée :



(où  $R$  est un groupe carboné)

Enfin, l'association de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{OCl}^-$  produit un oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  :



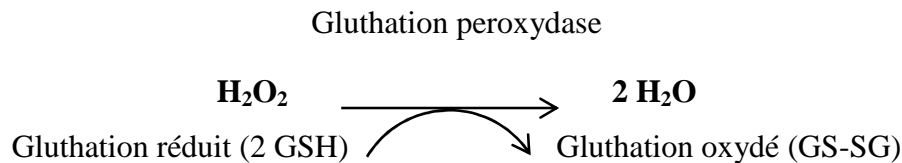
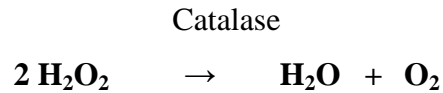
Plusieurs sources génératrices d'anions  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ont été rapportées. La principale reste l'activation de la NADPH oxydase qui est le système majeur de production d'anions  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Elle catalyse la réduction monoélectronique de l'oxygène où le NADPH est le donneur d'électrons selon la réaction suivante :



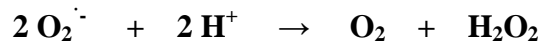
D'autres sources potentielles d'anions  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ont été identifiées : le cytochrome P450, la lipooxygénase, la xanthine oxydoréductase, la gamma glutamyl transférase ainsi que la NO synthase découplée.

### I.1.1. La détoxification des ROS

Au-delà d'un certain seuil, l'exposition aux ROS occasionne des lésions tissulaires. L'organisme possède des systèmes de détoxification qui vont permettre l'élimination d'une part du peroxyde d'hydrogène par la catalase ou la glutathion peroxydase et d'autre part de l'ion  $\text{O}_2^{\cdot-}$  par la superoxyde dismutase (SOD) :



Les SOD catalysent la réaction de dismutation de l'ion  $\text{O}_2^{\cdot -}$  en peroxyde d'hydrogène :



### III.2. Les ROS sont présents dans la PR

Il existe dans la PR une modification de l'équilibre entre les moyens de détoxification des ROS et les systèmes producteurs de ROS, en faveur de ces derniers. Le TNF $\alpha$ , dont la concentration est considérablement augmentée au sein de l'articulation, est un puissant agent pré-activant la NADPH oxydase Nox2 des phagocytes (Dang *et al.*, 2006). Le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (Chenevier-Gobeaux *et al.*, 2006) stimulent l'activité NADPH oxydase des FLS. La présence de ROS dans l'articulation engendrent la dépolymérisation de l'acide hyaluronique (Grootveld *et al.*, 1991) et de la chondroïtine sulfate (Rees *et al.*, 2004). De plus, les ROS participent à l'accélération de l'athérosclérose qui constitue la première cause de mortalité dans la PR (Aviña-Zubieta *et al.*, 2008).

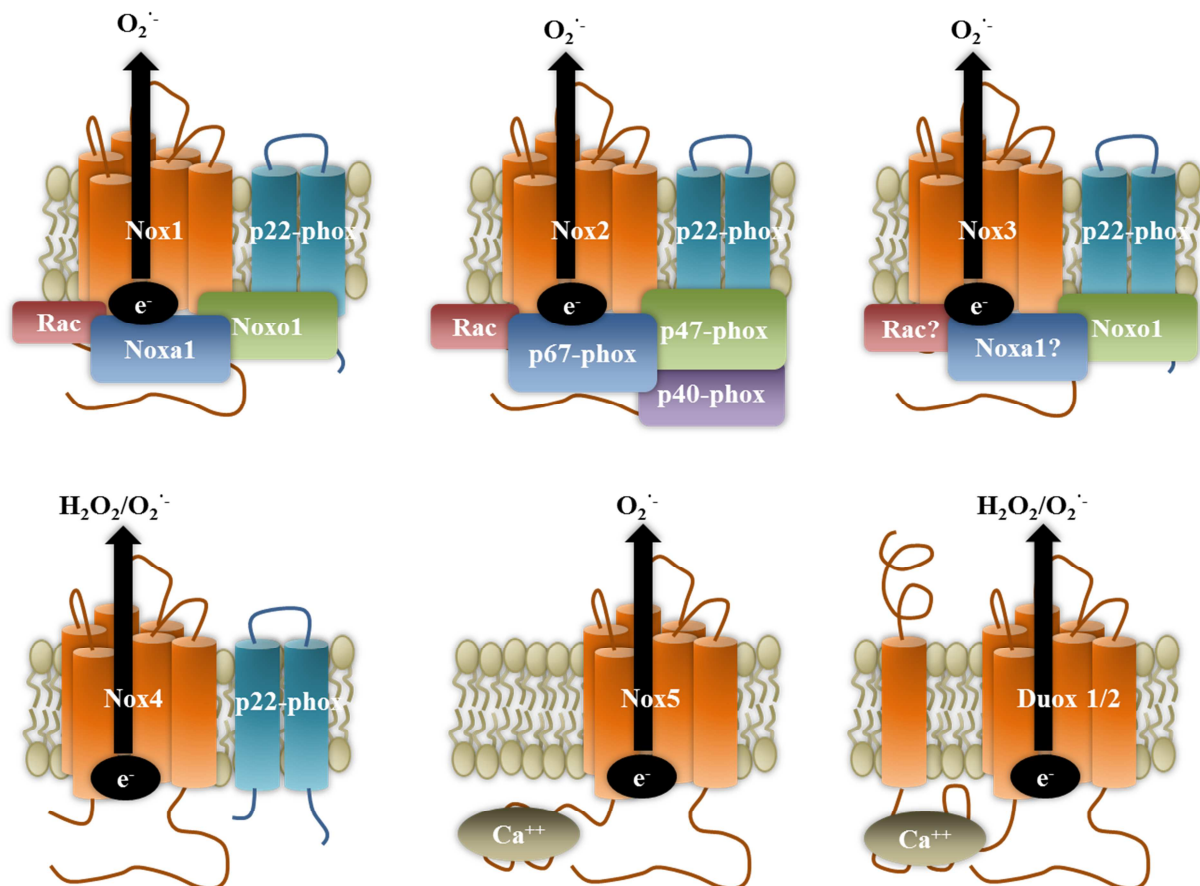
#### III.2.1. La NADPH oxydase phagocytaire dans la PR

La production de ROS par les PMN infiltrant (Cedergren *et al.*, 2007) l'articulation est nettement augmentée. La production massive des cytokines TNF $\alpha$  et IL-8 est à l'origine d'une phosphorylation de p47-phox, participant à un état de pré-stimulation de la NADPH oxydase (El-Benna *et al.*, 2002), couramment dénommé « *priming* », qui conduit à une production de ROS plus rapide et plus intense en réponse à un deuxième stimulus. Plusieurs résultats expérimentaux indiquent que l'augmentation de la production de ROS au sein de l'articulation est un élément majeur à l'origine de la destruction articulaire dans la PR (Merry *et al.*, 1991).

#### III.2.2. La famille des NADPH oxydases

Les NADPH oxydases (Nox) forment une famille d'enzymes membranaires qui catalysent un transfert d'électrons depuis le NADPH vers l'oxygène moléculaire  $\text{O}_2$ . Nox2 est le prototype

des NADPH oxydases (Nox pour NADPH oxydase). Elle est principalement exprimée dans les phagocytes. La famille des NADPH oxydases comprend plusieurs membres, tous homologues de la sous-unité catalytique Nox2 : Nox1 à 5 et Duox1 et 2 (pour « Dual oxydase »). Nox1, Nox2, Nox3 et Nox4 forment un dimère avec une sous-unité stabilisatrice p22-phox (phox pour « phagocyte oxydase »).



**Figure 4: La famille des NADPH oxydases.** Malgré leur structure et leur fonction similaires, les membres de la famille des NADPH oxydases diffèrent dans leur mode d'activation. Nox1 nécessite la présence de p22-phox, Noxa1, Noxo1 et Rac. Nox2 requiert la présence de p22-phox, p47-phox, p67-phox, p40-phox et Rac. Nox3 quant à lui nécessite l'association de Noxo1 et peut être de Noxa1 et Rac. Nox4 est uniquement associé à p22-phox mais ne nécessite pas la présence de facteurs cytosoliques. Enfin, Nox5 et les Duox ne sont associés à aucun partenaire et sont activés par le calcium intracellulaire. (D'après Bedard *et al.*, 2007).

Nox2 est activée par des facteurs cytosoliques régulateurs, p47-phox, p67-phox, p40-phox et Rac. Nox1 a été la première isoenzyme de Nox2 caractérisée (Suh *et al.*, 1999). L'activité de Nox1 (présente dans l'épithélium du côlon, les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules endothéliales, l'utérus, la prostate et les ostéoclastes) est modulable par des facteurs cytosoliques Noxo1 et Noxa1 homologues respectifs de p47-phox et de p67-phox. L'activité de Nox3 est également stimulable par Noxo1 (Banfi *et al.*, 2004). L'expression de cette isoenzyme est restreinte à l'oreille interne. Nox4 présente une activité constitutive (Grange *et*

*al.*, 2006). Toutefois, des travaux récents montrent que la protéine poldip2 (Polymerase Delta Interacting Protein-2) interagit avec p22-phox (Lyle *et al.*, 2009) dans les cellules musculaires lisses, augmentant ainsi l'activité de Nox4. Nox5, Duox1 et Duox2 sont activées par le calcium (Banfi *et al.*, 2001 ; Kawahara *et al.*, 2005).

## IV. La NADPH oxydase phagocytaire

La NADPH oxydase phagocytaire est un complexe enzymatique multimérique constitué de protéines transmembranaires, Nox2 (gp91-phox) et p22-phox, qui forment le cytochrome  $b_{558}$ , et de protéines cytosoliques p40-phox, p47-phox, p67-phox et Rac2. Son activation dépend de l'assemblage des facteurs cytosoliques sur le cytochrome  $b_{558}$  membranaire ce qui induit le transfert d'électrons et la production d'ions superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ .

### IV.1. La granulomatose sceptique chronique, modèle d'étude de la NADPH oxydase des phagocytes

Un défaut de fonctionnement de la NADPH oxydase se traduit par une maladie grave, la granulomatose septique chronique (CGD, « Chronic Granulomatous Disease »). C'est une immunodéficience primaire d'origine génétique, affectant 1/200000 personnes (Alvarez-Cardona *et al.*, 2009). Elle est caractérisée par un déficit de bactéricidie des phagocytes entraînant des infections itératives fongiques et bactériennes graves. La forme la plus fréquente concerne la CGD à transmission liée à l'X (~65 % des cas de CGD). Dans ce cas, le cytochrome  $b_{558}$  est le plus souvent indétectable (Segal, 1987), on parle de CGD  $X^0$ . Mais le cytochrome  $b_{558}$  peut être présent en quantité réduite lors d'une CGD  $X^-$  (Stasia *et al.*, 2003) ou en proportion normale mais sous une forme non-fonctionnelle dans le cas de la CGD  $X^+$  (Cross *et al.*, 1995).

Les formes autosomales récessives touchant le gène codant pour p47-phox représentent près de 25% des CGD alors que celles affectant l'expression de p22-phox et p67-phox comptent chacune moins de 5 % de la population atteinte (Cross *et al.*, 2000). Un seul cas de CGD lié à une mutation du gène codant pour p40-phox a été reporté (Matute *et al.*, 2009).



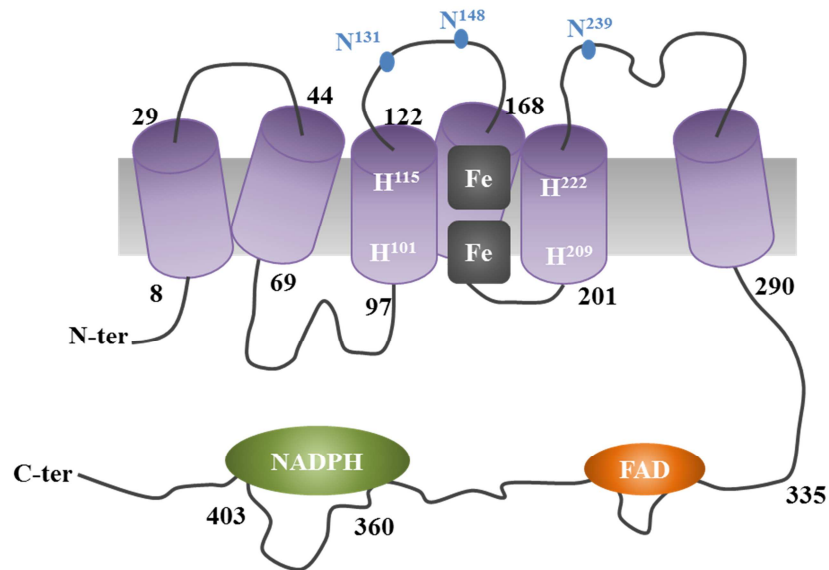
## IV.2. Le cytochrome $b_{558}$ , centre catalytique membranaire de la NADPH oxydase

Le cytochrome  $b_{558}$ , cœur catalytique de la NADPH oxydase des phagocytes, doit son nom à son spectre d'absorption rédox comprenant une bande  $\alpha$  à 558 nm. C'est un hétérocomplexe formé de Nox2 (gp91-phox) et p22-phox, assemblés selon une stoechiométrie 1 : 1 (Wallach et Segal, 1996), qui porte deux hèmes.

### IV.2.1. Nox2, cœur catalytique du cytochrome $b_{558}$

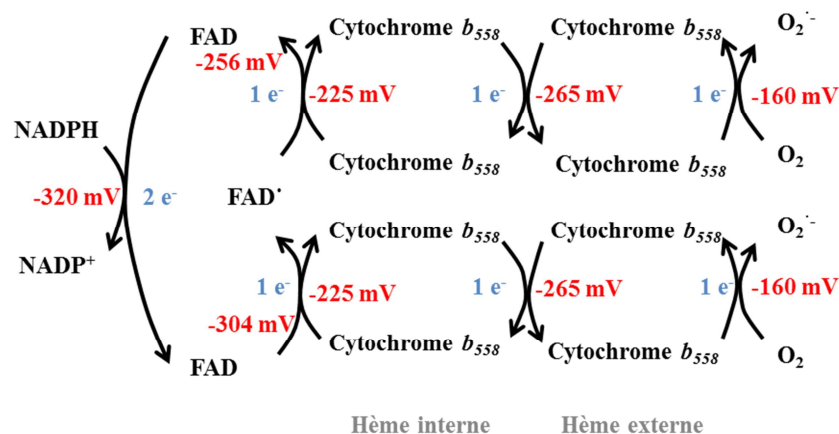
Nox2 est une protéine de 570 acides aminés codée par le gène CYBB (chromosome Xp21.1) qui contient 13 exons (Royer-Pokora *et al.*, 1986). Le transcrit de 5 kb est traduit en une protéine de 65 kDa (gp65) au niveau du réticulum endoplasmique (Porter *et al.*, 1996). Cette protéine sera massivement glycosylée sur 3 asparagines (Asn<sup>131</sup>, Asn<sup>148</sup>, Asn<sup>239</sup>) dans l'appareil de Golgi (Yu *et al.*, 1999). La masse apparente de 91 kDa, déterminée après migration électrophorétique, a donné son nom à la protéine mature. Une analyse du profil d'hydrophobicité de la séquence peptidique couplée à la caractérisation d'épitopes reconnus par des anticorps monoclonaux spécifiques de Nox2 a été réalisée (Lambeth, 2002). Elle a permis de prédire 6 passages transmembranaires et une queue cytosolique supportant les différents sites nécessaires au transfert d'électron depuis son substrat le NADPH jusqu'à l'oxygène (Figure 5). L'homologie de séquence avec des ferrédoxines NADP réductases indique 2 sites putatifs de liaison au FAD sur la queue cytosolique de Nox2 : <sup>338</sup>HPFTLSA<sup>342</sup> et <sup>354</sup>IRIVGD<sup>359</sup> (Taylor *et al.*, 1993). Des expériences de mutagénèse dirigée attestent que l'His<sup>338</sup> joue un rôle capital dans la liaison du FAD au cytochrome  $b_{558}$  (Yoshida *et al.*, 1998). Il existe 4 sites potentiels de fixation du NADPH sur la partie C-terminale de Nox2 localisés dans la partie cytosolique C-terminale (405-538) (Rosengren *et al.*, 2010).

L'incubation de cellules PLB-985 différenciées en granulocytes en présence d'inhibiteur de la synthèse de l'hème, la succinyl acétone, montre que l'incorporation de deux hèmes, au sein du noyau protoporphyrine, est indispensable à la stabilisation de Nox2 et à la formation de l'hétérodimère Nox2/p22-phox (Yu *et al.*, 1997). Quatre résidus histidines, situés sur le troisième (His<sup>101</sup> et His<sup>115</sup>) et le cinquième passage transmembranaire (His<sup>209</sup> et His<sup>222</sup>) de Nox2, coordonnent les hèmes.



**Figure 5 : Les différents sites de Nox2 impliqués dans le transfert d'électrons.** Nox2 est une protéine transmembranaire comprenant une partie C-terminale et N-terminale cytosoliques séparées par 6 hélices  $\alpha$ . Les domaines de liaison au NADPH et au FAD sont figurés ainsi que les 4 histidines des 3<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> passages transmembranaires permettant la coordination des deux hèmes, de potentiel redox différent, contenant un atome de fer. Trois asparagines glycosylées sont figurées sur les 2<sup>ème</sup> (N<sup>131</sup> et N<sup>148</sup>) et 3<sup>ème</sup> (N<sup>239</sup>) boucles extracellulaires (Paclat *et al.*, 2004 ; El-Benna *et al.*, 2010).

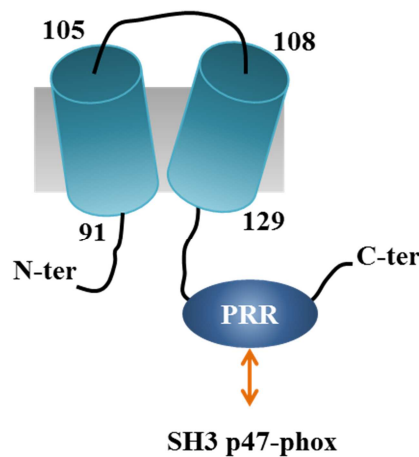
Plusieurs étapes sont nécessaires au transfert des deux électrons du NADPH vers l'oxygène pour former les anions  $O_2^{\cdot-}$ . La première phase consiste en un transfert de deux électrons du NADPH vers le FAD. Un premier électron est délivré par le FADH<sub>2</sub> vers l'hème de plus bas potentiel redox qui le transfère ensuite au deuxième hème. L'hème externe permet la production d'une première molécule d'anion  $O_2^{\cdot-}$  par réduction mono-électronique de dioxygène (Figure 6). Puis un autre électron du FAD est transféré à une autre molécule d'oxygène *via* le premier puis le deuxième hème (Cross et Segal, 2004). D'après le potentiel redox des deux hèmes, le transfert d'électrons de l'hème interne vers l'hème externe est défavorable (Figure 6).



**Figure 6 : Le processus de transport électronique du cytochrome  $b_{558}$ .** Les potentiels redox sont indiqués en rouge. (Cross et Segal, 2004).

## IV.2.2. p22-phox, partenaire de Nox2

L'analyse du génotype de patients atteints de CGD autosomale récessive a permis de caractériser le gène CYBA, formé de 6 exons, codant pour p22-phox. Il est situé sur le bras long du chromosome 16 (16q24). La protéine p22-phox contient 195 acides aminés (Figure 7). p22-phox est essentielle à la maturation et à la stabilité de Nox2 ainsi qu'à l'activation de l'oxydase. D'après l'analyse du profil d'hydrophobicité de la séquence primaire de p22-phox et l'étude des épitopes reconnus par des anticorps monoclonaux spécifiques de p22-phox, cette protéine contiendrait deux passages transmembranaires et une région cytosolique riche en proline du côté C-terminal au niveau de laquelle se fixe la région SH3 (« Src Homology domain 3 ») de p47-phox.



**Figure 7: Les domaines fonctionnels de p22-phox.** PRR = "Prolin rich region"; SH3 = "Src Homology domain 3". (El-Benna *et al.*, 2010).

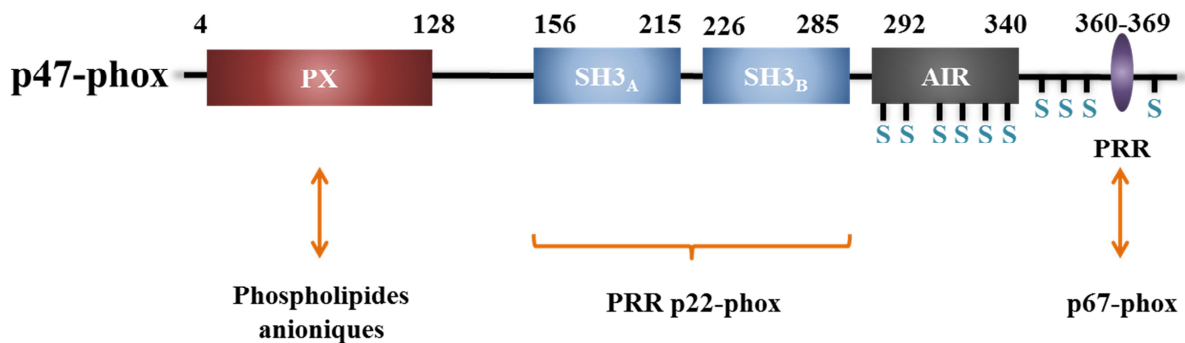
## IV.3. Les facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase

### IV.3.1. p47-phox, adaptateur du complexe NADPH oxydase

p47-phox est une protéine codée par le gène NCF1 situé sur le bras long du chromosome 7 au locus 7q11.23 (Lomax *et al.*, 1989). Elle contient 390 acides aminés. Son rôle est d'orchestrer la translocation des facteurs cytosoliques sur le cytochrome  $b_{558}$  membranaire au cours de l'activation de l'enzyme (Heyworth *et al.*, 1991). p47-phox possède quatre domaines fonctionnels importants (Groemping et Rittinger, 2005) (Figure 8) :

- Deux domaines SH3 (résidus 156-215 et 226-285) impliqués dans les interactions avec p67-phox et p22-phox (Sumimoto *et al.*, 1994).
- Une région riche en proline PRR (acides aminés 360-369).

- Un domaine auto-inhibiteur (AIR, « Auto-Inhibitory Region » : acides aminés 292-340) qui, en l'absence de stimulation, maintient la protéine p47-phox en conformation repliée grâce à des interactions intramoléculaires avec le tandem de domaines SH3 (acides aminés 156-285) (Yuzawa *et al.*, 2004).
- Un domaine PX (« Phox Homology ») qui permet l'ancrage de p47-phox à la membrane plasmique par l'interaction avec les phosphoinositides membranaires (Kanai *et al.*, 2001).



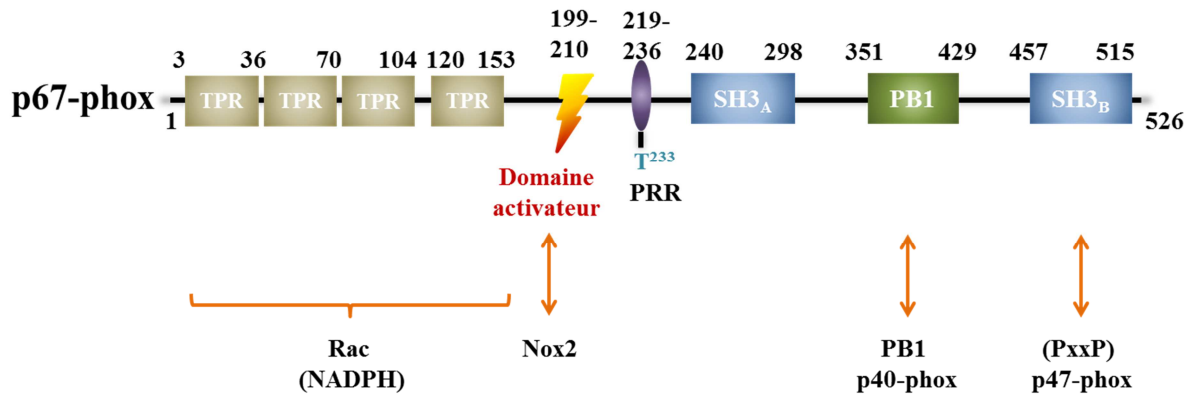
**Figure 8: p47-phox, adaptateur de l'assemblage de la NADPH oxydase.** Domaines structuraux de p47-phox: PX= « Phox Homology », AIR= « Auto-Inhibitory Region », PRR= « Prolin Rich Region », SH3= « Src Homology domain 3 ». Les sérines phosphorylables de la région C-terminale sont figurées. (Groemping et Rittinger, 2005).

#### IV.3.2. p67-phox, activateur du cytochrome $b_{558}$

La séquence primaire de p67-phox est composée de 526 acides aminés. Le gène NCF2 de 16 exons, codant pour cette protéine, est localisé sur le bras court du chromosome 1 (1q25) (Francke *et al.*, 1990). p67-phox possède plusieurs domaines (Figure 9) :

- Quatre motifs TPR (« Tetratricopeptide Repeat ») du côté N-terminal qui confèrent à la protéine une structure compacte (Koga *et al.*, 1999) et permettent l'interaction avec Rac selon une stoechiométrie 1 : 1 (Lapouge *et al.*, 2000)
- Un domaine activateur indispensable à l'initiation du transfert d'électron (Han *et al.*, 1998) est inclus entre les résidus 199 et 210.
- Un motif riche en proline PRR qui porte le résidu Thr<sup>233</sup> phosphorylable et qui permet la liaison du domaine SH3 de p47-phox.
- Deux motifs SH3, au niveau des résidus 242-299 et 457-516 (Durand *et al.*, 2010) impliqués dans la translocation de p67-phox *via* l'interaction avec le domaine PRR de p47-phox.
- Un domaine PB1 (« Phox and Bem1 ») qui engage des liaisons électrostatiques avec p40-phox (Ito *et al.*, 2001 ; Nakamura *et al.*, 1998).

Enfin, des études suggèrent l'existence de sites de fixation du NADPH sur p67-phox (Dang *et al.*, 2000).

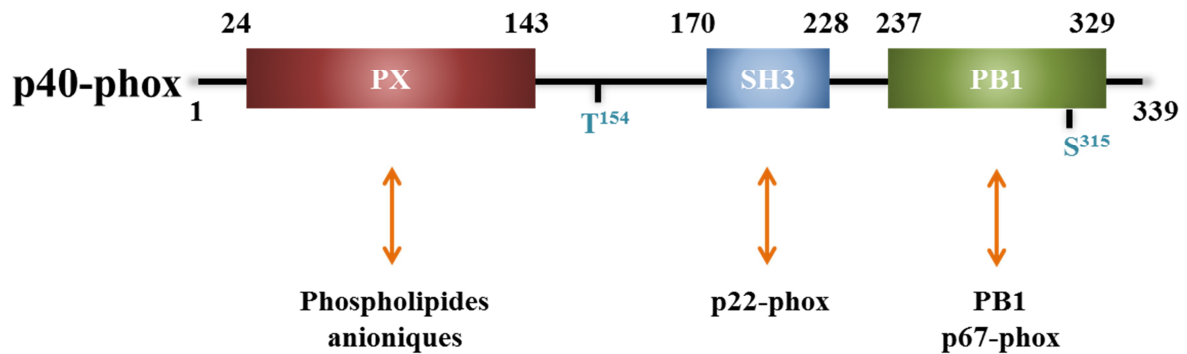


**Figure 9: p67-phox, activateur de la NADPH oxydase.** Domaines structuraux de p67-phox. PB1= « Phox and Bem1 », PRR= « Proline Rich Region », TPR= « Tetratricopeptide Repeat », SH3= « Src Homology domain 3 », la Thr<sup>233</sup> est figurée au niveau du site PRR. (Groemping et Rittinger, 2005).

### IV.3.3. p40-phox, partenaire d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire

La protéine p40-phox est composée de 339 acides aminés. Le gène de 10 exons codant pour cette protéine est localisé sur le bras long du chromosome 22 au locus 22q13.1. Elle possède trois domaines intervenant dans l'interaction avec les autres protéines de l'oxydase des phagocytes (Figure 10) :

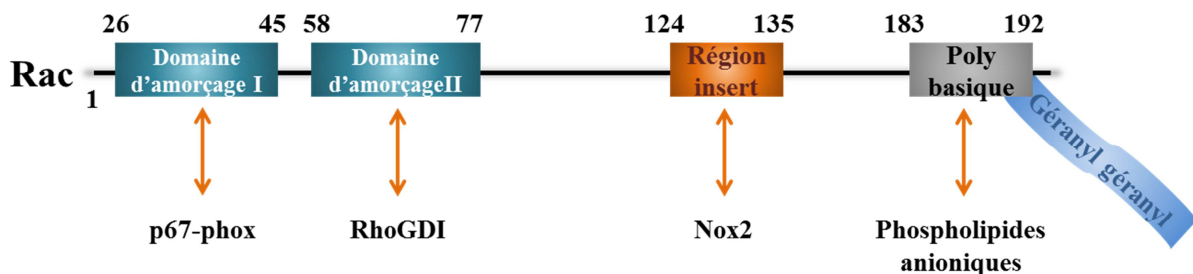
- Un domaine PB1 (acides aminés 237-329) susceptible de lier les régions SH3 de p67-phox (Nakamura *et al.*, 1998).
- Un domaine PX C-terminal (acides aminés 24-143) liant spécifiquement le phosphatidyinositol-3-phosphate membranaire (Zhan *et al.*, 1996).
- Un domaine SH3 (acides aminés 228-237) susceptible de lier le domaine PRR de p22-phox (Tamura *et al.*, 2007).



**Figure 10: p40-phox, partenaire d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire.** Domaines structuraux de p40-phox : PX= « Phox Homology », PB1= « Phox and Bem1 », PRR= « Proline Rich Region » ; SH3= « Src Homology domain 3 ». Les sites de phosphorylation Thr<sup>154</sup> et Ser<sup>315</sup> sont figurés. (Groemping and Rittinger, 2005).

#### IV.3.4. La protéine G monomérique Rac

Les protéines Rac sont des petites protéines G monomériques à activité GTPase. Les trois isoenzymes Rac1, Rac2 et Rac3 appartiennent à la sous-famille Rho des protéines Ras. L'expression de Rac1 est ubiquitaire alors que celle de Rac2 est restreinte à la lignée myéloïde. Dans le neutrophile humain, c'est Rac2 dont le locus est situé sur le chromosome 22 (22q13.1) qui est la forme prédominante permettant d'activer la NADPH oxydase (Knaus *et al.*, 1991). Du côté N-terminal, il existe deux domaines d'amorçage dont la conformation dépend de la liaison au GDP ou au GTP. L'association de Rac avec la protéine cytosolique RhoGDI (« Rho GDP dissociation inhibitor ») permet le maintien de Rac2 sous une forme inactive liée au GDP. Après la dissociation de RhoGDI (Geiszt *et al.*, 2001), Rac2 peut lier et hydrolyser le GTP. Le changement de conformation qui s'ensuit permet à Rac de lier p67-phox (Nisimoto *et al.*, 1997). Le domaine impliqué dans l'interaction avec Nox2 est compris entre les résidus 124 et 135. Le domaine C-terminal polybasique possède une queue géranyl géranyl permettant d'ancrer Rac à la membrane plasmique (Figure 11).



**Figure 11: La protéine G monomérique Rac.** Domaines structuraux de Rac. Deux domaines d'amorçage I et II qui se lient respectivement à p67-phox et RhoGDI. Une région d'insert qui se lie à Nox2. Une partie polybasique en C-terminal permettant de fixer les phospholipides anioniques de la membrane plasmique.

## V. Activation de la NADPH oxydase des phagocytes

De nombreux mécanismes contrôlent l'initiation, l'entretien et la terminaison de l'explosion oxydative. En effet, la production de ROS par les PMN est un processus qui nécessite une régulation très stricte. Tous les partenaires du complexe de la NADPH oxydase doivent s'assembler pour que le cytochrome  $b_{558}$  adopte la conformation active obligatoire pour que la production de ROS soit optimale. L'activité de l'enzyme peut différer en fonction de la compartimentation subcellulaire et de la répartition en microdomaines lipidiques (Shao *et al.*, 2003 ; Vilhardt et van Deurs, 2004).

En particulier, le flux calcique et l'acide arachidonique contribuent à l'assemblage et l'activation du complexe.

### V.1. Rôle du flux calcique dans l'activation de Nox2

La stimulation des PMN par le fMLP induit un influx de calcium (Heyworth et Badwey, 1990). Ce phénomène est appelé « entrée capacitative » ou SOCE (« Store-Operated Calcium Entry »). Si le calcium extracellulaire est chélaté, la production d'anion  $O_2^{\cdot -}$  par le PMN stimulé par le fMLP est diminuée. Dans les cellules HL-60, les membres des « Transient Receptor Potential Canonical » (TRPC) et Orai1 sont impliqués dans la formation de deux types de canaux à calcium (Brécharde *et al.*, 2008). TRPC1, TRPC6 et Orai1 contribuent à la formation des SOCE, tandis que TRPC3 constitue lui-même un canal à calcium. L'entrée du calcium extracellulaire, médiée par ces canaux, est primordiale pour l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire.

Suite à l'influx calcique, plusieurs médiateurs concourent à l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire. Dans la lignée myéloïde HL-60, une stimulation par le fMLP permet le recrutement de la PKC $\beta$ , qui phosphoryle p47-phox et favorise la translocation des facteurs cytosoliques.

### V.2. Rôle de l'acide arachidonique

L'augmentation de calcium intracellulaire conduit également à l'activation de la phospholipase  $A_2$  cytosolique (PLA $_2$ ) qui transloque alors à la membrane où elle hydrolyse des phospholipides libérant ainsi de l'acide arachidonique (AA). Il a été montré que la déplétion en PLA $_2$  cytosolique des cellules PLB985 différenciées en pseudo-neutrophiles se traduisait par une diminution de l'activité NADPH oxydase *in vivo* (Dana *et al.*, 1998). *In vitro*, l'AA augmente également l'activité NADPH oxydase des phagocytes (Doussiere *et al.*,

1999). Plusieurs mécanismes sont avancés pour expliquer la stimulation de l'activité NADPH oxydase par l'AA. En se liant au cytochrome  $b_{558}$ , l'AA peut induire un changement conformationnel de l'hémoprotéine qui déclenche l'activation de la NADPH oxydase (Foubert *et al.*, 2002). Sur le plan moléculaire, l'AA induit un changement de spin du cytochrome  $b_{558}$  ce qui augmente son affinité pour l'oxygène moléculaire (Doussière *et al.*, 1996). De plus, cet agent amphiphile peut entraîner la rupture des liaisons intramoléculaires auto-inhibitrices de p47-phox facilitant l'interaction avec p22-phox (Shiose et Sumimoto, 2000). En outre, la production de l'AA par la PLA<sub>2</sub> cytosolique et son transport par les protéines S100A8/A9 conduit à l'activation de la NADPH oxydase des phagocytes par un mécanisme régulé par le calcium (Bouzidi et Doussiere, 2004).

### **V.3. Les kinases impliquées dans l'activation**

L'assemblage et l'activation du complexe de la NADPH oxydase phagocytaire sont liés à des événements de phosphorylations qui affectent principalement les facteurs cytosoliques, en particulier p47-phox mais aussi Nox2 et p22-phox.

#### **V.3.1. Les protéines kinases C (PKC)**

La famille des PKC regroupe au total 10 sérines/thréonines kinases. Elles sont divisées en trois sous-groupes :

- les PKC classiques (isoenzymes  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$ ) nécessitent du calcium, du diacylglycérol produit par la phospholipase C et un phospholipide membranaire tel que la phosphatidylsérine pour leur activation.
- les nouvelles PKC (isoenzymes  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  et  $\theta$ ) n'ont pas besoin du calcium pour être activées.
- les PKC atypiques (isoenzymes  $M\zeta$ ,  $\iota$  et  $\lambda$ ) n'ont besoin ni de calcium ni de diacylglycérol.

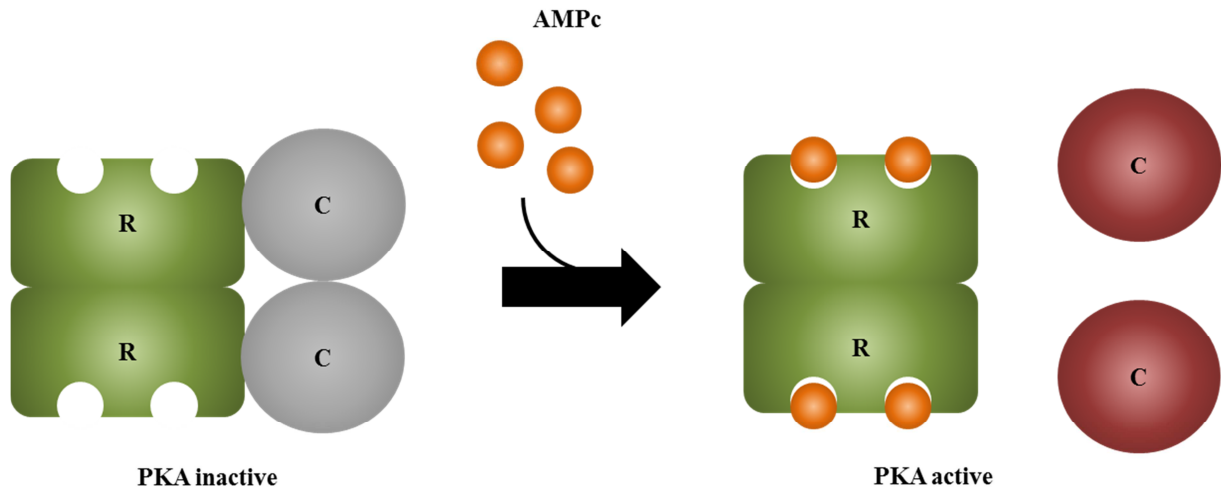
Dans les PMN, les trois classes de PKC sont représentées avec une majorité pour la PKC $\beta$  (Dekker *et al.*, 2000). Le PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate) est un puissant activateur des PKC classiques (Castagna *et al.*, 1982). Il mime le diacylglycérol. La PKC $\beta$  est impliquée dans la phosphorylation de p47-phox (Reeves *et al.*, 1999).

#### **V.3.2. La protéine kinase A (PKA)**

La PKA est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités régulatrices qui maintiennent deux sous-unités catalytiques. C'est une sérine/thréonine kinase qui est activée par l'AMP



cyclique (AMPC) qui va, en se fixant sur chacune des sous-unités régulatrices, dissocier l'enzyme. Ce phénomène va lever l'effet auto-inhibiteur des sous-unités régulatrices pour libérer les deux sous-unités catalytiques (Figure 12). La PKA ainsi activée va phosphoryler des protéines cibles au niveau de résidus sérine et thréonine (Dell'Acqua et Scott, 1997).



**Figure 12: Représentation schématique de l'activation de la PKA par l'AMPC.** Les sites de fixation de l'AMPC sont situés sur les sous-unités régulatrices (R) de la PKA. Une fois que l'AMPC est fixé, les deux sous-unités catalytiques (C) sont libérées : c'est l'activation de la PKA.

Cette protéine-kinase participe à la régulation du métabolisme du glucose *via* la phosphorylation de la 6-phosphofructo-kinase-2 (PFK-2) qui est un excellent substrat de la PKA *in vitro* dans les cardiomyocytes de bœuf (Deprez *et al.*, 1997 ; Rider, Vandamme, *et al.*, 1992 ; Kitamura *et al.*, 1988). Dans ces cellules, les phosphorylations de la PFK-2 par la PKA sont situées sur les résidus sérines S<sup>466</sup> et S<sup>483</sup>. Celles-ci sont primordiales pour l'activité kinase de la PFK-2 (Rider, van Damme, *et al.*, 1992). Chez la levure, l'activité de la PFK-2, phosphorylée par la PKA, est multipliée par cinq (Dihazi *et al.*, 2003). La PKA peut phosphoryler p47-phox (Kramer *et al.*, 1988) sur les résidus Ser<sup>320</sup> et un ou plusieurs autres résidus sérines (328, 359 et 370) (El Benna, Faust, *et al.*, 1996).

### V.3.3. Les MAP kinases (« Mitogen Activated Protein kinase »)

Les MAP-kinases sont des sérine/thréonine kinases qui sont activées par une MAP-kinase kinase (MEK), elle-même phosphorylée par une MAP-kinase kinase kinase (MEKK). Cette famille regroupe les ERK1/2 et les p38-MAPK impliquées dans l'activation de la NADPH oxydase (El Benna, Han, *et al.*, 1996) et les JNK (Jun N-terminal Kinase) MAP kinase.

### V.3.4. Les phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)

Les PI3-kinases sont des hétérodimères comprenant une sous-unité régulatrice et une sous-unité catalytique. Leur rôle consiste à transférer un groupement phosphate de l'ATP sur le carbone 3' de l'inositol des phosphatidylinositols membranaires. Ces protéines kinases catalysent ainsi la formation du phosphatidylinositol-3-phosphate, du phosphatidylinositol-3,5-diphosphate et du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. Ces trois composés sont des messagers secondaires essentiels à l'activation de la NADPH oxydase (Brown *et al.*, 2003).

### V.3.5. Les protéines-kinases B / Akt (PKB)

PKB/Akt est une famille de sérine/thréonine kinases. Son nom lui a été donné par ressemblance avec l'oncogène viral « Akt-8 ». Akt1 est impliquée dans la signalisation anti-apoptotique et dans la croissance tissulaire. Akt2 est une molécule majeure de la voie de signalisation de l'insuline. *In vitro*, Akt peut phosphoryler les résidus Ser<sup>466</sup> et Ser<sup>485</sup> de la PFK-2 (Deprez *et al.*, 1997). L'inhibition de l'activité d'Akt a un impact sur la production de ROS par la NADPH oxydase des neutrophiles humains en réponse au fMLP (Chen *et al.*, 2006).

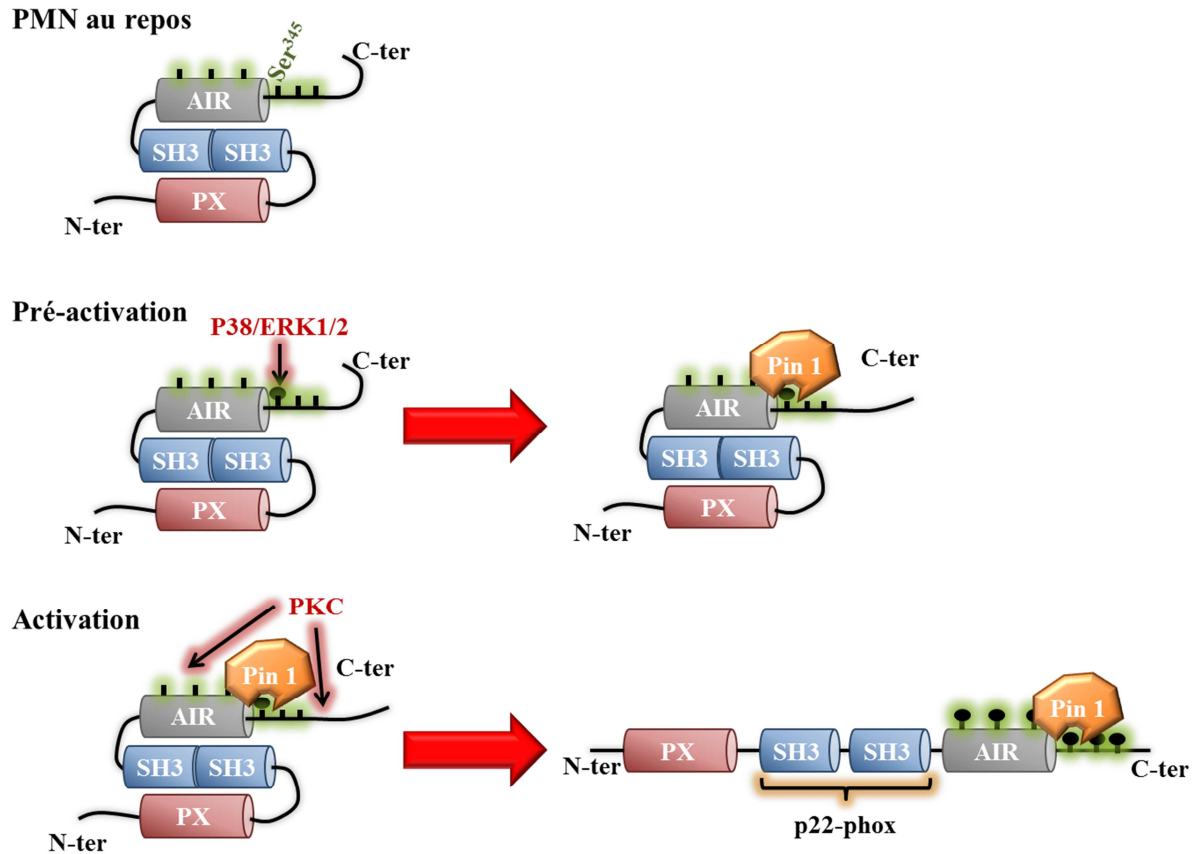
## V.4. Phosphorylations des sous-unités de la NADPH oxydase

### V.4.1. Phosphorylation du cytochrome *b*<sub>558</sub>

L'ensemble des modifications post-traductionnelles de Nox2 et p22-phox sont à l'interface de l'interaction avec les facteurs cytosoliques et l'activation de la NADPH oxydase. p22-phox est phosphorylée sur le résidu Thr<sup>147</sup> (Garcia et Segal, 1988) et est vraisemblablement impliquée dans l'ancrage de p47-phox à la membrane (Lewis *et al.*, 2009). Nox2 est phosphorylée sur sa partie C-terminale par la PKC ce qui favorise les interactions avec p47-phox, p67-phox et Rac2 (Raad *et al.*, 2008).

### V.4.2. Phosphorylation de p47-phox

Quand les PMN sont activés, p47-phox est phosphorylée sur une dizaine de sérines localisées sur la partie C-terminale de la protéine (Faust *et al.*, 1995). p47-phox est le substrat de plusieurs protéines-kinases : la PKC (Fontayne *et al.*, 2002), la p38 MAPK, ERK1/2 MAPK (Dang *et al.*, 2006) et Akt (Didichenko *et al.*, 1996). Ces phosphorylations ont lieu à des instants très précis lors de la pré-activation et l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire (Figure 13).



**Figure 13: Phosphorylation de p47-phox lors de la pré-activation et l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire.** Lorsque les PMN sont incubés avec des faibles concentrations de cytokines comme le TNF $\alpha$  (Elbim *et al.*, 1994), la NADPH oxydase Nox2 est pré-activée. Ce processus potentialise la formation de ROS en réponse à une seconde stimulation. La phosphorylation partielle de p47-phox est un évènement important dans ce mécanisme. Au cours de la pré-activation, la proline isomérase Pin 1 interagit avec la Ser<sup>345</sup> de p47-phox, phosphorylée par les p38 ou ERK1/2 MAP kinases. Cela induit un changement de conformation qui favorise la phosphorylation ultérieure par la PKC lors de l'activation (Boussetta *et al.*, 2010).

#### V.4.3. Phosphorylation de p67-phox

Même si p67-phox est phosphorylée au cours de l'activation des PMN (El Benna *et al.*, 1997), le rôle de ces phosphorylations n'est pas encore tout à fait défini. Tout comme p47-phox, p67-phox adopte vraisemblablement une conformation auto-inhibée au repos qui se relâche lors de l'activation (Durand *et al.*, 2010). La Thr<sup>233</sup> est le site principal de phosphorylation par les MAPK. Plusieurs kinases sont potentiellement impliquées : *in vitro* par la PAK (« P21 Activated Kinase », (Ahmed *et al.*, 1998)) et *in vivo* par certaines MAPK : p38 MAPK et ERK1/2 MAPK.

#### **V.4.4. Phosphorylation de p40-phox**

p40-phox est le substrat de certaines kinases de la famille des PKC (Lopes *et al.*, 2004). Les phosphorylations de la Thr<sup>154</sup> et de la Ser<sup>315</sup> sur l'activation de la NADPH oxydase sont encore contradictoires (Chessa *et al.*, 2010).

#### **V.4.5. Activation de Rac par phosphorylation de RhoGDI**

La protéine RhoGDI est phosphorylable sur les résidus Ser<sup>101</sup> et Ser<sup>174</sup> par différents types de kinases. Il s'ensuit une dissociation de RhoGDI et de Rac. Cette dernière peut alors fixer et hydrolyser le GTP avant d'être transféré à la membrane plasmique (DerMardirossian *et al.*, 2004).

### **V.5. Mode de régulation de l'activité NADPH oxydase**

#### **V.5.1. Régulation par phosphorylation**

Dans les PMN humains, Nox2 est phosphorylée. *In vitro*, la phosphorylation de la partie C-terminale de Nox2, médiée par la PKC augmente l'activité diaphorase, c'est à dire le transfert d'électron entre le NADPH et le FAD (Raad *et al.*, 2008). La phosphorylation de p22-phox est également assurée par la PKC (Regier *et al.*, 2000). Elle se traduit par une augmentation de l'activité NADPH oxydase *via* des mécanismes dépendant et indépendant de la phospholipase D qui hydrolyse les phospholipides membranaires en acide phosphatidique.

#### **V.5.2. Régulation par allostérie**

La cinétique enzymatique de la NADPH oxydase n'est pas michaelienne. La liaison de p67-phox sur le cytochrome *b*<sub>558</sub> engendre une modification conformationnelle de l'hémoprotéine (Palet *et al.*, 2000) nécessaire au transfert d'électron. La structure oligomérique, requise pour considérer l'existence d'une régulation allostérique, est suggérée par homologie avec la structure oligomérique déterminée récemment pour l'isoenzyme Nox5 de la NADPH oxydase (Kawahara *et al.*, 2011).

#### **V.5.3. S100A8/S100A9, partenaires d'activation de Nox2**

Les protéines S100 sont des protéines solubles dans une solution de sulfate d'ammonium à 100 % de saturation. Cette famille de protéines regroupe 21 membres (Ravasi *et al.*, 2004) qui ont en commun deux sites EF-hand leur permettant de fixer deux molécules de calcium. Les

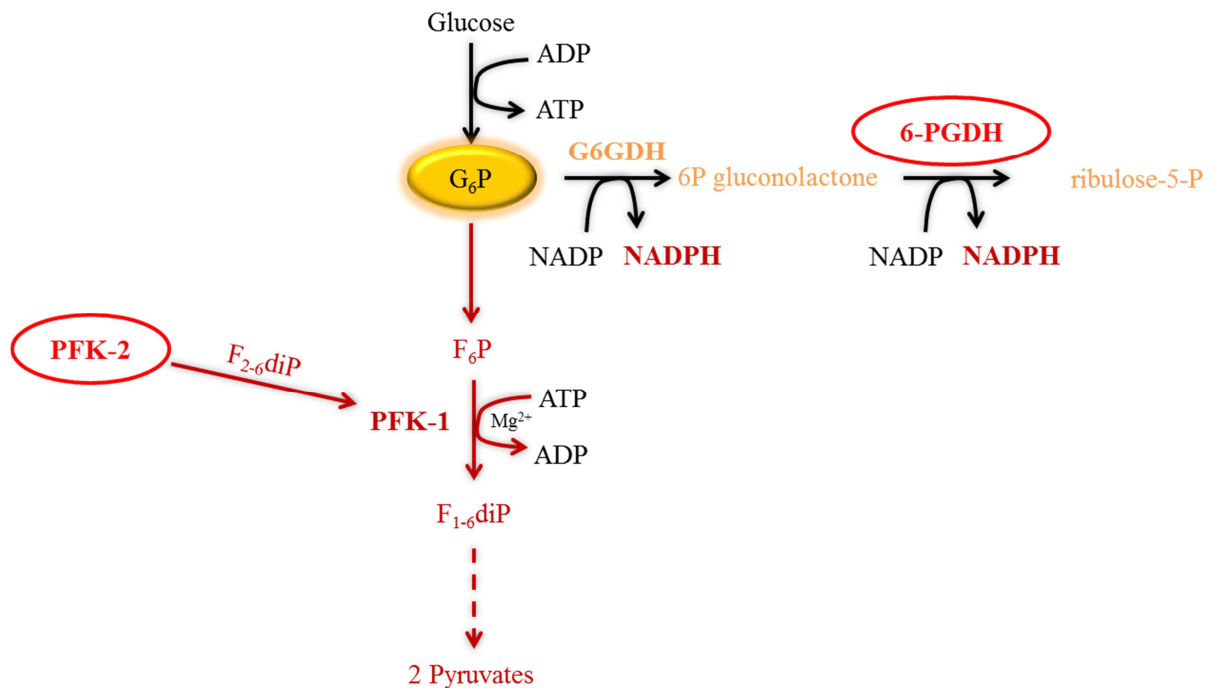
protéines S100A8 (Calgranuline A ou MRP8, pour « Myeloid Related Protein ») et S100A9 (Calgranuline B ou MRP14) peuvent également lier une molécule de zinc avec une forte affinité (Donato, 1999) sur un site en C-terminal His-X-X-X-His différent du site de fixation du calcium. Les protéines S100A8 (93 acides aminés, 10880 Da) et S100A9 (114 acides aminés, 13800 Da) représentent ~40 % des protéines cytosoliques du PMN (Morel *et al.*, 1994). La protéine S100A12 (92 acides aminés, 10400 Da) est également exprimée dans le PMN et représente environ 5 % du contenu protéique cytosolique de cette cellule. S100A8 et S100A9 sont plus fréquemment retrouvées sous la forme d'un hétérodimère (Hunter et Chazin, 1998). Les protéines S100A8/A9 sont impliquées dans la régulation de l'activité NADPH oxydase des phagocytes (Doussiere *et al.*, 1999 ; Berthier *et al.*, 2003). Quand la concentration calcium augmente, les protéines S100A8/A9 transportent l'AA (Sopalla *et al.*, 2002). Lors de la translocation de l'hétérodimère à la membrane, l'AA peut changer la conformation du cytochrome  $b_{558}$  (Doussiere *et al.*, 1999) et le rendre pleinement actif. De plus, S100A8/A9 augmente l'affinité du cytochrome  $b_{558}$  pour p67-phox de façon synergique avec p47-phox (Berthier *et al.*, 2003). Des liens entre S100A8 et p67-phox ont été démontrés (Kerkhoff *et al.*, 2005).

#### V.5.4. La disponibilité du substrat

Le  $K_m$  de l'oxydase pour le NADPH est d'environ 30  $\mu\text{M}$  (Burritt *et al.*, 2003). Etant donné que la concentration cytoplasmique en NADPH reste relativement constante dans le neutrophile, environ 50  $\mu\text{M}$  (DeChatelet *et al.*, 1974), la concentration en substrat influe significativement l'activité NADPH oxydase (Petheo et Demaurex, 2005). L'étude du courant électrique induit par l'activité oxydase de membrane de polynucléaires éosinophiles humains indique que la concentration de NADPH modifie le transfert d'électron en partie par modulation du potentiel de membrane (Petheo et Demaurex, 2005).

L'étude du complexe de la NADPH oxydase active isolé montre la présence de la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH) co-purifiée avec les autres partenaires du complexe NADPH oxydase (Palet *et al.*, 2007). La 6-PGDH est une enzyme de la voie des pentoses phosphate qui produit le NADPH intracellulaire (Figure 14). Aussi appelée « shunt » des hexoses monophosphates, la voie des pentoses phosphates permet la synthèse de ribose-5-phosphate, précurseur des acides nucléiques nécessaires à la synthèse d'ADN en ARN, ainsi que la réduction du  $\text{NADP}^+$  en NADPH, substrat des NADPH oxydases et de la glutathion réductase qui permet le maintien du statut redox cytosolique. Au laboratoire, il a été montré

que la 6-PGDH est impliquée dans la régulation de l'activité NADPH oxydase en augmentant l'affinité de Nox2 pour le NADPH dans les PMN activés (Baillet *et al.*, 2011).



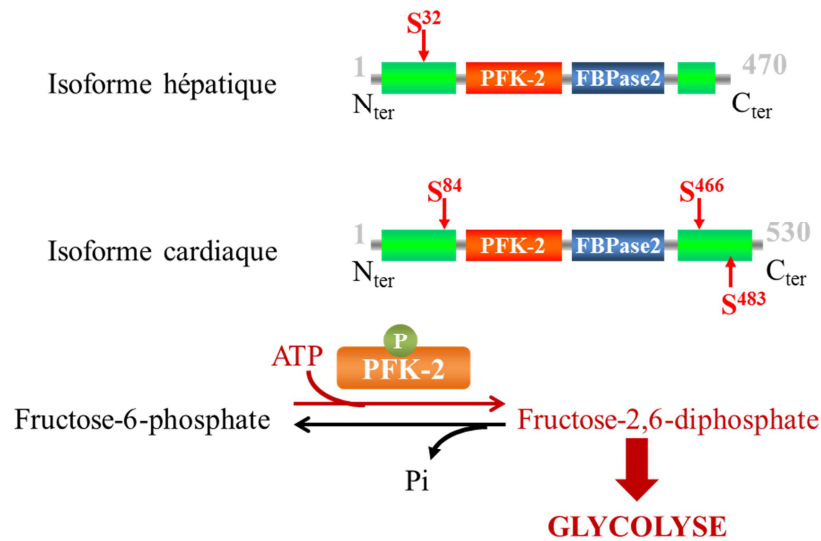
**Figure 14: La 6-PGDH et la PFK-2, enzymes du métabolisme du glucose.** ADP/ATP = Adénosine di/triphosphate, F<sub>6</sub>P = Fructose-6-phosphate, F<sub>1-6</sub>P = Fructose-1,6-diphosphate, G6PDH = glucose-6-phosphate déshydrogénase, G6P = glucose-6-phosphate, NADPH = nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, PFK = phosphofructokinase, 6PGDH = 6-phosphogluconate déshydrogénase.

### a. La PFK-2 régule la glycolyse

L'analyse du complexe de la NADPH oxydase active isolé à partir de neutrophiles a également montré la présence de la 6-phosphofructo-kinase-2 (PFK-2), une autre enzyme du métabolisme du glucose, associée à la NADPH oxydase (Palet *et al.*, 2007). La PFK-2 est une enzyme bifonctionnelle comportant un site catalytique kinase et un site phosphatase. Quatre gènes différents PFKB1, PFKB2, PFKB3 et PFKB4 codent respectivement pour les isoenzymes hépatiques, cardiaques, cérébrales et testiculaires.

L'isoenzyme hépatique est la plus étudiée. Elle possède une activité phosphatase prépondérante (Figure 15). L'isoenzyme retrouvée dans le complexe oxydase, isolé à partir de fractions cytosolique et membranaire de PMN activés, est l'isoenzyme cardiaque dont le locus est situé sur le chromosome 1 (1q23). C'est un homodimère d'environ 100 kDa qui se singularise par une partie C-terminale comprenant deux sites de phosphorylation pour la PKA. A la faveur d'une phosphorylation, l'activité kinase de l'isoenzyme cardiaque est stimulée. Il s'ensuit une augmentation de la production de fructose-2,6-diphosphate, activateur

allostérique de la PFK-1, l'enzyme limitante de la glycolyse, et une stimulation de la glycolyse (Figure 15).

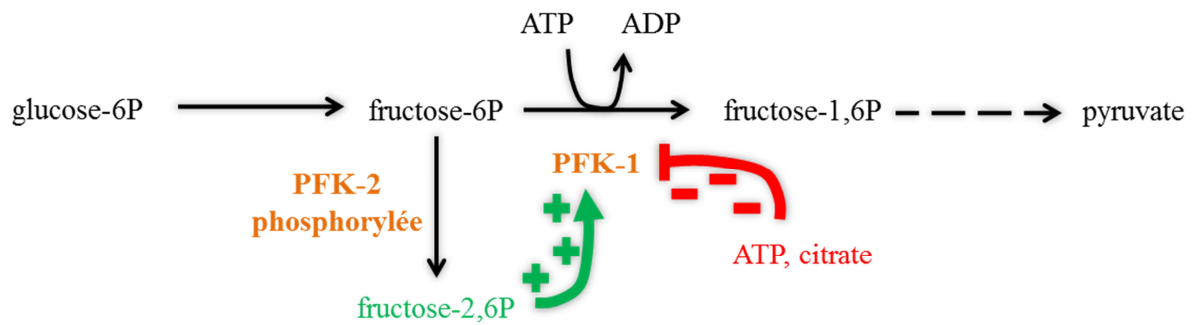


**Figure 15: Comparaison de l'isoforme cardiaque de la PFK-2 avec l'isoforme hépatique.** L'isoforme cardiaque, exprimée dans les PMN, possède une séquence plus longue que l'isoforme hépatique. Il y a également deux sites de phosphorylations supplémentaires (la sérine 466 et la sérine 483) pris en charge par la PKA. Dans le cœur, la phosphorylation de l'enzyme va favoriser l'activité kinase et donc l'activation de la PFK-2, ce qui va se traduire par une augmentation de la glycolyse dans les cellules.

### b. La glycolyse, source principale d'énergie dans les PMN

Dans les PMN, l'énergie provient essentiellement de la glycolyse. Quelques mitochondries sont présentes dans les PMN (Maiani *et al.*, 2004). Elles sont importantes dans la programmation de l'apoptose (Maiani *et al.*, 2002) mais elles sont incapables de produire de l'ATP. De ce fait, dans les PMN, la production énergétique sous forme d'ATP est entièrement assurée par la glycolyse.

La glycolyse se déroule dans le cytosol. Elle consiste en l'oxydation progressive du glucose en deux molécules de pyruvate avec une production de deux molécules d'ATP et de NADH. Cette voie est régulée à son entrée par l'activité hexokinase. La phosphofructokinase-1 (PFK-1) catalyse la phosphorylation irréversible du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-diphosphate en présence de  $Mg^{2+}$ . L'activité de cette enzyme est régulée par des effecteurs allostériques, l'ATP et le citrate sont des inhibiteurs allostériques de la PFK-1, tandis que le fructose-2,6-diphosphate est l'activateur allostérique de cette enzyme (Figure 16).



**Figure 16: Schéma de la glycolyse.** ADP/ATP = Adénosine di/triphosphate, PFK = phosphofruktokinase, Glucose-6P = glucose-6-phosphate, Fructose-6P = fructose-6-phosphate, fructose-1,6P = fructose-1,6-diphosphate, Fructose-2,6-P = fructose-2,6-diphosphate.

La NADPH oxydase phagocytaire est un complexe enzymatique multimérique dont l'activité est finement régulée sur le plan moléculaire et cellulaire.

La question se pose du rôle de la PFK-2 dans la régulation de l'activité NADPH oxydase des PMN, et de façon plus générale du lien entre la glycolyse et la production de ROS dans les PMN.

Les modes de régulation de l'activité NADPH oxydase dans les PMN sont multiples et orchestrés de façon à contrôler rigoureusement la production de dérivés réactifs de l'oxygène. Dans le cas de certaines pathologies, cette régulation n'est plus effective et contribue à des effets délétères. En particulier dans la PR, la surproduction de ROS joue un rôle central dans la pathologie en participant à la destruction du cartilage dans l'articulation. Mais à ce jour, rien n'est connu de l'impact des ROS sur la membrane synoviale et sur le changement de phénotype des FLS observé dans la PR.

Dans ce travail, nous avons cherché à répondre à ces questions.



# Objectifs

Dans un premier temps, nous avons étudié le lien entre l'activation de la PFK-2 et l'activation de la NADPH oxydase des phagocytes. Dans un second temps, nous avons évalué l'effet des ROS produits par la NADPH oxydase des PMN dans la PR et plus particulièrement sur les FLS de la membrane synoviale.

Notre étude s'est portée sur l'enzyme de la PFK-2 qui a été co-purifiée avec le complexe de la NADPH oxydase, isolé et constitutivement actif, dans les PMN (Pacllet *et al.*, 2007). La PFK-2 est une enzyme du métabolisme du glucose : elle participe indirectement à la glycolyse, source d'énergie principale dans les PMN.

Nous nous sommes intéressés aux mécanismes de régulation de l'activité NADPH oxydase des phagocytes à travers la PFK-2 en analysant :

- L'impact des kinases déjà décrites comme phosphorylant la PFK-2, dans d'autres types cellulaires, sur la phosphorylation de la PFK-2 des PMN.
- L'impact des inhibiteurs pharmacologiques de kinases sur l'activité NADPH oxydase des PLB-985 différenciées et des PMN.
- Le lien entre l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire et l'activité glycolytique des PMN.

Dans le contexte physiopathologique de la PR, les PMN, principales cellules infiltrantes, et les FLS, cellules de la membrane synoviale, jouent un rôle majeur dans le développement et le maintien de l'inflammation. En mimant *in vitro* les conditions inflammatoires de la maladie, nous avons étudié le dialogue entre les deux types cellulaires :

- Identification des isoenzymes des NADPH oxydases exprimées dans les FLS mis en culture, puis mesure de leur activité oxydase.
- Etude du rôle des ROS produits par la NADPH oxydase des PMN sur les cellules de la membrane synovial : les FLS.
- Evaluation de l'impact des protéines S100A8 et S100A9 sur l'activité NADPH oxydase des FLS.

# Matériel & Méthodes

# I. Préparation du matériel biologique

## I.1. Matériel cellulaire

### I.1.1. Cellules PLB-985

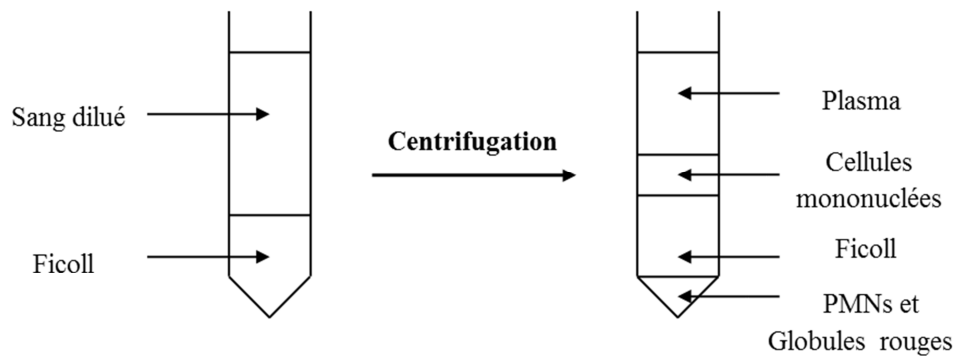
Les cellules PLB-985 sont issues du sang périphérique d'un patient atteint de leucémie myéloïde (Tucker *et al.*, 1987). Une étude morphologique de la lignée des PLB-985 a montré que ces cellules appartiennent à la famille des myélomonoblastes. Elles présentent également quelques rares granules azurophiles dans leur cytoplasme. Ces cellules sont capables de se différencier en granulocytes ou monocytes matures en présence d'agent chimique spécifique (Tucker *et al.*, 1987). Au contact du diméthylformamide (DMF) les cellules PLB-985 se différencient en pseudo-neutrophile et acquièrent, après 4 jours d'incubation, la capacité de produire des ROS *via* une NADPH oxydase phagocytaire fonctionnelle similaire à celle des neutrophiles matures. Il faut attendre 6 jours de différenciation pour observer la formation d'un noyau fragmenté et polylobé, se traduisant par une diminution du rapport noyau/cytoplasme. Il est également important de préciser la formation d'un grand nombre de granules azurophiles dans le cytoplasme (Zhen *et al.*, 1993).

Les cellules PLB-985 sont cultivées en milieu RPMI-1640 (SVF 10 % (v/v), pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL, L-glutamine 2 mM) dans un incubateur humide à 37 °C sous une atmosphère de CO<sub>2</sub> 5 % / air 95 %. Pour la différenciation, les cellules sont divisées puis le lendemain, la concentration cellulaire est ajustée à  $5 \times 10^5$  cellules/mL dans un volume de 40 mL de milieu de culture. Le DMF est ajouté à 0,5 % (v/v). Après 3 jours de différenciation, il est nécessaire de renouveler le milieu de culture. Les cellules sont sédimentées dans les boîtes pendant 30 min. Le milieu de culture est éliminé et un même volume de milieu frais est ajouté. Le DMF, avec une concentration finale de 0,5% (v/v), est également ajouté pour maintenir le déroulement de la différenciation. A partir du quatrième jour, les cellules peuvent être utilisées pour la mesure de l'activité NADPH oxydase mais il faudra attendre 6 jours d'incubation pour la différenciation en granulocytes.

### I.1.2. Neutrophiles humains

L'isolement des neutrophiles est réalisé à partir de 15 mL de sang, prélevés sur des donneurs à l'Etablissement Français du Sang. Le sang frais est dilué 2 fois dans du PBS contenant 1% (v/v) de tri-citrate de sodium. La dilution est ensuite déposée délicatement sur 12,5 mL d'un

gradient de densité (Ficoll-Paque PLUS®, d=1,077). Les cellules sanguines sont séparées par centrifugation à 800 g pendant 20 min à température ambiante.



**Figure 17: Schéma de la séparation des cellules sanguines sur un gradient de Ficoll.** Après centrifugation (800 g / 20 min / 20 °C) les différentes cellules sanguines sont séparées en fonction de leur densité. Le Ficoll a une densité supérieure à celle du plasma et à celle des cellules mononucléées, par contre sa densité est plus faible que celle des globules rouges et celle des PMN.

Le surnageant (plasma + cellules mononucléées + Ficoll) est éliminé par aspiration (Figure 16). Les globules rouges du culot sont lysés dans un tampon de lyse hypotonique (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, KHCO<sub>3</sub> 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 7) pendant 15 min dans la glace. Le culot de PMN (blanc) est récupéré après une centrifugation à 460 g pendant 5 min à 4 °C, puis lavé et remis en suspension dans le tampon PBS.

### I.1.3. Synoviocytes primaires humains

Les synoviocytes de type fibroblastique (FLS) sont issus de prélèvement de liquides synoviaux de patients atteints de PR ou d'autres maladies inflammatoires (arthrose ou autre forme d'arthrite). Les liquides synoviaux sont centrifugés à 2500g pendant 15 min, à 25°C afin de sédimenter les cellules. Le surnageant est conservé et stocké à -80 °C tandis que le culot cellulaire est mis en suspension dans du milieu de culture DMEM (SVF 10% (v/v), pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL, L-glutamine 2 mM) puis transvasé dans une boîte de culture et placé dans un incubateur humide à 37 °C sous une atmosphère de CO<sub>2</sub> 5 % / air 95 %. Après 24h d'adhésion des FLS, les cellules qui n'ont pas adhéré (neutrophiles principalement et quelques lymphocytes) sont éliminées par lavage. Du milieu frais est ajouté et les cellules prolifèrent une semaine avant d'être transvasées dans une boîte de culture plus grande. Pour se faire, les FLS sont préalablement lavés en DMEM sans SVF à trois reprises, puis sont traités avec de la trypsine-EDTA 0,25% (p/v) pendant 15 à 30 min. Une fois les cellules détachées, l'action de la Trypsine est stoppée avec l'ajout de milieu de culture DMEM (SVF 10 % (v/v), pénicilline 100 U / mL, streptomycine 50 mg / mL, L-glutamine 2

mM). Les cellules sont transvasées dans une autre boîte de culture et adhèrent en 24 h. Le milieu est changé au moins deux fois par semaine. Les cellules sont utilisées entre 6 et 8 passages, soit après 4 à 6 semaines de culture cellulaire.

## I.2. Numération des cellules

La concentration cellulaire est déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez. Les cellules sont comptées sur 10 rectangles indépendants et non contigus. Arbitrairement, il est convenu de tenir compte uniquement des cellules sur les côtés droits et inférieurs. La moyenne du nombre de cellules est multipliée par 10 000 et les éventuels facteurs de dilution pour obtenir la concentration cellulaires en cellule/mL. En parallèle, la viabilité des cellules est mesurée par exclusion au bleu trypan. Pour cela, 25 µL de la suspension cellulaire sont dilués dans 100 µL de PBS + 25 µL de bleu de trypan, la dilution finale est de de 1/6<sup>ème</sup> (les cellules ayant un cytoplasme et un noyau bleuté sont considérées comme mortes).

## II. Matériel biochimique

### II.1. Anticorps

#### II.1.1. Anticorps monoclonaux dirigés contre le cytochrome *b*<sub>558</sub>

##### a. Anticorps monoclonaux de souris anti-Nox2

Plusieurs anticorps monoclonaux anti-Nox2 ont été développés au laboratoire et purifiés à partir de liquide d'ascite (Campion *et al.*, 2007). Pour cette étude, deux de ces anticorps ont été utilisés pour l'immunodétection de Nox2 : le clone 8G11 et le clone 7A2 (dilution au 1/2000), leur épitope est situé sur la deuxième boucle extra-cellulaire de Nox2.

##### b. Anticorps monoclonaux de souris anti-p22-phox

Des anticorps monoclonaux dirigés contre p22-phox ont été développés au laboratoire et purifiés à partir de liquide d'ascite (Campion *et al.*, 2009). Pour cette étude, c'est le clone 16G7 qui a été utilisé au 1/2000, son épitope est situé sur la partie C-terminale de p22-phox des acides aminés 130 à 139.

### II.1.2. Anticorps polyclonaux dirigés contre les facteurs cytosoliques de l'oxydase

Trois anticorps polyclonaux de lapin, respectivement dirigés contre des peptides spécifiques de p40-phox, p47-phox ou p67-phox ont été utilisés (dilution au 1/1000). Ces immunoglobulines ont été purifiées à partir d'antisérum de lapin sur 1 mL de protéine A Sepharose.

**Tableau 1: Caractéristiques des anticorps anti-peptides utilisés.**

Anticorps	Epitope cible	Région
Anti-p40-phox	résidu 325 à 339	C-ter
Anti-p47-phox	résidu 371 à 390	C-ter
Anti-p67-phox	résidu 511 à 526	C-ter

#### a. Anticorps polyclonaux anti-S100A8/S100A9

L'immunodétection des protéines S100A8/S100A9 a été réalisée à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique du complexe S100A8/S100A9 (dilué au 1/1000), produit au laboratoire (Baillet *et al.*, 2010).

#### b. Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la PKA

PKA $\alpha/\beta/\gamma$  cat (H-95): sc-28892 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) est un anticorps polyclonal de lapin reconnaissant les acides aminés 226 à 320 de la partie C-terminale de la sous-unité  $\alpha$  de la PKA humaine. Cet anticorps a été utilisé au 1/500 pour la détection de la PKA en Western blot. La taille attendue pour la protéine est de 40 kDa.

#### c. Anticorps polyclonaux dirigés contre la PFK-2

- Anti-PFK-2 native :

PFK-2 car (Y-13) : sc-50956 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) est un anticorps polyclonal de chèvre purifié par chromatographie d'affinité reconnaissant un peptide présent sur la partie N-terminale de l'isoforme cardiaque de la PFK-2 humaine. Cet anticorps a été utilisé au 1/500 pour la détection de PFK-2 en Western blot. La taille attendue pour la protéine est de 55 kDa.

- Anti-PFK-2 phosphorylée (Ser 466) :

p-PFK-2 car (Ser 466) : sc-32966 (Santa Cruz Biotechnology, inc) est un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre une petite séquence d'acides aminés contenant la sérine 466

phosphorylée de la PFK-2 humaine, spécifique de l'isoforme cardiaque. Cet anticorps a été utilisé au 1/500 pour la détection de la PFK-2 phosphorylée sur la sérine 466 en Western blot. La taille attendue pour la protéine est de 55 kDa.

## II.2. Inhibiteurs pharmacologiques de kinases

- SB202190 (Jena Bioscience, Jena, Allemagne) :

Ce composé fait partie des imidazoles pyridine, c'est un inhibiteur spécifique de la p38a (p38 MAPK) et la p38b. Il n'a aucun effet sur la p38g et la p38d (Manthey *et al.*, 1998). C'est un inhibiteur compétitif de la p38 MAPK qui se lie sur le site de fixation de l'ATP. Sa valeur de  $CI_{50}$  (concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité d'une molécule cible) est 50 nM pour la p38a et de 100 nM pour la p38b. Il est important de noter que SB202190 peut induire la mort cellulaire avec l'apparition des caractéristiques typiques de l'apoptose comme la condensation des noyaux ou bien la fragmentation de l'ADN (Nemoto *et al.*, 1998).

- H-89, Dihydrochloride (Cell Signaling technology, Danvers, USA):

C'est un inhibiteur de la protéine kinase A (PKA) avec une  $CI_{50}$  d'approximativement 50 nM (Chijiwa *et al.*, 1990) (Meja *et al.*, 2004). L'effet inhibiteur de H-89 est dû à sa fixation sur la poche ATP sur la sous-unité catalytique de la kinase (Engh *et al.*, 1996). H-89 inhibe également, de façon modérée, la protéine kinase G (PKG) et la protéine kinase  $C\mu$  (PKC $\mu$ ) avec une  $CI_{50}$  d'environ 500 nM (Chijiwa *et al.*, 1990) (Johannes *et al.*, 1995).

- Akt inhibitor XIII (Calbiochem, Gibbstown, USA) :

Cette molécule a été développée et décrite comme un inhibiteur de la protéine kinase B (PKB), connue également sous le nom d'Akt (Zhao *et al.*, 2008). C'est un inhibiteur allostérique d'Akt 1/2 avec une  $CI_{50}$  de 560 nM pour Akt 1, 390 nM pour Akt 2 et 7,8  $\mu$ M pour Akt 3. Une inhibition est également observée sur la PKA, la PKC et la « sérum and glucocorticoid-regulated kinase » (SKG) avec une  $CI_{50}$  supérieure à 50  $\mu$ M. De plus, dans différentes cellules tumorales, l'Akt inhibitor XIII augmente l'induction de l'activité de la caspase-3 (Zhao *et al.*, 2008).

- PD 98059 (Calbiochem, Gibbstown, USA) :

C'est un inhibiteur de la MEK qui agit sur l'activation de la MAP kinase et toutes les phosphorylations dépendantes de cette enzyme avec une  $CI_{50}$  de 2  $\mu$ M (Dudley *et al.*, 1995). Plusieurs effets secondaires ont été observés dans les cellules traitées avec ce composé,



notamment un blocage de l'induction de l'expression du gène codant pour le TNF $\alpha$  par le LPS (Means *et al.*, 2000).

- Ro-31-8220 (Calbiochem, Gibbstown, USA) :

Cette molécule est un inhibiteur de la PKC avec une  $CI_{50}$  de 10 nM. Des effets ont également été observés pour la CaM kinase II ( $CI_{50}$  = 17  $\mu$ M) et la PKA ( $CI_{50}$  = 900 nM) (Davis *et al.*, 1992). De manière plus modérée, Ro-31-8220 inhibe l'expression de la MAP kinase phosphatase-1 et active la c-Jun N terminal kinase-1 (JNK-1). Des effets induisant l'apoptose ont été observés dans la lignée cellulaire HL-60 (Han *et al.*, 2000).

**Tableau 2: Concentration des inhibiteurs de kinases utilisés dans les expériences.**

Inhibiteur	Kinase cible	Concentration utilisée
SB202190	p38 MAP kinase	10 $\mu$ M
H-89	PKA	10 $\mu$ M
Akt Inhibitor XIII	PKB (Akt)	5 $\mu$ M
PD98059	MAP kinase kinase (MEK)	50 $\mu$ M
Ro-38-8220	PKC	10 $\mu$ M

Les cellules sont mises en suspension dans du tampon PBS à une concentration de  $5 \times 10^7$  cellules/mL. Elles sont ensuite incubées en présence d'un inhibiteur de kinase pendant 30 min à 37 °C. Chaque inhibiteur a été utilisé à une concentration sub létale (Tableau 2) : la viabilité cellulaire a été contrôlée par la mesure d'exclusion au bleu trypan sur une cellule de Malassez après traitement. Une fois le traitement terminé, les cellules sont sédimentées par centrifugation (350 g / 8 min / 20 °C) et lavées à deux reprises en PBS. Elles seront utilisées pour la mesure de l'activité NADPH oxydase par chimiluminescence en réponse à différents stimuli et également pour réaliser des Western blot sur des lysats cellulaires ou de fractions cytosoliques.

### III. Traitement des cellules

#### III.1. Stimulation de l'activité NADPH oxydase phagocytaire

Trois agents activateurs de la NADPH oxydase phagocytaire ont été utilisés : le phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), un ester de phorbol qui active directement les PKC (shunt des voies de signalisation) et stimule ainsi l'activation de la NADPH oxydase. La ionomycine, un

composé ionophore qui augmente la concentration calcique intracellulaire, activant les PKC. Le fMLP, un tri-peptide formylé dérivé de la paroi bactérienne qui se fixe au récepteur FP des PMN. Il a pour effet d'augmenter la concentration calcique intracellulaire ce qui active en particulier les PKC. Les agents stimulant ont été utilisés à la concentration suivante :

- PMA            130 nM
- Ionomycine   2  $\mu$ M
- fMLP           100 nM

Les cellules sont préalablement mises en suspension dans du PBS contenant du  $\text{CaCl}_2$  (0,8 mM) et du  $\text{MgCl}_2$  (0,5 mM). La concentration cellulaire est ajustée à  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Le PMA, la ionomycine ou le fMLP est ajouté au milieu. L'incubation en présence des agents activateurs se fait à 37 °C pendant 5 min. La stimulation est stoppée par l'ajout d'un volume de PBS glacé. Les cellules sont centrifugées (350 g / 10 min / 20 °C) et lavées à trois reprises avec le tampon PBS puis sont mises en suspension dans 0,5 mL de PBS glacé.

### **III.2. Inhibition de l'activité NADPH oxydase**

Le diphenylène iodonium (DPI) et ses analogues sont des inhibiteurs des flavoenzymes dont les NADPH oxydases font partie. Les cellules sont incubées en présence de DPI 10  $\mu$ M à 37°C pendant 10 min. Elles sont ensuite centrifugées (350 g/ 10 min / 20 °C) et lavées en PBS, puis sont utilisées pour des mesures d'activités enzymatiques.

### **III.3. Co-culture des FLS primaires et des cellules PLB-985**

Des cellules PLB-985 différenciées sont stimulées avec un ester de phorbol, le PMA (130 nM). La concentration cellulaire est ajustée à  $3 \times 10^6$  cellules / mL dans le tampon PBS contenant du  $\text{MgCl}_2$  (0,5 mM) et du  $\text{CaCl}_2$  0,9 mM. Les cellules stimulées sont immédiatement mises au contact des synoviocytes, préalablement lavés, dans une petite boîte de culture confluente ( $25 \text{ cm}^2 = 5 \times 10^6$  cellules) pendant 2 h à 37°C. Par la suite, les cellules PLB-985 sont retirées et les synoviocytes sont lavés avec le tampon PBS pour enlever les cellules PLB985 résiduelles. Ces derniers sont traités à la trypsine-EDTA 0,25 %. Une fois décrochés, les synoviocytes sont mis en suspension dans du milieu de culture DMEM contenant du SVF 10 % (v/v), de la pénicilline 100 U / mL, de la streptomycine 50 mg/mL et de la L-glutamine 2 mM pour stopper l'action de la trypsine. Enfin, les synoviocytes sont lavés en PBS puis centrifugés (400 g / 8 min / 25 °C). L'activité NADPH oxydase des synoviocytes est mesurée par la technique de chimiluminescence.

### **III.4. Evaluation de la contamination des synoviocytes par les PLB-985**

Pour évaluer la contamination des synoviocytes en fin de co-culture par les cellules PLB-985, les fractions de lavage sont collectées et les cellules sont comptées. Connaissant le nombre total de PLB-985 ajoutées en début d'expérience, il est possible de déterminer par soustraction le nombre de PLB-985 résiduelles dans la suspension de synoviocytes. Une fois le nombre de cellules contaminantes déterminé, un nombre identique de cellules PLB-985 différenciées sont stimulées avec le PMA (130 nM) dans les mêmes conditions que pour la co-culture mais en absence de synoviocytes. Elles sont incubées pendant 2 h à 37 °C puis leur activité NADPH oxydase est mesurée par chimiluminescence. Ainsi, il est possible d'évaluer les ROS produits par les cellules PLB-985 différenciées résiduelles dans la suspension de synoviocytes.

### **III.5. Traitement des synoviocytes avec le TNF $\alpha$**

Les synoviocytes sont cultivés dans une grande boîte de culture (175 cm<sup>2</sup>). Lorsque les cellules arrivent à confluence, ce qui correspond environ à 3 ou 4×10<sup>7</sup> cellules, les synoviocytes sont incubées en présence de TNF $\alpha$  à 1 ng/mL à 37 °C pendant 24 h dans le milieu DMEM contenant du SVF 10 % (v/v), de la pénicilline 100 U / mL, de la streptomycine 50 mg / mL et de la L-glutamine 2 mM. Les synoviocytes sont ensuite lavés en DMEM (sans SVF) et détachés avec de la trypsine-EDTA 0,25 %. D'autres synoviocytes, provenant du même liquide synovial sont traités dans les mêmes conditions mais sans TNF $\alpha$  et constitueront une condition contrôle. Les cellules sont utilisées soit pour mesurer l'activité NADPH oxydase par chimiluminescence ou par fluorimétrie, soit pour extraire les ARN totaux en vue d'analyser les transcrits des NADPH oxydases exprimées dans les synoviocytes. Ces cellules seront également utilisées pour faire des homogénats cellulaires afin d'analyser l'expression protéique des NADPH oxydases.

## IV. Fractionnement subcellulaire

### IV.1. Préparation de fractions cytosoliques et membranaires

Avant tout fractionnement subcellulaire, les cellules ajustées à  $1 \times 10^8$  cellules/mL dans le tampon PBS sont incubées en présence de 3,5 mM diisopropylfluorophosphate (DFP), un puissant inhibiteur de protéases à sérine, pendant 15 min dans la glace. Les tubes sont ensuite centrifugés à 350 g pendant 8 min à 4 °C.

Le surnageant contenant le DFP est éliminé dans une solution de NaOH 2 M. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 1 mL de tampon PBS glacé contenant des inhibiteurs de protéases (leupeptine 1,8  $\mu$ M, pepstatine 1,5  $\mu$ M, TLCK 10  $\mu$ M). Les cellules sont cassées par sonication avec trois cycles de 10 secondes à une puissance de 40 W, avec une pause de 1 min dans la glace entre chaque cycle. Les homogénats obtenus sont centrifugés à 1 000 g pendant 15 min à 4 °C pour éliminer les cellules non-cassées, les débris et les noyaux. Les surnageants sont ensuite ultracentrifugés à 200 000 g pendant 60 min à 4 °C. Le surnageant correspond au cytosol et le culot correspond aux membranes brutes. Le culot est mis en suspension dans le tampon PBS contenant des inhibiteurs de protéases (leupeptine 1,8  $\mu$ M, pepstatine 1,5  $\mu$ M, TLCK 10  $\mu$ M). Les échantillons de membranes sont homogénéisés par sonication dans les mêmes conditions que précédemment, un seul cycle suffit. La concentration protéique des membranes et du cytosol est déterminée par la méthode de Bradford. Les échantillons sont conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

*Remarque : Le DFP est un produit extrêmement toxique qui nécessite des mesures de sécurité particulières. Il est manipulé sous hotte chimique avec des gants en latex. Tout le matériel qui s'est retrouvé en contact du DFP doit être neutralisé dans une solution de NaOH 2 M préalablement préparée.*

### IV.2. Préparation de lysats cellulaires

#### IV.2.1. Lyse des cellules en présence de triton X-100

Les cellules sont centrifugées à 1000 g pendant 5 min à 4 °C. Les culots obtenus sont remis en suspension dans 200  $\mu$ L de tampon de lyse (Tris-HCl 500 mM pH 7,5, leupeptine 1,8  $\mu$ M, pepstatine 1,5  $\mu$ M, TLCK 10  $\mu$ M, triton X-100 1 % (v/v)). Les échantillons sont incubés pendant 20 min dans la glace avec une agitation régulière au vortex. Le milieu est centrifugé à

14000 g pendant 15 min à 4 °C. Les surnageants correspondants aux lysats cellulaires sont recueillis. La concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford après dilution de l'échantillon. Les aliquots sont conservés à -80 °C jusqu'à utilisation.

#### **IV.2.2. Lyse des cellules en présence de nonidet P40**

Le protocole est identique à celui décrit précédemment hormis le tampon de lyse (Tris-HCl 500 mM pH 7,5, leupeptine 1,8 µM, pepstatine 1,5 µM, TLCK 10 µM, nonidet P40 0,5 % (v/v)). Le nonidet P40 n'interfère pas avec la mesure de l'activité enzymatique en particulier le dosage de l'activité de la PFK-1, ce qui n'est pas le cas du triton X-100.

### **IV.3. Production de la protéine chimère S100A8-A9 recombinante**

La protéine chimère S100A8-A9 a été préparée au laboratoire par Sylvie Berthier (Berthier *et al.*, 2012). Le protocole était le suivant : des bactéries *E. Coli* BL21 compétentes sont transformées avec le plasmide pGEX-5x2, possédant le gène codant pour la Gluthation-S-Transferase (GST) en amont de la séquence du gène inséré : celui codant pour la protéine chimère S100A8-S100A9. Les bactéries sont cultivées dans un milieu Luria-Bertani (25 g/L) enrichi en ampicilline (100 µg/mL) à 37 °C, jusqu'à atteindre une absorbance de 1,5 à 600 nm. La production de protéines recombinantes est induite par l'IPTG (0,2 mM), toute la nuit, à 16 °C. Les bactéries sont ensuite cassées par sonication (3 cycles de 3 min dans la glace) et les protéines de fusion solubles, GST-S100A8-S100A9, sont séparées par ultracentrifugation à 100 000 g pendant 1 h à 4 °C. Elles sont par la suite purifiées à partir d'une matrice de glutathion-Sepharose en présence de DTT (10 mM). Après une étape de lavage en tampon PBS, les protéines recombinantes sont directement purifiées sur la matrice de glutathion-Sepharose par l'action du facteur XA, qui clive la région charnière entre la GST et la protéine d'intérêt, dans du tampon PBS, toute la nuit, à 4 °C. Les protéines recombinantes sont purifiées par filtration, puis les éluats sont conservés à -20°C. La concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford.

## **V.Méthode de biochimie**

### **V.1. Dosage et analyse des protéines**

#### **V.1.1.Dosage des protéines par la méthode de Bradford (Bradford, 1976)**

Le bleu de Coomassie (G250) en milieu acide forme un complexe avec les protéines en se fixant sur les groupements amines libres. Il change alors de couleur en passant du rouge (460 nm) au bleu (595 nm). La concentration en protéines du milieu est proportionnelle à l'absorbance à 595 nm. Elle est déterminée par comparaison avec une courbe d'étalonnage de concentration connue et croissante en sérum albumine bovine (BSA). Cette technique est simple et rapide. Il suffit d'incuber l'étalon pour la gamme et les échantillons à doser avec 2 mL de réactif de Bradford pendant, au minimum, 5 min à température ambiante. La lecture s'effectue dans l'heure qui suit, période de stabilité de la coloration. Par ailleurs, cette méthode permet de doser des quantités faibles de protéines, de l'ordre du  $\mu\text{g}$ , dans des milieux de concentration saline élevée.

#### **V.1.2.Electrophorèse en gel d'acrylamide dénaturant (SDS-PAGE) (Laemmli et Favre, 1973)**

L'électrophorèse en gel SDS-PAGE repose sur la séparation des protéines en fonction de leur masse molaire, dans un gel d'acrylamide dont la taille du maillage est déterminée d'après le pourcentage d'acrylamide utilisé. Le gel SDS-PAGE est composé d'un gel de séparation (Tableau 3) et d'un gel de concentration qui va concentrer l'échantillon protéique déposé (Tableau 4). Pour cette technique électrophorétique, les protéines sont dénaturées par l'ajout d'un détergent, le SDS et les ponts disulfures intra- et/ou inter-chaînes polypeptidiques sont rompus par l'addition d'un agent réducteur, le  $\beta$ -mercaptoéthanol. Le SDS étant un détergent anionique, sa présence en excès va charger négativement les protéines. Les protéines seront alors séparées suivant leur masse molaire par l'application d'un champ électrique. Pour connaître la masse molaire apparente des protéines de l'échantillon déposé sur le gel, un mélange de protéines de masse molaire connue est déposé dans les mêmes conditions dénaturantes. En général, les gels (6×8 cm) utilisés contiennent 10 % (v/v) ou 15 % (v/v) d'acrylamide, leur épaisseur varie de 0,75 à 1,5 mm.

**Tableau 3: Préparation d'un gel de séparation.** Les quantités sont données pour 2 minigels (6×8 cm) et de 0,75 mm d'épaisseur.

Gel d'acrylamide	10 % Volume (mL)	15 % Volume (mL)
Tampon Tris-HCl 1,5 M, pH 8,9	3	3
H <sub>2</sub> O	5,8	4,3
Acrylamide/bis Acrylamide 40 % (p/v)	3	4,5
SDS 10% (p/v)	0,12	0,12
Persulfate d'ammonium 10% (p/v)	0,075	0,075
TEMED	0,0125	0,0125

**Tableau 4: Préparation d'un gel de concentration.**

Gel de concentration	Volume (mL)
Tampon Tris-HCl 0,5M, pH 6,8	2,5
H <sub>2</sub> O	6,36
Acrylamide/ Bis Acrylamide 40% (p/v)	0,94
SDS 10% (p/v)	0,1
Persulfate d'ammonium 10% (p/v)	0,07
TEMED	0,01

### V.1.3. Préparation des échantillons

Pour la séparation en SDS-PAGE, les échantillons sont préalablement dénaturés et réduits. Le traitement consiste à faire chauffer un échantillon protéique à 60 °C pendant 1 h en présence d'un tampon de solubilisation : sucrose 5 % (p/v), SDS 2 % (p/v), bleu de bromophénol 0,02 % (v/v), β-mercaptoéthanol 0,25 % (v/v) en Tris HCl 63 mM pH 6,7. Le tampon de solubilisation dénature les protéines et alourdit l'échantillon pour faciliter le dépôt. Le β-mercaptoéthanol est un agent réducteur qui réduit les ponts disulfures. Le sodium dodécyl sulfate (SDS) est un détergent anionique qui charge négativement les protéines.

### V.1.4. Migration électrophorétique

Une fois les protéines déposées sur le gel, elles seront séparées par électrophorèse dans un tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1% (p/v), pH 8,8) dans une cuve d'électrophorèse. L'intensité du courant est modulée en fonction de la migration des

échantillons : faible dans le gel de concentration ( $\sim 15$  mA / gel) et plus élevée une fois que les protéines ont pénétré dans le gel (30 mA / gel). Le voltage ne doit pas dépasser 200 volts. La migration est stoppée lorsque le front de migration, visible grâce au bleu de bromophénol contenu dans les échantillons, arrive en bas du gel.

## V.2. Analyse des protéines par Western-blot (Towbin et al., 1979)

### V.2.1. Transfert semi-sec des protéines

Pour identifier les protéines présentes dans un échantillon à l'aide d'un anticorps spécifique, les protéines sont transférées du gel d'acrylamide sur une membrane de nitrocellulose en utilisant leur propriété de migration dans un champ électrique.

A la fin de la migration électrophorétique, le gel est incubé dans un tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM, Glycine 129 mM, SDS 0,01% (p/v), méthanol 20% (v/v), pH 8,3) pendant quelques minutes. En parallèle, la cuve de transfert semi-sec est préparée : elle est constituée de deux électrodes reliées à un générateur : une cathode en acier inoxydable et une anode en platine titane (Thermo scientific®, Owl HEP-1). Il est important de bien les humidifier avant le transfert. Le gel est ensuite déposé sur la membrane de nitrocellulose de façon à constituer un sandwich en 6 feuilles de papier Whatman n°3 aux dimensions identiques à celles du gel (Figure 18). Les constituants du sandwich sont tous incubés préalablement dans le tampon de transfert. Les protéines du gel, chargées négativement en présence de SDS, migreront ainsi de la cathode (chargée négativement) vers l'anode (chargée positivement) et seront adsorbées sur la membrane qui sera ainsi l'empreinte exacte du gel. Le courant appliqué lors du transfert est de 1 mA / cm<sup>2</sup> de gel à transférer. Le temps de transfert dépend de l'épaisseur du gel : il faut environ 1h15 pour un gel de 0,75 mm d'épaisseur et 2h30 pour un gel deux fois plus épais.

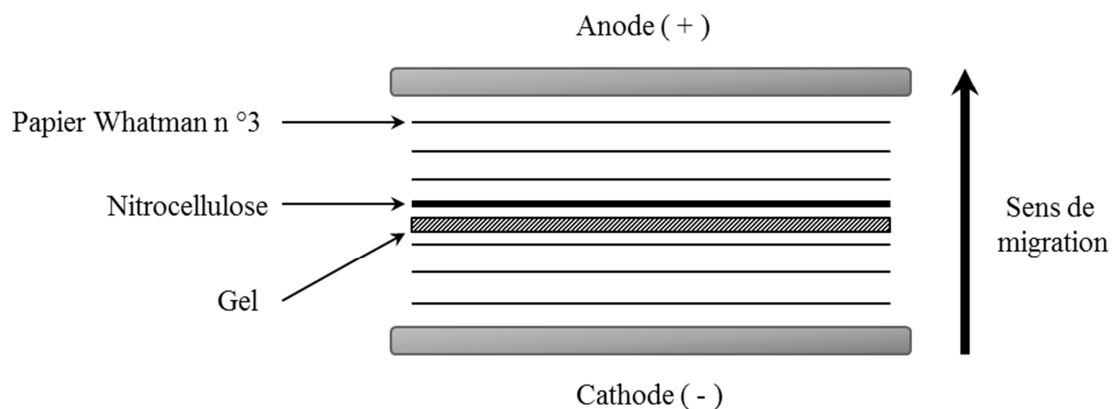


Figure 18: Représentation schématique du « sandwich » utilisé pour le transfert semi-sec des protéines.



### V.2.2. Révélation des protéines par chimiluminescence

A la fin du transfert, les sites libres de la membrane de nitrocellulose sont saturés avec une solution de lait écrémé à 1% (p/v) dans un tampon constitué de TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7,5) additionné de Tween 20 0,05% (p/v) pendant 45 minutes à température ambiante sous agitation lente. Après plusieurs lavages en TBS/Tween 0,05% (p/v), la membrane de nitrocellulose est incubée en présence de l'anticorps primaire (dilution appropriée dans le même tampon) pendant 1h15 à température ambiante sous agitation lente. Elle est ensuite rincée abondamment. Un anticorps secondaire (spécifiquement dirigé contre les Ig de l'espèce animale utilisée pour produire l'anticorps primaire) est ajouté pendant 45 min. Cet anticorps secondaire est couplé à une enzyme, la peroxydase (HRPO). La révélation finale est effectuée par chimiluminescence (ECL) (Kit ECL western blotting, *Amersham Biosciences*) après des lavages abondant en TBS/Tween 0,05% (p/v). La luminescence est définie par une émission de lumière résultant de la dissipation de l'énergie d'une substance dans un état excité. En chimiluminescence, l'excitation est le résultat d'une excitation chimique. Le système HRPO / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalyse l'oxydation du luminol en conditions alcalines. Le luminol, une fois oxydé, est dans un état excité. Son retour à un état basal s'accompagne d'une émission de lumière. Cette lumière peut être amplifiée en présence de phénol qui optimise l'oxydation de luminol par la peroxydase. La lumière émise est détectée à l'aide d'une caméra.

**Tableau 5: Anticorps secondaires (couplés à une peroxydase) utilisés pour la révélation des immunoblots.**

Anticorps	Dilution
IgG-HRP d'âne anti-chèvre (Santa Cruz Biotechnology)	1/5000
IgG-HRP d'âne anti-lapin (GE healthcare)	1/5000
IgG-HRP de mouton anti-souris (GE healthcare)	1/5000

### V.2.3. Analyse densitométrique du signal émis

Le signal de luminescence émis au niveau d'une bande protéique peut être quantifié par densitométrie. Cette méthode est semi-quantitative. Cette procédure est réalisée sur un ordinateur à l'aide du logiciel Image Lab (Bio-Rad Laboratories). Le signal d'une bande d'intérêt est délimité par une zone de quantification directement tracée sur l'image de révélation ECL. Pour cela, l'image doit être propre avec un bruit de fond très clair et les bandes de signal ne doivent pas être saturées. Le logiciel va donner une valeur

densitométrique (proportionnelle au nombre de photons émis) pour la bande d'intérêt. Cette valeur est normalisée en faisant un ratio avec la valeur densitométrique d'une bande contrôle présente de la même façon dans tous les échantillons (une protéine présente en quantité identique dans tous les échantillons). Cette analyse permet de comparer les niveaux d'expression des protéines détectées en fonction des conditions de préparation des échantillons.

### **V.3. Mesure de l'activité NADPH oxydase dans les cellules**

#### **V.3.1. Par chimiluminescence**

La mesure de l'activité NADPH oxydase par luminescence est particulièrement sensible et permet de déterminer l'activité NADPH oxydase des cellules entières après stimulation. Elle est effectuée à l'aide d'un luminomètre (Luminoskan, labsystem). Les cellules sont mises en suspension dans le tampon PBS à la concentration de  $1 \times 10^7$  cellules/mL pour les PMN ou  $2 \times 10^7$  cellules/mL pour les synoviocytes. Les cellules ( $50 \mu\text{L}$ /puits) sont déposées dans une plaque de 96 puits. Les éléments nécessaires à cette réaction sont apportés par l'addition, dans chaque puits, de  $200 \mu\text{L}$  de PBS contenant  $0,5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0,9 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $20 \text{ mM}$  glucose,  $20 \mu\text{M}$  de luminol,  $10 \text{ U / mL}$  de peroxydase. La plaque est incubée à  $37^\circ\text{C}$  pendant 1 min puis les cellules sont stimulées par un ester de phorbol, le PMA ( $130 \text{ nM}$ ) ; un composé ionophore, la ionomycine ( $2 \mu\text{M}$ ) ; ou bien un tripeptide formylé, le fMLP ( $100 \text{ nM}$ ). Le principe de la mesure est le suivant : les ions superoxydes produits par les cellules sont capables d'exciter le luminol. En revenant à son état stable, le luminol émet de la lumière directement proportionnelle à l'activité NADPH oxydase des cellules testées. L'activité est mesurée toutes les 15 secondes pendant 30 ou 60 min. Elle est exprimée par la somme des RLU (Relative Luminescence Unit) obtenues.

#### **V.3.2. Par fluorimétrie (Amplex red)**

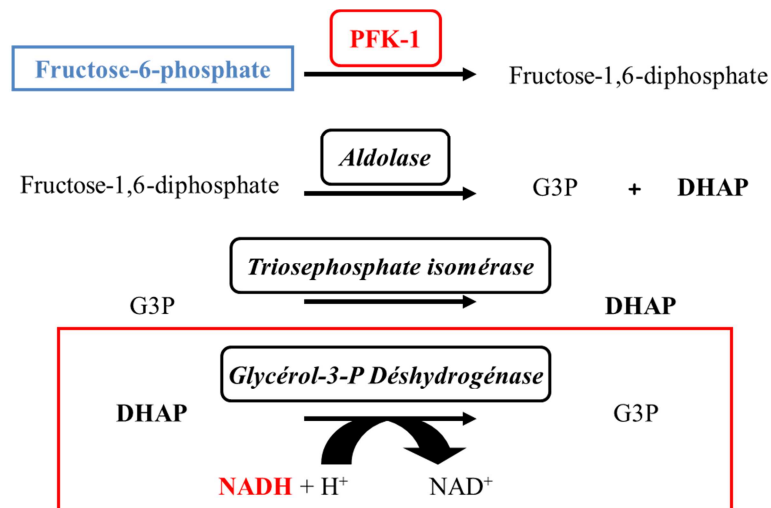
L'Amplex Red (Invitrogen) est une molécule fluorogène qui, en présence de peroxydase, est oxydée stoechiométriquement par le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pour donner la résorufine, un composé fluorescent qui absorbe à  $571 \text{ nm}$  et émet à  $585 \text{ nm}$ . Le peroxyde d'hydrogène, diffuse librement à travers les membranes cellulaires : cette méthode permet de mesurer une production totale du  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les cellules ( $5 \times 10^5$  cellules /  $20 \mu\text{L}$  de PBS) sont mises en présence de  $100 \mu\text{L}$  de milieu commun contenant  $0,1 \text{ U/mL}$  de HRP et  $50 \mu\text{M}$  d'Amplex® red en PBS (selon les spécifications du fabricant). La cinétique de fluorescence est suivie à

raison d'une lecture par minute pendant 1 à 2 h à l'aide d'un fluorimètre Fluostar Omega (BMG Labtec). Grâce à une gamme étalon de  $\text{H}_2\text{O}_2$  allant de 0 à 10  $\mu\text{M}$ , la quantité de  $\text{H}_2\text{O}_2$  totale produite par les cellules peut être ainsi calculée

## V.4. Mesure de l'activité glycolytique des cellules

### V.4.1. Mesure de l'activité PFK-1 (ajout de substrat)

La mesure de l'activité PFK-1 en présence d'un excès de substrat a été mesurée pour vérifier que la PFK-1 fonctionnait de la même façon quel que soit le traitement des cellules. Des lysats cellulaires (800  $\mu\text{g}$ ) réalisés à l'aide d'un tampon spécifique (Tris-HCl 500 mM pH 7,5, leupeptine 1,8  $\mu\text{M}$ , pepstatine 1,5  $\mu\text{M}$ , TLCK 10  $\mu\text{M}$ , Nonidet P40 0,5 % (v/v)) sont dilués dans un tampon réactionnel (Tris-HCl 50 mM pH 8, ATP 1 mM,  $\text{MgSO}_4$  2 mM, NADH 0,2 mM, DTT 5 mM, fructose-6-phosphate 2 mM) auquel on ajoute de l'aldolase (0,2 U), de la triose-phosphate isomérase (TIM) (10 U) et de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GDH) (10 U). La mesure est effectuée à 37 °C avec 800  $\mu\text{g}$  de lysats cellulaires de PLB-985 différenciées ou de neutrophiles humains. L'activité PFK-1 est mesurée indirectement par la mesure d'absorbance à 340 nm, longueur d'onde à laquelle le NADH absorbe la lumière (Figure 19).



**Figure 19: Principe du dosage de l'activité de la PFK-1.** La PFK-1 transforme le fructose-6-phosphate (F<sub>6</sub>P) en fructose-1,6-diphosphate (F<sub>1,6</sub>P). Le F<sub>1,6</sub>P est transformé par l'aldolase en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et en dihydroxyacétone-phosphate (DHAP). Le G3P est directement pris en charge par la triose-phosphate isomérase qui le transforme en DHAP. DHAP est transformé par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GDH) en G3P avec consommation d'une molécule de NADH. L'activité PFK-1 est proportionnelle à l'oxydation du NADH, qui est suivie par la diminution d'absorbance du NADH à une longueur d'onde de 340 nm (Beckman, DU 640 spectrophotometer).

$$AT = \frac{\Delta A/\text{min} \times 1000 \times VT}{2 \times \epsilon \cdot l \times Pe} = UI$$

AT	Activité totale en UI/L (ou $\mu\text{M} / \text{min}$ )
$\Delta A/\text{min}$	Variation de l'absorbance par min
$\epsilon$	Coefficient d'extinction moléculaire du NADH à 340 nm ( $6,3 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )
l	Longueur du trajet optique (1 cm)
Pe	Volume de l'échantillon introduit dans la cuve ( $\mu\text{L}$ )

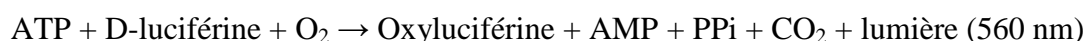
*Remarque : Signification du chiffre multiplicatif 2 ; pour 1 mole de fructose-6-phosphate transformée il y a 2 moles de NADH oxydées.*

#### V.4.2. Mesure de la vitesse de réaction catalysée par la PFK-1

La vitesse de la réaction catalysée par la PFK-1 sans ajout de substrat reflète la production de fructose-1,6-diphosphate dans la cellule. Elle est directement proportionnelle à l'activité glycolytique des cellules. L'expérience est semblable à la précédente hormis le tampon réactionnel qui ne contient pas de fructose-6-phosphate (Tris-HCl 50 mM pH 8, ATP 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, NADH 0,2 mM, DTT 5 mM).

#### V.5. Mesure de la concentration d'ATP dans les cellules.

La concentration cytosolique en ATP a été mesurée à l'aide du kit ENLITEN® ATP Assay system en suivant le protocole établi par le fabricant. Une gamme étalon d'ATP est réalisée avec des concentrations d'ATP allant de  $1 \times 10^{-7}$  à  $1 \times 10^{-11}$  M. Les fractions cytosoliques (10  $\mu\text{L}$  à 0,5 mg/mL) sont diluées dans 50  $\mu\text{L}$  de milieu de réaction Luciférase recombinante/Luciférine (luciférase et D-luciférine purifiée, EDTA, BSA, Mg(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, DTT et tris-acetate pH 7,75) pour détecter rapidement et quantitativement l'ATP. Ce milieu réactionnel est reconstitué avec un tampon salin. La mesure est effectuée par chimiluminescence dans une plaque 96 puits et suit la réaction de bioluminescence suivante :



La réaction de bioluminescence a lieu grâce à une activation préalable de la luciférine par l'hydrolyse d'ATP qui donne de l'AMP, et permet l'oxydation de la luciférine en Oxyluxiférine par la luciférase avec émission d'un photon. Quand l'ATP est le composant

limitant dans la réaction impliquant la luciférase, l'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la quantité d'ATP dans l'échantillon. L'émission de lumière est mesurée avec un luminomètre (luminoskan, labsystem) à température ambiante après 2 secondes de délai avec 2 secondes de temps d'intégration.

## **VI. Méthode de biologie moléculaire**

### **VI.1. Extraction des ARN totaux**

La manipulation consiste à extraire les ARN totaux des cellules (ARN messagers, ARN de transfert et ARN ribosomal). La manipulation se déroule sous hotte chimique avec port de gant en latex obligatoire. Le protocole se divise en plusieurs étapes :

- Homogénéisation :

Les PMN sont sédimentés par centrifugation. Du TRIzol (GIBCO) (1 mL pour  $1 \times 10^8$  à  $2 \times 10^8$  cellules) contenant du thiocyanate de guanidium est ajouté et va entraîner la lyse des cellules en dissociant tous les composants cellulaires, en inhibant par la même occasion l'action des RNAses et DNAses intracellulaires.

- Séparation de phase :

Du chloroforme est ajouté à la préparation à raison de 0,2 mL pour 1 mL de TRIzol ajouté. Le chloroforme va dégrader les lipides et augmenter la pureté des ARN. Les préparations sont agitées 15 secondes au vortex puis centrifugées à 10 000 g pendant 15min à 4°C. Les ARN totaux sont récupérés dans la phase aqueuse supérieure (la phase inférieure organique phénol-chloroforme contient l'ADN et les protéines).

- Précipitation des ARN :

Les ARN extraits précipitent dans l'isopropanol (0,5 mL pour 1 mL de TRIzol), 10 min à température ambiante et sont récupérés par centrifugation 10 000 g pendant 10 min à 4 °C.

Le culot d'ARN (blanc) est lavé avec de l'éthanol 70% sous forte agitation, puis centrifugé à 10 000 g pendant 10 min à 4 °C. Il est ensuite séché à l'air et remis en suspension dans 34 µL d'eau distillée autoclavée dont 4 µL serviront à l'évaluation de la pureté de l'ARN ainsi que la mesure de sa concentration dans l'échantillon recueillie.

- Evaluation de la pureté de l'ARN :

Des mesures d'absorbance à 260 nm sont effectuées sur les échantillons d'extraction pour quantifier les acides nucléiques. La mesure de l'absorbance à 280 nm permet d'évaluer la contamination protéique. La pureté de l'ARN est calculée en faisant le rapport :

**$A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$  (rapport compris entre 1,5 et 2 = pur)**

Pour cette mesure, 4  $\mu\text{L}$  d'échantillon d'ARN sont dilués dans 1 mL d'eau distillée autoclavée (dilution 1/250).

- Mesure de la concentration en ARN :

A partir de la mesure précédente, il est possible de déterminer la concentration de l'échantillon d'ARN :

$$A_{260} = 1 \text{ pour } [\text{ARN}] = 40 \mu\text{g/mL}$$

(Cette formule est valable uniquement pour une dilution au 1/250<sup>ème</sup> de l'ARN)

## **VI.2. Transcription inverse (RT)**

Les ARN sont transcrits en ADN complémentaires grâce à la transcriptase inverse extraite du rétrovirus de la myéloblastose aviaire (AMV-RT), commercialisée par la société Roche. Le milieu réactionnel est préparé de la façon suivante :

- Tampon de réaction 10 X	2 $\mu\text{L}$
(Tris-HCL 50mM pH 8,3, MgCl <sub>2</sub> 6mM, KCl 40mM)	
- MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2 $\mu\text{L}$
- Mix dNTP	2 $\mu\text{L}$
- Inhibiteur des RNase	1 $\mu\text{L}$
- AMV-RT	0,8 $\mu\text{L}$
- ARN	2 $\mu\text{g}$
- Eau distillée stérile (qsp)	20 $\mu\text{L}$

Le milieu réactionnel est incubé 10 min à 25°C pour l'hybridation des dNTPs avec l'enchaînement poly A des ARNm, puis 1 h à 42°C pour la transcription des ARN en ADN complémentaire simple brin. La réaction est arrêtée en dénaturant l'enzyme (5 min à 99 °C).

## **VI.3. Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

La méthode de PCR permet l'amplification du nombre de copies d'une séquence nucléotidique donnée à partir d'une très faible quantité d'ADN. Cette technique, basée sur les propriétés de répllication de l'ADN par l'ADN polymérase, se fait par une répétition de cycles de température à l'aide d'un thermocycleur. La double hélice de l'ADN est tout d'abord

dénaturée 10 min à 95 °C. Après la dénaturation, l'ADN alors devenu simple brin est hybridé aux amorces (séquences oligonucléotidiques complémentaires situées aux extrémités 5') et l'ADN polymérase termine le cycle par une étape d'élongation de la séquence qui se fait à 72 °C. L'étape d'hybridation s'effectue à une température spécifique pour chaque séquence à amplifier et peut se calculer selon la formule suivante :

$$\text{Température d'hybridation (°C)} = 2(\text{A+T}) + 4(\text{G+C})$$

Une PCR s'effectue par 30 à 35 cycles d'amplification. Chaque cycle est constitué d'une étape de dénaturation (95 °C pendant 1 min), puis d'une étape d'hybridation (à température spécifique des amorces pendant 1 min) et finalement d'une étape d'élongation (72°C pendant 1 min 30). A la fin des cycles, une élongation supplémentaire de 10 min est effectuée.

L'amplification des séquences d'intérêt va être assurée par la *Taq* polymérase, isolée de la bactérie thermophile *Thermusaquaticus*. Cette polymérase a la particularité d'être rapide, mais elle peut commettre des erreurs dans l'enchaînement des nucléotides. Il existe d'autres polymérases, comme la *Pfu* polymérase, isolée de la bactérie thermophile *Pyrococcusfuriosus*. Celle-ci est beaucoup plus lente que la précédente mais à l'avantage d'être plus fidèle. Elle sera utilisée si une étape de séquençage a lieu ensuite. Ici la PCR est utilisée pour mettre en évidence les transcrits des Nox et de leur partenaire dans les synoviocytes : c'est la *Taq* polymérase qui a été utilisée pour l'amplification.

Le mélange réactionnel contient : 4 µL de désoxynucléosides triphosphates (mélange de dATP, dTTP, dCTP, dGTP à 10 mM), soit 0,8 mM, en présence des amorces spécifiques de la séquence d'ADNc à amplifier (Tableau 6), de l'ADN polymérase thermorésistante (0,5 µL de *Taq*) et de 1 µL d'ADNc complété à un volume final de 50 µL avec un tampon de réaction 1 X (Tris 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM pH 8,3).

Programme du thermocycleur (Bio-Rad, Icycler) :

- Etape 1                            4 min à 95 °C (dénaturation de l'ADN)
- Etape 2 (35 cycles)            1 min à 95 °C  
   1 min à X °C (hybridation des amorces)  
   1 min 30 à 72 °C (polymérisation : *Taq* polymérase)
- Etape 3                            10 min à 72 °C
- Etape 4                            Conservation à 4 °C

**Tableau 6: Couples d'amorces utilisés pour les amplifications avec leur séquence, leur température d'hybridation et la taille du fragment d'ADN amplifié.**

Couple amorces	Sens	Séquence	T ° hybridation	Taille (pb)
<i>Nox2</i>	5'	ATAAGCAGGAGTTTCAAGAT	55 °C	600
	3'	GAAGTTTTCTTGTGAAAATGAAATG		
<i>Nox4</i>	5'	CAGCAAGATACCGAGATG	55 °C	400
	3'	CTGGCTTATTGCTCCGGA		
<i>p22<sup>phox</sup></i>	5'	CGCTGGCGTCCGGCCTGATCCTCA	60 °C	300
	3'	ACGCACAGCCGCCAGTAGGTAGAT		
<i>p40<sup>phox</sup></i>	5'	ATGGCTGTGGCCCAGCAGCT	62 °C	600
	3'	GCGGTCAAGGCTGTTGCCCT		
<i>p47<sup>phox</sup></i>	5'	GAGCACTGGAGGCCACCCAGT	60 °C	300
	3'	GTTTTATGGAAGCTCGTAGATCTCG		
<i>p67<sup>phox</sup></i>	5'	TGTCTTGAAGAAGGGC	58 °C	800
	3'	GACTTCTCTCCGAGTGCTTTC		
<i>Actine</i>	5'	ATCTGGACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG	55 °C	800
	3'	CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCT		

#### VI.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Du fait de leurs charges négatives portées par les groupements phosphates, les fragments nucléotidiques d'ADNc peuvent être séparés en fonction de leur taille dans un courant électrique sur gel d'agarose. L'agarose 1 % (p/v) est dissout au four micro-ondes dans du tampon TAE 0,5 X (Tris acétate 20mM, EDTA 0,5mM pH 8), puis 0,01 % (p/v) de bromure d'éthidium (BET) sont ajoutés. Les échantillons sont alors dilués avec 1/5<sup>ème</sup> de tampon d'échantillonnage 6 X (formamide 80% (v/v), bleu de bromophénol 20% (v/v)). Ils sont ensuite déposés dans les puits du gel d'agarose préalablement placé dans l'appareil d'électrophorèse rempli de tampon TAE 0,5 X. La migration s'effectue pendant 20 min environ sous une tension de 100 V. La détection des fragments d'ADN se fait par exposition aux U.V qui vont exciter le BET, intercalé entre les bases azotées de l'échantillon d'ADN. Ainsi, la taille des fragments amplifiés par PCR peut être contrôlée. Cette méthode permet de savoir si le transcrit du gène d'intérêt est présent dans les cellules analysées.



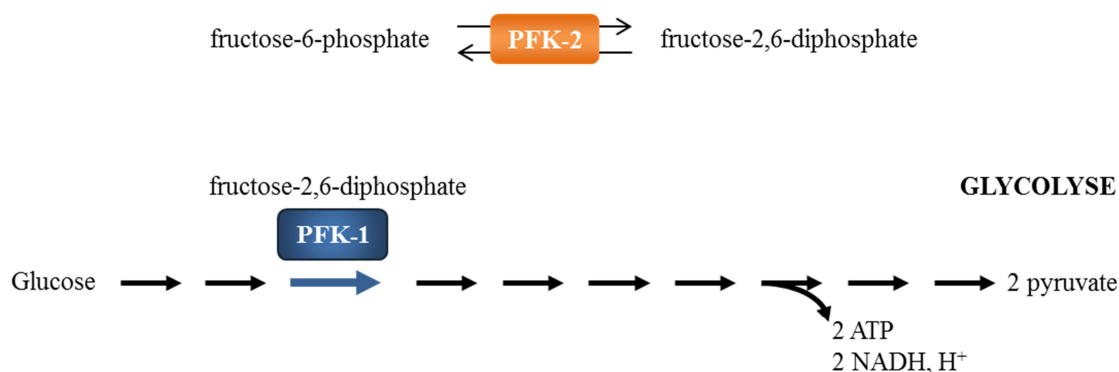
## **VII. Analyse statistique**

Les données représentées sur les histogrammes sont été exprimées par la moyenne d'au moins 3 expériences +/- SD. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le test t non-apparié. Les résultats sont reportés à l'aide d'un astérisque (\*) quand ils sont significativement différents ( $P < 0,05$ ) des contrôles.

# Résultats

## I. Etude de la régulation de l'activité NADPH oxydase : rôle de la PFK-2

La PFK-2 est une enzyme bifonctionnelle qui possède un domaine d'activité kinase et un domaine d'activité phosphatase. Sous sa forme kinase, elle catalyse la formation de fructose-2,6-diphosphate à partir du fructose-6-phosphate (Figure 20). Sous sa forme phosphatase elle catalyse la réaction inverse.



**Figure 20: L'activation de la PFK-1 favorise la glycolyse.** La PFK-2 est indirectement impliquée dans l'activation de la glycolyse dans les cellules. Sous sa forme kinase, elle catalyse la formation du fructose-2,6-diphosphate, activateur allostérique de la PFK-1. Il en résulte l'activation de la glycolyse.

Dans une étude précédente réalisée au laboratoire, la PFK-2 sous sa forme phosphorylée a été retrouvée associée au complexe de la NADPH oxydase dans les neutrophiles humains, il a été également été montré que :

- La PFK-2 est présente dans le complexe de la NADPH oxydase isolé sous une forme constitutivement active à partir des PMN. D'autre part, elle co-immunoprécipite avec les facteurs cytosoliques activateurs de la NADPH oxydase dans les PMN activés.
- Sur le plan cellulaire, la PFK-2, qui est une enzyme cytosolique, co-localise avec Nox2 membranaire dans les cellules PLB-985 différenciées en pseudo-neutrophiles.
- Sur le plan fonctionnel, la déplétion en PFK-2 des cellules PLB-985 différenciées par un traitement avec des siRNA spécifiques se traduit par une diminution de l'activité NADPH oxydase des cellules en réponse à un stimulus.

Dans cette partie, des inhibiteurs pharmacologiques de kinases ont été utilisés pour mieux déterminer le rôle de la PFK-2 phosphorylée dans l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire.

## **I.1. Expression et activation de la PFK-2 dans les PMN**

Dans les neutrophiles, c'est l'isoforme cardiaque de la PFK-2 qui est exprimée. Celle-ci diffère de l'isoforme hépatique. En effet, la PFK-2 dans le cœur a une partie C-terminale plus importante et est donc plus grande que dans le foie. De plus, l'isoforme cardiaque dispose de sites de phosphorylations supplémentaires situés sur les sérines 466 et 483 de sa séquence peptidique. L'activité des deux isoformes va différer en fonction des événements de phosphorylations. Ainsi, sous leur forme phosphorylée, les isoenzymes hépatiques et cardiaques auront des activités différentes mais adaptées au contexte physiologique du tissu dans lequel elles se trouvent. Dans le foie, la PFK-2 phosphorylée aura une activité phosphatase en faveur de la gluconéogénèse alors que dans le cœur, la PFK-2 phosphorylée aura une activité kinase en faveur de la glycolyse.

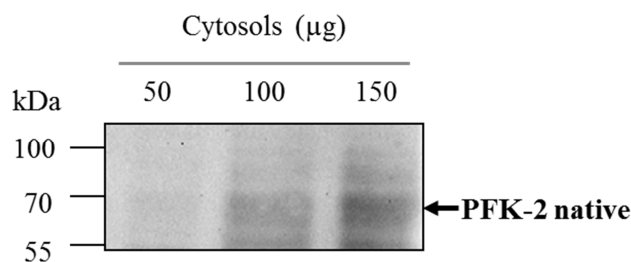
A ce jour, rien n'est encore connu sur la PFK-2 dans les PMN. Nous nous sommes intéressés au lien de cette enzyme avec l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire et sur le métabolisme énergétique des cellules.

- Dans un premier temps, l'expression de la PFK-2 native a été analysée dans les cellules PLB-985 différenciées en pseudo-neutrophiles.
- Dans un second temps, la phosphorylation de la PFK-2 a été évaluée après activation des cellules en réponse au PMA, à la ionomycine ou au le fMLP.

### **I.1.1. Expression de la PFK-2**

L'expression de la PFK-2 dans les cellules PLB-985 différenciées a été analysée par Western blot. Pour cela, des fractions cytosoliques ont été préparées à partir des cellules PLB-985 après 6 jours de différenciation en granulocytes. Les échantillons sont analysés par immunoblot. L'immuno-détection de la PFK-2 native est réalisée avec l'anticorps polyclonal de chèvre commercialisé par la société Santa Cruz Biotechnology.

L'analyse de quantités croissantes de cytosol par immunoblot montre une bande diffuse inférieure à 70 kDa, dont l'intensité augmente avec la quantité de cytosol déposé (Figure 21). Des bandes de taille inférieure sont également retrouvées suggérant une dégradation protéique ou le marquage non-spécifique par l'anticorps d'autres protéines du cytosol.

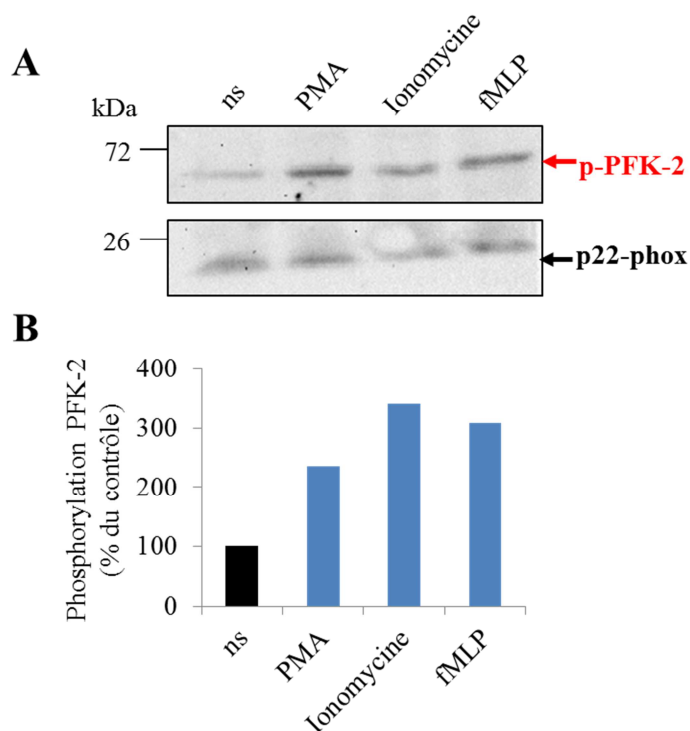


**Figure 21: Mise en évidence de la PFK-2 dans les cellules PLB-985 différenciées.** Western blot de la PFK-2 native sur des cytosols de cellules PLB-985 différenciées ( $5 \times 10^7$  cellules/mL). L'immunodétection est réalisée à l'aide de l'anticorps anti-PFK-2 native (Santa Cruz Biotechnology, inc) dilué au 1/500. Celui-ci est révélé avec un anticorps d'âne anti-IgG de chèvre (GE, Healthcare®) dilué au 1/5000 et couplé à une peroxydase (HRPO).

### I.1.2. Phosphorylation de la PFK-2 en réponse à une stimulation cellulaire

L'activation de l'isoenzyme cardiaque de la PFK-2 se traduit par la phosphorylation des résidus sérines, en particulier Ser<sup>466</sup> (Deprez *et al.*, 1997). Tout d'abord, nous avons évalué l'effet de la stimulation des cellules PLB-985 différenciées sur la phosphorylation de la PFK-2. L'expérience a été réalisée par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-phospho-PFK-2 spécifique de la sérine 466. L'analyse a été réalisée sur des lysats de pseudo-neutrophiles. Les cellules ont préalablement été stimulées avec du PMA, de la ionomycine ou bien du fMLP. La phosphorylation de la PFK-2 dans ces cellules a été comparée à des lysats de pseudo-neutrophiles non-stimulés (ns) (Figure 22).

La PFK-2 sous sa forme phosphorylée est détectée entre 55 et 70 kDa par l'anticorps reconnaissant la phosphorylation en Ser<sup>466</sup>. La figure 22 montre une augmentation de la phosphorylation de la PFK-2 dans les cellules stimulées, quel que soit le stimulus utilisé (PMA, ionomycine ou fMLP).



**Figure 22: Effet de la stimulation des cellules PLB-985 différenciées sur la phosphorylation de la PFK-2.** Les pseudo-neutrophiles sont ajustés à  $5 \times 10^7$  cellules/mL. Ils sont incubés en présence de DMSO 0,1% pendant 30 min à 37 °C. Les cellules sont sédimentées par centrifugation (350 g / 10 min / 20 °C) puis lavées avec du tampon PBS. Elles sont divisées en 4 groupes : non stimulées (ns), PMA (130 nM), ionomycine (2 mM) et fMLP (100 nM). Dans chaque groupe la concentration est ajustée à  $2 \times 10^6$  cellules/mL dans du tampon PBS+. La stimulation est effectuée pendant 5 min à 37 °C. Après cela, des lysats totaux sont réalisés. (A) analyse des lysats cellulaires par Western blot (50 µg par dépôt) avec l'anticorps anti-p-PFK-2 (Ser 466) (Santa Cruz Biotechnology, Inc) dilué au 1/500. Ce dernier est mis en évidence à l'aide d'un anticorps d'âne reconnaissant les IgG de lapin (GE, Healthcare®) dilué au 1/5000. (B) Histogrammes correspondant à l'analyse densitométrique de la phosphorylation de la PFK-2 du Western blot présenté en A. L'expression de la PFK-2 phosphorylée a été normalisée par rapport à l'expression de p22-phox, détectée à l'aide de l'anticorps monoclonal 16G7. Celui-ci est mis en évidence avec un anticorps d'âne (1/5000) reconnaissant les IgG de souris. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle DMSO 0,1% non-stimulé. Les données des histogrammes sont représentatives de trois expériences réalisées sur des préparations indépendantes.

## I.2. Rôle de la PKA dans l'activation de la PFK-2

### I.2.1. Généralités

#### a. PKA et phosphorylation de la PFK-2

Dans le foie, le glucagon stimule la PKA, qui va phosphoryler la Ser<sup>32</sup> de l'isoenzyme hépatique de la PFK-2. Il en résulte l'inactivation de la PFK-2 au profit de l'activation de la phosphatase FBPase-2 (Rider *et al.*, 2004) en favorisant la gluconéogenèse. Il en est tout autrement dans le cœur: l'insuline va stimuler la glycolyse par une augmentation du transport du glucose puis l'activation de la PFK-2 cardiaque. La phosphorylation de la PFK-2 est assurée par plusieurs kinases et majoritairement par la PKA (El-Maghrabi *et al.*, 1982). En

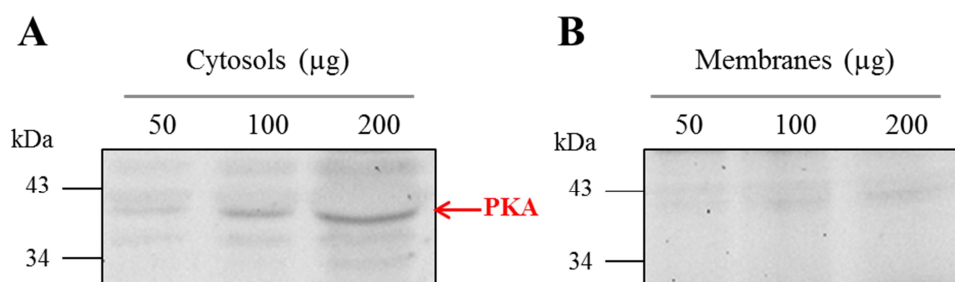
effet, celle-ci va prendre en charge les résidus Ser<sup>466</sup> et Ser<sup>483</sup> de la PFK-2 et participe donc à l'activation de l'isoenzyme dans le cœur (Rider *et al.*, 2004).

### b. PKA et activation de la NADPH oxydase

Lors de l'activation des PMN, le cytochrome *b*<sub>558</sub> ainsi que les facteurs cytosoliques sont phosphorylés par des protéines kinases. Ces phosphorylations sont primordiales pour l'activation du complexe de la NADPH oxydase sans quoi la production de ROS serait impossible. Dans les PMN, lors de la stimulation des cellules, p47-phox va être phosphorylée par la PKC (5 résidus sérine) et par la PKA (3 voire 4 résidus sérine). Cependant, l'action de la PKA seule ne permet pas l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire. En effet, dans certaines conditions l'augmentation de l'AMPc dans les PMN peut inhiber la production de ROS. La PKA semble être un régulateur négatif de la NADPH oxydase en inhibant l'assemblage du complexe (Kramer *et al.*, 1988).

### I.2.2. Expression de la PKA dans les PMN

L'expression de la PKA dans les PMN a été analysée par Western blot sur des échantillons de cytosols et de membranes de PMN humains. Les résultats obtenus montrent que la PKA (40 kDa) est présente dans le cytoplasme (Figure 23A) des PMN et est absente de la membrane (Figure 23B).

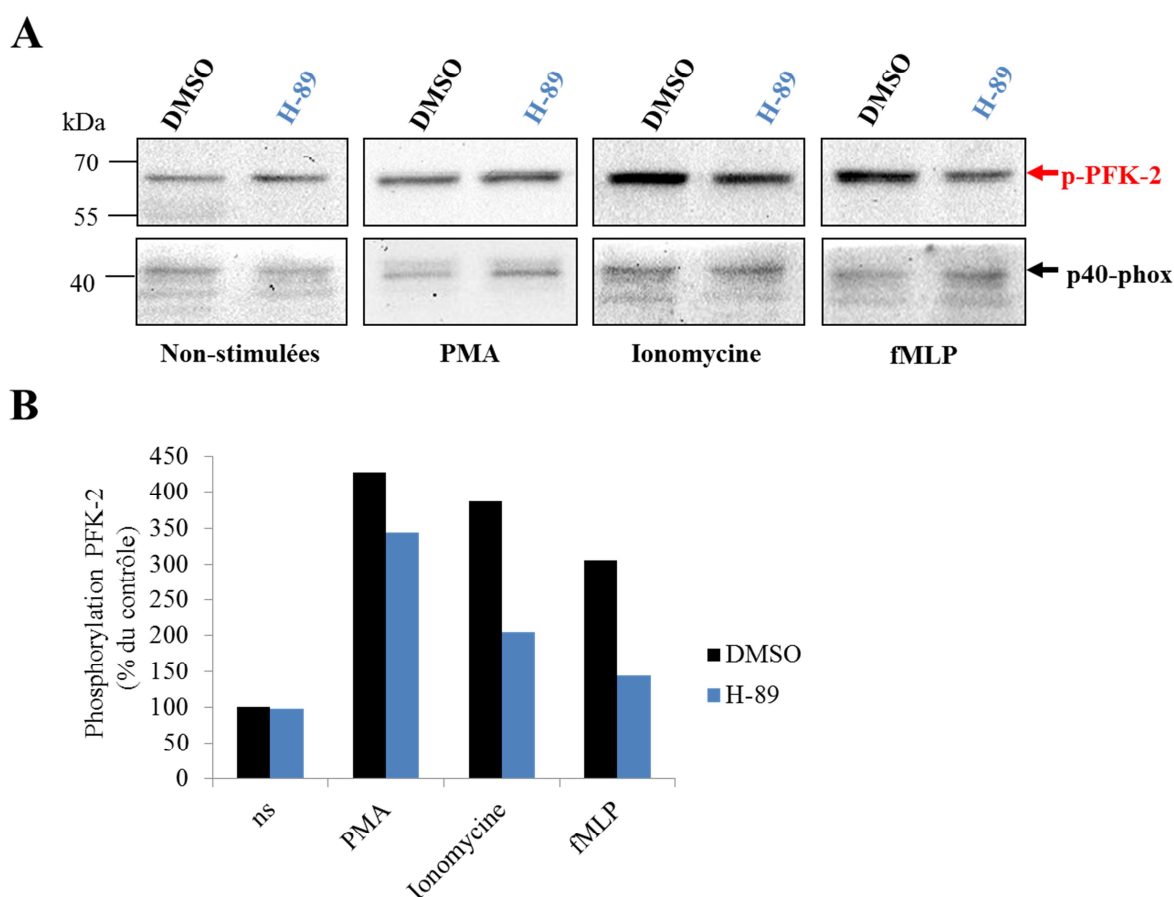


**Figure 23: Analyse de l'expression de la PKA dans les PMN.** Western blot de la PKA réalisé sur un échantillon de cytosol (A) et un échantillon de membrane (B) de PMN. L'immunodétection de la PKA est effectuée avec l'anticorps anti-PKA (Santa Cruz Biotechnology, inc) dilué au 1/500. Celui-ci est révélé à l'aide d'un anticorps d'âne anti-IgG de lapin (GE, Healthcare®) dilué 1/5000 couplé à une peroxydase (HRPO).

### I.2.3. Impact de la PKA sur l'activation de la PFK-2 dans les pseudo-neutrophiles

Dans un premier temps, l'implication de la PKA dans la phosphorylation de la PFK-2 a été étudiée dans les cellules PLB-985 différenciées en pseudo-neutrophiles. Pour cela, les cellules ont été incubées en présence de l'inhibiteur pharmacologique de la PKA, H-89 (10 µM) avant d'être stimulées avec le PMA (130 nM), la ionomycine (2 µM) ou le fMLP (100 nM). Les

cellules sont fractionnées en cytosol et membranes. Les échantillons de cytosol sont préparés et séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 10 %. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, le degré de la phosphorylation de la PFK-2 est analysé par Western blot avec l'anticorps anti-phosphoPFK-2 spécifique de la sérine 466 (Santa Cruz Biotechnology). Une augmentation très nette de la phosphorylation de la PFK-2 est observée dans les cellules stimulées quel que soit le stimulus employé (PMA, ionomycine, fMLP) (Figure 24B).



**Figure 24: Analyse de la phosphorylation de la PFK-2 dans les cellules PLB-985 différenciées.** Les cellules ( $5 \times 10^7$  cellules/mL) sont incubées en présence de DMSO (0,1 %) ou de H-89 (10  $\mu$ M) pendant 30 min à 37 °C. Après centrifugation (350 g / 10 min / 20 °C) et lavage avec du PBS, les cellules sont divisées en quatre groupes : non stimulées (ns), PMA (130 nM), ionomycine (2  $\mu$ M) et fMLP (100 nM). La concentration cellulaire est préalablement ajustée à  $2 \times 10^6$  cellules/mL et la stimulation est effectuée pendant 5 min à 37 °C. Une fois la stimulation terminée, les cellules sont fractionnées. Les cytosols sont utilisés pour effectuer des Western blot de la PFK-2 phosphorylée à raison de 100  $\mu$ g par dépôt (A). La PFK-2 phosphorylée a été détectée avec l'anticorps anti-pPFK-2 (Ser 466) (Santa Cruz Biotechnology, Inc) dilué au 1/500. (B) Histogrammes correspondant à l'analyse densitométrique de la phosphorylation de la PFK-2 des Western blots présentés en A. L'expression de la PFK-2 phosphorylée a été normalisée par rapport à l'expression de p40-phox, détectée à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-p40, développé au laboratoire. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle DMSO 0,1% non-stimulé. Les données des histogrammes sont représentatives de trois expériences réalisées sur des préparations indépendantes.

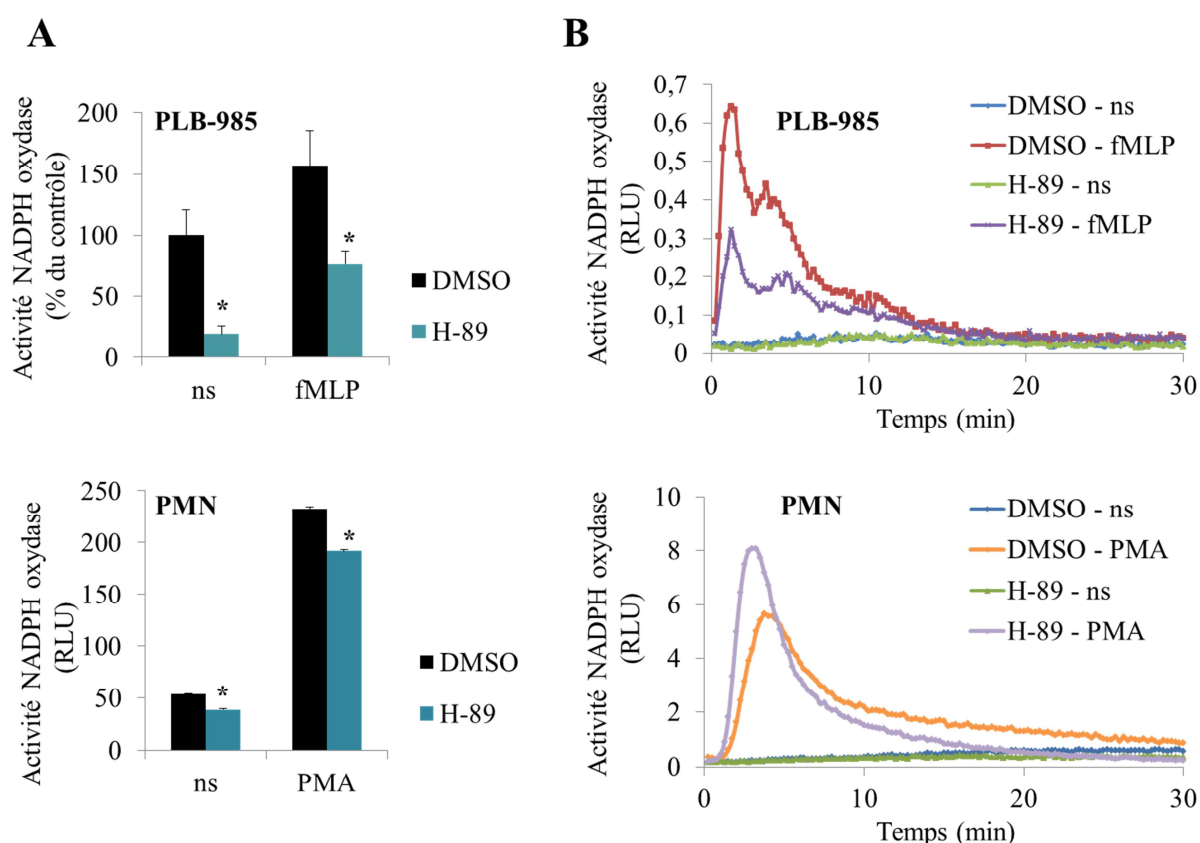
Ces résultats sont confirmés par l'analyse densitométrique des Western blots (Figure 24B). Le traitement des cellules avec l'inhibiteur pharmacologique de PKA (H-89) réduit fortement



la phosphorylation de la PFK-2 induite par la stimulation par la ionomycine ou le fMLP. La diminution de la phosphorylation est également observée avec les cellules stimulées par le PMA mais l'effet est moins important. L'analyse densitométrique du Western blot confirme la diminution de la phosphorylation de la PFK-2 observée dans les pseudo-neutrophiles traités avec l'inhibiteur de la PKA.

### I.2.4. Impact de l'inhibition de la PKA sur l'activité NADPH oxydase

La PKA est impliquée dans la phosphorylation de la PFK-2 dans les PMN stimulés. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent que la PFK-2 activée participerait à la régulation de l'activité NADPH oxydase. Des cellules PLB-985 différenciées ou des neutrophiles humains ont été traités avec l'inhibiteur pharmacologique de la PKA, H-89, puis stimulés avec le fMLP, un activateur physiologique de la NADPH oxydase. L'activité NADPH oxydase de ces cellules a été mesurée par chimiluminescence.



**Figure 25: Activité NADPH oxydase mesurée par chimiluminescence dans les cellules PLB-985 différenciées et les PMN.** Les cellules PLB985 différenciées (A) ou les PMN humains (B) sont incubés en présence de DMSO 0,1 % ou de H-89 10  $\mu$ M pendant 30 min 37 °C. La concentration cellulaire est ajustée à  $5 \times 10^7$  cellules/mL. Les cellules sont centrifugées (350 g / 10 min / 20 °C) puis lavées avec du PBS. L'activité NADPH oxydase des cellules est ensuite mesurée par chimiluminescence pendant 30 min. (A) Histogramme représentant l'activité NADPH oxydase totale des PLB-985-différenciées en pourcentage du contrôle, et des PMN humains en RLU. (B) Graphes correspondant à la cinétique de l'activité NADPH oxydase des PLB-985-différenciées et des PMN, exprimée en RLU. \* $P < 0,05$  (traitement DMSO comparé au traitement H-89). (n=3).

Dans les cellules PLB-985 différenciées, une diminution significative de la production de ROS en réponse à une stimulation par le fMLP est observée dans les cellules traitées par l'inhibiteur pharmacologique de la PKA (Figure 25A). Cette diminution est également visible dans les cellules non-stimulées.

L'inhibition de la PKA dans les PMN humains conduit également à une diminution faible mais significative de la production de ROS en réponse au PMA (Figure 25B), mais pas dans les cellules traitées par le fMLP. Si nous regardons la cinétique de production des ROS dans les PMN stimulés par le PMA après traitement par l'inhibiteur de la PKA, nous observons deux effets (Figure 25B) :

- Une production plus rapide et plus importante des ROS dans les premières minutes par rapport aux cellules non traitées.
- Une production qui s'arrête prématurément par rapport aux cellules non traitées.

### **I.3. Rôle d'autres kinases dans la phosphorylation de PFK-2**

#### **I.3.1. Généralités : autres kinases décrites**

D'autres kinases ont été décrites comme pouvant phosphoryler et donc activer l'isoenzyme cardiaque de la PFK-2. Nous avons étudié leur rôle dans la phosphorylation de la PFK-2 dans les PMN en réponse à des stimuli induisant l'activation de la NADPH oxydase.

##### **a. PKC**

Il a été démontré que l'isoenzyme cardiaque de la PFK-2 dans les cardiomyocytes de bovin est un substrat des PKC (Rider *et al.*, 2004) qui phosphorylent les sérines 84, 466 et la thréonine 475. La signification physiologique de la phosphorylation de la PFK-2 cardiaque par la PKC reste non-clarifiée. Néanmoins, toutes les isoformes de la PKC peuvent phosphoryler la sérine 466 activant ainsi la PFK-2. La PKC a aussi été décrite dans l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire, en effet cette kinase est responsable de la phosphorylation du facteur cytosolique p47-phox (Fontayne *et al.*, 2002). Cette donnée fait de la PKC une kinase très intéressante participant à la fois à la phosphorylation de la PFK-2 et à l'activité NADPH oxydase. C'est pourquoi, dans le cadre de notre étude, un inhibiteur pharmacologique des PKCs a été utilisé (Ro-31-8221) afin d'étudier le rôle de ces kinases dans la phosphorylation et l'activation de la PFK-2 dans les PMN.

### **b. p70<sup>s6k</sup>, MAPKAP kinase-1 et PKB**

Les kinases p70<sup>s6k</sup>, MAPKAP kinase-1 et la PKB ont également été montrées comme pouvant phosphoryler et activer l'isoforme cardiaque de la PFK-2 (Deprez *et al.*, 1997). Comme la PKA, la PKB et la MAPKAP kinase-1 vont phosphoryler les résidus Ser<sup>466</sup> et Ser<sup>483</sup> de la PFK-2, tandis que la p70<sup>s6k</sup> est plus spécifique de Ser<sup>466</sup> uniquement. Dans le cadre de l'activation des cardiomyocytes par l'insuline, il a été démontré que l'activation de la PFK-2 par la p70<sup>s6k</sup> et la MAPKAP kinase-1 était peu probable. Par contre, la PKB, étant activée elle-même par l'insuline, est une kinase de choix dans l'activation de la PFK-2 cardiaque. Un inhibiteur pharmacologique de la PKB (Akt inhibitor XIII) et un autre de la MEK (PD98059) ont été utilisés pour déterminer les rôles respectifs de ces kinases dans la phosphorylation et l'activation de la PFK-2 dans les PMN.

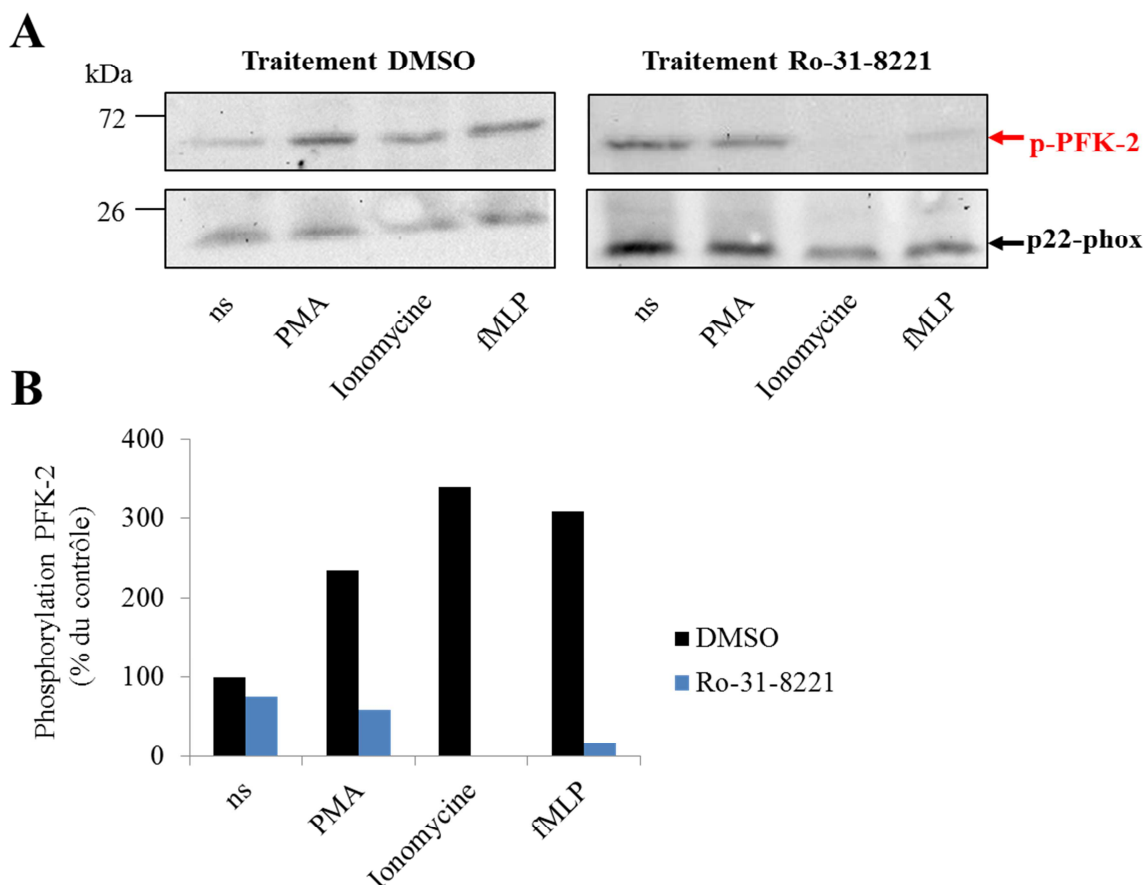
### **c. p38 MAPK**

Bien que cette kinase n'ait jamais été décrite dans la phosphorylation de la PFK-2, elle est impliquée dans l'activation de la NADPH oxydase. En effet, elle a été décrite dans la phosphorylation des facteurs cytosoliques p47-phox (El Benna, Han, *et al.*, 1996) et également p67-phox (Dang *et al.*, 2003) dans les PMN humains. Nous avons étudié son rôle éventuel dans l'activation de la PFK-2 dans les neutrophiles en utilisant l'inhibiteur SB202190.

## **I.3.2. Impact de ces kinases sur la phosphorylation de la PFK-2**

### **a. Inhibition de la PKC**

Les cellules PLB-985 différenciées ont été traitées avec l'inhibiteur pharmacologique de la PKC, Ro-31-8221 (Calbiochem, Gibbstown, USA) puis stimulées avec le PMA (130 nM), le fMLP (100 nM) ou la ionomycine (2 mM). La phosphorylation de la PFK-2 est comparée à celle obtenue dans les cellules contrôles traitées avec DMSO 0,1 % (v/v) puis stimulées dans les mêmes conditions. Les résultats montrent que le traitement des cellules par l'inhibiteur de la PKC entraîne une abolition complète de la phosphorylation de la PFK-2 quel que soit le stimulus utilisé (PMA, fMLP ou ionomycine) (Figure 26).

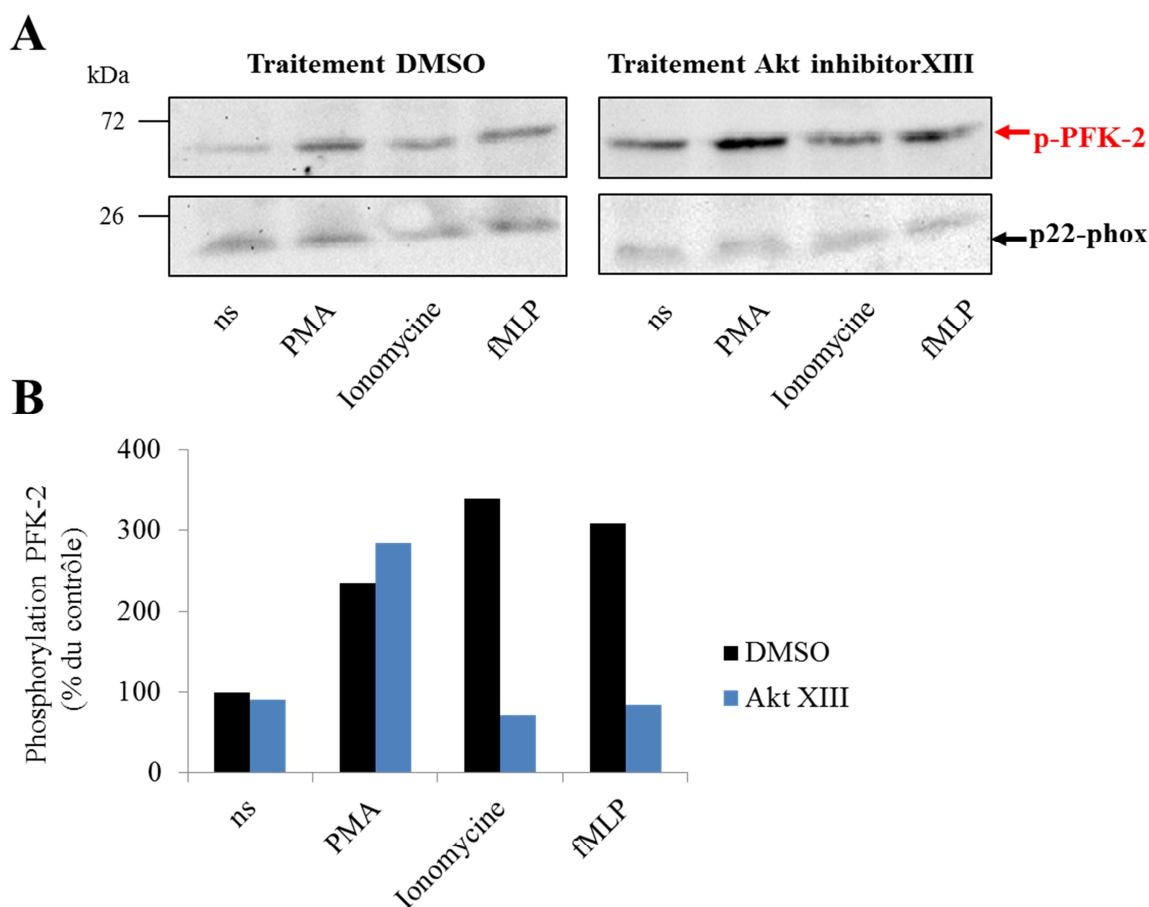


**Figure 26: Effet de Ro-31-8221 sur la phosphorylation de la PFK-2.** Les cellules PLB985 différenciées sont ajustées à  $5 \times 10^7$  cellules/mL puis incubées en présence de Ro-31-8221 10  $\mu$ M ou de DMSO 0,1 % pendant 30 min à 37 °C. Les cellules sont centrifugées (350 g / 10 min / 20 °C), lavées en PBS, ajustées à une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL puis stimulées avec le PMA (130 nM), la ionomycine (2 mM) ou le fMLP (100 nM) pendant 30 min à 37 °C. Un témoin de cellules non-stimulées est également réalisé (ns). Une fois la stimulation terminée, les cellules sont utilisées pour réaliser des lysats cellulaires. (A) Analyse des lysats cellulaires par Western blot (50  $\mu$ g par dépôt) avec l'anticorps anti-p-PFK-2 (Ser 466) (Santa Cruz Biotechnology, Inc) dilué au 1/500. (B) Histogrammes correspondant à l'analyse densitométrique de la phosphorylation de la PFK-2 du Western blot présenté en A. L'expression de la PFK-2 phosphorylée a été normalisée par rapport à l'expression de p22-phox, détectée à l'aide de l'anticorps monoclonal 16G7. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle. Les cellules traitées au DMSO 0,1 % et non stimulés font office de contrôle. Les données des histogrammes sont représentatives de trois expériences réalisées sur des préparations indépendantes.

### b. Inhibition de la PKB

Les cellules PLB-985 différenciées en pseudo-neutrophiles ont été traitées avec l'inhibiteur pharmacologique de la PKB, Akt inhibitor XIII (Calbiochem, Gibbstown, USA) puis stimulées avec le PMA (130 nM), le fMLP (100 nM) ou la ionomycine (2 mM). La phosphorylation de la PFK-2 est comparée à celle obtenue dans les cellules contrôles traitées avec le DMSO 0,1 % (v/v) puis stimulées dans les mêmes conditions. Dans les cellules traitées avec l'inhibiteur de la PKB, la phosphorylation de la PFK-2 analysée par Western-blot reste à un état basal dans les cellules PLB-985 différenciées en pseudo-neutrophiles

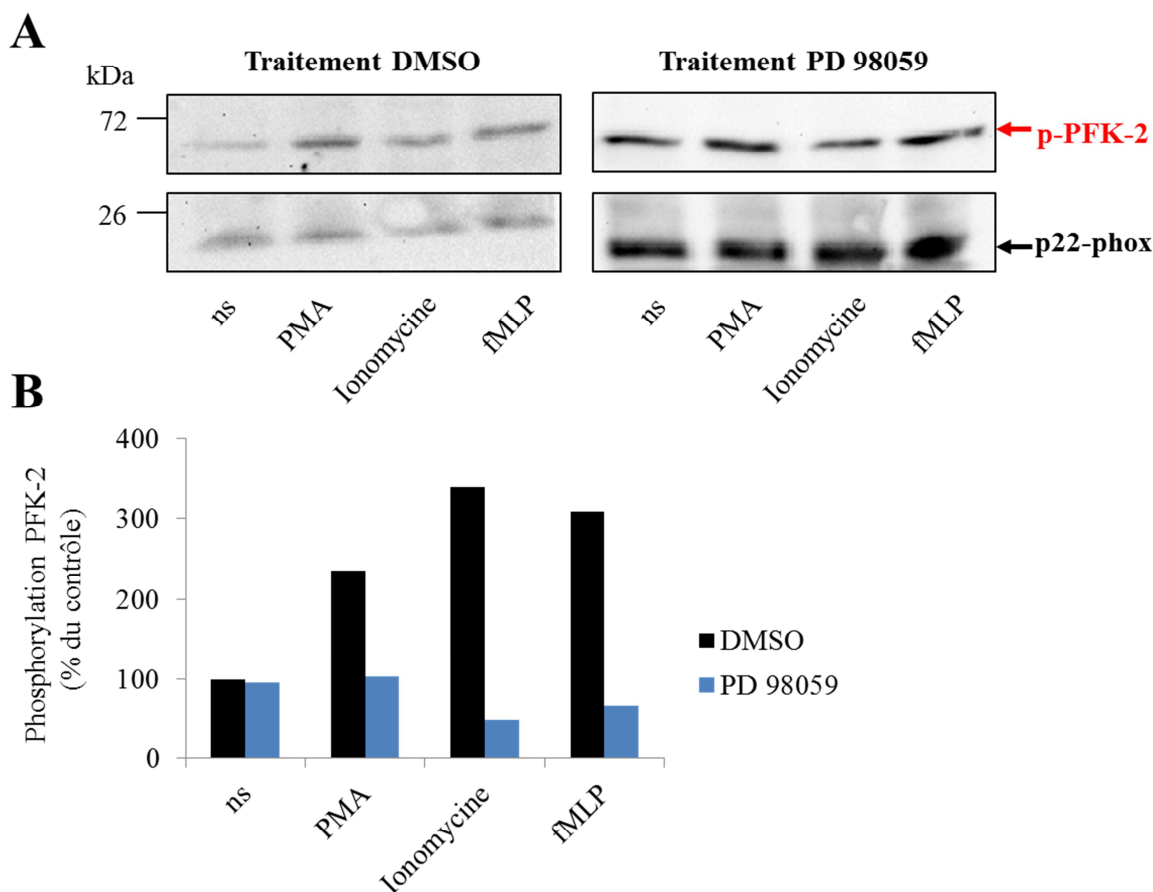
stimulés avec la ionomycine, ou le fMLP (Figure 27). Par contre, lors de la stimulation avec le PMA, la phosphorylation de la PFK-2 n'est pas affectée par l'inhibition de la PKB.



**Figure 27: Effet de l'inhibition de la PKB sur la phosphorylation de la PFK-2.** Les cellules PLB985 différenciées sont ajustées à  $5 \times 10^7$  cellules/mL puis incubés en présence d'Akt Inhibitor XIII  $5 \mu\text{M}$  ou de DMSO 0,1 % pendant 30 min à  $37^\circ\text{C}$ . Les cellules sont sédimentées par centrifugation ( $350 \text{ g} / 10 \text{ min} / 20^\circ\text{C}$ ), lavées en PBS, ajustées à une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL, puis stimulées avec le PMA ( $130 \text{ nM}$ ), la ionomycine ( $2 \text{ mM}$ ) ou le fMLP ( $100 \text{ nM}$ ) pendant 30 min à  $37^\circ\text{C}$ . Un témoin de cellules non-stimulées est également réalisé (ns). Une fois la stimulation terminée, les cellules sont utilisées pour réaliser des lysats totaux. (A) Analyse des lysats cellulaires par Western blot ( $50 \mu\text{g}$  par dépôt) avec l'anticorps anti-p-PFK-2 (Ser 466) (Santa Cruz Biotechnology, Inc) dilué au 1/500. (B) Histogrammes correspondant à l'analyse densitométrique de la phosphorylation de la PFK-2 du Western blot présenté en A. L'expression de la PFK-2 phosphorylée a été normalisée par rapport à l'expression de p22-phox, détectée à l'aide de l'anticorps monoclonal 16G7. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle. Les cellules traitées au DMSO 0,1 % et non stimulés font office de contrôle. Les données des histogrammes sont représentatives de trois expériences réalisées sur des préparations indépendantes.

### c. Inhibition de la voie MEK1/2

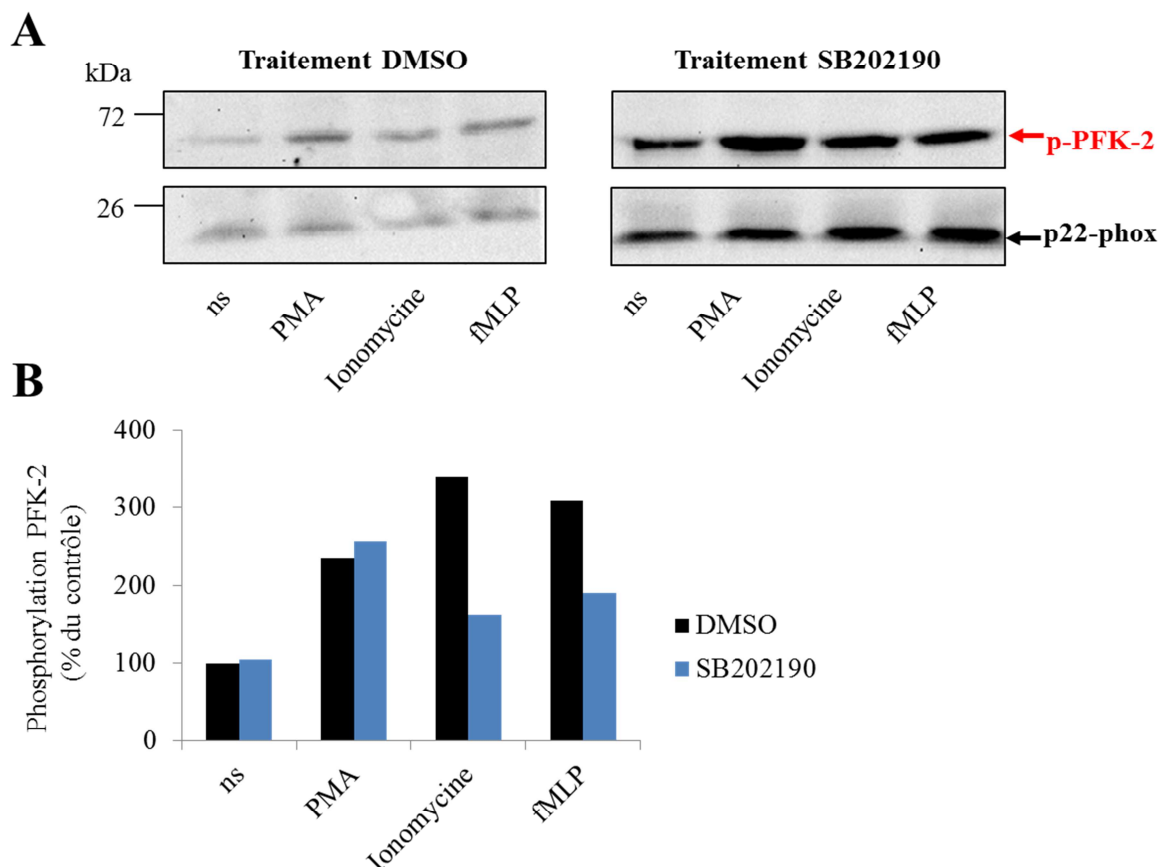
Les cellules PLB985 différenciées ont été traitées avec l'inhibiteur pharmacologique de la voie MEK1/2, PD98059 (Calbiochem, Gibbstown, USA). Les résultats montrent que ce traitement entraîne une inhibition complète de la phosphorylation de la PFK-2 en réponse au PMA, la ionomycine, ou au fMLP (Figure 28).



**Figure 28: Effet de PD98059 sur la phosphorylation de la PFK-2.** Les cellules PLB985 différenciées sont ajustées à  $5 \times 10^7$  cellules/mL puis incubées en présence de PD98059 50  $\mu$ M ou de DMSO 0,1 % pendant 30 min à 37 °C. Les cellules sont sédimentées par centrifugation (350 g / 10 min / 20 °C), lavées avec du PBS, ajustées à la concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL, puis stimulées avec le PMA (130 nM), la ionomycine (2 mM) ou le fMLP (100 nM) pendant 30 min à 37 °C. Un témoin de cellules non-stimulées est également réalisé (ns). Une fois la stimulation terminée, les cellules sont utilisées pour réaliser des lysats totaux. (A) Analyse des lysats cellulaires par Western blot (50  $\mu$ g par dépôt) avec l'anticorps anti-p-PFK-2 (Ser 466) (Santa Cruz Biotechnology, inc) dilué au 1/500. (B) Histogrammes correspondant à l'analyse densitométrique de la phosphorylation de la PFK-2 du Western blot présenté en A. L'expression de la PFK-2 phosphorylée a été normalisée par rapport à l'expression de p22-phox, détectée à l'aide de l'anticorps monoclonal 16G7. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle. Les cellules traitées au DMSO 0,1 % et non stimulées font office de contrôle. Les données des histogrammes sont représentatives de trois expériences réalisées sur des préparations indépendantes.

#### d. Inhibition de la p38 MAPK

Les cellules PLB-985 différenciées ont été traitées avec l'inhibiteur pharmacologique de la p38 MAPK, SB202190 (Jena Biosciences, Jena, Allemagne) puis stimulées avec le PMA (130 nM), le fMLP (100 nM) ou la ionomycine (2 mM). La phosphorylation de la PFK-2 est comparée à celle obtenue dans les cellules contrôles traitées avec DMSO 0,1 % (v/v) puis stimulées dans les mêmes conditions. Le traitement avec l'inhibiteur pharmacologique de la p38 MAPK n'entraîne aucune modification de la phosphorylation de la PFK-2 en réponse au PMA. En revanche, ce traitement induit une diminution de la phosphorylation de PFK-2 dans les cellules stimulées par la ionomycine, ou le fMLP (Figure 29).



**Figure 29: Effet de SB202190 sur la phosphorylation de la PFK-2.** Les cellules PLB985 différenciées sont ajustées à  $5 \times 10^7$  cellules/mL puis incubées en présence de SB202190 10  $\mu$ M ou de DMSO 0,1 % pendant 30 min à 37 °C. Les cellules sont sédimentées par centrifugation (350 g / 10 min / 20 °C), lavées avec du PBS, ajustées à la concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL, puis stimulées avec le PMA (130 nM), la ionomycine (2 mM) ou le fMLP (100 nM) pendant 30 min à 37 °C. Pour se faire la concentration cellulaire est préalablement ajustée à  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Un témoin de cellules non-stimulées est également réalisé (ns). Une fois la stimulation terminée, les cellules sont utilisées pour réaliser des lysats totaux. (A) Analyse des lysats cellulaires par Western blot (50  $\mu$ g par dépôt) avec l'anticorps anti-p-PFK-2 (Ser 466) (Santa Cruz Biotechnology, inc) dilué au 1/500. (B) Histogrammes correspondant à l'analyse densitométrique de la phosphorylation de la PFK-2 du Western blot présenté en A. L'expression de la PFK-2 phosphorylée a été normalisée par rapport à l'expression de p22-phox, détectée à l'aide de l'anticorps monoclonal 16G7. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle. Les cellules traitées au DMSO 0,1 % et non stimulées font office de contrôle. Les données des histogrammes sont représentatives de trois expériences réalisées sur des préparations indépendantes.

Ainsi, sur les 4 inhibiteurs utilisés, deux s'avèrent efficace pour inhiber la phosphorylation de la PFK-2 dans les cellules PLB985 différenciées stimulées par le PMA, la ionomycine ou le fMLP : Ro-31-8221 et PD98059 qui impliquent respectivement les kinases PKC et MEK1/2 dans la phosphorylation de la PFK-2. En ce qui concerne l'inhibiteur de p38 MAPK et l'inhibiteur de PKB, la phosphorylation de PFK-2 est réduite en réponse à une stimulation par la ionomycine ou le fMLP, mais pas en réponse au PMA.

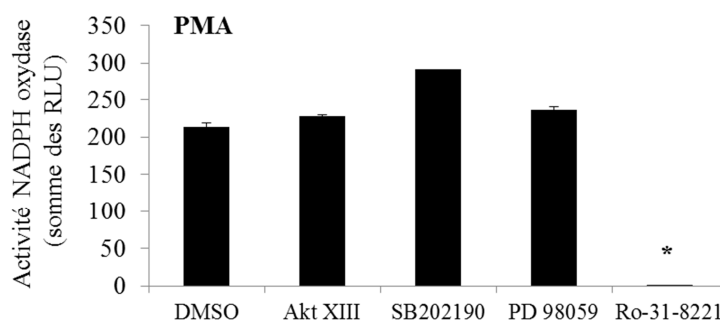
### I.3.3. Impact de l'inhibition des kinases impliquées dans la phosphorylation de la PFK-2 sur l'activité NADPH oxydase

Tout comme la PKA, la PKC, la PKB et la MEK1/2 sont impliquées dans la phosphorylation de la PFK-2 dans les cellules PLB985 différenciées stimulées le PMA, la ionomycine ou le fMLP. Pour poursuivre notre étude, nous avons évalué l'effet de l'inhibition de ces kinases sur l'activité NADPH oxydase dans les pseudo-neutrophiles stimulés par les mêmes molécules.

Dans les expériences qui suivent, les cellules PLB985 ont été traitées avec les inhibiteurs de kinases de la PKC (Ro-31-8221), de la PKB (Akt Inhibitor XIII), de MEK (PD98059) et de la p38 MAPK (SB202190). Ensuite, l'activité NADPH oxydase des cellules a été évaluée par chimiluminescence, en réponse à différents stimuli : le PMA, la ionomycine, ou le fMLP.

#### a. Stimulation avec le PMA

Les cellules sont stimulées par le PMA (130 nM). L'activité NADPH oxydase des cellules incubées en présence de Akt Inhibitor XIII (5  $\mu$ M) ou SB 202190 (10  $\mu$ M) reste identique à celle observée dans le contrôle (DMSO 0,1 %) voire même supérieure pour les cellules incubées en présence de PD 98059 (10  $\mu$ M) (Figure 30). Il est cependant intéressant de voir que l'activité est largement inhibée pour les cellules incubées en présence de Ro-31-8221, inhibiteur de la PKC. Le PMA, en pénétrant les membranes des PMN, active la PKC qui est impliquée dans la phosphorylation de p47-phox, le facteur cytosolique dirige l'assemblage de la NADPH oxydase phagocytaire. En l'absence de phosphorylation p47-phox la cellule est incapable de produire des ROS.

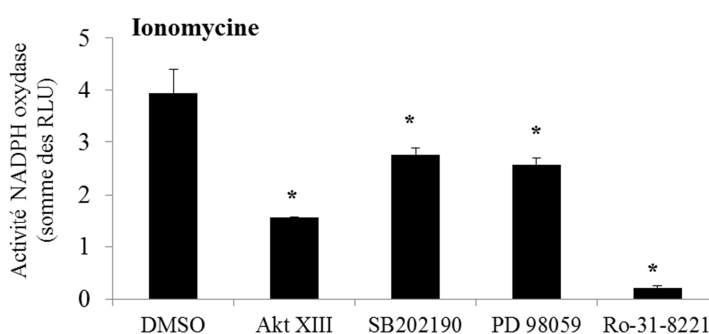


**Figure 30: Production de ROS des cellules PLB-985 différenciées traitées aux inhibiteurs de kinases puis stimulées par le PMA.** Les PLB-985 différenciées sont incubées en présence d'inhibiteurs de kinase dans 4 conditions distinctes. La concentration cellulaire de chaque échantillon est ajustée à  $5 \times 10^7$  cellules/mL. Les cellules sont incubées en présence d'Akt Inhibitor XIII 5  $\mu$ M, de SB202190 10  $\mu$ M, de PD 98059 50  $\mu$ M, ou de Ro-31-8221 10  $\mu$ M pendant 30 min 37 °C. Un contrôle est réalisé en traitant les cellules avec du DMSO 0,1 %. Les cellules de chaque préparation sont sédimentées par centrifugation (350 g / 10 min / 20 °C) puis lavées en PBS. L'activité NADPH oxydase des cellules est ensuite mesurée par chimiluminescence en réponse au PMA (130 nM). (n=3).



### b. Stimulation avec la ionomycine

L'expérience a été réalisée en stimulant les PLB-985 différenciées avec la ionomycine. C'est un composé ionophore qui va permettre d'augmenter la concentration calcique intracellulaire. Ainsi, les kinases dépendantes du calcium dans le cytoplasme vont être activées. Les cellules sont stimulées avec la ionomycine (2  $\mu$ M). L'inhibition de l'activité NADPH oxydase par rapport au témoin en DMSO est significative dans toutes les conditions (Figure 31). Elle est plus nette pour les cellules traitées avec les inhibiteurs de la PKB (Akt inhibitor XIII) ou de la PKC (Ro-31-8221). L'inhibition de l'activité NADPH oxydase est moins importante dans les cellules traitées avec les inhibiteurs de la p38 MAPK (SB202190) et de la voie des MEK1/2 (PD98059). Ainsi, la stimulation des pseudo-neutrophiles par la ionomycine implique la PKB, la p38 MAPK et MEK1/2.

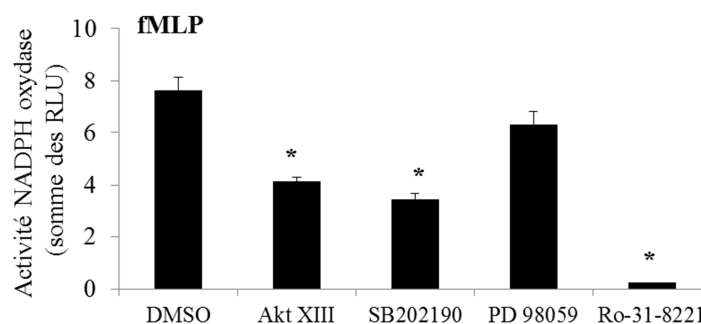


**Figure 31: Production de ROS des PLB-985 différenciées traitées aux inhibiteurs de kinases en réponse à la ionomycine.** Les PLB-985 différenciées sont incubées en présence d'inhibiteurs de kinase dans 4 conditions distinctes. La concentration cellulaire de chaque échantillon est ajustée à  $5 \times 10^7$  cellules/mL. Les cellules sont incubées en présence d'Akt Inhibitor XIII 5  $\mu$ M, de SB202190 10  $\mu$ M, de PD 98059 50  $\mu$ M, ou de Ro-31-8221 10  $\mu$ M pendant 30 min 37 °C. Un contrôle est réalisé en traitant les cellules avec du DMSO 0,1 %. Les cellules de chaque préparation sont sédimentées par centrifugation (350 g / 10 min / 20 °C) puis lavées en PBS. L'activité NADPH oxydase des cellules est mesurée par chimiluminescence en réponse à la ionomycine (2  $\mu$ M). (n=3).

### c. Stimulation avec le fMLP

Pour cette expérience, les cellules PLB-985 différenciées ont été activées avec le fMLP (100 nM). Une fois le fMLP lié à son récepteur, il déclenche une cascade de réactions aboutissant à l'augmentation du calcium intracellulaire et l'activation des PKC. Les cellules sont stimulées avec le fMLP (100  $\mu$ M). Une inhibition proche de 50 % de l'activité NADPH oxydase est observée pour les cellules incubées en présence d'Akt Inhibitor XIII (5  $\mu$ M) et SB202190 (10  $\mu$ M). L'activité est également inhibée dans les cellules incubées en présence de PD 98059 (50  $\mu$ M), inhibiteur de MEK1/2, mais de façon non significative. En ce qui concerne les cellules

traitées avec l'inhibiteur Ro-31-8221 (inhibiteur de la PKC), l'activité NADPH oxydase induite par le fMLP est complètement abolie. Ces résultats montrent que l'activation de la NADPH oxydase en réponse à la stimulation des pseudo-neutrophiles par le fMLP implique la p38 MAPK, la PKB et la PKC.



**Figure 32: Production de ROS des PLB-985 différenciées traitées aux inhibiteurs de kinases en réponse au fMLP.** Les cellules PLB-985 différenciées sont incubées en présence d'inhibiteurs de kinase dans 4 conditions distinctes. La concentration cellulaire de chaque échantillon est ajustée à  $5 \times 10^7$  cellules/mL. Les cellules sont incubées en présence d'Akt Inhibitor XIII 5  $\mu$ M, de SB202190 10  $\mu$ M, de PD 98059 50  $\mu$ M, ou de Ro-31-8221 10  $\mu$ M pendant 30 min 37 °C. Un contrôle est réalisé en traitant les cellules avec du DMSO 0,1 %. Les cellules de chaque préparation sont sédimentées par centrifugation (350 g / 10 min / 20 °C) puis lavées en PBS. L'activité NADPH oxydase des cellules est ensuite mesurée par chimiluminescence en réponse au fMLP (100 nM). (n=3).

En résumé, si nous comparons l'effet des inhibiteurs sur l'activation de la NADPH oxydase et sur la phosphorylation de PFK-2, nous observons:

- L'inhibition de la PKC se traduit par une diminution de la phosphorylation de PFK-2 et une diminution de l'activité NADPH oxydase quel que soit le stimulus cellulaire.
- L'inhibition de la PKB induit une diminution de la phosphorylation de PFK-2 couplée à une diminution de l'activité NADPH oxydase en réponse au fMLP et à la ionomycine.
- De même, l'inhibition de p38 MAPK se traduit par une diminution de la phosphorylation de PFK-2 ainsi qu'une diminution de l'activité NADPH oxydase après stimulation des cellules par le fMLP ou la ionomycine.
- En ce qui concerne l'inhibition de MEK1/2, il n'y a pas de corrélation visible entre la phosphorylation de la PFK-2 et l'activation de la NADPH oxydase.

## **I.4. Etude du lien entre l'activité NADPH oxydase phagocytaire et l'activité glycolytique des cellules**

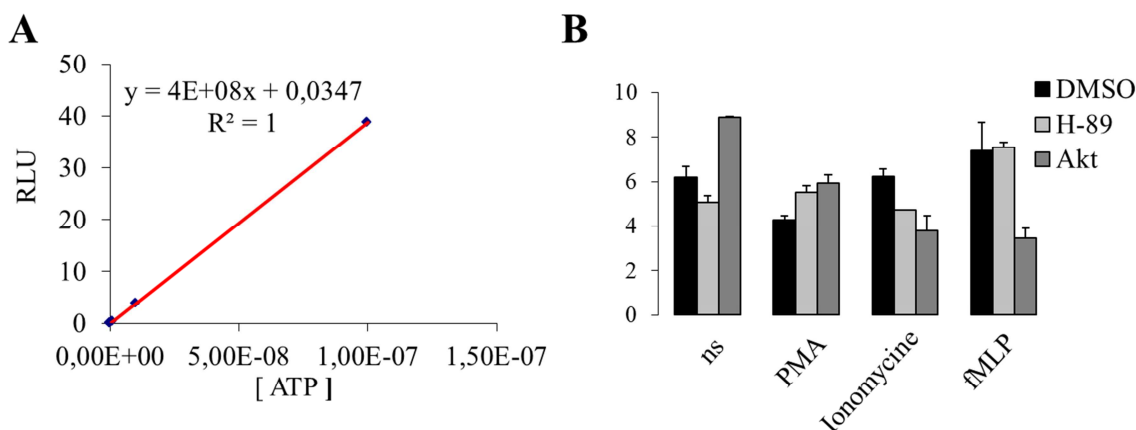
La PFK-2 est une enzyme qui joue un rôle dans la régulation de la glycolyse. Dans les neutrophiles, l'activation de la PFK-2 aboutit à la production d'énergie dans les cellules. Des précédents travaux réalisés au laboratoire ont montré une association de PFK-2 avec le complexe de la NADPH oxydase phagocytaire. Cette association est retrouvée uniquement dans les neutrophiles activés, suggérant un rôle de la PFK-2 dans la régulation de l'activité NADPH oxydase des PMN. L'inhibition de la PFK-2 est couplée à une diminution de l'activité NADPH oxydase. L'activité glycolytique des cellules PLB-985 différenciées a été évaluée en vue d'établir un lien entre l'activation de la NADPH oxydase et la glycolyse.

### **I.4.1. Généralités : la production d'énergie dans les PMN**

Le métabolisme énergétique d'une cellule est assuré en grande partie par les mitochondries, *via* le cycle de Krebs (dans la matrice), et la chaîne de transfert des électrons (dans la membrane interne). Ces organites sont également appelés « centrale énergétique » des cellules. Dans les neutrophiles, les mitochondries sont beaucoup moins nombreuses que dans les autres types cellulaires. D'autre part, elles jouent un rôle essentiellement dans l'apoptose c'est pourquoi, dans le neutrophile, la production d'ATP est totalement dépendante de la glycolyse (Maiani *et al.*, 2004).

### **I.4.2. Mesure de la concentration d'ATP dans les cellules stimulées**

Pour déterminer l'activité glycolytique des PMN, nous avons mesuré la concentration d'ATP dans le cytosol des cellules PLB985 différenciées à l'aide du kit de dosage ENLITEN® ATP Assay system. Les cellules ont été traitées comme précédemment en présence des inhibiteurs de kinases (PKA ou PKB) ou de DMSO 0,1 % (v/v) puis divisées dans 4 groupes : non-stimulées, PMA (130 nM), ionomycine (2 mM) et fMLP (100 nM). Les résultats ne montrent pas d'augmentation significative de la concentration d'ATP dans les cellules stimulées quel que soit le stimulus utilisé (PMA, ionomycine, fMLP) (Figure 33). D'autre part, les expériences n'ont pas donné de résultats reproductibles. Il est donc impossible d'interpréter ces données.



**Figure 33: Mesure de la concentration en ATP dans les cellules PLB-985 différenciées.** Les cellules sont ajustées à  $5 \times 10^7$  cellules/mL puis incubées en présence de DMSO 0,1 %, H-89 10  $\mu$ M ou de Akt Inhibitor XIII pendant 30 min 37 °C. Les cellules sont centrifugées (350 g / 10 min / 20 °C), lavées en PBS et ajustées à la concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL pour ensuite être divisées en quatre sous-groupes: non stimulées (ns), PMA (130 nM), ionomycine (2 mM) et fMLP (100 nM). La stimulation dure 5 min à 37 °C. Une fois la stimulation terminée, les cytosols sont préparés et utilisés pour mesurer la concentration en ATP par chimiluminescence à l'aide du kit de dosage ENLITEN® ATP Assay system. (A) Courbe étalonnage d'ATP permettant de mesurer la concentration en ATP des échantillons. (B) Histogrammes représentant les quantités d'ATP (exprimée en RLU) des échantillons de cytosols.

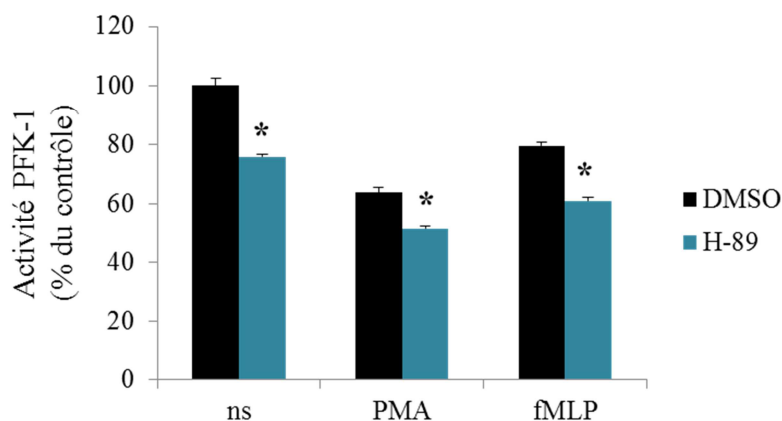
### I.4.3. Mesure de la concentration en fructose-6-phosphate dans les cellules stimulées, traitées ou non avec l'inhibiteur de la PKA

#### a. Test sur les cellules PLB-985 différenciées

La PFK-2 activée va catalyser la formation de fructose-2,6-diphosphate ( $F_{2,6}P$ ), l'activateur allostérique de la PFK-1. La PFK-1 est l'enzyme limitante de la glycolyse, une fois activée, elle transforme le fructose-6-phosphate ( $F_6P$ ) en fructose-1,6-diphosphate ( $F_{1,6}P$ ). Ici nous avons mesuré l'activité de la PFK-1 dans les lysats cellulaires de PLB-985 différenciées (Figure 34).

➤ Mesure de l'activité de la PFK-1 dans les cellules traitées par H-89 puis stimulées :

Dans un premier temps, l'activité PFK-1 a été mesurée en ajoutant dans le milieu de mesure un excès de substrat (Figure 34). L'activité PFK-1 n'est pas significativement différente dans les cellules traitées par l'inhibiteur de la PKA et dans les cellules non-traitées, suggérant que le traitement des cellules par H-89 n'influence pas l'activité de la PFK-1.

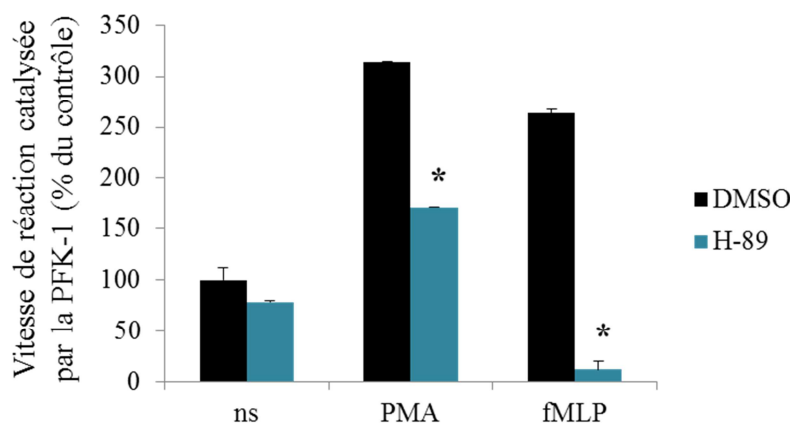


**Figure 34: Mesure de l'activité PFK-1 dans les cellules PLB-985 différenciées.** Les cellules sont incubées en présence de l'inhibiteur de kinase H-89 10 $\mu$ M ou de DMSO 0,1 % pendant 30 min 37 °C. Les cellules sont sédimentées par centrifugation (350 g / 10 min / 20 °C), lavées avec du PBS, puis ajustées à la concentration de 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cellules/mL et divisées en trois groupes : non stimulées (ns), PMA (130 nM) et fMLP (100 nM). La stimulation dure 5 min à 37 °C. Ensuite, les cellules sont lysées en présence de Nonidet P40. Les lysats cellulaires sont utilisés pour mesurer l'activité PFK-1 par spectrophotométrie à 340 nm. Les histogrammes représentant l'activité PFK-1. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle. Le contrôle 100 % correspond à la condition des cellules traitées avec du DMSO 0,1 % et non-stimulées. \*P<0,05 (traitement DMSO comparé au traitement H-89) (n=3).

➤ Mesure de la vitesse de réaction catalysée par la PFK-1 **sans ajout de substrat** :

Dans un second temps, la vitesse de la réaction catalysée par la PFK-1 a été mesurée sur les mêmes échantillons mais sans ajouter de F<sub>6</sub>P dans le milieu réactionnel (Figure 35). Le substrat de la PFK-1 est donc endogène.

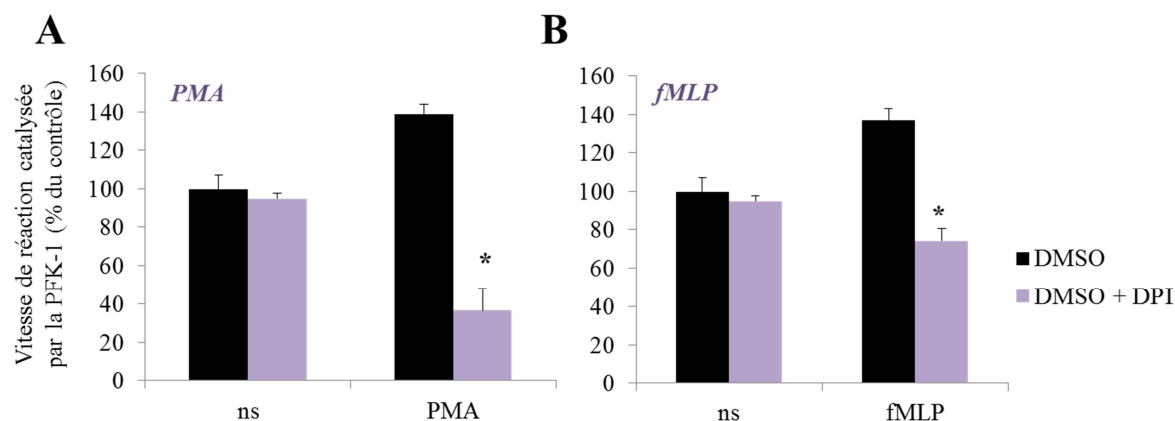
Les résultats présentés sur la figure montrent une augmentation de la vitesse de la réaction catalysée par la PFK-1 dans les cellules stimulées par le PMA ou le fMLP. Quand ces mêmes cellules sont traitées avec l'inhibiteur de la PKA (H-89) puis stimulées, la vitesse de transformation du F<sub>6</sub>P est diminuée indiquant un ralentissement de la réaction. Ceci indique un ralentissement de la glycolyse.



**Figure 35: Analyse de la vitesse de réaction catalysée par la PFK-1 dans les cellules PLB-985 différenciées.** Les cellules sont incubées en présence de l'inhibiteur de kinase H-89 10 $\mu$ M ou de DMSO 0,1 % pendant 30 min 37 °C. Les cellules sont sédimentées par centrifugation (350 g / 10 min / 20 °C), lavées avec du PBS, puis ajustées à la concentration de 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cellules/mL et divisées en trois groupes : non stimulées (ns), PMA (130 nM) et fMLP (100 nM). La stimulation dure 5 min à 37 °C. Ensuite, les cellules sont lysées en présence de Nonidet P40. Les lysats cellulaires sont utilisés pour mesurer l'activité PFK-1 par spectrophotométrie à 340 nm. Les histogrammes représentant l'activité PFK-1. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle. Le contrôle 100 % correspond à la condition des cellules traitées avec du DMSO 0,1 % et non-stimulées. \*P<0,05 (traitement DMSO comparé au traitement H-89) (n=3).

**b. Mesure de la vitesse de réaction catalysée par la PFK-1 dans les cellules PLB-985 différenciées en présence de DPI**

Pour confirmer le lien entre l'activité glycolytique et l'activité NADPH oxydase dans les cellules PLB-985 différenciées, une nouvelle expérience a été réalisée en traitant cette fois-ci les cellules avec un inhibiteur des NADPH oxydases, le DPI.

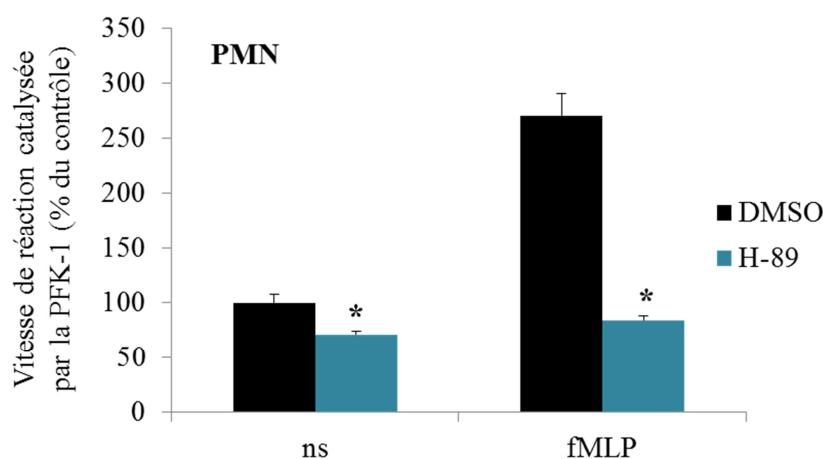


**Figure 36: Vitesse de réaction de la PFK-1 mesurée dans les cellules PLB-985 différenciées traitées avec le DPI.** Histogrammes représentant la vitesse de la réaction catalysée PFK-1 dans les cellules. Ajustées à 5 $\times$ 10<sup>7</sup> cellules/mL, elles sont traitées avec du DMSO 0,1 % pendant 30 min à 37°C. Après lavage des cellules avec du PBS, leur concentration est ajustée à 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cellules/mL. Les cellules sont traitées ou non avec le DPI 10  $\mu$ M pendant 10 min à 37°C puis divisées en 6 sous-groupes : non stimulées (ns), non-stimulées + DPI, PMA (130 nM), PMA + DPI, fMLP (100 nM) et fMLP +DPI. Les cellules sont lysées en présence de Nonidet P40. Les lysats sont utilisés pour mesurer la vitesse de réaction catalysée par PFK-1 par spectrophotométrie à 340 nm. Les histogrammes représentent la vitesse de réaction catalysée par PFK-1 dans les cellules stimulées avec le PMA (A) ou le fMLP (B). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle, les cellules traitées au DMSO, non-stimulées et non traitées au DPI. \*P<0,05 (traitement DMSO comparé au traitement DPI) (n=3).

La vitesse de la réaction catalysée par la PFK-1 a été mesurée en présence du substrat endogène uniquement. Celle-ci est augmentée dans les pseudo-neutrophiles en réponse au PMA (Figure 36A) ou au fMLP (Figure 36B). Dans les cellules traitées par le DPI, inhibiteur de la NADPH oxydase, l'augmentation de la vitesse de la réaction catalysée par la PFK-1 en réponse au PMA ou au fMLP est complètement abolie (Figure 36). Un tel effet souligne l'existence d'un lien entre les deux systèmes étudiés, à savoir : la production de ROS et l'activité glycolytique des PMN.

### c. Mesure de la vitesse de réaction catalysée par la PFK-1 dans les neutrophiles humains

Afin de valider les résultats obtenus sur le modèle de cellules PLB-985 différenciées, les expériences ont été reproduites sur des lysats de neutrophiles humains. Les résultats montrent une augmentation significative de la vitesse de réaction catalysée par la PFK-1 dans les PMN stimulés par le fMLP (Figure 37). En revanche, quand les PMN sont traités avec l'inhibiteur de la PKA, la stimulation par le fMLP n'induit aucun changement de la vitesse de réaction catalysée par la PFK-1, validant ainsi l'expérience sur le modèle humain (Figure 37).



**Figure 37: Mesure de la vitesse de réaction de la PFK-1 dans les neutrophiles humains.** Les PMN humains sont ajustés à  $5 \times 10^7$  cellules/mL. Ils sont soit incubés en présence de DMSO 0,1 % ou de H-89 10  $\mu$ M pendant 30 min 37 °C. Les cellules de chaque préparation sont sédimentées par centrifugation (350 g / 10 min / 20 °C) puis lavées en PBS pour ensuite être divisée en deux sous-groupes : non stimulées (A) et fMLP (100 nM) (B). La concentration cellulaire est ajustée à  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Les PMN sont stimulés 5 min à 37 °C. Ils sont ensuite utilisés pour réaliser des lysats cellulaires en présence de Nonidet P40. Les échantillons sont utilisés pour mesurer l'activité PFK-1 par spectrophotométrie à 340 nm. Les histogrammes représentant la vitesse de réaction catalysée par la PFK-1 en présence du substrat endogène uniquement. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (cellules traitées en DMSO 0,001% et non-stimulées). \*P<0,05 (traitement DMSO comparé au traitement H-89) (n=3).

## II. Implication de la NADPH oxydase phagocytaire dans la Polyarthrite Rhumatoïde

Nous avons mis en évidence une nouvelle approche des mécanismes de régulation de l'activité NADPH oxydase dans les phagocytes. L'activité de cette enzyme est régulée de façon très stricte. Le moindre dérèglement peut avoir des conséquences graves comme nous pouvons l'observer dans les maladies inflammatoires. En particulier dans la PR où les PMN surproduisent des ROS. Nous nous sommes intéressés à l'impact de ces ROS sur les cellules de la membrane synoviale: les synoviocytes.

Au cours de la maladie, la membrane synoviale est exposée à un stress oxydatif (Chenevier-Gobeaux *et al.*, 2006). Les ROS produits vont engendrer l'hydrolyse du collagène et activer des métalloprotéases matricielles ((Henrotin *et al.*, 2003). Il a également été décrit que les ROS peuvent provoquer des mutations de p53 dans les FLS (Firestein *et al.*, 1997). Ce qui s'accorde avec le phénotype pseudo-tumoral qu'acquièrent les FLS au cours de la maladie. La principale source de ROS dans la maladie est la NADPH oxydase phagocytaire des neutrophiles qui s'infiltrent dans l'articulation. Mais d'autres phénomènes sont observés dans la réaction inflammatoire de la maladie, des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  jouent également un rôle prépondérant. Elles sont retrouvées en grande quantité dans le liquide synovial des patients malades et activent le NF $\kappa$ B, qui à son tour va activer plusieurs étapes du processus inflammatoire en jouant le rôle de facteur de transcription (Flohé *et al.*, 1997) (Barnes et Karin, 1997). Les protéines S100A8 et S100A9 sont également présentes. Ces protéines myéloïdes sont sécrétées en abondance dans les foyers inflammatoires par les PMN activés. D'importantes concentrations de ces protéines S100 ont été retrouvées chez les patients souffrant de PR. De plus, elles ont été décrites comme des biomarqueurs de la maladie (Baillet *et al.*, 2010). Ces protéines sont également des effecteurs positifs de la régulation de l'activité NADPH oxydase phagocytaires (Berthier *et al.*, 2003).

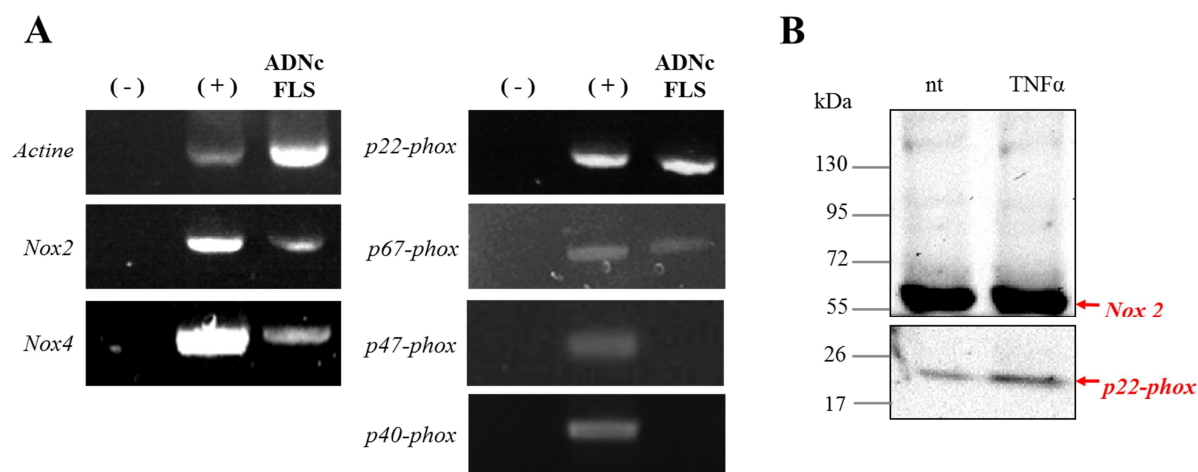
Les cellules de l'immunité, en particulier les PMN, seraient les principaux acteurs dans la PR. Cependant, de nombreuses recherches suggèrent également l'implication des cellules résidentes, les FLS.

Afin de mieux caractériser l'inflammation de la membrane synoviale dans la PR, le contexte inflammatoire de la maladie a été reproduit *in vitro*. L'étude s'est focalisée sur le dialogue entre cellules infiltrantes et cellules résidentes, les PMN et les FLS, en se focalisant sur les ROS produit par la NADPH oxydase phagocytaire et leurs effets sur la membrane synoviale.



## II.1. Expression des NADPH oxydases dans les FLS

Avant d'étudier la production de ROS par les FLS et les conditions physiologiques de la maladie, l'expression des Noxs et des différents facteurs cytosoliques dans les FLS ont été évalués. Dans la littérature, les ARNm de Nox2, Nox4, p22-phox et p47-phox ont été décrits (Chenevier-Gobeaux *et al.*, 2006). Au laboratoire, Nox2 et Nox4 ont bien été identifiées dans les FLS mis en culture (Figure 38A). Les ARNm de p22-phox et de p67-phox ont également été retrouvés dans ces cellules (Figure 38A). En revanche, les transcrits de p40-phox ou de p47-phox n'ont pas été mis en évidence (Figure 38A). En ce qui concerne l'expression protéique, Nox2 et p22-phox ont été identifiées par Western blot sur les lysats totaux de FLS (Figure 38B). Aucune variation de l'expression des deux protéines n'est constatée quand les cellules sont traitées avec le TNF $\alpha$ . La bande de Nox2 est détectée à un poids moléculaire d'environ 55 kDa contre 91 kDa dans les neutrophiles. Il est probable que dans les FLS, Nox2 ne subisse pas les mêmes maturations que dans les neutrophiles, ce qui pourrait expliquer cette différence de poids moléculaire.



**Figure 38: Analyse de l'expression des transcrits et des protéines des NADPH oxydases dans les FLS.** (A) Analyse des produits de PCR par électrophorèse en gel d'agarose. Les ARNm ont été purifiés à partir de  $1 \times 10^8$  FLS puis transformés en ADNc par la RT. Les ADNc obtenus sont utilisés en PCR pour mettre en évidence les transcrits des NADPH oxydases 2 et 4, la sous-unité p22-phox et les facteurs cytosoliques p40-phox, p47-phox et p67-phox grâce à des amorces spécifiques. (B) Western blot de Nox2 et p22-phox réalisé sur des lysats totaux de FLS (100  $\mu$ g). Les cellules ont été incubées pendant 24 h en présence de TNF $\alpha$  à 37 °C. La protéine Nox2 a été mise en évidence à l'aide d'un anticorps monoclonal produit au laboratoire, 8G11 dilué au 1/2000. La protéine p22-phox a été identifiée avec l'anticorps produit au laboratoire, 16G7, dilué au 1/2000.

## II.2. Etude du milieu pro-inflammatoire sur les FLS

En couplant les résultats obtenus précédemment avec les données de la littérature, les FLS disposent du matériel nécessaire pour produire des ROS. L'activité NADPH oxydase de ces cellules a été évaluée en reproduisant le contexte physiologique de la polyarthrite rhumatoïde.

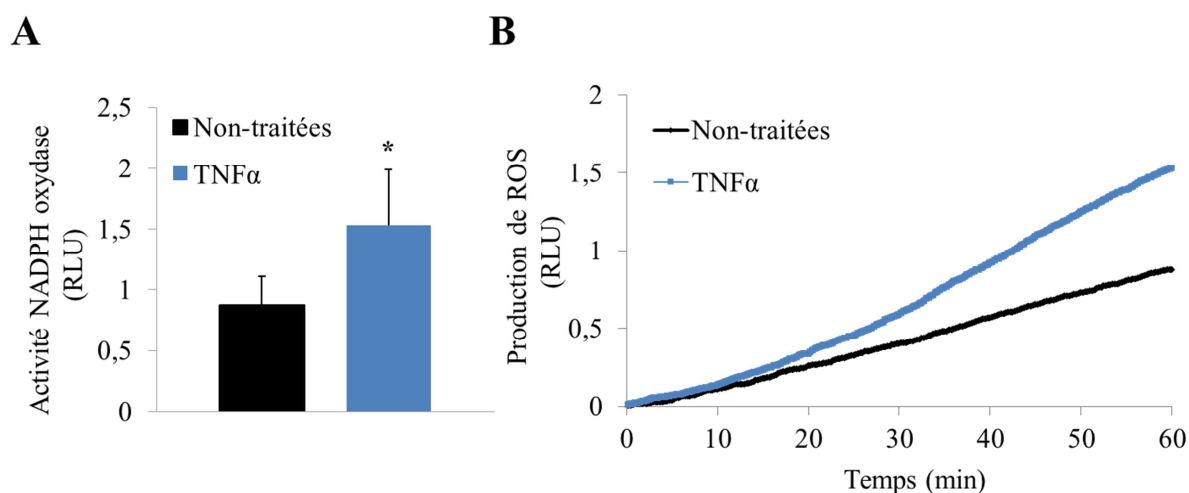
Les FLS ont été exposés aux conditions inflammatoires caractéristiques de la maladie. Ainsi, la production de ROS par les FLS a été mesurée par chimiluminescence et par fluorimétrie.

### II.2.1. Effet du TNF $\alpha$

Le TNF $\alpha$  est la principale cytokine pro-inflammatoire retrouvée dans la PR. Les synoviocytes ont été incubés en présence de celle-ci. L'activité NADPH oxydase de ces cellules a ensuite été déterminée en mesurant la production de ROS par chimiluminescence ou la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par fluorimétrie. Les résultats sont toujours comparés à ceux obtenus avec des cellules n'ayant pas été incubées en présence de la cytokine.

#### a. Mesure de l'activité NADPH oxydase des FLS par chimiluminescence

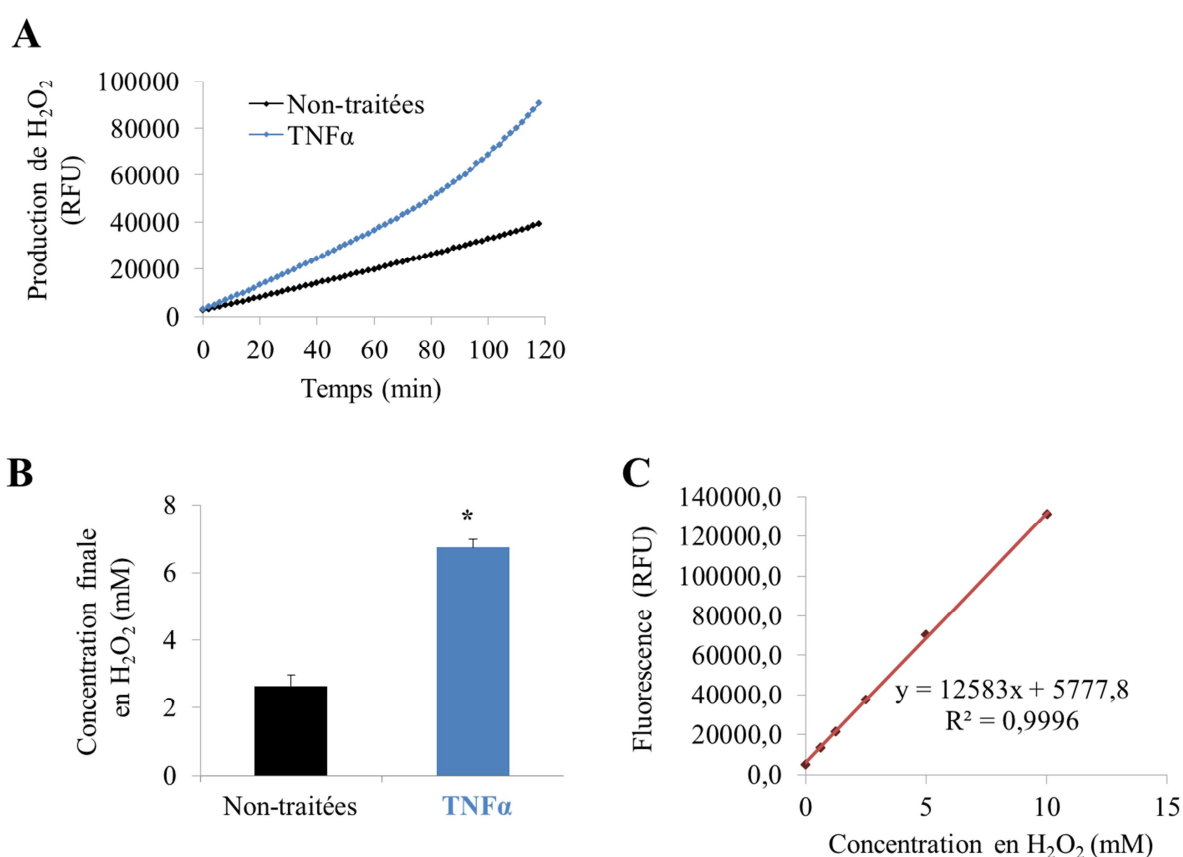
Les FLS en culture sont incubés pendant 24 h en présence de TNF $\alpha$ . Le but de l'expérience est de reproduire les conditions physiologiques de la PR, notamment l'exposition de la membrane synoviale à certaines cytokines pro-inflammatoires, largement présentes dans la maladie. La production de ROS augmente dans les FLS qui ont été incubés en présence de TNF $\alpha$ . (Figure 39). Même si la production est très faible, l'augmentation de la quantité de ROS produite est significative par rapport à celle des FLS non-traités.



**Figure 39: Mesure de la production de ROS dans les synoviocytes par chimiluminescence.** Les FLS ont été incubés en présence de TNF $\alpha$  1 ng/mL pendant 24 h à 37 °C. La production de ROS est mesurée par chimiluminescence avec  $1 \times 10^6$  cellules par puits pendant 60 minutes en effectuant une mesure toutes les 15 secondes. (A) Les histogrammes représentent les quantités de ROS totales (exprimée en RLU) produites par les FLS en fin d'expérience. (B) Cinétique de l'activité NADPH oxydase, le graphe représente la quantité de ROS cumulée au cours du temps (n=3).

### b. Mesure de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des FLS par fluorimétrie (Amplex Red)

Un autre moyen de déterminer la production de ROS dans les cellules est de mesurer la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> appartient à la famille des dérivés réactifs de l'oxygène. Il est produit suite à la réaction de dismutation de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), catalysée par la SOD. La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été mesurée par fluorimétrie à l'aide de la technique de l'Amplex Red. Une augmentation de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est observée dans les FLS incubés avec le TNF $\alpha$  (Figure 40A). Grâce à une gamme étalon d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 40C), la concentration finale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par les cellules a été calculée. Celle-ci est amplement supérieure dans les FLS qui ont été incubés en présence de TNF $\alpha$  (Figure 40B).

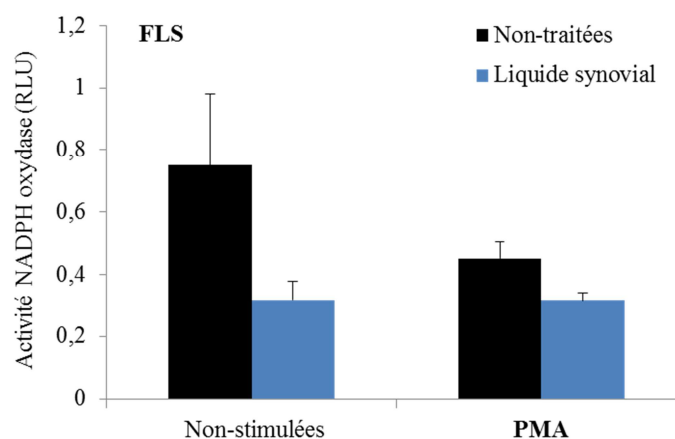


**Figure 40: Mesure de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par fluorimétrie dans les synoviocytes.** Les FLS ont été incubés en présence de TNF $\alpha$  1 ng/mL pendant 24 h à 37 °C. La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est mesurée par fluorimétrie (Amplex Red) avec  $1 \times 10^6$  cellules par puits pendant 2 h à 37 °C avec une mesure toutes les 30 secondes. (A) Evolution de la quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par les FLS au cours du temps. La quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est exprimée en RFU. (B) Histogrammes représentant la concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> finale obtenue en fin d'expérience, les concentrations sont calculées à l'aide d'une gamme étalon d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réalisée au cours de l'expérience (C). (n=3).

### II.2.2. Effet du liquide synovial

Le liquide synovial est sécrété par les FLS dans l'articulation. C'est dans ce fluide que se trouvent les cellules infiltrantes (PMN principalement mais aussi lymphocytes) mais aussi

toutes les molécules impliquées dans l'inflammation (cytokines pro-inflammatoire, protéines S100, MMPs). Pour évaluer l'impact de ce liquide sur les FLS, ceux-ci ont été incubés en présence de liquide synovial de patients atteints de PR. Ensuite, par chimiluminescence, la production de ROS a été mesurée dans les cellules. Les FLS ont une activité NADPH oxydase très faible. L'activité enregistrée reste également très faible quand les cellules sont stimulées avec du PMA (Figure 41). Aussi, le liquide synovial de PR ne semble avoir aucun effet sur l'activité NADPH oxydase des FLS, même en présence de PMA.



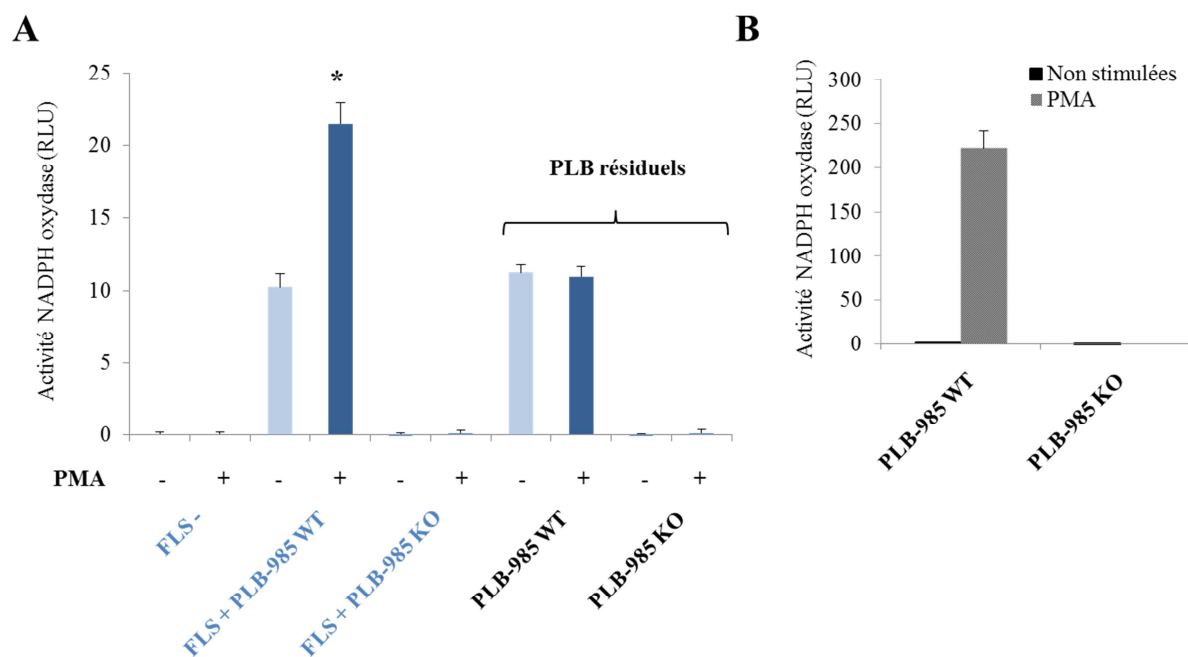
**Figure 41: Mesure de la production de ROS dans les synoviocytes après incubation avec le liquide synovial.** Les FLS sont incubés en présence de liquide synovial rhumatoïde pendant 24 h à 37 °C. La production de ROS est mesurée par chimiluminescence avec  $1 \times 10^6$  cellules par puits pendant 30 minutes en. La stimulation avec le PMA (130 nM) est réalisée au début de l'enregistrement. L'histogramme représente l'activité NADPH oxydase des FLS, exprimée en RLU.

### II.2.3. Co-culture des PLB-985 différenciées avec les FLS

Afin de mieux comprendre le rôle des PMN dans la PR, des expériences de co-culture ont été réalisées entre les FLS et des cellules PLB-985 différenciées en pseudo-neutrophiles. L'activité NADPH oxydase des FLS a été analysée afin d'étudier l'impact des pseudo-neutrophiles activés sur la membrane synoviale. Ainsi, après 2 h de co-incubation, l'activité NADPH oxydase des FLS a été mesurée par chimiluminescence (Figure 42A). Au début de la mesure, ces cellules ont été stimulées ou non avec le PMA. Les FLS qui n'ont pas été en contact avec les cellules PLB-985 n'ont pas d'activité oxydase, qu'ils soient stimulés ou non par le PMA. La co-culture induit l'apparition d'une activité oxydase dans les FLS non-stimulés. Cette activité correspond des PLB-985 résiduelles comme il est montré sur la figure 42A. En revanche, Quand les FLS sont stimulés par le PMA après la co-culture, l'activité oxydase est doublée. Cette activité est largement supérieure à celle détectée dans les PLB-985 résiduelles, indiquant la contribution des FLS dans la formation de ROS en réponse au PMA.

Le PMA étant un activateur de Nox2, ceci suggère que la production de ROS par les FLS est due à l'activité de Nox2, seule Nox activable par le PMA exprimée dans les FLS.

D'autre part, la co-culture avec les PLB-985 déficientes en Nox2 n'induit pas d'activité pour les FLS qu'ils soient stimulés ou non par le PMA. Ceci suggère une implication des ROS produits par les PLB-985 sur la production de ROS par les FLS stimulés.



**Figure 42: Mesure de l'activité NADPH oxydase des synoviocytes après co-culture.** Les PLB-985 différenciées WT et KO sont ajustés à  $3 \times 10^6$  cellules/mL dans 3 mL de PBS<sup>+</sup> et sont activés avec du PMA (130 nM). Ils sont versés sur les FLS, cultivés dans des boîtes de culture (25 cm<sup>2</sup>), formant un tapis cellulaire d'environ  $5 \times 10^6$  cellules par boîte. Les FLS normaux (FLS -) sont incubés dans 3 mL de PBS<sup>+</sup> en présence de PMA (130 nM). La co-culture dure 2 h à 37 °C. Les FLS sont ensuite lavés en PBS et les cellules PLB-985 sont retirées puis sont comptées au fur et à mesure des lavages afin de déterminer le nombre de PLB-985 résiduelles. Les FLS sont détachés de leur support par un traitement en trypsine-EDTA 0,25 % pendant 30 min. Les FLS sont lavés en PBS par centrifugation (400g / 8 min / 20 °C). L'activité NADPH oxydase est mesurée par chimiluminescence en stimulant ou non les FLS avec du PMA (130 nM). (A) Histogrammes représentant l'activité NADPH oxydase des FLS, exprimée en RLU (n=3). FLS- correspond à l'activité des FLS normaux n'ayant pas été co-incubés avec des PLB-985. FLS+PLB-985 WT correspond à l'activité des FLS ayant été co-incubés avec des PLB-985 différenciées. FLS+PLB-985 KO correspond à l'activité des FLS ayant été co-incubés avec des PLB-985 différenciées déficientes en Nox2. PLB-985 WT et PLB-985 KO correspondent aux activités des PLB-985 différenciées résiduelles normales ou déficientes en Nox2. (B) L'histogramme représente l'activité NADPH oxydase de cellules PLB-985 WT différenciée, ce graphe fait office de témoin positif quant à l'efficacité du PMA. \*P<0,05 (Co-culture FLS + PLB-985 WT comparé à co-culture FLS -).

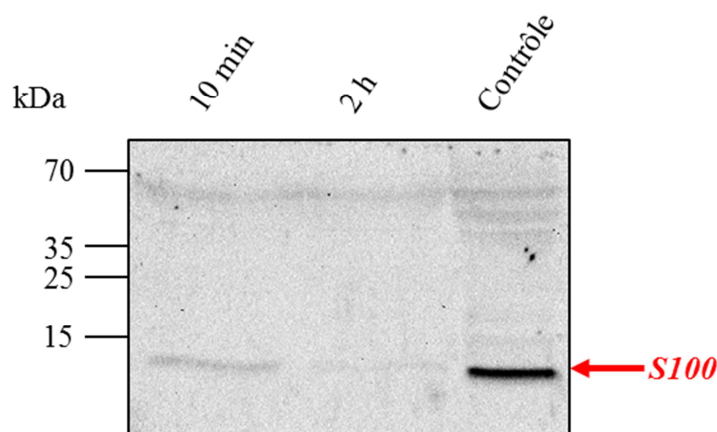
#### II.2.4.Effet des protéines S100 sur les synoviocytes

Les protéines S100A8, S100A9 et S100A12 sont toutes les trois des biomarqueurs de la PR discriminant ainsi la maladie des autres rhumatismes inflammatoires, comme l'arthrose (Baillet *et al.*, 2010). Elles sont sécrétées par les neutrophiles activés et vont entretenir l'inflammation de l'articulation. S100A8 et S100A9 interfèrent avec les mécanismes de contrôle de la douleur inflammatoire (Dale *et al.*, 2006 ; Mitchell *et al.*, 2008). Ces deux

protéines sont également des effecteurs positifs de la régulation de l'activité NADPH oxydase dans les phagocytes (Berthier *et al.*, 2003) aboutissant à la production de ROS et la destruction du cartilage.

#### a. Sécrétion des protéines S100 dans le milieu de la co-culture

Il a été déterminé si les cellules PLB-985 différenciées en pseudo-neutrophiles sécrètent des protéines S100 dans le milieu de co-culture. Pour cela, après activation des cellules avec le PMA, le surnageant de cellules a été prélevé en deux temps après incubation à 37 °C. S100A8 et S100A9 ont ensuite été identifiées par Western blot. Après 10 min d'incubation, les protéines S100 sont sécrétées dans le milieu extracellulaire (Figure 43). Par contre, elles ne sont plus visibles après 2 h d'incubation. Les PLB-985 différenciées sécrètent des protéines S100 après activation au PMA. Ces protéines sont présentes dans le milieu de co-culture.



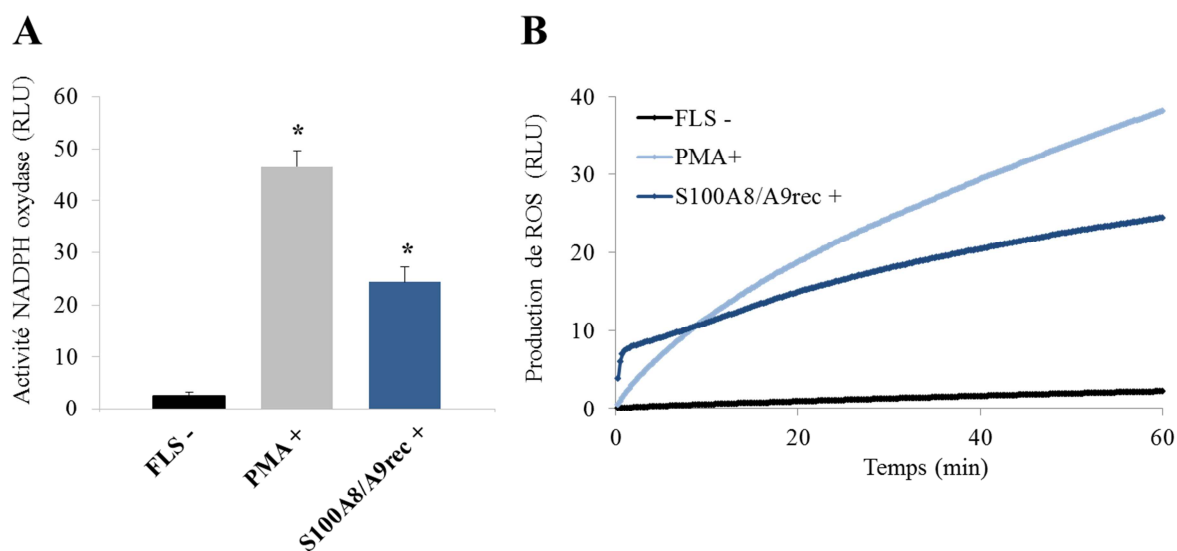
**Figure 43: Etude par Western blot de la sécrétion des protéines S100 dans le surnageant de pseudo-neutrophiles activés.** Les pseudo-neutrophiles sont ajustés à  $3 \times 10^6$  cellules/mL dans du PBS<sup>+</sup> en boîte de culture (25 cm<sup>2</sup>). Les cellules sont stimulées avec du PMA (130 nM). Un prélèvement est réalisé à 10 min ( $\sim 1 \times 10^7$  cellules) et un autre à 2 heures ( $\sim 1 \times 10^7$  cellules) d'incubation à 37 °C. Les concentrations protéiques des deux prélèvements sont déterminées par la méthode de Bradford. Les protéines S100 sont identifiées par Western blot avec un anticorps de lapin polyclonal dilué au 1/1000. Pour se faire 100 µg de chaque échantillon est déposé sur un gel SDS-PAGE 15% (v/v). Le contrôle positif est réalisé sur 100 µg de cytosol de PLB-985 différenciées activées.

#### b. Effet sur l'activité NADPH oxydase des FLS

Nous avons ensuite évalué l'impact des protéines S100 sur des FLS ayant été préalablement en contact avec des pseudo-neutrophiles activés. L'activité NADPH oxydase des FLS a été mesurée par chimiluminescence après co-incubation avec les pseudo-neutrophiles. L'activité NADPH oxydase des FLS a été comparée dans trois conditions de stimulation différentes :

- 1<sup>ère</sup> condition, les FLS n'ont pas été stimulés lors de la mesure d'activité.
- 2<sup>nde</sup> condition, les FLS ont été stimulés avec du PMA.

- 3<sup>ème</sup> condition, l'activité NADPH oxydase des FLS a été déterminée en présence des protéines S100A8 et S100A9. Pour cela, des protéines S100A8/A9 recombinantes, produites au laboratoire (Berthier *et al.*, 2003), ont été utilisées à des concentrations proches de celles retrouvées chez les patients souffrants de PR.



**Figure 44: Mesure de l'activité NADPH oxydase des synoviocytes après co-incubation avec des protéines S100 recombinantes.** Les FLS sont cultivés dans une boîte (25 cm<sup>2</sup>) jusqu'à confluence des cellules (5×10<sup>6</sup> cellules). Pour cette expérience, les FLS ont été co-incubés avec les pseudo-neutrophiles (3×10<sup>6</sup> cellules/mL dans 3 mL de PBS<sup>+</sup>) préalablement activées avec du PMA (130 nM). L'incubation dure 2 h dans une étuve à 37 °C. Après lavage, l'activité NADPH oxydase est mesurée sur les FLS par. Une condition témoin négatif (FLS-) correspond aux FLS non-stimulés. Une condition témoin positif (PMA+) correspond aux FLS stimulés avec le PMA (130 nM). Une troisième condition (S100A8/A9rec +) correspond aux FLS incubés en présence des protéines S100A8/A9 recombinantes (500 µg/mL) au cours de la mesure. (A) Histogrammes de l'activité NADPH oxydase (exprimée en RLU) enregistrée dans les FLS. (B) Cinétique de l'activité NADPH oxydase cumulée au cours du temps dans les FLS. \*P<0,05 (cellules stimulées comparé à cellules non-stimulées).

L'activité NADPH oxydase est augmentée dans les FLS stimulés avec du PMA, préalablement co-incubées avec les cellules PLB985 différenciées (Figure 44A). De manière très intéressante, les protéines S100 stimulent également l'activité NADPH oxydase des FLS (Figure 44). D'après la figure 43B, l'activité NADPH oxydase des FLS stimulés avec les protéines S100 est très importante au cours des premières minutes d'expérience. Par la suite l'activité continue d'augmenter mais beaucoup plus faiblement. Dans les PMN, les protéines S100A8 et S100A9 sont impliquées dans la régulation de l'activité NADPH oxydase phagocytaire, Nox2. Ces deux protéines sont connues pour jouer un rôle dans l'amplification de l'inflammation. En extracellulaire, il semblerait qu'elles stimulent l'activité NADPH oxydase de Nox2 des FLS.

# Discussion



La production de ROS par les PMN appelé « explosion respiratoire » est un mécanisme essentiel de défense de l'immunité innée vis-à-vis des agents pathogènes. L'activité de la NADPH oxydase des phagocytes résulte de l'assemblage des facteurs cytosoliques p47-phox, p67-phox, p40-phox et Rac au niveau du cytochrome *b<sub>558</sub>*. L'existence de partenaires cellulaires-spécifiques de la NADPH oxydase est suggérée par l'explosion oxydative des neutrophiles qui est considérablement différente de la production de ROS des cellules non-phagocytaires telles que le lymphocyte B sur le plan qualitatif et quantitatif.

Néanmoins, la production de ROS reste potentiellement nocive pour les tissus. De ce fait, l'activité de la NADPH oxydase nécessite une régulation des plus rigoureuses. En effet, la production de ROS doit être optimale pour détruire les éventuels agents pathogènes, sans pour autant occasionner des lésions tissulaires comme nous l'avons observé dans la PR.

Dans ce travail, nous nous sommes d'abord focalisés sur la PFK-2 comme partenaire potentiel d'activation et de régulation de la NADPH oxydase phagocytaire. Dans un deuxième temps, notre attention s'est portée sur l'implication de la NADPH oxydase des phagocytes dans la PR et plus précisément son rôle dans les interactions entre les synoviocytes et les neutrophiles.

Tout d'abord, notre objectif a été de démontrer l'implication de la PFK-2 dans l'activation de l'oxydase. Notre approche consiste à utiliser des inhibiteurs pharmacologiques de kinases impliquée dans la phosphorylation de la PFK-2, qui a été co-purifiée sous cette forme avec le complexe de la NADPH oxydase des phagocytes (Paquet *et al.*, 2007). Notre analyse s'est portée à la fois sur les variations de la phosphorylation de la PFK-2, l'activité NADPH oxydase et l'activité glycolytique des cellules PLB985 différenciées en granulocytes et les PMN.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté de mieux caractériser le rôle des ROS dans l'interaction des synoviocytes et des neutrophiles. En effet, ces derniers surproduisent des ROS dans l'articulation au cours de la PR. Notre étude s'est focalisée sur l'interaction entre FLS et pseudo-neutrophiles, plus particulièrement sur l'impact des ROS produits par sur la membrane synoviale et les conséquences qui en résultent.

## **I. La PFK-2 à l'interface de l'oxydase et de la glycolyse dans le neutrophile**

Les données obtenues avec ce travail suggèrent que la PFK-2 phosphorylée est impliquée dans la régulation de la NADPH oxydase phagocytaire. Lors de la stimulation des

neutrophiles, cette enzyme du métabolisme du glucose migre à la membrane et s'associe aux facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase phagocytaire. La PFK-2 phosphorylée stimule la production d'ATP nécessaire à la phosphorylation des facteurs cytosoliques, essentielle pour l'assemblage du complexe de la NADPH oxydase.

Tout d'abord, la détection immuno-chimique de la PFK-2 phosphorylée a permis de mettre en évidence une nette augmentation de la phosphorylation de l'enzyme dans les cellules PLB985 différenciées en granulocytes en réponse à différents stimuli (PMA, ionomycine ou fMLP). Ensuite, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de kinases nous a apporté des informations supplémentaires quant à la phosphorylation de la PFK-2 dans les neutrophiles. La PKA est la principale kinase décrite dans la phosphorylation de l'isoforme cardiaque de la PFK-2, nous avons commencé par utiliser l'inhibiteur H-89, spécifique de la PKA. Les expériences de Western blots, réalisées sur des cytosols de cellules PLB985 différenciées, ont révélé une nette diminution de la phosphorylation de la PFK-2 dans les cellules traitées avec l'inhibiteur H-89 et ce, malgré la stimulation en réponse au PMA, la ionomycine ou le fMLP. Ainsi, comme dans le cœur, la PKA est impliquée dans la phosphorylation de la PFK-2 dans les cellules granulocytaires. Cependant, d'autres kinases ont également été décrites dans la phosphorylation de l'isoenzyme cardiaque de la PFK-2. L'utilisation des inhibiteurs de la PKB, la PKC ou MEK, démontre également la participation de ces enzymes dans l'activation de la PFK-2 dans les cellules PLB-985 différenciées (Tableau 7).

**Tableau 7: Récapitulatif des résultats obtenus pour l'inhibition de la phosphorylation de PFK-2 et l'inhibition de l'activité NADPH oxydase.**

Inhibition kinases	Inhibition phosphorylation PFK-2			Inhibition activité NADPH oxydase		
	PMA	Ionomycine	fMLP	PMA	Ionomycine	fMLP
PKC	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
PKB	0 %	100 %	100 %	0 %	50 %	~60 %
MEK1/2	100 %	100 %	100 %	0 %	~10%	~35%
p38-MAPK	0 %	50 %	50 %	0 %	~50 %	30 %

En parallèle, l'activité NADPH oxydase a été mesurée dans les cellules traitées avec les inhibiteurs pharmacologiques de kinase. Après traitement avec l'inhibiteur de la PKC (Ro-31-8221), l'activité NADPH oxydase est complètement abolie en réponse à un stimulus, aussi

bien le PMA que la ionomycine ou le fMLP. En ce qui concerne le PMA, son mode d'action active directement les PKC, c'est le shunt des voies de signalisation. Pour la ionomycine et le fMLP, les voies de signalisation employées pour l'activation de la NADPH oxydase passent par la PKC. En réalité, cette kinase est impliquée dans la phosphorylation de p47-phox (Fontayne *et al.*, 2002). Ce qui nous empêche de discriminer si l'effet observé est dû uniquement à l'inhibition de la phosphorylation de p47-phox, ou si cet effet combine l'inhibition de la phosphorylation de PFK-2 avec la diminution de p47-phox phosphorylé.

De même avec l'inhibiteur de p38 MAP kinase, l'activité NADPH oxydase est diminuée. Cette kinase a été décrite comme participant à la phosphorylation de p47-phox et p67-phox (El Benna, Han, *et al.*, 1996 ; Dang *et al.*, 2003). L'effet observé sur l'activité oxydase peut être lié uniquement à la diminution de la phosphorylation de ces facteurs cytosoliques ou à la combinaison de cet événement avec la diminution de la phosphorylation de PFK-2.

La PKB a été décrite dans l'activation de la PFK-2 *in vitro* dans les cardiomyocytes de bœuf (Deprez *et al.*, 1997). Les expériences de Western blot réalisées au cours de cette étude montrent également l'implication de la PKB dans l'activation de la PFK-2 dans les cellules PLB-985 différenciées. En effet, la phosphorylation de la PFK-2 en réponse à la ionomycine et au fMLP est nettement diminuée dans les cellules traitées avec l'inhibiteur de la PKB. En parallèle, ce dans ces mêmes cellules, l'activité NADPH oxydase est diminuée. Cela corrobore ce qui a été montré dans la littérature : la PKB a un impact sur l'activité NADPH oxydase phagocytaire en réponse au fMLP (Chen *et al.*, 2006). En revanche, l'inhibition de la PKB n'a aucun impact sur la phosphorylation de la PFK-2 et sur l'activité NADPH oxydase dans les cellules stimulées par le PMA.

Notre étude a également mis en évidence l'implication de MEK dans la phosphorylation de la PFK-2. Comme la PKB, MEK peut activer *in vitro* la PFK-2 dans les cardiomyocytes de bœuf (Deprez *et al.*, 1997). En effet, l'inhibition de cette protéine kinase dans les cellules PLB-985 différenciées se traduit par une diminution de la phosphorylation de la PFK-2 malgré la stimulation avec le PMA, la ionomycine ou le fMLP. Cependant l'activité NADPH oxydase des cellules ne semble pas impactée par l'inhibition de MEK.

Suite au traitement avec l'inhibiteur de la PKA, nous pouvons observer une diminution significative de l'activité NADPH oxydase dans les cellules PLB-985 différenciées et les

PMN et ce même en réponse à un stimulus (PMA, ionomycine ou fMLP). Les données obtenues en Western blot ont montré une nette diminution de la phosphorylation de la PFK-2 dans ces mêmes cellules. Ceci suggère un rôle de la PKA dans l'activation de la PFK-2 dans les PMN.

Il a été montré que la PKA peut phosphoryler p47-phox mais cette phosphorylation n'induit pas l'activation de la NADPH oxydase des PMN (Liu *et al.*, 2012). La diminution de l'activité NADPH oxydase observée après inhibition de la PKA est vraisemblablement due à l'inhibition de l'activation de PFK-2. Ainsi, un lien étroit entre la glycolyse et la production de ROS dans les PMN est mis en évidence.

Notre attention s'est ensuite tournée vers l'activité glycolytique des neutrophiles. Sous sa forme phosphorylée, l'isoenzyme cardiaque de la PFK-2, retrouvée dans les PMN, catalyse la transformation du F<sub>6</sub>P en F<sub>2,6</sub>P. Celui-ci se trouve être l'activateur allostérique de la PFK-1, l'enzyme limitante de la glycolyse.

Des expériences ont donc été réalisées en mesurant la vitesse de la réaction catalysée par la PFK-1 en présence du F<sub>6</sub>P endogène. La stimulation cellulaire induit une augmentation de la vitesse de la réaction catalysée par PFK-1 dans les cellules PLB985 différenciées et les PMN, ce qui démontre une accélération de la glycolyse. L'inhibition de la phosphorylation de PFK-2 par le traitement des cellules avec H-89 comme l'inhibition de la NADPH oxydase par le DPI se traduit par le même effet : une diminution de la vitesse de la glycolyse. Ces données confirment l'existence d'un lien étroit entre l'activité NADPH oxydase et la glycolyse dans les PMN.

L'étude de l'association de la PFK-2 avec la NADPH oxydase des phagocytes avait déjà été explorée au laboratoire. Des expériences de co-immunoprécipitation et de microscopie confocale ont permis d'établir, lors de l'activation des PMN, qu'il y'a une association des facteurs cytosoliques p47-phox, p67-phox et p40-phox avec la PFK-2. Cette association a été constatée uniquement lors de l'activation des neutrophiles et non au repos. D'autres expériences, toujours en microscopie confocale, démontrent la colocalisation de Nox2 avec la PFK-2 au niveau de la membrane plasmique dans les pseudo-neutrophiles activés uniquement. Sur le plan fonctionnel, une approche employant des siRNA spécifiques de la PFK-2 se traduit par une diminution de l'activité NADPH oxydase des pseudo-neutrophiles transfectés en réponse à un stimulus.

En associant les données présentées ici aux résultats précédents, nous confirmons l'existence d'un lien entre deux systèmes prédominants dans le PMN : la NADPH oxydase phagocytaire et la glycolyse. En réponse à un stimulus, l'activité NADPH oxydase est augmentée, tout comme l'activité glycolytique des cellules. L'inhibition de la PKA, diminuant la phosphorylation de la PFK-2, a un effet direct sur les deux systèmes qui sont inhibés. Notre étude confirme de précédents travaux qui avaient mis en évidence une forte diminution de l'activité NADPH oxydase lors de l'inhibition de la glycolyse par inactivation de la PFK-1 (Anderson *et al.*, 1991).

Le couplage de l'activité NADPH oxydase des phagocytes avec les produits des voies métaboliques, *via* la PFK-2 phosphorylée, ou des pentoses phosphates, *via* la 6-PGDH (Baillet *et al.*, 2011) semble tout à fait possible au vu des besoins énergétiques de l'explosion oxydative. Dans la glycolyse comme dans la voie des pentoses phosphates, enzymes et substrats sont regroupés ce qui va favoriser une vitesse de réaction optimale. Cette compartimentation permettrait de positionner certaines de ces enzymes au voisinage direct de la NADPH oxydase.

C'est dans les radeaux lipidiques, une zone métaboliquement active, que le rassemblement de la NADPH oxydase avec la 6-PGDH (Baillet *et al.*, 2011) et la PFK-2 (Baillet *et al.*, en préparation) a été décelé. Les radeaux lipidiques constituent des plateformes membranaires rigides permettant des interactions privilégiées pour l'activité de certaines enzymes notamment celles du métabolisme du glucose qui sont transférées à la membrane lors de l'activation (Lloyd and Hardin, 2001). Au cours de l'explosion oxydative du PMN, les facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase colocalisent dans ces radeaux lipidiques (Shao *et al.*, 2003 ; Vilhardt and van Deurs, 2004). Ces microdomaines semblent impliqués dans l'initiation de l'activité NADPH oxydase en favorisant les interactions entre le cytochrome *b*<sub>558</sub> et les facteurs cytosoliques (Shao *et al.*, 2003). Ainsi, il a été montré que les PMN de souris invalidés pour le gène de la cavéoline ont une production de ROS nettement diminuée en réponse au fMLP (Hu *et al.*, 2008). L'association de la NADPH oxydase avec la 6-PGDH et la PFK-2 permettrait (Figure 45) :

- D'une part, d'augmenter localement la concentration de NADPH et l'affinité de Nox2 pour le substrat NADPH.
- D'autre part, de catalyser localement la libération de quantités importantes de F<sub>2,6</sub>P l'activateur de la PFK-1, l'enzyme limitante de la glycolyse, aboutissant ainsi à une augmentation locale de la concentration d'ATP.

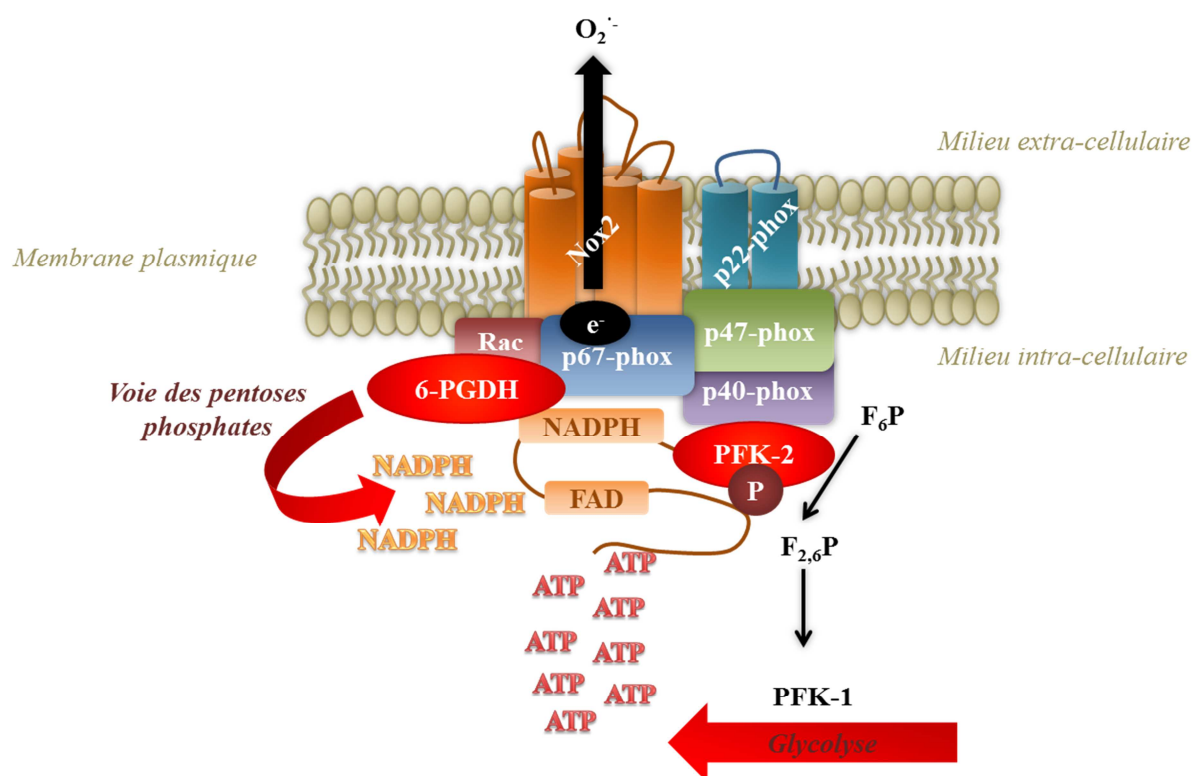


Figure 45: Illustration de l'implication des enzymes du métabolisme du glucose dans l'activation de la NADPH oxydase des phagocytes.

Toutes ces données sont en faveur d'un nouveau mode de régulation de l'activité de la NADPH oxydase phagocytaire par micro-compartmentation de la NADPH oxydase avec les enzymes du métabolisme énergétique (Figure 45).

## II. La NADPH oxydase phagocytaire au cœur de la PR

Dans la PR, la membrane synoviale, composée de synoviocytes, est constamment exposée aux produits de sécrétion de nombreuses cellules infiltrantes parmi lesquelles les PMN sont les plus abondantes. Ces derniers surproduisent des ROS *via* la NADPH oxydase dans le milieu articulaire. Dans ce travail, nous mettons en évidence une modification phénotypique des FLS, induite par les ROS issus de la NADPH oxydase phagocytaire.

Nos travaux ont été réalisés sur des FLS extraits de liquide synoviaux de patients souffrant de maladie inflammatoire, en général PR, mais aussi arthrose. Les FLS ont été mis en culture

selon le protocole établi dans la littérature (Stebulis *et al.*, 2005). L'étude des antigènes de surface exprimés sur les cellules en culture a permis d'identifier les FLS (Stebulis *et al.*, 2005).

Tout d'abord, nous avons identifié les NADPH oxydases exprimées dans les FLS en culture. Dans la littérature, les transcrits de Nox2, p22-phox ainsi que Nox4 (Chenevier-Gobeaux *et al.*, 2006) ont été décrits. Nous retrouvons l'expression des ARNm de Nox2, p22-phox ainsi que Nox4 *via* des expériences de RT-PCR sur les FLS en culture. En ce qui concerne les facteurs cytosoliques, les ARNm de p47-phox, p67-phox et p40-phox ont également été identifiés (Chenevier-Gobeaux *et al.*, 2006). Dans ce travail, seuls les transcrits de p67-phox et p40-phox ont été détectés dans les FLS en culture.

Par la suite, les protéines de Nox2 et p22-phox ont été détectées par immuno-marquage en Western blot. A la différence de Nox2 dans les phagocytes, une protéine de 91 kDa, l'anticorps monoclonal spécifique de Nox2 a détecté une protéine de masse apparente de 55 kDa dans les FLS. Cette taille correspond à celle observé lorsque Nox2 est déglycosylé (Palet *et al.*, 2000) suggérant que Nox2 dans les FLS n'est pas glycosylé. Des expériences de déglycosylation sont envisagées pour confirmer cette hypothèse.

Les synoviocytes en culture expriment les protéines de Nox2 et p22-phox. Nous nous sommes intéressés à l'aspect fonctionnel de la NADPH oxydase dans ces cellules. Ainsi, après 24 h d'incubation en présence de TNF $\alpha$ , l'activité NADPH oxydase des FLS a été déterminée par chimiluminescence pour mesurer la production d'anion superoxyde, O $_2^{\cdot-}$ , et par fluorimétrie pour mesurer la production de peroxyde d'hydrogène, H $_2$ O $_2$ . Dans les deux cas, nous avons observé une augmentation significative de l'activité NADPH oxydase induite par le TNF $\alpha$ . Ces résultats sont en accord avec de précédents travaux impliquant les cytokines pro-inflammatoires du TNF $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  dans la régulation de l'expression et de l'activation de la NADPH oxydase dans les FLS (Chenevier-Gobeaux *et al.*, 2006).

Les expériences de co-culture entre les FLS en culture et les cellules PLB-985 différenciées préalablement stimulées ont mis en évidence une contribution directe des ROS produits par la NADPH oxydase phagocytaire dans l'activation de la NADPH oxydase des FLS. En effet, après co-incubation avec cellules PLB-985 sauvages différenciées, les synoviocytes produisent des ROS en réponse au PMA. Les synoviocytes incubés seuls ou co-incubés avec les cellules PLB-985 déficientes en Nox2 n'ont pas d'activité détectable. Cette donnée est d'autant plus pertinente que ces cellules n'expriment pas Nox2 et sont donc dans l'incapacité

de produire des ROS. Ce résultat montre un rôle direct des ROS produits par les PMN sur l'activation des synoviocytes.

De plus, Nox2 est la seule Nox activable par le PMA exprimée dans le synoviocyte. Nos résultats montrent que la production des ROS dans les FLS après co-culture avec les granulocytes est due à l'activation de Nox2.

Nous nous sommes également intéressés à l'effet de l'hétérodimère S100A8-S100A9 sur la stimulation de l'activité NADPH oxydase des synoviocytes. Ces deux protéines avec S100A12 sont des marqueurs sensibles de l'inflammation (Foell et Roth, 2004). Ce sont également des effecteurs positifs de l'activité NADPH oxydase des neutrophiles (Berthier *et al.*, 2003) et qui sont retrouvées dans la PR (Baillet *et al.*, 2010). Aussi, S100A8/A9 ont été identifiées par Western blot dans le surnageant de co-culture entre les FLS et les cellules PLB-985 différenciées. Les protéines S100A8/A9, de manière moins importante que le PMA, augmente significativement l'activité NADPH oxydase des FLS préalablement co-incubés avec des pseudo-neutrophiles activés. Ainsi, S100A8/A9 présentes dans le milieu extracellulaire stimulent l'activité NADPH oxydase des FLS. Dans la PR, ces protéines sont majoritairement sécrétées dans l'articulation par les neutrophiles activés.

Outre les études situant les protéines S100 comme biomarqueurs de la PR, des données fondamentales impliquent les protéines S100 dans les mécanismes physiopathologiques de la PR (Baillet *et al.*, 2010). Premièrement, les protéines S100A8 et S100A9 semblent avoir un rôle capital dans la phase aiguë de l'inflammation par l'induction de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . Elles sont également des chimiokines qui permettent le recrutement des PMN sur le site inflammatoire (Ryckman *et al.*, 2003). Deuxièmement, le rôle des protéines S100A8 et S100A9 dans les destructions articulaires a été mis en évidence dans des modèles murins d'arthrites chroniques (van Lent *et al.*, 2007). L'hétérocomplexe S100A8/A9 est un ligand de RAGE (« Receptor for Glycation End products ») et active celui-ci (Heo *et al.*, 2011). Ce récepteur, largement exprimé dans les FLS de PR, est impliqué dans le déclenchement de l'inflammation. Une hausse de l'activation de RAGE entraîne des complications cellulaires ainsi que des dommages tissulaires. Des études *in vitro* montrent que la stimulation de RAGE, récepteur de S100A12, dans les FLS de PR, pourrait contribuer au développement de leur phénotype pseudo-tumoral (Steenvoorden *et al.*, 2007).



Bien que la pathologie de la PR soit encore mal connue, les ROS, produits de façon démesurée par les PMN infiltrants, ont largement été décrits dans la maladie et semblent jouer un rôle prédominant dans l'évolution de celle-ci. Cependant, les PMN ne sont pas les seules cellules capables de produire des ROS dans la PR. Les cellules résidentes, en particulier les FLS expriment les NADPH oxydases de Nox2 et Nox4 comme décrit dans la littérature (Chenevier-Gobeaux *et al.*, 2006). Sur le plan fonctionnel, nos résultats mettent en évidence l'activation de Nox2 des synoviocytes en réponse au PMA. Une étude précédente avait démontré l'augmentation de l'expression de p47-phox et de Nox2 dans les FLS de PR en réponse à un traitement avec des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) mais aussi le PMA (Chenevier-Gobeaux *et al.*, 2006). De plus, l'incubation prolongée des FLS de PR en présence de ces mêmes cytokines pro-inflammatoires augmente significativement la phosphorylation de p47-phox dans ces cellules. Les données obtenues nous permettent de proposer un modèle d'interaction entre les FLS et les PMN, divisée en plusieurs étapes :

- Infiltration des PMN dans l'articulation et activation de la NADPH oxydase phagocytaire (Figure 46, (1)).
- Sécrétion de divers molécules dans le milieu articulaire (Figure 46, (2)) : production de ROS, sécrétion de protéines S100A8/A9 et de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ).
- Dans la foulée, les ROS produits par les neutrophiles activés pourraient induire l'expression ou la pré-activation de Nox2 dans les FLS de la membrane synoviale (Figure 46, (3)).
- En parallèle, les produits de sécrétion du PMN vont stimuler l'activité NADPH oxydase des FLS qui à leur tour, vont produire des ROS (Figure 46, (4)).

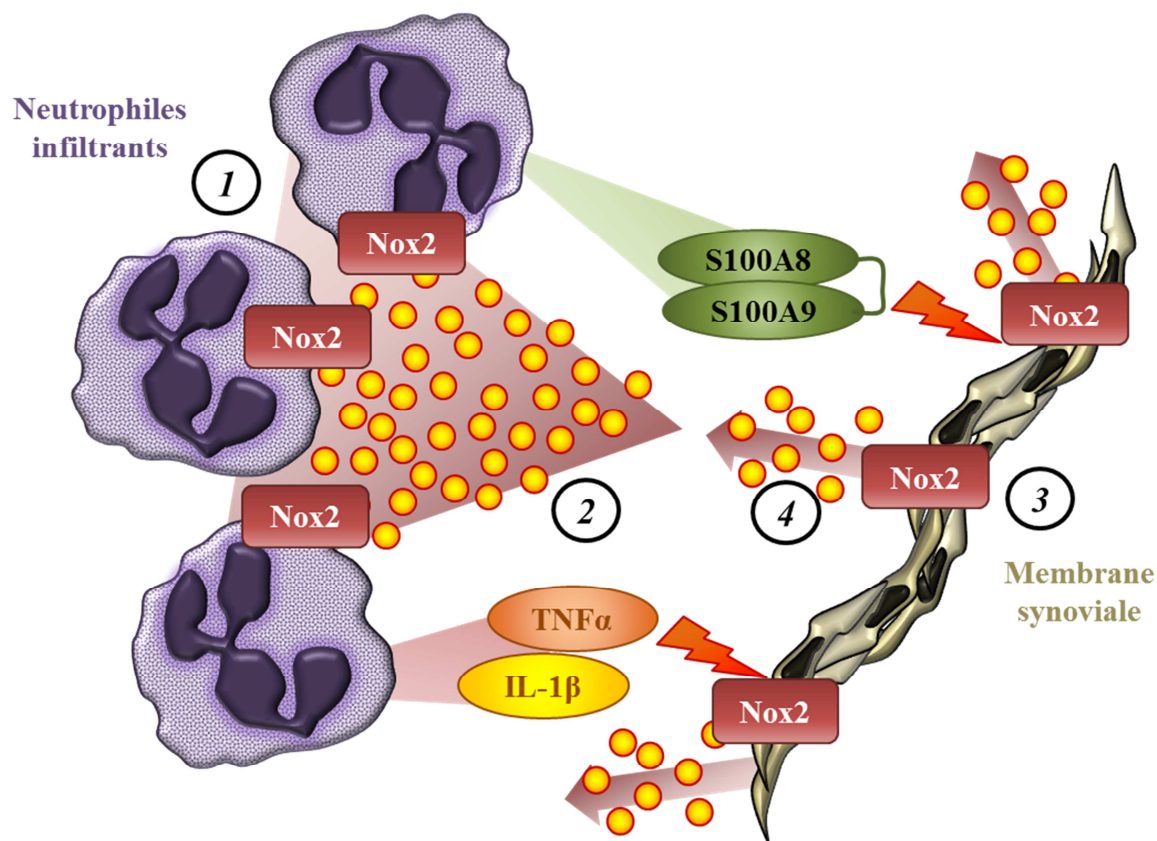


Figure 46: Illustration schématique des étapes consécutives dans l'interaction des synoviocytes avec les neutrophiles.

### III. Conclusion et perspectives

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme de régulation de la NADPH oxydase phagocytaire à travers la PFK-2. Notre étude suggère que cette enzyme permet d'activer localement la glycolyse *via* l'activation de la PFK-1. L'ATP produit localement serait utilisé pour favoriser les phosphorylations du cytochrome  $b_{558}$  et des facteurs cytosoliques indispensables à l'activation de l'enzyme. De plus, il semble exister une régulation par compartimentation en microdomaines membranaires, favorisant ainsi la production de ROS. Dans un second temps, nous montrons les effets délétères des ROS produits par les PMN dans le cas de réaction inflammatoires poussées telles que la PR. Dans cette pathologie, les ROS, surexprimés, provoquent des lésions tissulaires importantes aboutissant à la destruction des structures articulaires. Ici, notre travail met en évidence l'expression de Nox2 dans les FLS, induites par les ROS produits par les PMN suggérant que

les synoviocytes résidents, une fois activés sont capables d'entretenir le processus inflammatoire.

A l'avenir, il serait intéressant de vérifier l'hypothèse de la microcompartimentation cellulaire dans les neutrophiles. Des expériences de microscopie confocale réalisées au laboratoire montrent déjà une colocalisation de PFK-2 avec des marqueurs de radeaux lipidiques dans les cellules PLB-985 différenciées et activées par le PMA. La purification des radeaux lipidiques, impliqués dans ce processus, apporterait des informations supplémentaires quant à la localisation des différents constituants de la NADPH oxydase phagocytaire et de la PFK-2.

En ce qui concerne les FLS de PR, il serait intéressant d'évaluer le niveau d'expression de Nox2 dans les cellules avant et après exposition à des ROS, *via* l'ajout de xanthine oxydase dans le milieu, ou la co-incubation avec des neutrophiles activés. Les techniques actuelles de cytométrie en flux et de microscopie confocale seraient toutes indiquées pour réaliser cette étude. En parallèle, une analyse plus poussée de la fonctionnalité de Nox2 dans les synoviocytes pourrait être réalisée. Pour cela, la technologie des ARN interférents spécifiques des facteurs cytosoliques pourraient être utilisés pour analyser l'activité NADPH oxydase des synoviocytes transfectés.

Nous avons pu voir que les protéines S100A8/A9 sont capables de stimuler l'activité NADPH oxydase après co-incubation avec des pseudo-neutrophiles activés. Dans la PR, les protéines S100A8/A9 sont sécrétées sur le site inflammatoire par les PMN activés. Elles constituent de véritables biomarqueurs de la pathologie et elles jouent un rôle dans l'entretien et l'amplification de l'inflammation (Baillet *et al.*, 2010).

Des études rapportent également l'existence d'un effet anti-inflammatoire modulé par les protéines S100 (Harrison *et al.*, 1999). S100A8, dans le modèle murin, peut être oxydée par les ROS dans le milieu extracellulaire, ce qui a pour effet de réduire l'inflammation suggérant un rôle protecteur joué par la protéine.

Ainsi, dans le milieu extracellulaire, les protéines S100A8/A9 pourraient présenter des propriétés pro-inflammatoires ou des propriétés anti-inflammatoires. L'état d'oxydation des protéines S100A8/A9 pourrait être à l'origine de ce changement d'activité.

La suite du travail concernera l'analyse de l'état d'oxydation des protéines S100 purifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF après exposition à des ROS et l'étude de l'effet des protéines S100 oxydées sur les synoviocytes.

Appliqué à la PR, un nouveau rôle anti-inflammatoire des protéines S100A8/A9 pourrait être mis en évidence et constitué une nouvelle approche thérapeutique de la pathologie.

Nox4 est également exprimée dans les FLS de PR. Cependant, sur le plan fonctionnel, rien n'a encore été décrit au sujet de cette isoenzyme. Dans nos expériences, Nox2 semble être la principale NADPH oxydase impliquée dans la production de ROS par les FLS. Cependant, Nox4 a déjà été décrite comme jouant un rôle dans d'autres rhumatismes inflammatoires comme l'arthrose a déjà été décrite (Grange *et al.*, 2006). Des investigations complémentaires sont envisagées pour identifier le rôle de Nox4 dans la production de ROS par les synoviocytes.

# Références bibliographiques

- AHMED S., PRIGMORE E., GOVIND S., VERYARD C., KOZMA R., WIENTJES F., SEGAL A. AND BERTRAND L., (1998). Cryptic Rac-binding and p21Cdc42HS/Rac-activated Kinase Phosphorylation Sites of NADPH Oxidase Component p67phox. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 15693–15701.
- ALVAREZ-CARDONA A., YAMAZAKI-NAKASHIMADA M. AND ESPINOSA-PADILLA S., (2009). [Chronic granulomatous disease]. *Revista alergía México*, **56**, 165–174.
- ANDERSON R., VAN RENSBURG C., JOONÉ G. AND LESSING A., (1991). Auranofin inactivates phosphofructokinase in human neutrophils, leading to depletion of intracellular ATP and inhibition of superoxide generation and locomotion. *Molecular pharmacology*, **40**, 427–434.
- AVIÑA-ZUBIETA J., CHOI H., SADATSAFAVI M., ETMINAN M., ESDAILLE J. AND LACAILLE D., (2008). Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis and rheumatism*, **59**, 1690–1697.
- BAILLET A., TROCME C., BERTHIER S., ARLOTTO M., GRANGE L., CHENAU J., QUETANT S., SÈVE M., BERGER F., JUVIN R., MOREL F. AND GAUDIN P., (2010). Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases. *Rheumatology*, **49**, 671–682.
- BAILLET A., XU R., GRICHINE A., BERTHIER S., MOREL F. AND PACLET M., (2011). Coupling of 6-phosphogluconate dehydrogenase with NADPH oxidase in neutrophils: Nox2 activity regulation by NADPH availability. *The FASEB Journal*, **25**, 2333–2343.
- BANFI B., MALGRANGE B., KNISZ J., STEGER K., DUBOIS-DAUPHIN M. AND KRAUSE K., (2004). NOX3, a Superoxide-generating NADPH Oxidase of the Inner Ear. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 46065–46072.
- BANFI B., MOLNÁR G., MATURANA A., STEGER K., HEGEDŰS B., DEMAUREX N. AND KRAUSE K., (2001). A Ca<sup>2+</sup>-activated NADPH Oxidase in Testis, Spleen, and Lymph Nodes. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 37594–37601.
- BARNES P. AND KARIN M., (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England journal of medicine*, **336**, 1066–1071.
- BEDARD K., LARDY B. AND KRAUSE K., (2007). NOX family NADPH oxidases: Not just in mammals. *Biochimie*, **89**, 1107–1112.
- BERTHIER S., NGUYEN M., BAILLET A., HOGRAINDLEUR M., PACLET M., POLACK B. AND MOREL F., (2012). Molecular Interface of S100A8 with Cytochrome b558 and NADPH Oxidase Activation. *PLoS ONE*, **7**, e40277.
- BERTHIER S., PACLET M., LEROUGE S., ROUX F., VERGNAUD S., COLEMAN A. AND MOREL F., (2003). Changing the Conformation State of Cytochrome b558 Initiates NADPH Oxidase Activation: MRP8/MRP14 REGULATION. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 25499–25508.
- BOUSSETTA T., GOUGEROT-POCIDALO M., HAYEM G., CIAPPELLONI S., RAAD H., ARABI DERKAWI R., BOURNIER O., KROVIARSKI Y., ZHOU X., MALTER J., LU P., BARTEGI A., DANG P. AND EL-BENNA J., (2010). The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF- $\alpha$ -induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood*, **116**, 5795–5802.
- BOUZIDI F. AND DOUSSIERE J., (2004). Binding of arachidonic acid to myeloid-related proteins (S100A8/A9) enhances phagocytic NADPH oxidase activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **325**, 1060–1065.
- BRADFORD M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72**, 248–254.
- BRÉCHARD S., MELCHIOR C., PLANÇON S., SCHENTEN V. AND TSCHIRHART E., (2008). Store-operated Ca<sup>2+</sup> channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes. *Cell Calcium*, **44**, 492–506.

- BROWN G., STEWART M., LIU H., HA V. AND YAFFE M., (2003). A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase. *Molecular cell*, **11**, 35–47.
- BURRITT J., FOUBERT T., BANIULIS D., LORD C., TAYLOR R., MILLS J., BAUGHAN T., ROOS D., PARKOS C. AND JESAITIS A., (2003). Functional epitope on human neutrophil flavocytochrome b558. *The journal of immunology*, **170**, 6082–6089.
- CAMPION Y., JESAITIS A., NGUYEN M., GRICHINE A., HERENGER Y., BAILLET A., BERTHIER S., MOREL F. AND PACLET M., (2009). New p22-Phox Monoclonal Antibodies: Identification of a Conformational Probe for Cytochrome b558. *Journal of Innate Immunity*, **1**, 556–569.
- CAMPION Y., PACLET M., JESAITIS A., MARQUES B., GRICHINE A., BERTHIER S., LENORMAND J., LARDY B., STASIA M. AND MOREL F., (2007). New insights into the membrane topology of the phagocyte NADPH oxidase: Characterization of an anti-gp91-phox conformational monoclonal antibody. *Biochimie*, **89**, 1145–1158.
- CASTAGNA M., TAKAI Y., KAIBUCHI K., SANO K., KIKKAWA U. AND NISHIZUKA Y., (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of biological chemistry*, **257**, 7847–7851.
- CEDERGREN J., FORSLUND T., SUNDQVIST T. AND SKOGH T., (2007). Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients. *The Journal of rheumatology*, **34**, 2162–2170.
- CHEN M., LAM B., KANAOKA Y., NIGROVIC P., AUDOLY L., AUSTEN KF K. AND LEE D., (2006). Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. *Journal of Experimental Medicine*, **203**, 837–842.
- CHENEVIER-GOBEAUX C., LEMARECHAL H., BONNEFONT-ROUSSELOT D., POIRAUDEAU S., EKINDJIAN O. AND BORDERIE D., (2006). Superoxide production and NADPH oxidase expression in human rheumatoid synovial cells: regulation by interleukin-1 $\beta$  and tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Inflammation Research*, **55**, 483–490.
- CHESSA T., ANDERSON K., HU Y., XU Q., RAUSCH O., STEPHENS L. AND HAWKINS P., (2010). Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Blood*, **116**, 6027–6036.
- CHEVREL G., GARNERO P. AND MIOSSEC P., (2002). Addition of interleukin 1 (IL1) and IL17 soluble receptors to a tumour necrosis factor alpha soluble receptor more effectively reduces the production of IL6 and macrophage inhibitory protein-3 $\alpha$  and increases that of collagen in an in vitro model of rheumatoid synoviocyte activation. *Annals of the rheumatic diseases*, **61**, 730–733.
- CHIJIWA T., MISHIMA A., HAGIWARA M., SANO M., HAYASHI K., INOUE T., NAITO K., TOSHIOKA T. AND HIDAKA H., (1990). Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino) ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 5267–5272.
- CROSS A., ALESSI D., RAE J., CURNUTTE J. AND HEYWORTH P., (2000). Hematologically Important Mutations: The Autosomal Recessive Forms of Chronic Granulomatous Disease (First Update). *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **26**, 561–565.
- CROSS A., HEYWORTH P., RAE J. AND CURNUTTE J., (1995). A variant X-linked chronic granulomatous disease patient (X91+) with partially functional cytochrome b. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 8194–8200.
- CROSS A. AND SEGAL A., (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes—prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1657**, 1–22.
- DALE C., PAGANO R., PACCOLA C., PINOTTI-GUIRAO T., JULIANO M., JULIANO L. AND GIORGI R., (2006). Effect of the C-terminus of murine S100A9 protein on experimental nociception. *Peptides*, **27**, 2794–2802.

- DANA R., LETO T., MALECH H. AND LEVY R., (1998). Essential Requirement of Cytosolic Phospholipase A2 for Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 441–445.
- DANG P., JOHNSON J. AND BABIOR B., (2000). Binding of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate to the Tetratricopeptide Repeat Domains at the N-Terminus of p67<sup>PHOX</sup>, a Subunit of the Leukocyte Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase<sup>†</sup>. *Biochemistry*, **39**, 3069–3075.
- DANG P., MOREL F., GOUGEROT-POCIDALO M. AND EL BENNA J., (2003). Phosphorylation of the NADPH Oxidase Component p67<sup>PHOX</sup> by ERK2 and P38MAPK: Selectivity of Phosphorylated Sites and Existence of an Intramolecular Regulatory Domain in the Tetratricopeptide-Rich Region<sup>†</sup>. *Biochemistry*, **42**, 4520–4526.
- DANG P., STENSALLE A., BOUSSETTA T., RAAD H., DEWAS C., KROVIARSKI Y., HAYEM G., JENSEN O., GOUGEROT-POCIDALO M. AND EL-BENNA J., (2006). A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *The Journal of clinical investigation*, **116**, 2033–2043.
- DAVIS P., ELLIOTT L., HARRIS W., HILL C., HURST S., KEECH E., KUMAR M., LAWTON G., NIXON J. AND WILKINSON S., (1992). Inhibitors of protein kinase C. 2. Substituted bisindolylmaleimides with improved potency and selectivity. *Journal of medicinal chemistry*, **35**, 994–1001.
- DECHATELET L., MCPHAIL L., MULLIKIN D. AND MCCALL C., (1974). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase activity in human polymorphonuclear leukocytes. *Infection and immunity*, **10**, 528–534.
- DEKKER L., LEITGES M., ALTSCHULER G., MISTRY N., MCDERMOTT A., ROES J. AND SEGAL A., (2000). Protein kinase C-β contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem. J.*, **347**, 285–289.
- DELL'ACQUA M. AND SCOTT J., (1997). Protein Kinase A Anchoring. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 12881–12884.
- DEPREZ J., VERTOMMEN D., ALESSI D., HUE L. AND RIDER M., (1997). Phosphorylation and Activation of Heart 6-Phosphofructo-2-kinase by Protein Kinase B and Other Protein Kinases of the Insulin Signaling Cascades. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 17269–17275.
- DERMARDIROSSIAN C., SCHNELZER A. AND BOCKOCH G., (2004). Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. *Molecular cell*, **15**, 117–127.
- DIDICHENKO S., TILTON B., HEMMINGS B., BALLMER-HOFER K. AND THELEN M., (1996). Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47phox by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase. *Current biology*, **6**, 1271–1278.
- DIHAZI H., KESSLER R. AND ESCHRICH K., (2003). Glucose-Induced Stimulation of the Ras-cAMP Pathway in Yeast Leads to Multiple Phosphorylations and Activation of 6-Phosphofructo-2-kinase. *Biochemistry*, **42**, 6275–6282.
- DJEU J., SERBOUSEK D. AND BLANCHARD D., (1990). Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, **76**, 1405–1409.
- DONATO R., (1999). Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1450**, 191–231.
- DOUSSIÈRE J., BOUZIDI F., POINAS A., GAILLARD J. AND VIGNAIS P., (1999). Kinetic Study of the Activation of the Neutrophil NADPH Oxidase by Arachidonic Acid. Antagonistic Effects of Arachidonic Acid and Phenylarsine Oxide<sup>†</sup>. *Biochemistry*, **38**, 16394–16406.
- DOUSSIÈRE J., GAILLARD J. AND VIGNAIS P., (1996). Electron transfer across the O<sub>2</sub>-generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component. *Biochemistry*, **35**, 13400–13410.



- DUDLEY D.T., PANG L., DECKER S.J., BRIDGES A.J. AND SALTIEL A.R., (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 7686–7689.
- DURAND D., VIVÈS C., CANNELLA D., PÉREZ J., PEBAY-PEYROULA E., VACHETTE P. AND FIESCHI F., (2010). NADPH oxidase activator p67phox behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers. *Journal of Structural Biology*, **169**, 45–53.
- EL BENNA J., DANG P., GAUDRY M., FAY M., MOREL F., HAKIM J. AND GOUGEROT-POCIDALO M., (1997). Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Subunit p67phox during Human Neutrophil Activation. REGULATION BY PROTEIN KINASE C-DEPENDENT AND INDEPENDENT PATHWAYS. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 17204–17208.
- EL BENNA J., FAUST L., JOHNSON J. AND BABIOR B., (1996). Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Subunit p47[IMAGE] as Determined by Two-dimensional Phosphopeptide Mapping. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 6374–6378.
- EL BENNA J., HAN J., PARK J., SCHMID E., ULEVITCH R. AND BABIOR B., (1996). Activation of p38 in Stimulated Human Neutrophils: Phosphorylation of the Oxidase Component p47phox by p38 and ERK but Not by JNK. *Archives of biochemistry and biophysics*, **334**, 395–400.
- EL-BENNA J., DANG P.M.-C. AND PÉRIANIN A., (2010). Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochemical Pharmacology*, **80**, 778–785.
- EL-BENNA J., HAYEM G., DANG P., FAY M., CHOLLET-MARTIN S., ELBIM C., MEYER O. AND GOUGEROT-POCIDALO M., (2002). NADPH oxidase priming and p47phox phosphorylation in neutrophils from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondylarthropathy. *Inflammation*, **26**, 273–278.
- ELBIM C., BAILLY S., CHOLLET-MARTIN S., HAKIM J. AND GOUGEROT-POCIDALO M., (1994). Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infection and immunity*, **62**, 2195–2201.
- EL-MAGHRABI M., CLAUS T., PILKIS J. AND PILKIS S., (1982). Regulation of 6-phosphofructo-2-kinase activity by cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 315–319.
- ENGH R., GIROD A., KINZEL V., HUBER R. AND BOSSEMAYER D., (1996). Crystal Structures of Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase in Complex with Isoquinolinesulfonyl Protein Kinase Inhibitors H7, H8, and H89. STRUCTURAL IMPLICATIONS FOR SELECTIVITY. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 26157–26164.
- FAUST L., EL BENNA J., BABIOR B. AND CHANOCK S., (1995). The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *Journal of Clinical Investigation*, **96**, 1499–1505.
- FILER A., PARSONAGE G., SMITH E., OSBORNE C., THOMAS A., CURNOW S., RAINGER G., RAZA K., NASH G., LORD J., SALMON M. AND BUCKLEY C., (2006). Differential survival of leukocyte subsets mediated by synovial, bone marrow, and skin fibroblasts: site-specific versus activation-dependent survival of T cells and neutrophils. *Arthritis and rheumatism*, **54**, 2096–2108.
- FIRESTEIN G., ECHEVERRI F., YEO M., ZVAIFLER N. AND GREEN D., (1997). Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 10895–10900.
- FLOHÉ L., BRIGELIUS-FLOHÉ R., SALIOU C., TRABER M. AND PACKER L., (1997). Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radical Biology and Medicine*, **22**, 1115–1126.
- FOELL D. AND ROTH J., (2004). Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis and rheumatism*, **50**, 3762–3771.

- FONTAYNE A., DANG P.M., GOUGEROT-POCIDALO M. AND EL BENNA J., (2002). Phosphorylation of p47<sup>phox</sup> Sites by PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ II,  $\delta$ , and  $\zeta$ : Effect on Binding to p22<sup>phox</sup> and on NADPH Oxidase Activation. *Biochemistry*, **41**, 7743–7750.
- FOUBERT T., BURRITT J., TAYLOR R. AND JESAITIS A., (2002). Structural changes are induced in human neutrophil cytochrome b by NADPH oxidase activators, LDS, SDS, and arachidonate: intermolecular resonance energy transfer between trisulfopyrenyl-wheat germ agglutinin and cytochrome b(558). *Biochimica et biophysica acta*, **1567**, 221–231.
- FRANCKE U., HSIEH C., FOELLMER B., LOMAX K., MALECH H. AND LETO T., (1990). Genes for two autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease assigned to 1q25 (NCF2) and 7q11. 23 (NCF1). *American journal of human genetics*, **47**, 483.
- GADHER S., EYRE D., DUANCE V., WOTTON S., HECK L., SCHMID T. AND WOOLLEY D., (1988). Susceptibility of cartilage collagens type II, IX, X, and XI to human synovial collagenase and neutrophil elastase. *European journal of biochemistry*, **175**, 1–7.
- GAO J., WILKINS J. AND ISSEKUTZ A., (1995). Migration of human polymorphonuclear leukocytes through a synovial fibroblast barrier is mediated by both beta 2 (CD11/CD18) integrins and the beta 1 (CD29) integrins VLA-5 and VLA-6. *Cellular immunology*, **163**, 178–186.
- GARCIA R. AND SEGAL A., (1988). Phosphorylation of the subunits of cytochrome b-245 upon triggering of the respiratory burst of human neutrophils and macrophages. *Biochem. J*, **252**, 901–904.
- GEISZT M., DAGHER M., MOLNÁR G., HAVASI A., FAURE J., PACLET M., MOREL F. AND LIGETI E., (2001). Characterization of membrane-localized and cytosolic Rac-GTPase-activating proteins in human neutrophil granulocytes: contribution to the regulation of NADPH oxidase. *The Biochemical journal*, **355**, 851–858.
- GRANGE L., NGUYEN M., LARDY B., DEROUAZI M., CAMPION Y., TROCME C., PACLET M., GAUDIN P. AND MOREL F., (2006). NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxidants & redox signaling*, **8**, 1485–1496.
- GROEMPING Y. AND RITTINGER K., (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *The Biochemical journal*, **386**, 401–416.
- GROOTVELD M., HENDERSON E., FARRELL A., BLAKE D., PARKES H. AND HAYCOCK P., (1991). Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-nmr spectroscopy. *The Biochemical journal*, **273**, 459–467.
- HAN C., FREEMAN J., LEE T., MOTALEBI S. AND LAMBETH J., (1998). Regulation of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. IDENTIFICATION OF AN ACTIVATION DOMAIN IN p67phox. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 16663–16668.
- HAN Z., PANTAZIS P., LANGE T.S., WYCHE J.H. AND HENDRICKSON E.A., (2000). The staurosporine analog, Ro-31-8220, induces apoptosis independently of its ability to inhibit protein kinase C. *Cell death and differentiation*, **7**, 521–530.
- HARRISON C., RAFTERY M., WALSH J., ALEWOOD P., IISMAA S., THLIVERIS S. AND GECZY C., (1999). Oxidation Regulates the Inflammatory Properties of the Murine S100 Protein S100A8. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 8561–8569.
- HENROTIN Y., BRUCKNER P. AND PUJOL J., (2003). The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, **11**, 747–755.
- HEO Y., OH H., JUNG Y., CHO M., LEE SY, YU J., PARK M., KIM H., LEE SH AND PARK S., (2011). The expression of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in RA-FLS is induced by IL-17 via Act-1. *Arthritis research & therapy*, **13**, R113.

- HEYWORTH P. AND BADWEY J., (1990). Protein phosphorylation associated with the stimulation of neutrophils. Modulation of superoxide production by protein kinase C and calcium. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **22**, 1–26.
- HEYWORTH P., CURNUTTE J., NAUSEEF W., VOLPP B., PEARSON D., ROSEN H. AND CLARK R., (1991). Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *Journal of Clinical Investigation*, **87**, 352.
- HU G., YE R., DINAUER M., MALIK A. AND MINSHALL R., (2008). Neutrophil caveolin-1 expression contributes to mechanism of lung inflammation and injury. *American journal of physiology*, **294**, L178–L186.
- HUNTER M. AND CHAZIN W., (1998). High Level Expression and Dimer Characterization of the S100 EF-hand Proteins, Migration Inhibitory Factor-related Proteins 8 and 14. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 12427–12435.
- IMAZUMI T., MATSUMIYA T., YOSHIDA H., NARAOKA T., UESATO R., ISHIBASHI Y., OTA K., TOH S., FUKUDA S. AND SATOH K., (2009). Tumor-necrosis factor- $\alpha$  induces retinoic acid-inducible gene-I in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Immunology Letters*, **122**, 89–93.
- ITO T., MATSUI Y., AGO T., OTA K. AND SUMIMOTO H., (2001). Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions. *The EMBO journal*, **20**, 3938–3946.
- JOHANNES F., PRESTLE J., DIETERICH S., OBERHAGEMANN P., LINK G. AND PFIZENMAIER K., (1995). Characterization of activators and inhibitors of protein kinase C $\mu$ . *European journal of biochemistry*, **227**, 203–307.
- KANAI F., LIU H., FIELD S., AKBARY H., MATSUI T., BROWN G., CANTLEY L. AND YAFFE M., (2001). The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nature cell biology*, **3**, 675–678.
- KAWAHARA T., JACKSON H., SMITH S., SIMPSON P. AND LAMBETH J., (2011). Nox5 Forms a Functional Oligomer Mediated by Self-Association of Its Dehydrogenase Domain. *Biochemistry*, **50**, 2013–2025.
- KAWAHARA T., RITSICK D., CHENG G. AND LAMBETH J., (2005). Point Mutations in the Proline-rich Region of p22phox Are Dominant Inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent Reactive Oxygen Generation. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 31859–31869.
- KERKHOFF C., NACKEN W., BENEDYK M., DAGHER M., SOPALLA C. AND DOUSSIERE J., (2005). The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. *The FASEB Journal*, **19**, 467–469.
- KITAMURA K., KANGAWA K., MATSUI H. AND UYEDA K., (1988). Phosphorylation of myocardial fructose-6-phosphate, 2-kinase: fructose-2, 6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. Activation by phosphorylation and amino acid sequences of the phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 16796–16801.
- KNAUS U., HEYWORTH P., EVANS T., CURNUTTE J. AND BOCKOCH G., (1991). Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science*, **254**, 1512–1515.
- KOGA H., TERASAWA H., NUNOI H., TAKESHIGE K., INAGAKI F. AND SUMIMOTO H., (1999). Tetratricopeptide Repeat (TPR) Motifs of p67phox Participate in Interaction with the Small GTPase Rac and Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 25051–25060.
- KRAMER I., VAN DER BEND R., VERTHOEVEN A. AND ROOS D., (1988). The 47-kDa protein involved in the NADPH:O<sub>2</sub> oxidoreductase activity of human neutrophils is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase without induction of a respiratory burst. *Biochimica et biophysica acta*, **971**, 189–196.
- KURZ B., STEINHAGEN J. AND SCHÜNKE M., (1999). Articular chondrocytes and synoviocytes in a co-culture system: influence on reactive oxygen species-induced cytotoxicity and lipid peroxidation. *Cell and tissue research*, **269**, 555–563.

- LAEMMLI U. AND FAVRE M., (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *Journal of molecular biology*, **80**, 575–599.
- LAMBETH J., (2002). Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Current opinion in hematology*, **9**, 11–17.
- LAPOUGE K., SMITH S., GROEMPING Y. AND RITTINGER K., (2002). Architecture of the p40-p47-p67phox Complex in the Resting State of the NADPH Oxidase. A CENTRAL ROLE FOR p67phox. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 10121–10128.
- LAPOUGE K., SMITH S., WALKER P., GAMBLIN S., SMERDON S. AND RITTINGER K., (2000). Structure of the TPR Domain of p67phox in Complex with Rac· GTP. *Molecular cell*, **6**, 899–907.
- LEFÈVRE S., KNEDLA A., TENNIE C., KAMPMANN A., WUNRAU C., DINSER R., KORB A., SCHNÄKER E., TARNER I., ROBBINS P., EVANS C., STÜRZ H., STEINMEYER J., GAY S., SCHÖLMECHER J., PAP T., MÜLLER-LADNER U. AND NEUMANN E., (2009). Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nature medicine*, **15**, 1414–1420.
- VAN LENT P., GREVERS L., BLOM A., SLOETJES A., MORT J., VOGL T., NACKEN W., VAN DEN BERG W. AND ROTH J., (2007). Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, **67**, 1750–1758.
- LEWIS E., SERGEANT S., LEDFORD B., STULL N., DINAUER M. AND MCPHAIL L., (2009). Phosphorylation of p22phox on Threonine 147 Enhances NADPH Oxidase Activity by Promoting p47phox Binding. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 2959–2967.
- LINDEMANN A., RIEDEL D., OSTER W., MEUER S., BLOHM D., MERTELSMANN R. AND HERRMANN F., (1988). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor induces interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *The Journal of immunology*, **140**, 837–839.
- LIU F., DAY Y., LIOU J., YU H. AND LIAO H., (2012). Splitomicin inhibits fMLP-induced superoxide anion production in human neutrophils by activate cAMP/PKA signaling inhibition of ERK pathway. *European Journal of Pharmacology*, **688**, 68–75.
- LLOYD P. AND HARDIN C., (2001). Caveolae and the organization of carbohydrate metabolism in vascular smooth muscle. *Journal of cellular biochemistry*, **82**, 399–408.
- LOMAX K., LETO T., NUNOI H., GALLIN J. AND MALECH H., (1989). Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science*, **245**, 409–412.
- LOPES L., DAGHER M., GUTIERREZ A., YOUNG B., BOUIN A., FUCHS A. AND BABIOR B., (2004). Phosphorylated p40<sup>PHOX</sup> as a Negative Regulator of NADPH Oxidase †. *Biochemistry*, **43**, 3723–3730.
- LYLE A., DESHPANDE N., TANIYAMA Y., SEIDEL-ROGOL B., POUNKOVA L., DU P., PAPA HARALAMBUS C., LASSEGUE B. AND GRIENGLING K., (2009). Poldip2, a Novel Regulator of Nox4 and Cytoskeletal Integrity in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, **105**, 249–259.
- MAIANSKI N., GEISLER J., SRINIVASULA S., ALNEMRI E., ROOS D. AND KUIJPERS T., (2004). Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell death and differentiation*, **11**, 143–153.
- MAIANSKI N., MUL F., VAN BUUL J., ROOS D. AND KUIJPERS T., (2002). Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils. *Blood*, **99**, 672–679.
- MANTHEY C.L., WANG S.-W., KINNEY S.D. AND YAO Z., (1998). SB202190, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, is a powerful regulator of LPS-induced mRNAs in monocytes. *Journal of leukocyte biology*, **64**, 409–417.
- MAO G. AND POZNANSKY M., (1992). Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. *FEBS letters*, **305**, 233–236.

- MATUTE J.D., ARIAS A.A., WRIGHT N.A.M., WROBEL I., WATERHOUSE C.C.M., LI X.J., MARCHAL C.C., STULL N.D., LEWIS D.B., STEELE M., KELLNER J.D., YU W., MEROUEH S.O., NAUSEEF W.M. AND DINAUER M.C., (2009). A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*, **114**, 3309–3315.
- MEANS T., PAVLOVICH R., ROCA D., VERMEULEN M. AND FENTON M., (2000). Activation of TNF-alpha transcription utilizes distinct MAP kinase pathways in different macrophage populations. *Journal of Leukocyte Biology*, **67**, 885–893.
- MEJA K., CATLEY M., CAMBRIDGE L., BARNES P., LUM H., NEWTON R. AND GIEMBYCZ M., (2004). Adenovirus-Mediated Delivery and Expression of a cAMP-Dependent Protein Kinase Inhibitor Gene to BEAS-2B Epithelial Cells Abolishes the Anti-Inflammatory Effects of Rolipram, Salbutamol, and Prostaglandin E2: A Comparison with H-89. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **309**, 833–844.
- MERRY P., GROOTVELD M., LUNEC J. AND BLAKE D., (1991). Oxidative damage to lipids within the inflamed human joint provides evidence of radical-mediated hypoxic-reperfusion injury. *The American journal of clinical nutrition*, **53**, 362S–369S.
- MITCHELL K., YANG H., TESSIER P., MUHLY W., SWAIM W., SZALAYOVA I., KELLER J., MEZEY E. AND IADAROLA M., (2008). Localization of S100A8 and S100A9 expressing neutrophils to spinal cord during peripheral tissue inflammation. *Pain*, **134**, 216–231.
- MOREL F., DEWALD B., BERTHIER S., ZAOUÏ P., DIANOUX A., VIGNAIS P. AND BAGGIOLINI M., (1994). Further characterization of the gelatinase-containing particles of human neutrophils. *Biochimica et biophysica acta*, **1201**, 373–380.
- NAKAMURA R., SUMIMOTO H., MIZUKI K., AGO T., KITAJIMA S., TAKESHIGE K., SAKAKI Y. AND ITO T., (1998). The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40phox and p67phox, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase. *European journal of biochemistry*, **251**, 583–589.
- NEMOTO S., XIANG J., HUANG S. AND LIN A., (1998). Induction of Apoptosis by SB202190 through Inhibition of p38beta Mitogen-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 16415–16420.
- NISIMOTO Y., FREEMAN J., MOTALEBI S., HIRSHBERG M. AND LAMBETH J., (1997). Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 18834–18841.
- PACLET M., BERTHIER S., KUHN L., GARIN J. AND MOREL F., (2007). Regulation of phagocyte NADPH oxidase activity: identification of two cytochrome b558 activation states. *The FASEB Journal*, **21**, 1244–1255.
- PACLET M., COLEMAN A., VERGNAUD S. AND MOREL F., (2000). P67-phox-Mediated NADPH Oxidase Assembly: Imaging of Cytochrome b<sub>558</sub> Liposomes by Atomic Force Microscopy<sup>†</sup>. *Biochemistry*, **39**, 9302–9310.
- PACLET M., HENDERSON C. LM, CAMPION Y., MOREL F. AND DAGHER M., (2004). Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. *Biochem. J*, **382**, 981–986.
- PAP T., FRANZ J., HUMMEL K., JEISY E., GAY R. AND GAY S., (2000). Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. *Arthritis research*, **2**, 59–64.
- PETHEO G. AND DEMAUREX N., (2005). Voltage-and NADPH-dependence of electron currents generated by the phagocytic NADPH oxidase. *Biochem. J*, **388**, 485–491.
- PHILIPS D., DIAS H., KITAS G. AND GRIFFITHS H., (2010). Aberrant reactive oxygen and nitrogen species generation in rheumatoid arthritis (RA): causes and consequences for immune function, cell survival, and therapeutic intervention. *Antioxidants & redox signaling*, **12**, 743–785.

- PORTER C., KURIBAYASHI F., PARKAR M., ROOS D. AND KINNON C., (1996). Detection of gp91-phox precursor protein in B-cell lines from patients with X-linked chronic granulomatous disease as an indicator for mutations impairing cytochrome b558 biosynthesis. *Biochem. J*, **315**, 571–575.
- PRIVAT S., OO A. AND WATERBURY L., (2001). Production of interleukin-6, but not interleukin-8, induced by TNF-alpha or IL-1 beta in human fibroblast-like synoviocyte increases over cell passage. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, **44**, 9–13.
- RAAD H., PACLET M., BOUSSETTA T., KROVIARSKI Y., MOREL F., QUINN M., GOUGEROT-POCIDALO M., DANG P. AND EL-BENNA J., (2008). 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. *The FASEB Journal*, **23**, 1011–1022.
- RAVASI T., HSU K., GOYETTE J., SCHRODER K., YANG Z., RAHIMI F., MIRANDA L., ALEWOOD P., HUME D. AND GECZY C., (2004). Probing the S100 protein family through genomic and functional analysis. *Genomics*, **84**, 10–22.
- REES M., HAWKINS C. AND DAVIES M., (2004). Hypochlorite and superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulphates. *The Biochemical journal*, **381**, 175–184.
- REEVES E., DEKKER L., FORBES L., WIENTJES F., GROGAN A., PAPPIN D. AND SEGAL A., (1999). Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils. *The Biochemical journal*, **344**, 859–866.
- REGIER D., GREENE D., SERGEANT S., JESAITIS A. AND MCPHAIL L., (2000). Phosphorylation of p22phox Is Mediated by Phospholipase D-dependent and -independent Mechanisms. CORRELATION OF NADPH OXIDASE ACTIVITY AND p22phox PHOSPHORYLATION. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 28406–28412.
- RIDER M., BERTRAND L., VERTOMMEN D., MICHELS P., ROUSSEAU G. AND HUE L., (2004). 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem. J*, **381**, 561–579.
- RIDER M., VAN DAMME J., VERTOMMEN D., MICHEL A., VENDEKERCKHOVE J. AND HUE L., (1992). Evidence for new phosphorylation sites for protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase in bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS letters*, **310**, 139–142.
- RIDER M., VANDAMME J., LEBEAU E., VERTOMMEN D., VIDAL H., ROUSSEAU G., VANDEKERCKHOVE J. AND HUE L., (1992). The two forms of bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase result from alternative splicing. *Biochem. J*, **285**, 405–411.
- ROSENGREN S., CORR M. AND BOYLE D.L., (2010). Platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta synergistically potentiate inflammatory mediator synthesis by fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis research & therapy*, **12**, R65.
- ROYER-POKORA B., KUNKEL L., MONACO A., GOFF S., NEWBURGER P., BAEHNER R., COLE F., CURNUTTE J. AND ORKIN S., (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature*, **322**, 32–38.
- RYCKMAN C., MCCOLL S., VANDAL K., MÉDICIS R., LUSSIER A., POUBELLE P. AND TESSIER P., (2003). Role of S100A8 and S100A9 in Neutrophil Recruitment in Response to Monosodium Urate Monohydrate Crystals in the Air-Pouch Model of Acute Gouty Arthritis. *Arthritis and rheumatism*, **48**, 2310–2320.
- SEGAL A., (1987). Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease. *Nature*, **326**, 88–91.
- SHAO D., SEGAL A. AND DEKKER L., (2003). Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Letters*, **550**, 101–106.

- SHIOSE A. AND SUMIMOTO H., (2000). Arachidonic Acid and Phosphorylation Synergistically Induce a Conformational Change of p47phox to Activate the Phagocyte NADPH Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 13793–13801.
- SOPALLA C., LEUKERT N., SORG C. AND KERKHOFF C., (2002). Evidence for the involvement of the unique C-tail of S100A9 in the binding of arachidonic acid to the heterocomplex S100A8/A9. *Biological chemistry*, **383**, 1895–1905.
- STASIA M., BRION J., BOUTONNAT J. AND MOREL F., (2003). Severe Clinical Forms of Cytochrome b–Negative Chronic Granulomatous Disease (X91-) in 3 Brothers with a Point Mutation in the Promoter Region of CYBB. *Journal of Infectious Diseases*, **188**, 1593–1604.
- STEBULIS J., ROSSETTI R., ATEZ F. AND ZURIER R., (2005). Fibroblast-like synovial cells derived from synovial fluid. *The Journal of rheumatology*, **32**, 301–306.
- STEENVOORDEN M.M.C., TOES R.E.M., RONDAY H.K., HUIZINGA T.W.J. AND DEGROOT J., (2007). RAGE activation induces invasiveness of RA fibroblast-like synoviocytes in vitro. *Clinical and experimental rheumatology*, **25**, 740.
- SUH Y., ARNOLD R., LASSEGUE B., SHI J., XU X., SORESCU D., CHUNG A., GRIENGLING K. AND LAMBETH J., (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, **401**, 79–82.
- SUMIMOTO H., KAGE Y., NUNOI H., SASAKI H., NOSE T., FUKUMAKI Y., OHNO M., MINAKAMI S. AND TAKESHIGE K., (1994). Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 5345–5349.
- TAMURA M., SHIOZAKI I., ONO S., MIYANO K., KUNIHIRO S. AND SASAKI T., (2007). p40phox as an alternative organizer to p47phox in Nox2 activation: A new mechanism involving an interaction with p22phox. *FEBS Letters*, **581**, 4533–4538.
- TAYLOR W.R., JONES D.T. AND SEGAL A.W., (1993). A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b–245  $\beta$ -chain. *Protein Science*, **2**, 1675–1685.
- TOWBIN H., STAHELIN T. AND GORDON J., (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*, **24**, 145–149.
- TUCKER K., LILLY M., JR HECK L. AND RADO T., (1987). Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood*, **70**, 372–378.
- VILHARDT F. AND VAN DEURS B., (2004). The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly. *The EMBO journal*, **23**, 739–748.
- WALLACH T. AND SEGAL A., (1996). Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b558 of the NADPH oxidase of phagocytes. *The Biochemical journal*, **320**, 33–38.
- YOSHIDA L., SARUTA F., YOSHIKAWA K., TATSUZAWA O. AND TSUNAWAKI S., (1998). Mutation at Histidine 338 of gp91phox Depletes FAD and Affects Expression of Cytochrome b558 of the Human NADPH Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 27879–27886.
- YU L., DELEO F., BIBERSTINE-KINKADE K., RENEE J., NAUSEEF W. AND DINAUER M., (1999). Biosynthesis of Flavocytochrome b558. gp91phox IS SYNTHESIZED AS A 65-kDa PRECURSOR (p65) IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 4364–4369.
- YU L., ZHEN L. AND DINAUER M., (1997). Biosynthesis of the Phagocyte NADPH Oxidase Cytochrome b558. ROLE OF HEME INCORPORATION AND HETERODIMER FORMATION IN MATURATION AND STABILITY OF gp91phox and p22phox SUBUNITS. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 27288–27294.
- YUZAWA S., OGIURA K., HORIUCHI M., SUZUKI N., FUJIOKA Y., KATAOKA M., SUMIMOTO H. AND INAGAKI F., (2004). Solution Structure of the Tandem Src Homology 3 Domains of p47phox in an Autoinhibited Form. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 29752–29760.

ZHAN S., VAZQUEZ N., ZHAN S., WIJNTJES F., BUDARF M., SCHROCK E., RIED T., GREEN E. AND CHANOCK S., (1996). 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*, **88**, 2714–2721.

ZHAO Z., ROBINSON R.G., BARNETT S.F., DEFEO-JONES D., JONES R.E., HARTMAN G.D., HUBER H.E., DUGGAN M.E. AND LINDSLEY C.W., (2008). Development of potent, allosteric dual Akt1 and Akt2 inhibitors with improved physical properties and cell activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **18**, 49–53.

ZHEN L., KING A., XIAO Y., CHANOCK S., ORKIN S. AND DINAUER M., (1993). Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**, 9832–9836.



# Annexes

## LISTE DES PUBLICATIONS

### *PUBLICATIONS ORIGINALES DANS DES REVUES AVEC COMITE DE LECTURE*

Baillet A., **Hograindleur MA.**, El Benna J., Grichine A., Berthier S., Morel F., Paclet MH. (en préparation) – Coupling of NADPH oxidase activation and glycolysis in activated polymorphonuclear neutrophils: role of 6-phosphofructo-kinase 2.

Berthier S., Nguyen MV., Baillet A., Hograindleur MA., Paclet MH., Polack B., Morel F. (2012) - Molecular interface of S100A8 with cytochrome *b<sub>558</sub>* and NADPH oxidase activation. PLoS One 7(7): e40277.

### *COMMUNICATIONS ORALES*

Baillet A, **Hograindleur MA**, El Benna J, Grichine A, Berthier S, Morel F et Paclet MH - Couplage de la NADPH oxydase et de la glycolyse dans les neutrophiles activés : rôle de la phosphofructokinase-2. 8<sup>ème</sup> colloque Francophone du Club Oxydase, FIAP Jean Monnet, Paris (30-31 mai 2013).

### *COMMUNICATIONS PAR POSTER*

Baillet A, **Hograindleur MA**, El Benna J, Grichine A, Berthier S, Morel F et Paclet MH - Couplage de la NADPH oxydase et de la glycolyse dans les neutrophiles activés : rôle de la phosphofructokinase-2 - Journée de la Recherche Médicale de Grenoble, Faculté de Médecine, La Tronche (7 juin 2013).

Paclet MH, Baillet A, **Hograindleur MA**, El Benna J, Grichine A, Berthier S, Morel F - 6-phosphofructo-2-kinase: a new modulator of neutrophil NADPH oxidase activity. International Symposium “The neutrophil in immunity”, Quebec, Canada (9-12 juin 2012).

**Hograindleur MA**, Baillet A, Berthier S, Gaudin P, Morel F, Paclet MH - Interaction neutrophile / synoviocyte dans la polyarthrite rhumatoïde : rôle des dérivés réactifs de l’oxygène. Journée de la Recherche Médicale de Grenoble, Faculté de Médecine, La Tronche (4 mai 2012).

**La NADPH oxydase phagocytaire**  
*Régulation et implication dans la Polyarthrite Rhumatoïde*

*Hograindleur Marc - André*  
*Le 20 Décembre 2013*

**RÉSUMÉ**

La Polyarthrite Rhumatoïde est le rhumatisme inflammatoire le plus fréquent. Au cours de la pathologie, les synoviocytes de la membrane synoviale sont au contact de cellules inflammatoires en particulier des neutrophiles qui produisent en quantité massive des formes réactives de l'oxygène qui sont à l'origine d'importantes lésions tissulaires. L'enzyme impliquée de cette explosion oxydative est la NADPH oxydase des neutrophiles. La NADPH oxydase phagocytaire est formée d'un centre catalytique, le cytochrome  $b_{558}$ , sur lequel viennent s'associer des protéines cytosoliques régulatrices. L'enzyme est inactive et dissociée au repos. En réponse à un stimulus, les facteurs cytosoliques s'assemblent au niveau du cytochrome  $b_{558}$ , induisant un changement de sa conformation et la libération d'ions superoxyde  $O_2^-$ . Notre étude s'est focalisée sur l'analyse de la régulation de l'activité NADPH oxydase par la 6-phosphofructokinase-2, une enzyme impliquée dans la régulation de la glycolyse, la voie principale de production d'énergie dans les neutrophiles. L'emploi d'inhibiteurs pharmacologiques de kinases impliquées dans l'activation de la 6-phosphofructokinase-2, a montré une diminution de l'activité glycolytique des neutrophiles couplée à une réduction de l'activité NADPH oxydase. Ces premières données mettent en avant un nouveau mécanisme de régulation de l'activité de la NADPH oxydase par micro-compartimentation des enzymes du métabolisme énergétique avec la NADPH oxydase, dans les neutrophiles stimulés, ajoutant ainsi un niveau de contrôle supplémentaire de la production d'ions superoxyde. Au vu de la toxicité importante des dérivés réactifs de l'oxygène, une dérégulation de l'activité de la NADPH oxydase peut avoir des conséquences graves comme le développement de maladies inflammatoires, telles que la Polyarthrite Rhumatoïde dont les mécanismes physiopathologiques restent mal connus. Dans ce travail, nous avons étudié le dialogue entre les synoviocytes de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et des cellules mimant les neutrophiles activés. Nous avons pu montrer que la co-culture de ces deux types cellulaires entraîne une modification du phénotype des synoviocytes qui acquièrent la capacité à produire eux-mêmes des dérivés réactifs de l'oxygène. Aussi, dans un contexte pathologique comme la Polyarthrite Rhumatoïde, l'explosion oxydative médiée par les neutrophiles infiltrés favoriserait l'expression de la NADPH oxydase dans les synoviocytes qui pourraient alors participer à l'amplification de l'inflammation.

**MOTS-CLÉS :** NADPH oxydase, dérivés réactifs de l'oxygène, neutrophiles, phosphofructokinase-2, phosphorylations, glycolyse, synoviocytes, polyarthrite rhumatoïde.