

La NADPH oxydase

Présentation générale et exemple d'étude

Biochimie des flavoprotéines

Laura Baciou,
Tania Bizouarn
Florence Lederer
Leila Lamanuzzi (Post Doc)

Biochimie sous rayonnement ionisant

C. Houée Levin
Magali Gelinotte (Post Doc)

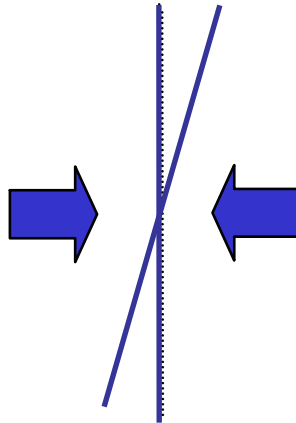
Photobiologie

Marie Erard
Fabienne Merola
Luis Alvarez (Doctorant)

Le Stress oxydant

**Production de
«Réactif Oxygen Species»**

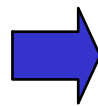
$^1\text{O}_2$, OH^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2
ou
R.O.S.



Capacités de défense anti-oxydante

**Enzymes de protection
Enzymes de réparation
Capteurs (vitamines,...)**

Stress Oxydant



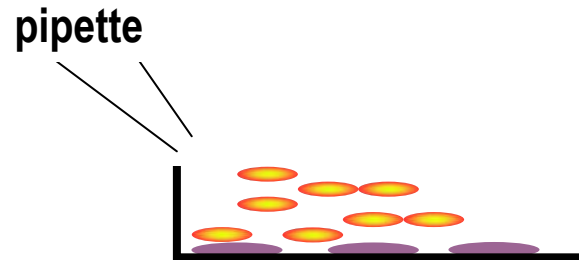
Désordres cellulaires graves
(cibles: protéines, lipides, ADN, ...)

- **Cancer, Maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, Inflammation**
- **Défense contre les agents infectieux / Granulomatose septique chronique**

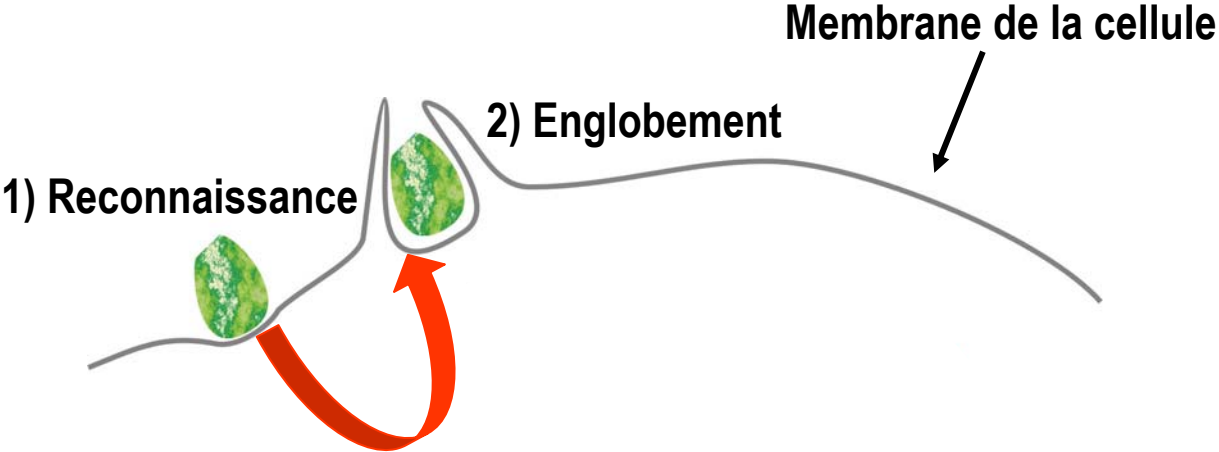
La phagocytose

Cellule: modèle de neutrophiles (cellules du système immunitaire)

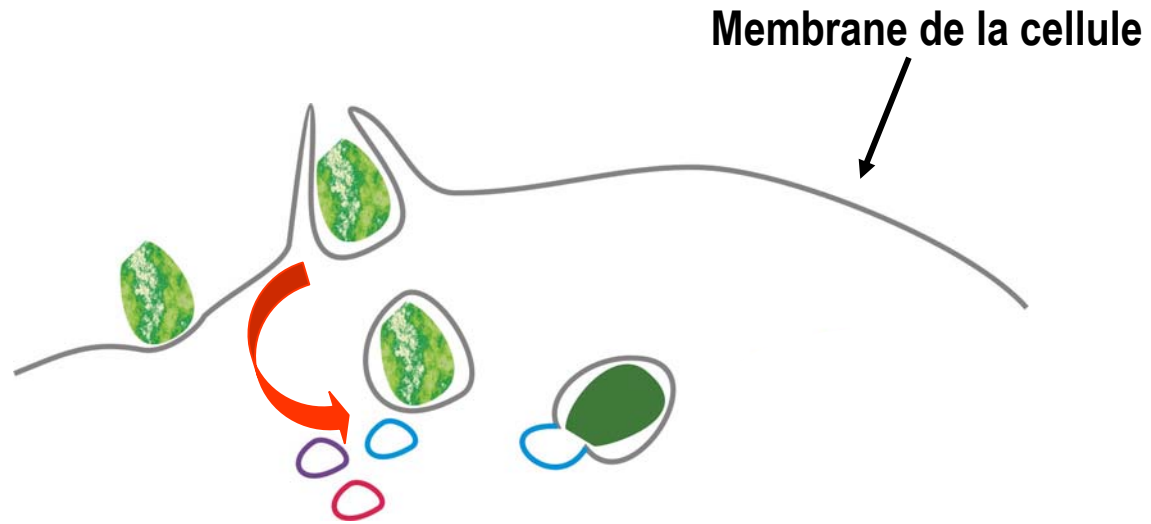
Objet phagocyté: levures marquées avec une sonde fluorescente sensible aux ROS



La phagocytose

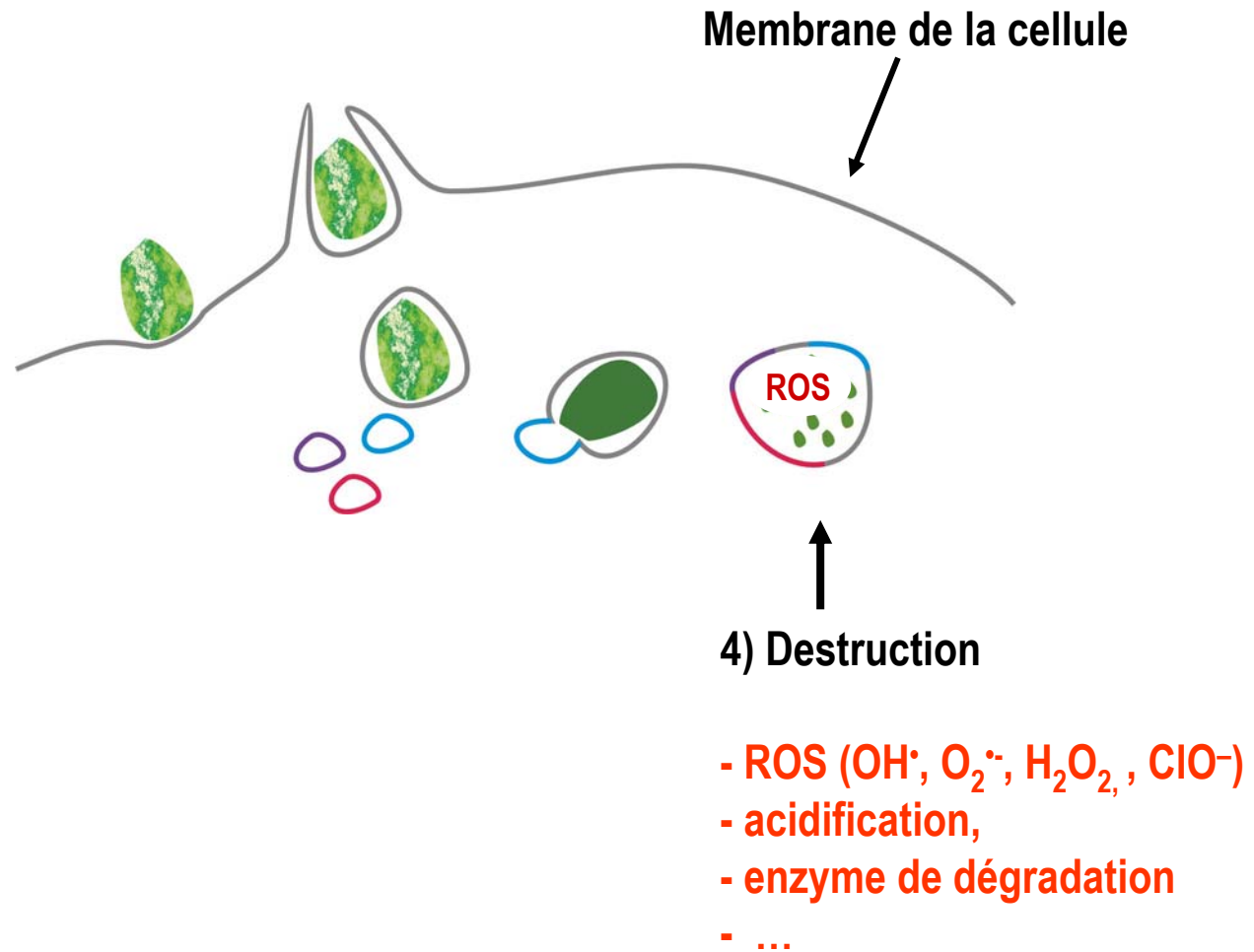


La phagocytose

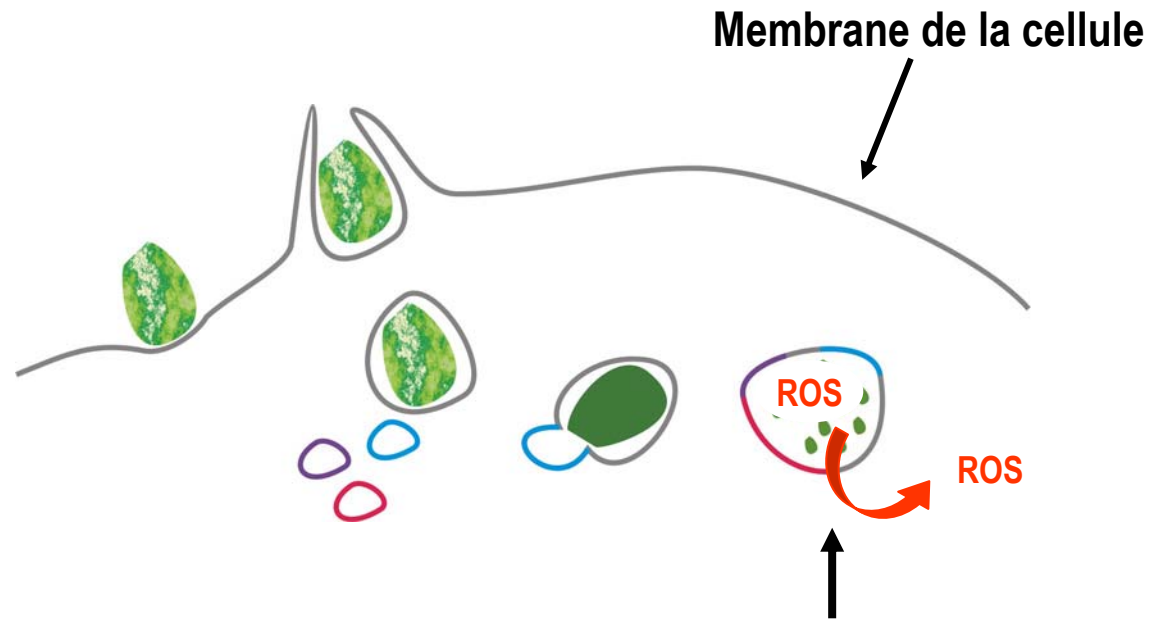


3) Les granules contenant les protéines nécessaires à la production des radicaux fusionnent avec le phagosome.

La phagocytose



La phagocytose



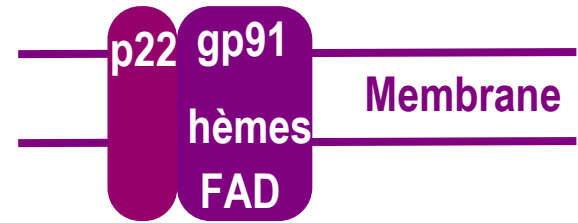
5) Diffusion des ROS hors du phagosome
Destruction des neutrophiles eux-mêmes (kamikaze!)

La NADPH oxydase est à l'origine de la production des ROS : production de $O_2^{\cdot-}$

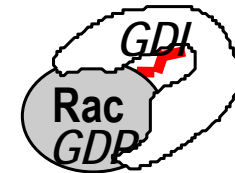
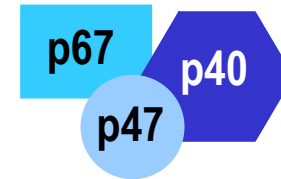
► $O_2^{\cdot-}$ conduit à OH^{\cdot} , H_2O_2 , ClO^-

La NADPH oxydase : les composants

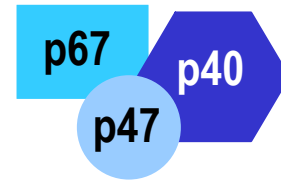
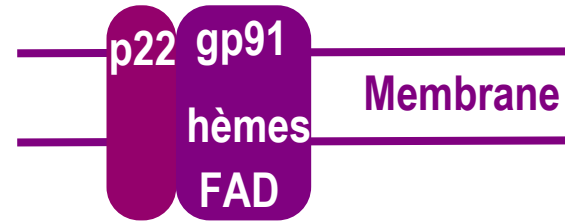
Membrane de la cellule



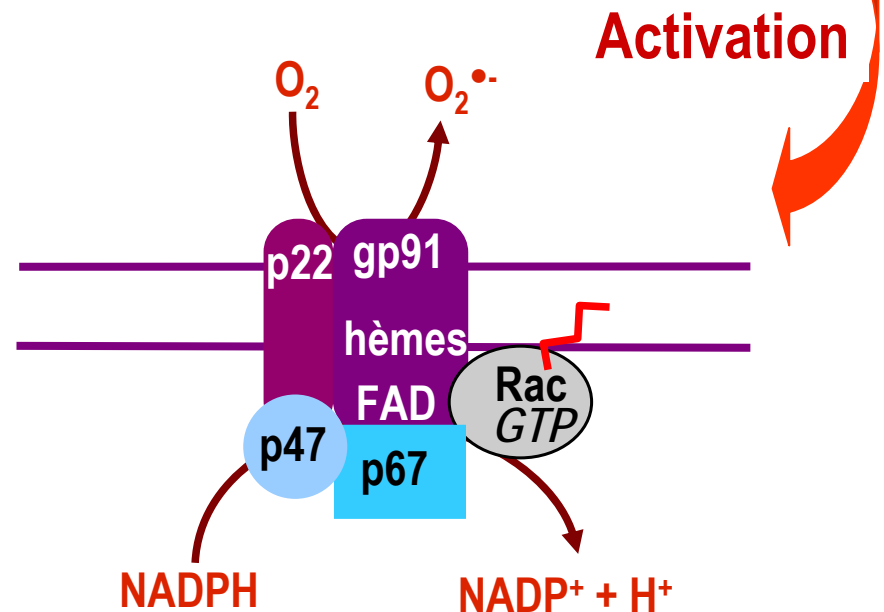
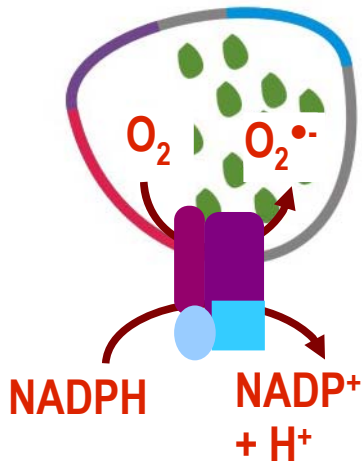
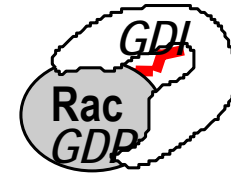
Cytoplasme



La NADPH oxydase : les composants

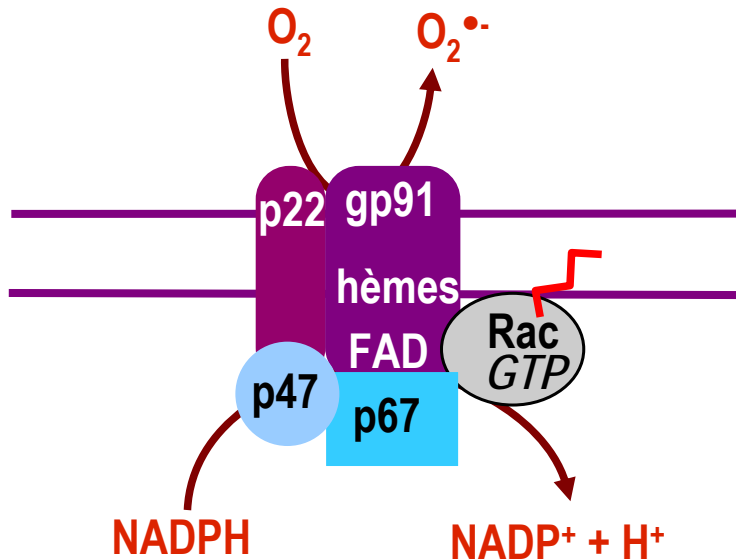
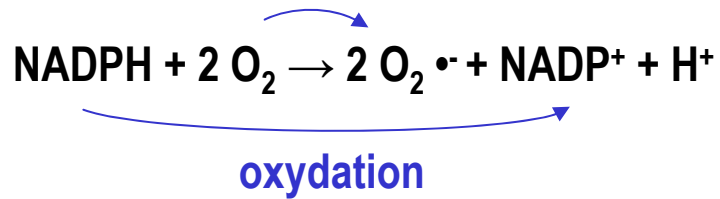


Cytoplasme

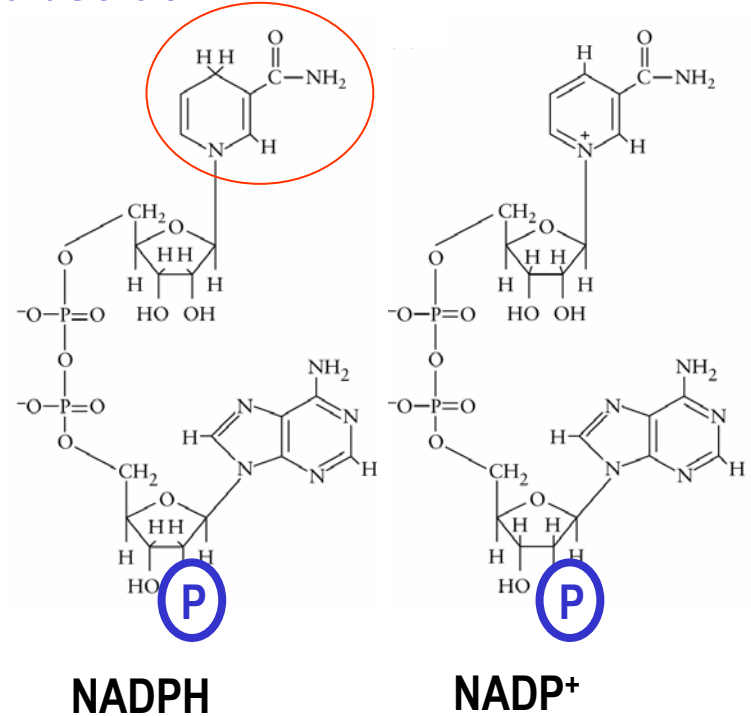


La NADPH oxydase : le bilan de la réaction

Réduction à 1électron



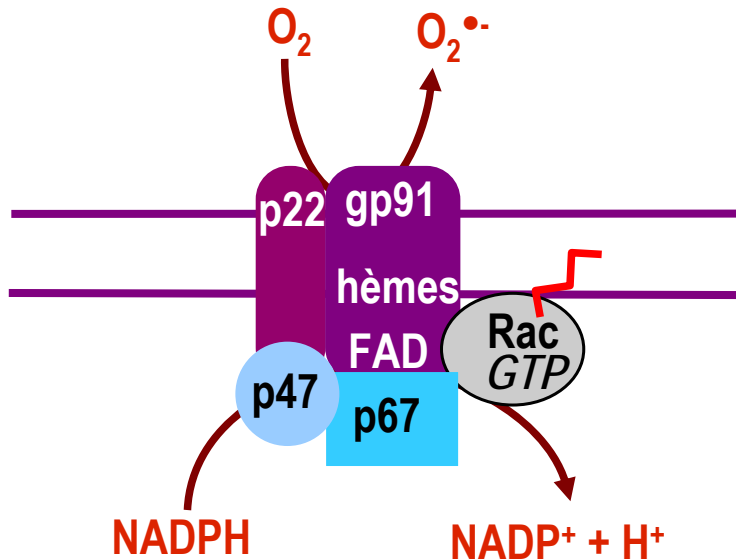
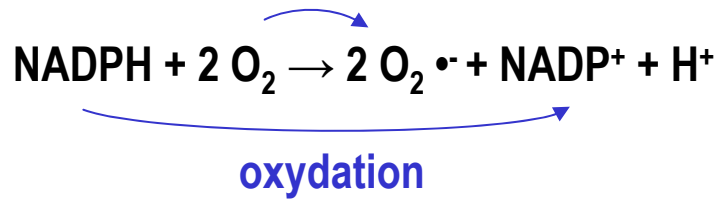
Le substrat:



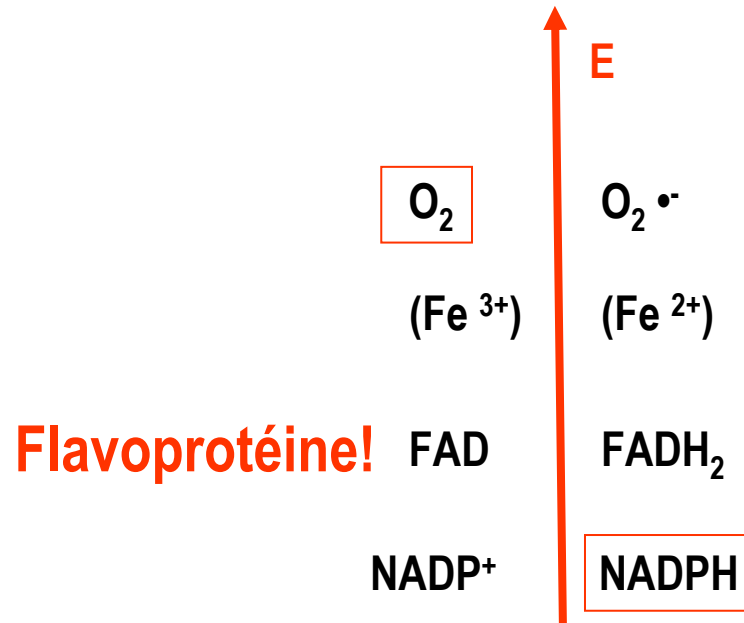
nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

La NADPH oxydase : le bilan de la réaction

Réduction à 1électron



La chaîne de transfert d'électrons:



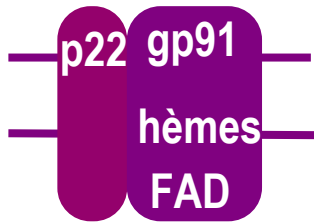
Tania Bizouarn : Site de fixation de NADPH

La NADPH oxydase : les outils

AU REPOS:

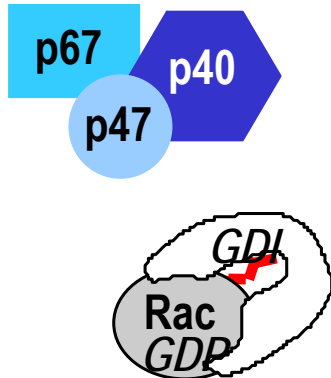
In vitro

En cellule



Membrane de neutrophiles
de bœuf

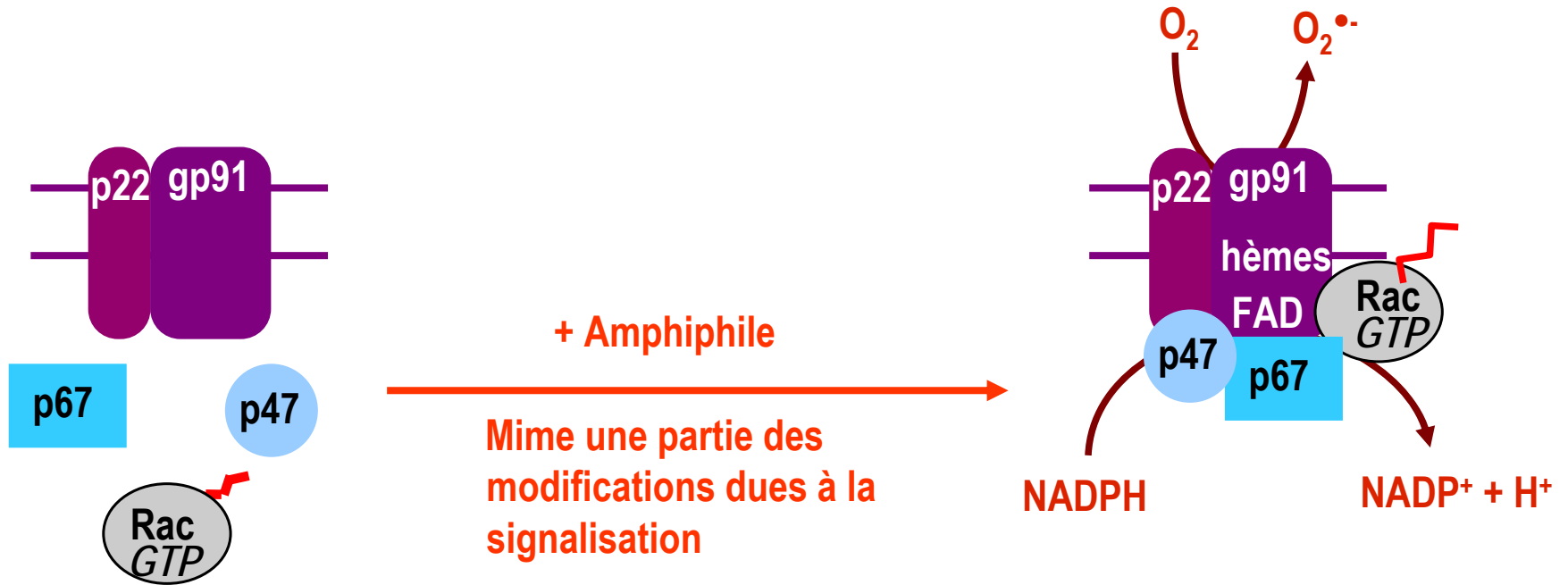
Granules
ou membrane cellulaire



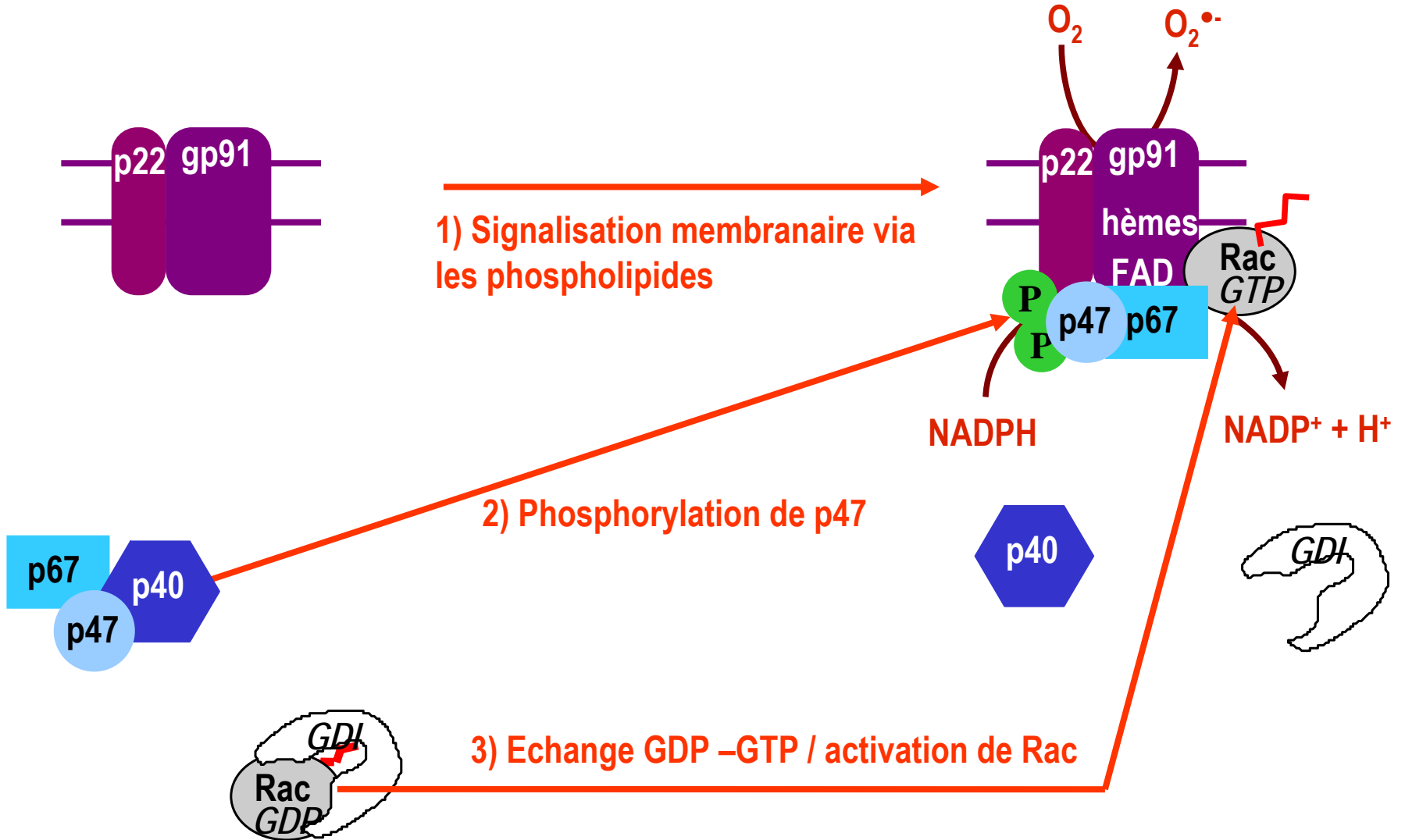
Recombinantes humaines ou
bovines

Dans le cytoplasme des
cellules

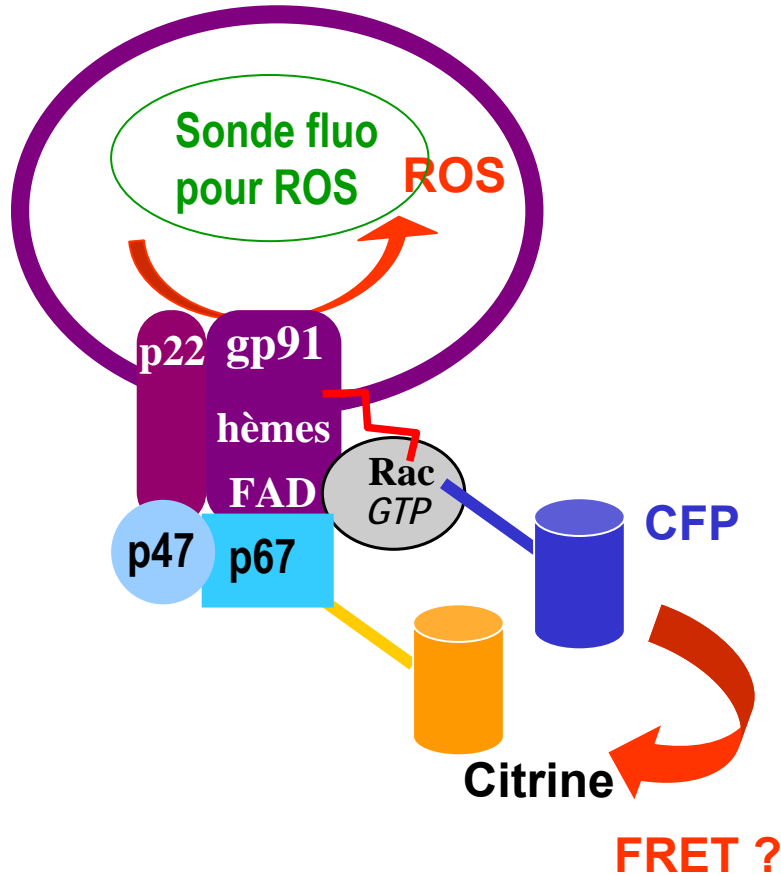
La NADPH oxydase : in vitro



La NADPH oxydase : en cellule



La NADPH oxydase : en cellule



Outils:

Videomicroscopie

Imagerie de durée de vie de fluorescence pour l'analyse du FRET.

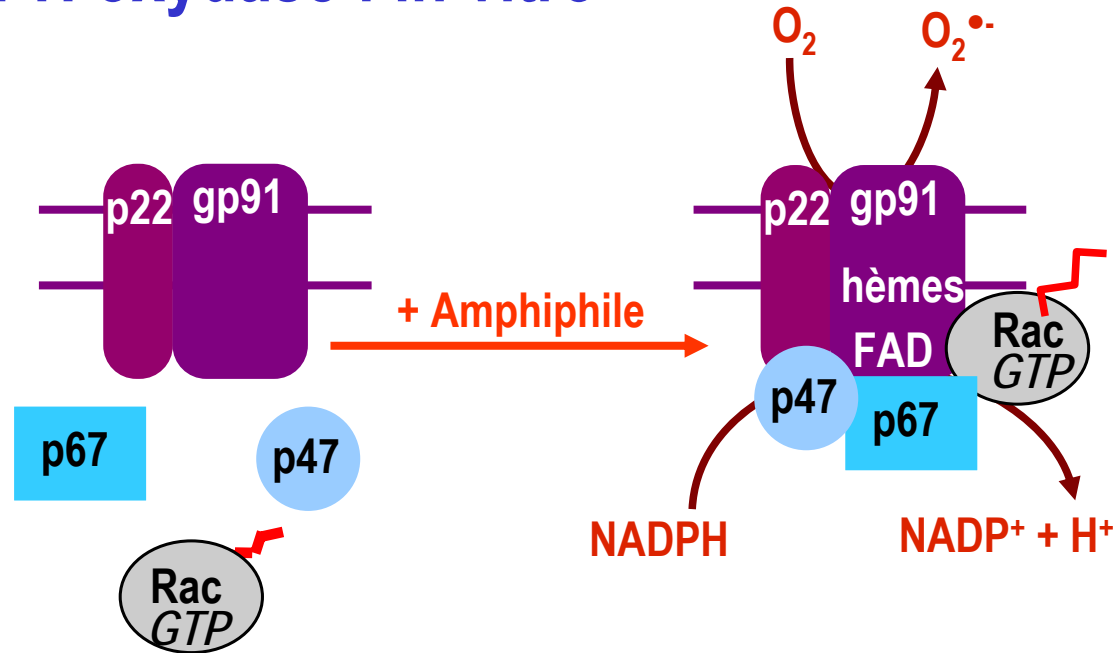
Coll Pr. Oliver Nüsse (U757 INSERM, Orsay)

- Observation de la production des ROS dans le phagosome
- Localisation de l'assemblage et étude cinétique
- Mesure de constantes d'association entre sous unités cytosoliques

La NADPH oxydase : in vitro

Outils:

biologie moléculaire, biochimie,
spectro UV-Vis et fluorescence
stationnaire, stopped flow,
radiolyse

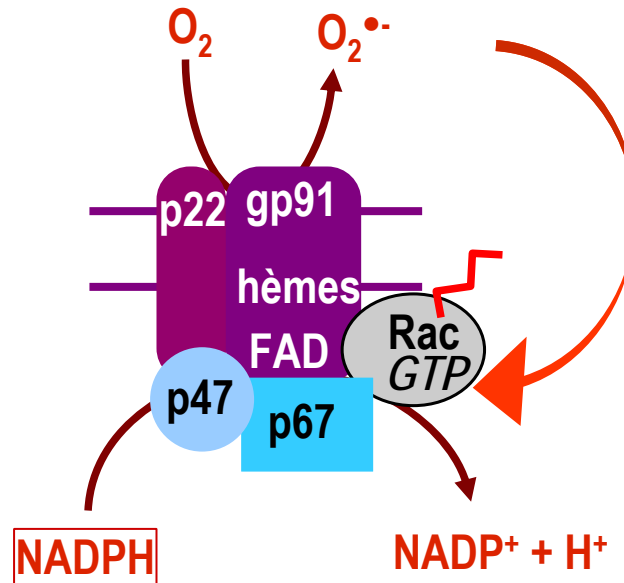


Objectifs:

- Etablir les constantes d'association entre les sous unités
- Cinétique et séquence d'association et de dissociation des sous unités

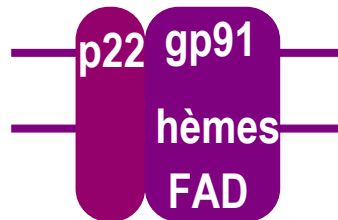
Acquisition du Stopped Flow

La NADPH oxydase : in vitro



- Quel est l'effet des radicaux libres sur le fonctionnement de l'enzyme lui même?

La NADPH oxydase : in vitro



- Exprimer et purifier les sous unités membranaires recombinantes pour les études fonctionnelles et structurales in vitro.

Post Doc ANR Jeunes Chercheurs