

Bases moléculaires de la granulomatose septique chronique

Françoise Morel
François Boulay
Jacques Doussière
Pierre Vignais

Les phagocytes professionnels disposent d'un arsenal moléculaire microbicide, constitué notamment par une NADPH oxydase qui catalyse la production d'anions superoxyde O_2^- . Tout défaut de fonctionnement ou d'activation de la NADPH oxydase entraîne une incapacité des phagocytes à tuer et à digérer les micro-organismes internalisés par endocytose entraînant une maladie appelée granulomatose septique chronique, qui se traduit, souvent dès le plus jeune âge, par des infections multiples, graves et répétées. La NADPH oxydase activée est constituée par l'assemblage de protéines membranaires à fonction redox, dont un cytochrome *b* de bas potentiel, et par des protéines sans fonction redox, dont une protéine G monomérique. Ces protéines non redox sont localisées dans le cytosol des neutrophiles non activés ; leur transfert sur les composants membranaires redox conditionne l'activation de la NADPH oxydase.

ADRESSE

F. Morel : *maître de conférence-praticien hospitalier*. Laboratoire d'enzymologie, CHRU-Grenoble, France.

F. Boulay : *ingénieur CEA*. Département de biologie moléculaire et structurale, laboratoire de biochimie, CEN-Grenoble, France.

J. Doussière : *directeur de recherche au Cnrs*. Département de biologie moléculaire et structurale, laboratoire de biochimie, CEN-Grenoble, France.

P. Vignais : *professeur de biochimie*. CHRU-Grenoble, département de biologie moléculaire et structurale, laboratoire de biochimie, CEN-Grenoble, DBMS/BCH, CENG, 85 x, 38041 Grenoble Cedex, France.

La granulomatose septique chronique, souvent désignée par le sigle CGD (*chronic granulomatous disease*), est une maladie familiale caractérisée par des infections graves et répétées dont l'individualisation en pathologie humaine est relativement récente, sans doute à cause de sa faible incidence (1/10⁶). Sa base moléculaire réside dans une incapacité des phagocytes professionnels, essentiellement les neutrophiles, monocytes et macrophages, à produire des ions superoxyde O_2^- et des dérivés oxygénés bactéricides, et par conséquent à tuer les micro-organismes englobés dans la cellule par endocytose. Dif-

férentes approches convergentes, mettant en œuvre la biochimie et la biologie moléculaire d'une part, la génétique et la pathologie humaines d'autre part, ont permis, au cours des dix dernières années, de décrypter le mécanisme d'activation du système générateur d' O_2^- dans les phagocytes, et de cibler différents déficits moléculaires spécifiques de la CGD.

Le présent exposé comporte un bref historique des étapes qui ont conduit à l'individualisation de la CGD en tant que syndrome clinique et entité moléculaire. Le système de production d' O_2^- est décrit brièvement, de même que son activation.

Des détails complémentaires pourront être trouvés dans des revues récentes [1, 2]

Individualisation du syndrome de la granulomatose septique (CGD) et corrélation avec un déficit de production d'O₂⁻ dans les neutrophiles

A la fin des années cinquante, une série d'observations relatives à des affections microbiennes graves et récidivantes, accompagnées de lésions tissulaires inflammatoires, survenant chez de jeunes garçons, conduisait à individualiser un nouveau syndrome clinique sous le nom de maladie granulomateuse de l'enfant [3]. Ces observations mentionnaient des adénopathies suppurées à localisation cervicale prédominante, une dermatite de type eczémateux touchant les paupières et la région péri-orbitale, une fièvre persistante, une perte de poids, et une hypergammaglobulinémie. La maladie progressait par poussées, avec installation d'une hépatosplénomégalie. Après quelques années, l'état du malade devenait critique avec l'apparition de pneumopathies et d'infections généralisées des muqueuses et du tissu cutané. La mort survenait avant l'âge de six ans. L'examen *post mortem* montrait au niveau du foie et des poumons, d'une façon assez fréquente des abcès, et d'une façon systématique des nodules de taille variable, le plus souvent de quelques millimètres, qui, après examen anatomo-pathologique, révélaient un processus granulomateux inflammatoire. On sait actuellement que ces nodules peuvent acquérir des dimensions telles qu'ils deviennent la cause de compressions et d'obstructions. La flore microbienne comportait des bactéries du type *Staphylococcus aureus*, des entérobactéries et des microorganismes de nature fongique du type *Candida*, *Aspergillus* ou *Nocardia*. Dans le cours des années soixante, le caractère familial de la CGD fut établi [4, 5], de même que la réduction considérable de l'activité bactéricide des neutrophiles des patients [6, 7]. Fait capital, ces neutrophiles, tout en étant capables d'englober les bactéries

par endocytose, étaient incapables de coupler l'endocytose à une augmentation d'activité respiratoire [8]. Le repérage de cette anomalie métabolique allait servir de fil conducteur pour remonter au défaut moléculaire, cause de la CGD.

La stimulation de l'activité respiratoire des neutrophiles liée à la phagocytose avait été, en fait, signalée pour la première fois dès 1933 par Baldrige et Gérard [9], et mise sur le compte d'une demande énergétique accrue. Explorée à nouveau un quart de siècle plus tard [10], cette stimulation respiratoire phagocytaire se révéla être insensible au cyanure, ce qui éliminait la participation de la cytochrome oxydase mitochondriale. Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ avait été initialement reconnu comme l'un des produits résultant de la consommation d'oxygène liée à la phagocytose [11]. Ce n'est que plus tard que le produit primaire de la réduction de l'oxygène fut identifié au superoxyde O₂⁻ [12], H₂O₂ étant un produit secondaire résultant de la dimutation d'O₂. En présence d'ions chlorure et de H₂O₂, la myéloperoxydase déversée dans la vacuole phagocytaire à partir de granules cytoplasmiques de type azurophile catalyse la formation d'hypochlorite et de chloramines fortement microbiocides [13].

Le rôle joué par H₂O₂ dans la destruction des bactéries internalisées fut explicité avec l'observation que les neutrophiles de patients atteints de CGD étaient incapables de détruire des bactéries riches en catalase, mais, en revanche, tuaient et digéraient des bactéries productrices d'H₂O₂ et déficientes en catalase, par exemple les streptocoques [14].

Les premières observations cliniques de CGD avaient porté sur des jeunes enfants de sexe masculin dont les mères présentaient une résistance apparemment normale aux infections. En visualisant la production d'O₂⁻ par des neutrophiles fixés sur lame de microscope, grâce à la réduction de nitrobleu de tétrazolium en formazan, on constata que, dans leur totalité, les neutrophiles des jeunes garçons atteints de CGD étaient incapables de réduire le colorant, mais que la moitié des neutrophiles de la mère étaient fonctionnels [15]. Cette particularité

permettait de localiser la mutation dans le chromosome X ; on sait en effet que chez l'individu de sexe féminin, l'un des deux chromosomes X est inactivé au hasard au début de l'embryogenèse. Plus tard, on reconnut que la CGD pouvait affecter des sujets des deux sexes avec un mode de transmission autosomique récessive [16], ce qui est en accord avec la notion récente d'un contrôle multigénique de la structure et de l'activité du complexe enzymatique générateur d'O₂⁻ sous sa forme activée. En résumé, la CGD, une maladie avec infections récidivantes et sévères, est plus particulièrement dépistée chez le jeune enfant, parfois avant l'âge de 1 an. Les foyers infectieux se manifestent surtout par des adénites et des adénophlegmons récidivants, des pneumopathies, des abcès hépatiques et des ostéo-arthrites. Les germes identifiés sont plus particulièrement des staphylocoques, des *Aspergillus*, des salmonelles, des colibacilles et des mycobactéries. La CGD doit son nom à la présence de foyers inflammatoires de type granulomateux dans différents parenchymes. Les granulomes montrent, à l'examen microscopique, la présence de cellules géantes multinucléées formées par la fusion de macrophages qui ont séquestré des bactéries, mais ne les ont pas détruites du fait d'un déficit de production d'O₂⁻. Ces granulomes sont généralement de petite taille (quelques millimètres de diamètre), mais ils acquièrent quelquefois des dimensions importantes évoquant un tableau pseudo-tumoral. Il n'existe pas de différence typique de susceptibilité à l'infection en ce qui concerne les différentes formes génétiques actuellement répertoriées de CGD. Il semble toutefois que la CGD liée à l'X soit particulièrement sévère.

Ligands agonistes et récepteurs impliqués dans l'activation de la réponse respiratoire des cellules phagocytaires

La plupart des études sur le mécanisme de stimulation de la production d'O₂⁻ chez les phagocytes professionnels ont été réalisées avec des neutrophiles pour des raisons de commodité

RÉFÉRENCES

1. Morel F, Doussière J, Vignais PV. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathology aspects. *Eur J Biochem* 1991 ; 201 : 523-46.
2. Cross AR, Jones OTG. Enzymatic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta* 1991 ; 1057 : 281-98.
3. Bridges RA, Berendes H, Good RA. A fatal granulomatous disease of childhood. The clinical, pathological and laboratory features of a new syndrome. *Am J Dis Child* 1959 ; 97 : 387-408.
4. Carson MJ, Chadwick DL, Brubaker CA, Cleland RS, Landing BH. Thirteen boys with progressive septic granulomatosis. *Pediatrics* 1965 ; 35 : 405-12.
5. Johnston RB, McMurry JS. Chronic familial granulomatosis. Report of five cases and review of the literature. *Am J Dis Child* 1967 ; 114 : 370-8.
6. Holmes B, Quie PG, Windhorst DB, Good RA. Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function. *Lancet* 1966 ; 1 : 1225-8.
7. Quie PG, White JG, Holmes B, Good RA. *In vitro* bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes : diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J Clin Invest* 1967 ; 46 : 668-79.
8. Holmes B, Page AR, Good RA. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest* 1967 ; 46 : 1422-32.
9. Baldrige CW, Gerard RW. The extrarpiration of phagocytosis. *Am J Physiol* 1933 ; 103 : 235-6.
10. Sbarra AJ, Karnovsky ML. The molecular basis of phagocytosis. I) Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1959 ; 234 : 1355-62.
11. Iyer GYN, Islam MF, Quastel JH. Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature* 1961 ; 192 : 535-41.
12. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973 ; 52 : 741-4.
13. Ripley RJ, Sbarra AJ. Role of the phagocyte in host-parasite interactions. XII : hydrogen peroxide-myeloperoxidase bactericidal system in the phagocyte. *J Bacteriol* 1967 ; 94 : 1425-30.
14. Kaplan EL, Laxdal T, Quie PG. Studies of polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic granulomatous disease of childhood : bactericidal capacity for streptococci. *Pediatrics* 1968 ; 41 : 591-9.

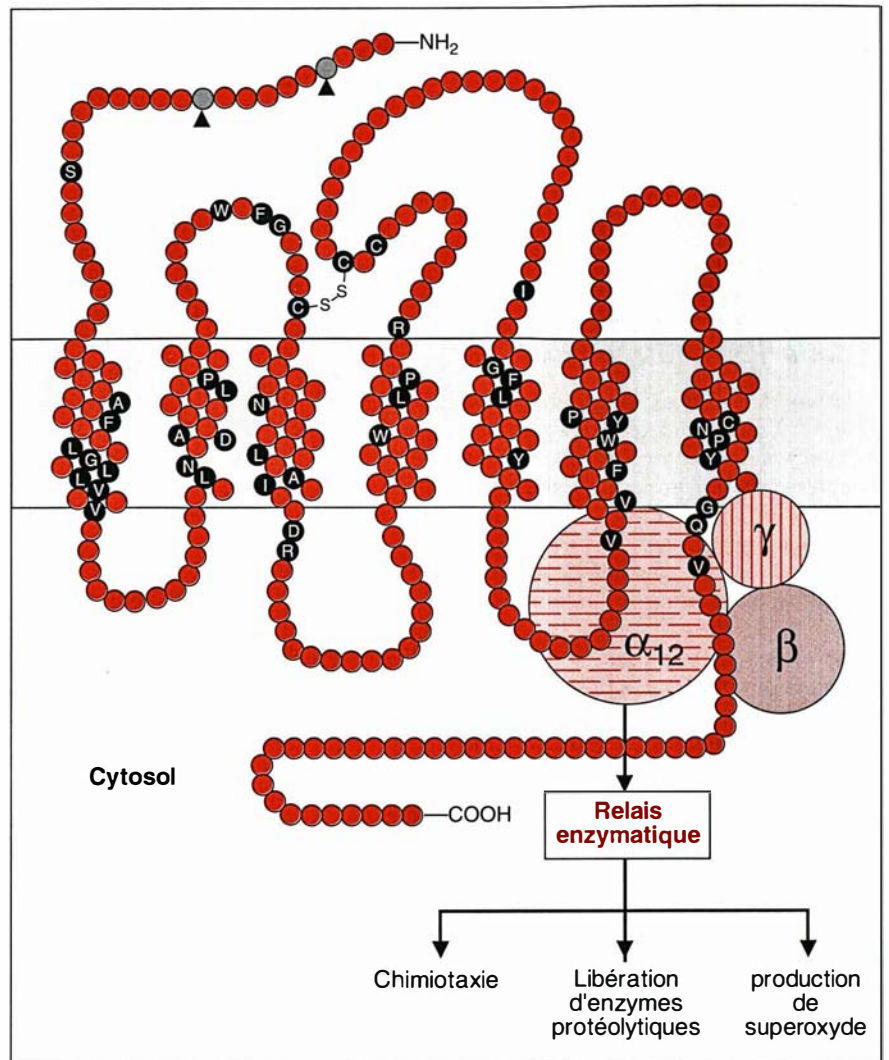


Figure 1. **Activation des trois grandes fonctions des cellules phagocytaires : production d'ions O_2^- , libération d'enzymes protéolytiques, chimiotaxie.** Cette activation résulte de la fixation d'un ligand activateur sur un récepteur de surface. Le schéma montre l'arrangement de la chaîne polypeptidique du récepteur des formyl méthionyl peptides et l'interaction de ce récepteur avec une protéine G trimérique G_{12} . L'interaction entre les deux partenaires se fait vraisemblablement au niveau de la 3^e boucle cytoplasmique et la région C-terminale du récepteur. La séquence de la protéine réceptrice prédite à partir de l'ADNc [17] fait apparaître sept régions hydrophobes, probablement organisées en hélices α transmembranaires. Un arrangement moléculaire similaire à celui du récepteur des formyl méthionyl peptides existe pour d'autres récepteurs de peptides chimioattractifs, ceux spécifiques de l'anaphylatoxine C5a et de l'interleukine 8. Les acides aminés conservés dans ces trois récepteurs sont représentés par des boules noires. La partie N-terminale (extracellulaire) du récepteur montre deux sites de glycosylation (triangles noirs). La partie C-terminale (cytoplasmique) est riche en résidus Ser et Thr avoisinant soit des résidus Arg (sites potentiels de phosphorylation par PKC), soit des résidus Glu ou Asp (sites potentiels de phosphorylation par une kinase acidotrope identique ou similaire à la kinase spécifique du récepteur β -adrénergique (β -ARK)). Contrairement à la rhodopsine et au récepteur β -adrénergique, les récepteurs des formyl méthionyl peptides, du C5a et de l'interleukine 8 ne sont pas palmitoylés dans la région C-terminale, ce qui laisse supposer un repliement différent de la chaîne peptidique.

expérimentale. Les neutrophiles du courant circulatoire n'ont pratiquement pas d'activité respiratoire génératrice d' O_2^- . La production d' O_2^- est induite quelques secondes après la fixation de ligands activateurs sur des récepteurs de surface ; elle est si rapide qu'elle a reçu le nom d'explosion respiratoire. L'ion O_2^- est formé par réduction monoélectronique d' O_2 , le donneur d'électrons étant le NADPH, suivant la réaction : $NADPH + 2 O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + 2 O_2^-$.

Une accélération du cycle des pentoses-phosphates pourvoit à une demande accrue en équivalents de réduction sous forme de NADPH.

L'explosion respiratoire des neutrophiles est observée au cours de la phagocytose d'agents particuliers tels que des micro-organismes recouverts d'opsonines, par exemple des IgG ou le fragment C_3b_i du complément. Des agents solubles qui, à faible concentration, ont un pouvoir chimio-attractif peuvent, à des concentrations plus élevées, induire une réponse respiratoire. Ce sont par exemple le fragment $C5a$ du complément, les formyl méthionyl peptides sécrétés par les bactéries, des lipides bioactifs en particulier le PAF (*platelet activating factor*) et le LTB_4 (leucotriène B_4), et l'interleukine 8 ou NAP_1 (*neutrophil-activating protein*). Tous ces agents se lient à des récepteurs de surface spécifiques. L'ADN complémentaire codant pour le récepteur des formyl méthionyl peptides a été le premier à avoir été cloné et séquencé [17]. Par la suite, les gènes pour les récepteurs du $C5a$, de PAF et de l'interleukine 8 ont été isolés (voir [1]). Tous ces récepteurs présentent des homologies significatives et appartiennent à une sous-classe de la superfamille de récepteurs organisés en sept domaines transmembranaires et couplés à une protéine G trimérique. La partie N-terminale exposée au milieu extracellulaire contient des sites de glycosylation, tandis que la partie C-terminale tournée vers le cytoplasme contient plusieurs résidus de sérine et de thréonine dont la phosphorylation pourrait désactiver la signalisation (figure 1). Chaque type de récepteurs est présent à une concentration de l'ordre de 50 000 à 100 000 copies par neutrophile.

Le recrutement par chimiotactisme des neutrophiles du courant sanguin vers un foyer d'infection bactérien grâce à des agonistes solubles est bien illustré dans le cas des formyl méthionyl peptides sécrétés par les bactéries. Ces peptides diffusent, pénètrent dans les capillaires sanguins avoisinants et se fixent sur les récepteurs spécifiques des neutrophiles circulants. Ainsi « étiquetés », les neutrophiles adhèrent aux cellules de l'endothélium vasculaire grâce à des récepteurs spécifiques de l'adhérence, du type sélectines et intégrines [18], traversent l'endothélium en s'insérant entre les cellules endothéliales, puis la membrane basale, et finalement remontent le gradient chimiotactique jusqu'au foyer d'infection. Le processus de phagocytose débute alors. Des pseudopodes émis par le neutrophile entourent et captent les bactéries. En même temps que se forme la vésicule phagocytaire, le processus d'activation

de l'oxydase génératrice d' O_2^- démarre. Une fois internalisées, les bactéries sont détruites par les dérivés d' O_2^- , en particulier HOCl, et par des enzymes lytiques provenant de granules cytoplasmiques du neutrophile (figure 2).

Transduction du signal conduisant à l'explosion respiratoire

Le signal reçu au niveau des récepteurs de la membrane plasmique ayant fixé un ligand activateur est propagé et amplifié à travers une cascade de réactions intracellulaires pour aboutir à l'activation de la NADPH oxydase. De façon classique intervient tout d'abord une protéine G trimérique (G_{i2}), dont un des caractères est l'inhibition par la toxine de *Bordetella pertussis*. La fixation du ligand sur le récepteur induit un changement de conformation qui est propagé à la

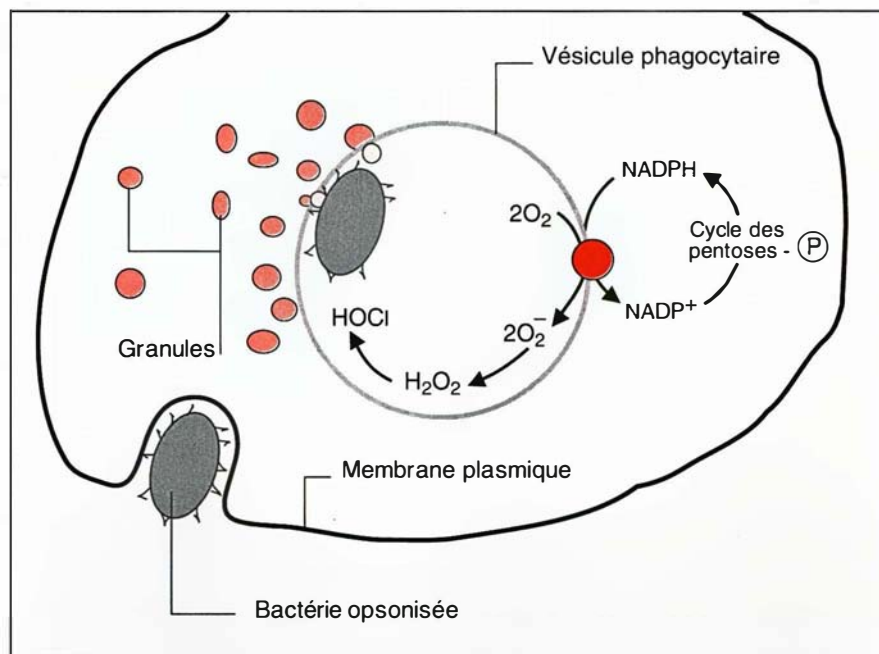


Figure 2. **Explosion respiratoire et dégranulation liées à la phagocytose dans un neutrophile.** Le schéma montre la capture d'une bactérie opsonisée par un neutrophile, suivie de la formation d'une vésicule phagocytaire. Deux événements quasi concomitants au niveau de la vésicule phagocytaire sont illustrés : 1. la dégranulation, c'est-à-dire la fusion de la membrane de granules cytoplasmiques, primaires (ou azurophiles) et secondaires (ou spécifiques) avec la membrane de la vésicule phagocytaire et le déversement du contenu des granules dans la vésicule ; 2. la sécrétion de l'ion superoxyde O_2^- dans la vésicule, suivie de sa dismutation en H_2O_2 , puis de la formation d'hypochlorite HOCl par action de la myéloperoxydase (provenant des granules azurophiles) sur H_2O_2 en présence de Cl^- .

RÉFÉRENCES

15. Windhorst DB, Page AR, Holmes B, Quie PG, Good RA. The pattern of genetic transmission of the leukocytic defect in fatal granulomatous disease of childhood. *J Clin Invest* 1968 ; 47 : 1026-34.
16. Mills EL, Rholl K, Quie PG. X-linked inheritance in females with chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1980 ; 66 : 332-40.
17. Boulay F, Tardif M, Brouchon L, Vignais PV. The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily or G protein-coupled receptors. *Biochemistry* 1990 ; 29 : 11123-33.
18. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell interactions with granulocytes : tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 1992 ; 13 : 93-100.
19. Lew PD. Receptor signalling and intracellular calcium in neutrophil activation. *Eur J Clin Invest* 1989 ; 19 : 339-46.
20. Haslett C, Savill JS, Meagher L. The Neutrophil. *Curr Op Immunol Curr Sci* 1989 ; 2 : 10-8.
21. Henderson LM, Chappell JB, Jones OTG. Superoxide generation by the electrogenic NADPH oxidase of human neutrophils is limited by the movement of a compensating charge. *Biochem J* 1988 ; 255 : 285-90.
22. Segal AW, Geisow M, Garcia R, Harper A, Miller R. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* 1981 ; 290 : 406-9.
23. Bromberg Y, Pick E. Unsaturated fatty acids stimulate NADPH-dependent superoxide production by cell-free system derived from macrophages. *Cell Immunol* 1984 ; 88 : 213-21.
24. Heyneman RA, Vercauteren RE. Activation of a NADPH oxidase from horse polymorphonuclear leukocytes in a cell free system. *J Leukocyte Biol* 1984 ; 36 : 751-9.
25. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, et al. Cloning of gene for an inherited human disorder — chronic granulomatous disease — on the basis of its chromosomal location. *Nature* 1986 ; 322 : 32-8.
26. Dinauer MC, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ, Parkos CA. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature* 1987 ; 327 : 717-20.
27. Teahan C, Rowe P, Parker P, Totty N, Segal AW. The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the β chain of cytochrome b_{245} . *Nature* 1987 ; 327 : 720-1.
28. Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 3319-23.
29. Parkos CA, Allen RA, Cochrane CG, Jesaitis AJ. Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91 000 and 22 000. *J Clin Invest* 1987 ; 80 : 732-42.
30. Lomax KJ, Leto TL, Nunoi H, Gallin JI, Malech HJ. Recombinant 47-kD cytosolic factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science* 1989 ; 245 : 409-12 et 1989 ; 246 : 987.
31. Volpp BD, Nauseef WM, Donelson JE, Moser DR, Clark RA. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47 kilodalton cytosolic component of human respiratory burst oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 7195-9 et 1989 ; 86 : 9563.
32. Leto TL, Lomax KJ, Volpp BD, et al. Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60^{src}. *Science* 1990 ; 248 : 727-30.
33. Rotrosen D, Yeung CL, Leto TL, Malech HL, Kwong CH. Cytochrome b_{559} : The flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 1992 ; 256 : 1459-62.
34. Baehner RL, Kunkel LM, Monaco AP, et al. DNA linkage analysis of X chromosome-linked chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 3398-401.
35. Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GAP, Curnutte JT, Orkin SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1990 ; 86 : 1729-37.
36. Francke U, Hsieh CL, Foellmer BE, Lomax KJ, Malech HL, Leto TH. Genes for two autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease assigned to 1q25 (NCF₂) and 7q11.23 (NCF₁). *Am J Hum Genet* 1990 ; 47 : 483-92.
37. Ligeti E, Tardif M, Vignais PV. Activation of O₂⁻ generating oxidase of bovine neutrophils in a cell-free system. Interaction of a cytosolic factor with the plasma membrane and control by G nucleotides. *Biochemistry* 1989 ; 28 : 7116-23.

protéine G_{i2}. Les conséquences en sont : (1) l'échange de GDP contre du GTP dans la sous-unité α de G_{i2} ; (2) la dissociation de α -GTP des deux autres sous-unités $\beta\gamma$ de G_{i2} ; (3) l'interaction de α -GTP avec une phospholipase C spécifique du phosphatidyl inositol 4-5 bis phosphate. Les produits de clivage de ce phospholipide sont le diacylglycérol et l'inositol triphosphate lequel induit le relâchement de Ca²⁺ à partir de vésicules de stockage [19]. Au-delà d'une concentration seuil (200 à 300 nM), le Ca²⁺ sous forme libre facilite la translocation de la protéine kinase C (PKC) du cytosol vers la membrane plasmique où son activation est potentialisée par le diacylglycérol. L'activation de la phospholipase C est un événement précoce et transitoire qui est relayé par l'activation de la phospholipase D. La déphosphorylation de l'acide phosphatidique par cette dernière enzyme fournit du diacylglycérol qui entretient l'activation de la PKC. La PKC activée joue un rôle important, mais non exclusif, dans la réponse respiratoire du neutrophile, en particulier en phosphorylant une protéine cytosolique de 47 kDa, considérée comme un facteur d'activation de l'oxydase. L'acide arachidonique, produit d'action de la phospholipase A₂, doit être ajouté à la liste des messagers formés par l'action des phospholipases C et D, c'est-à-dire Ca²⁺, diacylglycérol et inositol triphosphate (pour revue, voir [1]). Il convient de noter que ces messagers sont impliqués non seulement dans l'explosion respiratoire, mais encore dans d'autres fonctions importantes des neutrophiles telles que la chimiotaxie et la libération d'enzymes protéolytiques à partir de granules cytoplasmiques (figure 1).

Sensibilisation à l'activation de la NADPH oxydase (priming) et désensibilisation

La transition de la forme inactive de l'oxydase à la forme active n'est pas un phénomène de tout ou rien. La phase de latence de plusieurs secondes qui précède la production explosive d'O₂⁻ peut être raccourcie, et la vitesse de production d'O₂⁻ amplifiée, lorsque les neutrophiles sont soumis

à un contact préalable avec certains agents qui, à la faible concentration utilisée, ne déclenchent pas par eux seuls l'explosion respiratoire. Cette sensibilisation à l'activation est connue sous le terme de *priming* [20]. De nombreux agents de sensibilisation ont été identifiés, parmi lesquels les lipopolysaccharides bactériens, le PAF, le diacylglycérol, un certain nombre de cytokines dont plusieurs interleukines, en particulier le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et l'interféron (INF- γ), et finalement des constituants de la matrice extracellulaire sur lesquels adhèrent et migrent les neutrophiles après qu'ils ont quitté les vaisseaux par diapédèse pour se diriger vers le foyer d'infection (pour revue, cf. [1]). Bien que d'une façon assez constante, la sensibilisation à l'activation coïncide avec une élévation de la concentration en Ca^{2+} libre intracellulaire, son mécanisme précis est loin d'être élucidé.

L'explosion respiratoire des neutrophiles est un phénomène transitoire. Elle ne persiste pas au-delà de quelques minutes ; *in vitro*, elle cesse dès que l'agoniste est éliminé. La terminaison de l'explosion respiratoire dépend au moins de deux étapes clés dans la cascade d'activation de l'oxydase ; l'une, en amont de la cascade, concerne la désensibilisation du récepteur par internalisation et/ou phosphorylation l'autre, en aval, concerne la stabilité de l'assemblage du complexe oxydase dont la concentration stationnaire dépend du rapport des vitesses d'assemblage et de dissociation de ses composants. Une prévalence de la dissociation sur l'assemblage entraîne une disparition du complexe (pour revue, voir [1]).

Caractère vectoriel de la production d' O_2^- dans la vacuole phagocytaire

Après fractionnement subcellulaire de neutrophiles activés par un agoniste soluble ou particulaire, l'activité oxydase génératrice d' O_2^- est retrouvée soit dans la membrane plasmique, soit dans la membrane des vacuoles phagocytaires qui correspond à la membrane plasmique après internalisation d'une particule étrangère. Les composants redox du complexe oxydase qui transfèrent les électrons du NADPH

à O_2 fonctionnent dans une gamme restreinte de potentiel d'oxydo-réduction (de -320 mV [couple NADPH/NADP $^+$] à -160 mV [couple O_2/O_2^-]). Le potentiel du cytochrome b_{558} , le donneur direct d'électrons à l'oxygène, est de -245 mV.

Au cours de l'explosion respiratoire par des neutrophiles qui phagocytent des micro-organismes, O_2^- est sécrété dans la vacuole phagocytaire, c'est-à-dire au contact des micro-organismes internalisés. L'accumulation de charges négatives qui en résulte du côté interne de la vacuole phagocytaire est rapidement compensée par l'entrée de protons due à l'ouverture de canaux spécifiques [21]. Pendant les premières secondes de la phagocytose, le pH de la vacuole phagocytaire s'élève jusqu'à 7,5-8,0 ; après la première minute, il décroît jusqu'à une valeur constante qui se stabilise à 6,5-6,0 par entrée de protons. La légère élévation initiale du pH, probablement due à une consommation de protons dans la dismutation d' O_2^- en H_2O_2 facilite sans doute l'attaque des bactéries par des protéases neutres dans la vacuole phagocytaire [22].

L'activation de la NADPH oxydase implique un assemblage de protéines membranaires à fonction redox et de facteurs protéiques d'activation d'origine cytosolique

La mise au point d'un système d'activation acellulaire de la NADPH oxydase [23, 24] a constitué une percée expérimentale remarquable dans l'élucidation des événements moléculaires qui accompagnent la transition de la forme dormante de l'oxydase à sa forme activée. Ce système acellulaire comporte une fraction membranaire enrichie en membrane plasmique et une fraction soluble appelée cytosol, toutes deux préparées à partir d'un homogénat de neutrophiles ou de macrophages non activés. La fraction membranaire apporte des protéines à fonction redox et la fraction cytosolique, des facteurs protéiques d'activation. Pour être pleinement efficace, le milieu d'activation

doit être complété par un acide gras insaturé à longue chaîne, du GTP, et un sel de magnésium. La validité du système acellulaire est fondée sur l'observation que la production d' O_2^- dans ce système est déficiente lorsque la fraction membranaire ou la fraction cytosolique, proviennent de neutrophiles de patients porteurs de CGD et est déficiente en composants spécifiques de l'oxydase : cytochrome b_{558} dans le cas de la fraction membranaire, facteurs protéiques d'activation de l'oxydase dans le cas de la fraction cytosolique. De plus, l'oxydase activée dans le système acellulaire, possède la même spécificité et la même affinité pour le NADPH que l'oxydase des membranes préparées à partir de neutrophiles activés.

A côté de l'approche biochimique illustrée par le système acellulaire, les techniques de la biologie moléculaire, en s'appuyant en partie sur les déficits moléculaires de la CGD, ont permis le clonage de gènes codant pour quatre protéines du complexe oxydase, à savoir les deux sous-unités α et β d'un composant membranaire redox, le cytochrome b_{558} [25-29], et deux facteurs cytosoliques d'activation de 47 kDa et 67 kDa appelés p47 et p67 [30-32].

La sous-unité α du cytochrome b_{558} de 22 kDa porterait l'hème, tandis que la sous-unité β , une glycoprotéine de 91 kDa dont un tiers de la masse correspond à des résidus glycaniques [29], serait capable de fixer du FAD et se comporterait comme une NADPH-flavodéshydrogénase [33]. En d'autres termes, l'hétérodimère communément désigné cytochrome b_{558} pourrait être un flavocytochrome b capable de transférer les électrons du NADPH à l'oxygène. La fonction NADPH déshydrogénase de la sous-unité de 91 kDa reste cependant à confirmer, au vu de plusieurs publications concernant l'existence de déshydrogénases spécifiques dans le complexe oxydase (pour revue, voir [1]).

Le gène qui code pour la région protéique de la sous-unité β est localisé sur le chromosome X en Xp21.1 [34] ; celui qui code pour la sous-unité α est formé de six exons localisés sur le chromosome 16 en 16.q24 [35]. Quant aux gènes codant pour

RÉFÉRENCES

38. Rotrosen D, Kleinberg ME, Nunoi H, Leto T, Gallin JI, Malech HL. Evidence for a functional cytoplasmic domain of phagocytic oxidase cytochrome *b₅₅₈*. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 8745-50.
39. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Lawson T. SH2 and SH3 domains : elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 1991 ; 252 : 668-74.
40. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21 rac1. *Nature* 1991 ; 353 : 668-70.
41. Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac2. *Science* 1991 ; 254 : 1512-5.
42. Eklund EA, Marshall M, Gibbs JB, Crean CD, Gabig TG. Resolution of a low molecular weight G protein in neutrophil cytosol required for NADPH oxidase activation and reconstitution by recombinant Krev-1 protein. *J Biol Chem* 1990 ; 260 : 13964-70.
43. Gallin JI, Leto TL, Rotrosen D, Kwong CH, Malech HL. Delineation of the phagocyte NADPH oxidase through studies of chronic granulomatous diseases of childhood. *Curr Op Immunol* 1991 ; 4 : 53-6.
44. Francke U, Ocks HD, de Martinville B, et al. Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, *retinitis pigmentosa* and McLeod syndrome. *Am J Hum Genet* 1985 ; 37 : 250-67.
45. Roos D, de Boer M, Borregaard N, et al. Chronic granulomatous disease with partial deficiency of cytochrome *b₅₅₈* and incomplete respiratory burst : variants of the x-linked, cytochrome *b₅₅₈* negative form of the disease. *J Leukocyte Biol* 1992 ; 51 : 164-71.
46. Woodman RC, Erickson RW, Rae J, Jaffe HS, Curnutte JT. Prolonged recombinant interferon- γ therapy in chronic granulomatous disease : evidence against enhanced neutrophil oxidase activity. *Blood* 1992 ; 79 : 1558-62.
47. Cobbs CS, Malech HL, Leto TL, et al. Retroviral expression of recombinant p47/phox protein by Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes from a patient with autosomal chronic granulomatous disease. *Blood* 1992 ; 79 : 1829-35.
48. Trasher A, Chetty M, Casimir C, Segal AN. Restoration of superoxide generation to a chronic granulomatous disease-derived B-cell line by retrovirus mediated gene transfer. *Blood* 1992 ; 80 : 1125-9.
49. Cohen-Tanugi L, Morel F, Pilloud-Dagher MC, et al. Activation of O_2^- -generating oxidase in a heterologous cell free-system derived from Epstein-Barr-virus-transformed human B lymphocytes and bovine neutrophils. *Eur J Biochem* 1991 ; 202 : 649-55.

les facteurs cytosoliques p47 et p67, ils sont situés sur le chromosome 7 en 7.q11.23 et le chromosome 1 en 1.q.25, respectivement [36]. Ces facteurs cytosoliques ont été purifiés à partir de neutrophiles de différentes espèces (pour revue, voir [1]). L'activation de la NADPH oxydase est liée à la translocation et à la fixation des facteurs cytosoliques sur les composants membranaires redox de l'oxydase [37] (figure 3). Par exemple, p47 se fixe sur la portion C-terminale de la sous-unité β du cytochrome *b₅₅₈* [38]. p47 et p67 contiennent, chacun, deux régions similaires caractérisées par une forte identité de séquence avec le domaine régulateur SH3 (*Src homology 3*) présent dans le produit de l'oncogène *Src* et dans un certain nombre de protéines dont l'isoforme γ de la phospholipase C, la protéine GAP qui stimule l'activité GTPase des protéines G (*m/s n° 5, vol. 8, p. 471*), et

une protéine de fixation de l'actine (APB₁) dans la levure. Par leur motif SH3, ces protéines ont une propension à se lier aux microfilaments d'actine qui tapissent la membrane plasmique [39]. Par interaction avec le domaine SH3 de p47 et p67, les microfilaments pourraient être impliqués dans la translocation de ces protéines vers les composants membranaires redox de l'oxydase.

Le GTP potentialise l'activation de l'oxydase en système acellulaire, en se liant à une protéine cytosolique qui, au cours de l'activation, est transférée sur les composants membranaires redox (pour revue, voir [1]). Trois protéines G monomériques dérivées de la famille *ras* — à savoir les protéines Rac-1 [40], Rac-2 [41] et Rap-1 (K-rev 1) [42] — potentialisent l'activité oxydase ; Rac-1 et (ou) Rac-2 sembleraient être les candidats les plus convaincants.

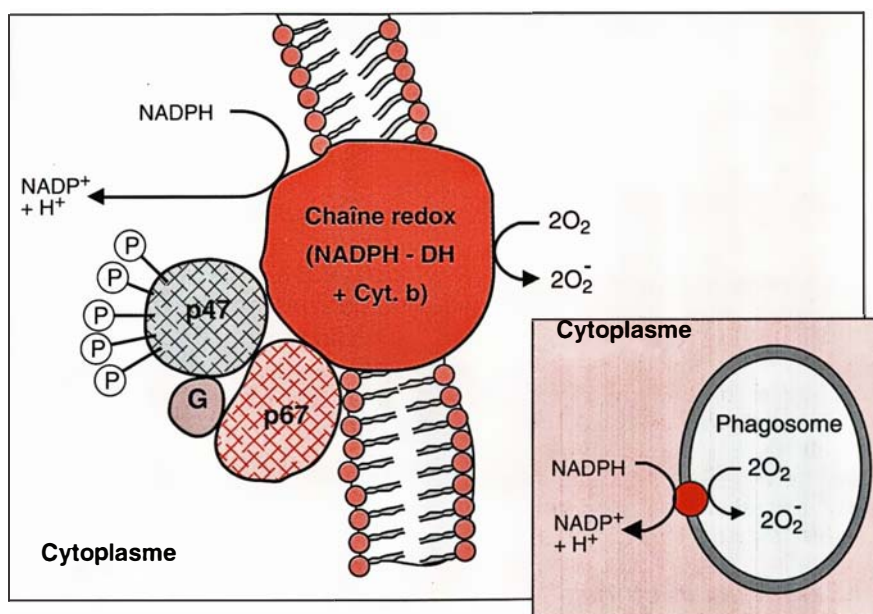


Figure 3. **Assemblage des composants du complexe NADPH oxydase aboutissant à une forme fonctionnelle génératrice d' O_2^- . Caractère vectoriel de la sécrétion d' O_2^- dans le phagosome.** Au cours de l'activation de la NADPH oxydase, trois composants protéiques présents dans le cytosol de neutrophiles non activés, à savoir une protéine de 47 kDa phosphorylable par la PKC (p47), une protéine de 67 kDa (p67) et une protéine G monomérique, s'associent aux composants de la chaîne redox localisés dans la membrane plasmique du neutrophile. De ce fait, la chaîne redox passe de l'état dormant à l'état activé. En encart est représenté un phagosome provenant de la vésiculation de la membrane plasmique avec inversion de polarité (face externe de la membrane plasmique = face interne du phagosome). On notera le caractère vectoriel de la production d' O_2^- (dans le phagosome) par réduction monoélectronique d' O_2 associée à l'oxydation du NADPH en $NADP^+$ (à l'extérieur du phagosome).

Tableau I
CARACTÉRISTIQUES DES CONSTITUANTS DE L'OXYDASE GÉNÉRATRICE D'IONS SUPEROXYDE
DANS LES CELLULES PHAGOCYTAIRES

Composants	Localisation dans le neutrophile non activé	Propriétés biochimiques	Localisation de gènes	Pourcentage de formes de CGD liées à une mutation dans le composant décrit
Sous-unité β du cytochrome b_{558}	Membrane plasmique et membrane de granules spécifiques	Glycoprotéine transmembranaire. Région C-terminale cytosolique. Région N-terminale extracellulaire sur laquelle se trouve branchée une grosse structure antennaire polysaccharide	Xp21.1	60
Sous-unité α du cytochrome b_{558}	Membrane plasmique et membrane de granules spécifiques	Région C- et N-terminales cytosoliques	16.q.24	5
Facteur p47	Cytosol	<ul style="list-style-type: none"> • Phosphorylation sur résidus sérine dans la région C-terminale au cours de l'activation • p47 se fixe sur la portion C-terminale de β-cytochrome b_{558} au cours de l'activation • Possède 2 domaines SH3 	1.q.25	30
Facteur p67	Cytosol	<ul style="list-style-type: none"> • Possède 2 domaines SH3 	7.q.11.23	5
Petite protéine G	Cytosol	<ul style="list-style-type: none"> • Probablement Rac-1 ou Rac-2 	?	?

Désordres moléculaires du complexe NADPH oxydase dans la CGD et tentatives thérapeutiques

Des mutations diverses (mutations ponctuelles et délétions) dans les quatre protéines actuellement clonées et séquencées du complexe oxydase, à savoir les sous-unités α et β du cytochrome b_{558} , et les facteurs cytosoliques p47 et p67, rendent compte de la totalité des cas de CGD répertoriés [43]. Les mutations dans la sous-unité β du cytochrome b_{558} codée par un gène du chromosome X sont mises en évidence essentiellement chez les garçons. Elles provoquent une déficience quasi totale de l'activité oxydase des cellules phagocytaires et se soldent par un tableau clinique évolutif grave que l'on dénomme CGD-X. Les porteurs féminins de la mutation CGD-X sont apparemment sains et possèdent deux populations à peu près égales de neutrophiles, l'une avec une oxydase fonctionnelle et l'autre non. Sur le

plan historique, le gène altéré dans la CGD-X fut pour la première fois identifié à partir d'études chez un patient présentant une délétion en Xp21 et des symptômes de CGD associés à une myopathie de Duchenne, une rétinite pigmentaire et un syndrome de McLeod [44]. La CGD-X est de loin la forme la plus fréquente des CGD (60 % des cas). Elle entraîne une perte de la synthèse non seulement de la sous-unité β , mais également de la sous-unité α , et la disparition du spectre du cytochrome b_{558} . Les mutations sur les autres sous-unités du complexe oxydase sont du type autosomique. Par ordre de fréquence des mutations de type autosomique viennent celles portant sur p47 (30 % des cas), sur la sous-unité α du cytochrome b_{558} (5 % des cas) et sur p67 (5 % des cas). L'ensemble de ces résultats est résumé dans le *Tableau I*. Si certaines mutations aboutissent à un déficit total de l'activité oxydase, d'autres ont comme résultat un déficit partiel (formes variantes de CGD) [45].

Une prophylaxie antimicrobienne utilisant le triméthoprime-sulfaméthoxazole (Bactrim®) ou la dicloxacilline permet de réduire la durée et l'intensité des poussées infectieuses sans toutefois éviter des surinfections par des micro-organismes résistants. L'INF- γ confère aux individus atteints de CGD une résistance significative aux infections ; cependant, les mécanismes de défense mis en œuvre semblent relever plutôt d'une stimulation de la synthèse de protéines bactéricides des cellules phagocytaires que d'une stimulation de production d' O_2^- [46]. La thérapie génique fait partie des possibilités d'avenir. Un pas dans cette direction vient d'être accompli dans le cas de patients porteurs d'une CGD due à une mutation sur p47. Des lymphocytes B provenant de ces patients ont été immortalisés par le virus d'Epstein-Barr, puis transfectés par un vecteur rétroviral murin contenant le cDNA codant pour p47 ; cette transfection a abouti à une restauration partielle de la protéine p47 [47, 48].

La fonction de l'ion O_2^- produit par des cellules non phagocytaires est énigmatique

Il existe de nombreux types de cellules non phagocytaires capables de produire O_2^- grâce à un complexe enzymatique similaire ou apparenté à la NADPH oxydase (lymphocytes B, cellules mésangiales, fibroblastes, cellules de l'endothélium vasculaire, etc.), toutefois avec une efficacité beaucoup plus faible que les phagocytes professionnels [2]. Dans les cellules non phagocytaires, O_2^- n'a pas de fonction bactéricide ; son rôle reste à élucider.

Bien que faiblement performants dans leur capacité de production d' O_2^- , les lymphocytes B apparaissent actuellement comme un matériel cellulaire bien adapté pour explorer certaines formes de CGD. Ils peuvent être entretenus en culture après immortalisation par le virus d'Epstein-Barr (EBV). Comme l'oxydase des neutrophiles, mais de façon moins efficace, l'oxydase des lymphocytes B-EBV est activée par de nombreux agents. Les lymphocytes B possèdent un cytochrome *b* et des facteurs cytosoliques p47 et p67 immunologiquement similaires à ceux des neutrophiles [49]. Dans un système acellulaire d'activation de l'oxydase mettant en œuvre des fractions cytosoliques et membranaires de lymphocytes B-EBV complémentés avec du GTP, de l'acide arachidonique et des ions Mg^{2+} , l'activité de production d' O_2^- est faible. Cependant, si la fraction membranaire issue de lymphocytes B est remplacée par la fraction membranaire de neutrophiles, la production d' O_2^- augmente considérablement, ce qui suggère que les composants limitants du complexe oxydase dans les lymphocytes B sont des protéines membranaires à fonction redox. En revanche, les facteurs cytosoliques p47 et p67 sont présents dans les lymphocytes B-EBV en quantité importante et sous une forme fonctionnelle. Sur cette base, un système hétérologue efficace d'activation de l'oxydase, constitué par du cytosol de lymphocytes B-EBV humains et des membranes de neutrophiles bovins, a été récemment mis au point [49] ; il pourrait être un

moyen d'évaluation de déficit en facteurs p47 et p67 dans les formes autosomiques de CGD.

Conclusion

En conclusion, si la nature des composants protéiques du complexe NADPH oxydase des neutrophiles est désormais connue, le mécanisme de l'explosion respiratoire reste à élucider. Il convient en particulier de comprendre comment la fixation des facteurs cytosoliques sur les composants redox membranaires des cellules phagocytaires induit dans ces composants une transition rapide de l'état dormant à l'état activé. La nécessité d'une protéine monomérique de type Rac pour l'activation de l'oxydase pose le problème de la reconnaissance spécifique de certaines séquences de Rac soit par les composants redox à l'oxydase, soit par les facteurs cytosoliques. La transmission de signaux d'activation par des récepteurs de surface spécifique est également un domaine ouvert d'autant plus que des cascades réactionnelles parallèles semblent concourir à la transmission du signal d'activation. Quant à la terminaison de l'explosion respiratoire, le mécanisme de son déclenchement reste hypothétique. Les rouages moléculaires impliqués dans le mécanisme d'activation de l'oxydase des cellules phagocytaires et dans le contrôle de son activité représentent un axe particulièrement attractif de l'énergétique cellulaire. Finalement il convient de remarquer que si la pathologie de la CGD liée au dysfonctionnement de l'oxydase frappe un très faible pourcentage de la population (1 cas sur 1 million), à l'inverse des états inflammatoires aigus ou chroniques causés parfois par la production massive et non contrôlée d'ions O_2^- représentent au plan statistique un problème social sérieux. A partir d'une meilleure connaissance du fonctionnement de l'oxydase, on peut raisonnablement prédire des retombées positives au plan pharmacologique dans la pathologie de l'inflammation ■

TIRÉS A PART

P. Vignais.

Summary

Chronic granulomatous disease. The clinical syndrome and its molecular basis

Professional phagocytes are equipped with two types of molecular weapons comprising lytic enzymes located in cytoplasmic granules and a redox complex, the NADPH oxidase, capable of generating the superoxide O_2^- upon activation. A defect in the functioning of the NADPH oxidase makes phagocytes unable to kill and digest microorganisms which are endocytosed. As a result, patients develop severe recurrent infections of any organ and granuloma formation. This syndrome was named chronic granulomatous disease (CGD). In activated phagocytes, the NADPH oxidase is located in the plasma membrane and in the membrane of the endocytic vacuole. The active NADPH oxidase complex consists of membrane-bound redox proteins, including a low potential cytochrome *b* and non-redox proteins including a small G protein which are present in the cytosol of resting phagocytes and are translocated to the membrane-bound redox components upon activation of the cells. This review is concerned with the pathological aspects of CGD, and some fundamental features of the signaling pathway leading to oxidase activation.

Remerciements

Les recherches sur la NADPH oxydase dans le laboratoire des auteurs ont été réalisées par F. Boulay, N. Bourmeyster, G. Brandolin, L. Brouchon, L. Cohen-Tanugi, A.-C. Dianoux, J. Doussière, V. Escriviou, A. Jouan, F. Laporte, E. Ligeti, L. Méry, F. Morel, M.-C. Pilloud-Dagher, M.-J. Stasia et M. Tardif. Les auteurs tiennent à remercier J. Bournet pour le travail dactylographique.