► La famille des NADPH oxydases, Nox, chez l'homme, est composée de sept isoenzymes, cinq Nox et deux Duox (*dual oxidase*). Leur unique fonction est de réduire l'oxygène moléculaire pour synthétiser l'anion superoxyde et les espèces radicalaires, ROS (*reactive oxygen species*), qui en découlent. Les ROS sont produites en excès dans les maladies chroniques et les pathologies du vieillissement. La compréhension des mécanismes impliqués dans le fonctionnement des Nox, et l'émergence d'inhibiteurs spécifiques, imposent une connaissance approfondie de leur nature et de leur structure. Les objectifs de cette revue sont de mettre l'accent, dans une approche structure/fonction, sur les principales propriétés qui rassemblent et différencient les Nox chez l'homme. ◀

Les NADPH oxydases, Nox

Une nouvelle famille d'isoenzymes

Minh Vu Chuong Nguyen¹, Bernard Lardy^{1,2},
Marie-Hélène Paclet^{1,2}, Francis Rousset¹,
Sylvie Berthier¹, Athan Baillet^{1,3}, Laurent Grange^{1,3},
Philippe Gaudin^{1,3}, Françoise Morel¹

¹GREPI (groupe de recherche et d'étude du processus inflammatoire), université Joseph Fourier, Grenoble, France ;
EFS Rhône-Alpes, 29, avenue des Maquis du Grésivaudan, 38700 La Tronche, France ;
²DBTP (département de biochimie, toxicologie et pharmacologie), institut de biologie et pathologie, CHU de Grenoble, France ;
³Clinique universitaire de rhumatologie, Hôpital Sud, CHU de Grenoble, France.
frmorel.enzymo@chu-grenoble.fr

Les Nox : isoenzymes et formes variantes

Les Nox au cours de l'évolution

L'histoire des NADPH oxydases (Nox) a débuté il y a un peu plus de 30 ans avec la découverte d'un cytochrome de type b, présent dans les neutrophiles humains et associé à la respiration des cellules stimulées. Il a été dénommé - en raison de ses propriétés spectrales - cytochrome b_{558} , et représente le cœur redox de la NADPH oxydase des phagocytes [1]. C'est à partir des années 1999-2000 que d'autres isoformes du cytochrome b_{558} ont été mises en évidence, donnant naissance à une nouvelle famille d'isoenzymes, celle des Nox [2]. Les Nox sont des hémoprotéines transmembranaires et des transporteurs d'électrons. Leur unique fonction est de catalyser la réduction de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, qui donnera par la suite les espèces réactives de l'oxygène (ROS), oxydantes et toxiques. Dans les neutrophiles stimulés au cours de la phagocytose ou dans l'inflammation, la consommation d'oxygène est foudroyante (*respiratory burst*), mais transitoire. Elle est abolie dans une maladie familiale, la granulomatose septique (*chronic granulomatous disease*, CGD) [3]. L'étude du cytochrome b_{558} et de son dysfonctionnement dans la CGD a servi de fil conducteur pour comprendre les mécanismes fonctionnels et de régulation des NADPH oxydases.

Le cytochrome b_{558} des neutrophiles est un hétérodimère constitué de deux sous-unités, gp91phox (β), et p22phox (α), produits de deux gènes, respectivement *CYBB* (*cytochrome b, β chain*) et *CYBA* (*cytochrome b, α chain*). Gp91phox est en fait le prototype d'une famille beaucoup plus ancienne, dont les membres sont apparus très tôt chez les eucaryotes au cours de l'évolution, au travers de la séparation entre le monde animal, les plantes et les champignons [4, 5]. Il y a sept isoenzymes exprimés chez l'homme : Nox1, Nox2 (ou gp91phox), Nox3, Nox4 et Nox5, ainsi que les Duox1 et 2, chacun provenant d'un gène spécifique ayant évolué à partir d'un ancêtre commun (*Tableau 1*). Cette famille se subdivise en deux groupes selon la capacité des Nox à constituer un hétérodimère avec p22phox (Nox1, -2, -3 et -4) ou selon la présence dans la séquence de motifs de type *EF-hand* qui fixent le calcium (Nox5 et les Duox) (*Figure 1A*). Nox5 est unique : elle n'est pas exprimée chez tous les mammifères, le gène s'étant perdu au cours de l'évolution chez les rongeurs. Chez les champignons, on trouve les isoformes NoxA, NoxB et NoxC. Les moustiques expriment l'isoforme NoxM, et l'algue NoxD. La présence d'orthologues chez les plantes a été rapportée, parmi lesquels RbohA-1 (*respiratory burst oxidase homologue*) [5]. L'amibe *Dictyostelium discoideum*, compte tenu de sa position phylogénétique située au carrefour des procaryotes et des eucaryotes, exprime ce qui pourrait s'apparenter

Figure 1. La famille des NADPH oxydases. **A.** Représentation schématique des Nox avec leurs partenaires au sein de la double couche phospholipidique membranaire. Sur un plan topologique, Nox2 est la mieux caractérisée : la topologie des autres isoformes est spéculative et prédite. Les Nox, à l'exception des Duox, possèdent deux domaines : l'un est transmembranaire avec six hélices α connectées par cinq boucles A, B, C, D et E ; l'autre, présent dans le cytoplasme, est le domaine déshydrogénase : c'est le domaine catalytique avec quatre sites de liaison du NADPH et deux sites de fixation du FAD. Tous les membres de la famille Nox chez l'homme possèdent le même noyau flavocytochrome ; c'est le domaine Nox qui correspond, non seulement aux régions transmembranaires, mais aussi à des sous-régions qui se replient pour former des cavités nécessaires à la liaison du FAD et du NADPH. Ce domaine Nox occupe environ 35 % de la séquence [5]. Nox5 renferme, en plus de ce domaine, en position amino-terminale, des motifs riches en EF-hand destinés à lier le calcium. Quant aux Duox, elles sont construites à partir de la structure de Nox5 avec, en position amino-terminale, un passage transmembranaire supplémentaire et une séquence homologue à celle des peroxydases. P22^{phox} est une protéine transmembranaire. C'est le garant de la stabilité de l'hétérodimère Nox/p22^{phox}, site d'ancrage des facteurs cytosoliques d'activation pour les isoformes Nox1, 2 et 3, et le partenaire de Nox4. Nox5 est une entité unique tandis que les Duox sont stabilisées par des activateurs, DuoxA1, dont il existe quatre variants d'épissage, et DuoxA2. Les DuoxA sont des facteurs de maturation qui jouent le rôle de protéines chaperonnes. Leur absence confine les Duox dans le réticulum endoplasmique [16]. **B.** Représentation linéaire, en domaines, de la séquence protéique des Nox. Les cercles discontinus soulignent les régions importantes impliquées dans la régulation de l'activité de chaque protéine : la boucle B conservée chez les Nox1, 2, 3 et 4 servirait d'interface entre les domaines transmembranaire et déshydrogénase. La nature des ROS produites par Nox4 dépendrait de ses propriétés structurales et, en particulier, de celles de la boucle E. Nox5 possède quatre séquences EF-hand, deux séquences polybasiques en positions amino- et carboxy-terminales, et deux sites consensus en position carboxy-terminale appelés REHBD (regulatory EF-hand binding domain) et PhosR, intervenant dans le repliement intramolécule de la protéine. Les Duox1/2 ont deux séquences EF-hand en position amino-terminale.

aux ancêtres des Nox chez l'homme. Chez cette amibe, trois isoformes des Nox ont été identifiées : deux Nox simples, DdNoxA et DdNoxB, qui affichent respectivement 39 % et 29 % d'identité avec Nox2, bien que DdNoxA soit plus proche de Nox4. Ces DdNox pourraient dériver l'une de l'autre par duplication génique. DdNoxC s'apparente à Nox5 avec deux motifs EF-hand en position amino-

terminale. L'expression des isoformes DdNox varie selon le stade de différenciation et le type cellulaire. L'invalidation simple du gène codant pour DdNoxA, DdNoxB et DdNoxC génère, non seulement un défaut majeur de développement, mais aussi un défaut de contrôle d'entrée du calcium [6].

Une variété d'isoenzymes

Les Nox sont des isoenzymes : elles catalysent une même réaction : $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{O}_2^{\cdot-} + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$, mais Nox4, contrairement aux autres Nox, génère principalement du H_2O_2 . Le dogme est cependant respecté, une source de protons spécifique de Nox4 pouvant accélérer la dismutation spontanée de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . Les isoenzymes Nox ont acquis, au cours de l'évolution, des spécificités différentes liées à l'expression tissulaire et la localisation subcellulaire, ou encore liées aux mécanismes d'activation et de régulation. Chez l'homme, on connaît des formes variantes pour chaque isoenzyme, sauf pour Nox3 et les Duox (Tableau 1). Ces formes résultent, soit de l'existence sur le gène de promoteurs alternatifs comme pour Nox1 et Nox5, soit d'un épissage alternatif observé pour Nox2, Nox4 et Nox5. Deux formes variantes de Nox1, et trois de Nox2, ont été décrites. À partir des 16 transcrits du gène de Nox4, cinq variants A, B, C, D et E, solubles ou membranaires, ont été identifiés chez l'homme. Comme pour d'autres Nox, ces variants ont une spécificité tissulaire et d'espèce. Seuls Nox4A, isoforme native, et Nox4D sont actifs [7]. Nox4B est inactif et peut agir en tant que dominant négatif. Ce dernier pourrait jouer un rôle significatif dans la régulation de l'activité de Nox4A. Il existe six variants d'épissage du gène de Nox5 (α , β , γ , δ , ε /S et ζ), la forme γ étant la référence avec la séquence la plus longue [8]. La résurgence de certaines de ces formes variantes, par exemple celles de Nox1 ou Nox5, a été rapportée dans les tissus cancéreux. Ainsi, l'hétérogénéité de la famille des Nox, chez l'homme, conduit à une spécificité et à un phénotype qui pourraient varier, selon l'état physiopathologique des tissus.

Localisations tissulaire et subcellulaire

La localisation tissulaire des Nox diffère [2]. Nox2 est surtout exprimée dans les cellules de la lignée myéloïde, mais également dans les cellules non phagocytaires, principalement les neurones, les cellules endothéliales ou encore les cellules souches embryonnaires. Nox1 est majoritairement exprimée dans les cellules épithéliales du côlon et les cellules musculaires lisses, Nox3 dans l'oreille interne. L'expression de Nox4 est ubiquitaire [9] : on la retrouve, principalement, dans le rein ou les cellules vasculaires, ainsi que dans les ostéoclastes, les chondrocytes et le pancréas. Nox5 a été identifiée dans les tissus lymphoïdes (Nox5 α) et les testicules (Nox5 β) [8], et les Duox dans la thyroïde, mais aussi dans l'épithélium pulmonaire et le côlon. Contrairement aux polynucléaires neutrophiles humains, les cellules non phagocytaires ont la capacité d'exprimer plusieurs Nox. Un dialogue pourrait s'établir entre les Nox et d'autres systèmes enzymatiques impliqués dans la synthèse d'espèces dérivées de l'oxygène, comme la xanthine oxydase, la NO synthase ou les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale [10].

En ce qui concerne la localisation subcellulaire des Nox dans les neutrophiles au repos, le cytochrome b_{558} se répartit entre la membrane plasmique (20 %) et la membrane des différentes populations de granules (80 %), à l'exception des granules azurophiles. Nox1 a été détectée dans les cellules musculaires lisses au niveau du réticulum endoplasmique, dans la membrane plasmique et dans les endosomes précoces. Peu d'anticorps spécifiques sont disponibles contre les nouvelles Nox ; cinq anticorps monoclonaux dirigés contre

Nox4 ont cependant été générés pour la première fois [11]. Ces anticorps ont permis de mettre en évidence Nox4 dans les cellules embryonnaires de rein (voir la photo [Vignette], page 43), plus particulièrement dans la région périnucléaire et le réticulum endoplasmique, mais aussi au niveau de la membrane plasmique (Figure 2B). La présence de Nox4, observée au niveau de la mitochondrie, suscite encore de nombreux débats. C'est au niveau de la membrane plasmique que l'on retrouve également Nox3, Nox5 et les Duox.

Structure en domaines des Nox

Bien qu'ayant un certain nombre de points communs, les Nox des cellules non phagocytaires chez l'homme se distinguent de la NADPH oxydase des neutrophiles, tant au plan fonctionnel que structural [12, 13].

Les Nox n'ont pas encore été cristallisées. Sur un plan topologique, Nox2 est l'isoenzyme le mieux caractérisé avec deux domaines : l'un est transmembranaire (TM), l'autre, présent dans le cytoplasme, est le domaine déshydrogénase (DH). Ce dernier est le domaine catalytique ; il présente une homologie de séquence avec les protéines de la famille des ferrédoxine-NADP réductases, et porte les sites de liaison non covalente du FAD et du NADPH. Les extrémités amino- et carboxy-terminales de Nox2 sont situées dans le cytoplasme. La topologie des autres isoformes est en revanche spéculative et repose sur des homologies de séquence avec Nox2, des programmes de prédiction de structure, des courbes d'hydropathie et le marquage d'épitopes à l'aide de cohortes d'anticorps monoclonaux.

La structure transmembranaire (TM) en position aminoterminal de Nox2 est constituée de six hélices α formant six piliers transmembranaires connectés par cinq boucles : les boucles A, C et E sont situées dans le milieu extracellulaire saturé en oxygène, et les boucles B et D font face au cytoplasme où se trouve le domaine catalytique (Figure 1). Les piliers 3 et 5 fixent, par des liaisons de coordination au niveau de quatre histidines, deux hèmes non identiques au plan du potentiel redox : hème A (-225 mV) et hème B (-265 mV). Ces histidines, en position His101, His115, His209, His222 dans la séquence de Nox2, sont conservées dans toutes les Nox. L'hème A est positionné dans la membrane du côté cytoplasmique, l'hème B est à l'opposé. Ces deux hèmes sont directement impliqués dans le transfert d'électrons. La taille des boucles A, C, D et E diffère entre les isoenzymes ; ces variations peuvent être à l'origine de caractéristiques propres à chacun d'entre eux. Ainsi, dans le cas de Nox4, la boucle E contient 28 acides aminés de plus que celle de Nox2 ; elle serait intimement impliquée dans

Isoenzymes (chromosome, chr)	Identité versus Nox2	Variants	Association avec p22phox	Activation	Sites et état de glycosylation	Changement conformationnel Repliement	Régulation
Nox1 (chr X)	56 %	2	Oui	Assemblage Nox01, NoxA1, Rac1	2	Boucle B $\leftrightarrow$ CDHD	NoxA1-P $\rightarrow$ Nox01-P $\rightarrow$ TKS4, TKS5
Nox2 (chr X)	100 %	3	Oui	Assemblage p47phox, p67phox, p40phox, Rac2	3	Boucle B $\leftrightarrow$ CDHD	Allostérie : p67phox/ S100A8 $\rightarrow$ 6PGDH $\rightarrow$ Pin1 $\rightarrow$ Nox2-P p47phox-P/p40phox-P/p67phox-P
Nox3 (chr 6)	58 %	(-)	Oui	Assemblage Nox01, NoxA1, Rac1 ?	1	Boucle B $\leftrightarrow$ CDHD	NoxA1 Phosphorylation ? TKS4, TKS5
Nox4 (chr 6)	37 %	5	Oui	Activité constitutive	2	Boucle B $\leftrightarrow$ CDHD	Poldip2 (VSMC) $\rightarrow$ HO-1 $\rightarrow$ Quinones/NQO1 $\rightarrow$ PDI $\rightarrow$ TLR4 $\rightarrow$
Nox5 (chr 15)	27 %	6	Non	Ca ⁺⁺	-	Nox5-EF $\leftrightarrow$ REHBD/ PhosR Levée d'inhibition	Nox5-P $\Rightarrow$ $\rightarrow$ sensibilité Ca ⁺⁺ Allostérie CaM/Ca ⁺⁺
Duox1/2 (chr 15)		(-)	Non	Ca ⁺⁺ $\leftrightarrow$ NoxA1 poumon	Plusieurs	Levée d'inhibition	Duox1/2-P $\Rightarrow$ $\rightarrow$ sensibilité Ca ⁺⁺ DuoxA1/DuoxA2

Tableau 1. Caractéristiques des Nox et mécanismes de régulation. Facteurs cytosoliques organisateurs : p40phox, p47phox, Nox01. Facteurs activateurs : p67phox, NoxA1. CDHD : catalytic deshydrogenase domain ; REHBD : regulatory EF-hand binding domain ; PhosR : segment phosphorylable ; CaM : calmoduline ; PDI : protein disulfide isomerase ; TLR4 : Toll-like receptor 4 ; Poldip2 : DNA polymerase delta interaction protein 2 ; NQO-1 : NA(D)PH quinone oxidoreductase-1 ; Pin1 : prolyl-6-trans-isomerase ; TKS : tyrosine kinase substrat ; 6PGDH : 6-phosphogluconate deshydrogenase ; P : phosphate ; VSMC : vascular smooth muscle cells.

Figure 2. Topologie et localisation subcellulaire de Nox4. **A.** Schéma montrant l'organisation topologique de la séquence protéique de Nox4. Nox4 s'organise en six domaines transmembranaires (TM) avec les extrémités amino- et carboxy-terminales du côté cytosolique. Les piliers transmembranaires sont connectés par des boucles appelées A, B, C, D et E. Les boucles B et E ont été décrites comme étant essentielles à la régulation de l'activité de Nox4 [15, 33]. La boucle B permettrait un rapprochement des sites NADPH/FAD vers l'hème A, facilitant le transfert d'électrons. L'intégrité de la boucle E (insert) est nécessaire au bon fonctionnement de Nox4 et, selon l'état d'oxydation des deux cystéines C226 et C270 (en rouge), à la génération directe de H_2O_2 ou de $\text{O}_2^{\bullet -}$ par Nox4 [14]. L'histidine H222 (en vert) pourrait servir de source de protons pour accélérer la dismutation spontanée de $\text{O}_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 . Les épitopes des anticorps monoclonaux (ACm) dirigés contre Nox4 (10B4, 8E9, 7C9, 5F9 et 6B11) sont représentés sur la séquence protéique de Nox4 [11]. **B.** Images de microscopie confocale montrant le marquage de Nox4 au niveau de la membrane plasmique réalisé avec l'anticorps monoclonal 8E9 dans les cellules HEK293 non perméabilisées surexprimant Nox4 (images du haut), et le marquage généralisé de Nox4 réalisé avec les anticorps monoclonaux 5F9 et 6B11 dans ces mêmes cellules perméabilisées (images du bas) [11].

le fonctionnement de l'oxydase Nox4, notamment dans sa capacité à générer directement du H_2O_2 (Figure 2A) [14]. Seule la boucle B présente une homologie considérable entre toutes les Nox, à l'exception de Nox5 et des Duox. Située du côté intracellulaire, elle est reliée au niveau des piliers transmembranaires 2 et 3. Des données récentes proposent un modèle dans lequel la boucle B pourrait servir d'interface entre les domaines transmembranaire et déshydrogénase, cette interface impliquant la présence d'une région conservée polybasique PBR (Nox1, 2, 3 et 4) (Figure 2A) [15]. Le repliement de la séquence conduirait ainsi le FAD à proximité de l'hème A (environ 22 Å) et favoriserait un transfert rapide d'électrons. Le sous-domaine de liaison du NADPH contiendrait les éléments majoritairement impliqués dans cette interface.

Dans les neutrophiles, gp91phox ou Nox2 est la sous-unité catalytique du cytochrome b_{558} . Son partenaire non catalytique est p22phox. Nox2 seul est inactif et doit s'associer à p22phox pour former un hétérodimère non covalent, mais stable. P22phox est également le partenaire des Nox1, Nox3 et Nox4. La maturation du cytochrome b_{558} des neutrophiles

a lieu dans deux sites, le réticulum endoplasmique, qui forme le précurseur mannose (65-kDa) au niveau duquel se lient les hèmes et par la suite p22phox, puis l'appareil de Golgi, qui génère la forme mature de Nox2 (91-kDa). La glycosylation des Nox (Tableau 1) n'affecte pas l'activité catalysée, à l'exception de celle des Duox, mais peut stabiliser un état conformationnel, voire la structure tridimensionnelle de la forme active. L'absence de N-glycosylation dans les Duox empêche leur expression à la surface des cellules thyroïdiennes [16].

Mécanismes fonctionnels et régulation

Sur le plan fonctionnel, Nox2 est supposée avoir la structure oligomérique d'un dimère : à l'équilibre, il suffit d'une molécule de NADPH pour transférer deux électrons à deux molécules d'oxygène, au travers des

centres redox de Nox2 via le FAD qui est réduit successivement en FADH[•], puis en FADH₂ (Figure 3A). Si le transfert d'énergie est favorable entre NADPH et l'oxygène, il ne l'est pas entre les deux hèmes. Un milieu aérobie est donc nécessaire. En l'absence d'oxygène, la vitesse de transfert est fortement diminuée [17]. Sur un plan structural et à l'état basal, chacun des hèmes présente un état « hexacoordiné¹ ». L'activation du cytochrome b₅₅₈ par l'acide arachidonique conduirait au passage transitoire de la forme « hexacoordinée » de l'hème B, vers une forme « pentacoordinée », capable de réagir avec l'oxygène [12]. La preuve expérimentale d'une structure oligomérique des Nox a été apportée avec Nox5 [18]. Un tétramère d'environ 350 kDa serait la conformation active de Nox5 et se formerait, dans la membrane plasmique, par assemblage des domaines déshydrogénase.

La nature des ROS produits par Nox4 et la formation de H₂O₂ aux dépens de O₂^{•-} pourraient s'expliquer par des propriétés structurales spécifiques de Nox4 [14]. En effet, la boucle E de Nox4 contient une histidine, H222, conservée entre les espèces ; cette histidine pourrait servir de source de protons pour accélérer la dismutation spontanée de O₂^{•-} en H₂O₂ (Figure 2A). Par ailleurs, l'intégrité de la boucle E, assurée par les deux cystéines C226 et C270, serait aussi nécessaire au bon fonctionnement de Nox4 et à la dismutation de O₂^{•-} en H₂O₂ [14, 19]. Un mécanisme commun serait observé avec les Duox ; le domaine amino-terminal extracellulaire de Duox1 joue un rôle similaire à celui de la boucle E de Nox4 [16].

Mécanismes de régulation des NADPH oxydases Nox

Les mécanismes de régulation des NADPH oxydases Nox sont intégrés et concertés, et se situent à deux niveaux, cellulaire et moléculaire. La compartimentation des partenaires et l'existence de microdomaines dans les membranes suggèrent une organisation spatiale et temporelle qui pourrait moduler l'activité catalysée. La complexité de ces mécanismes est liée à l'hétérogénéité des Nox et à la présence de formes variantes.

Mécanismes de régulation de Nox2

Les mécanismes de régulation des Nox associent le plus souvent une transition allostérique à des réactions de phosphorylation, et à un effet direct ou indirect du calcium. L'activité de Nox1, Nox2 et Nox3 est inductible. Elle dépend de la disponibilité en NADPH [20], de la stabilité d'un édifice moléculaire qui résulte de l'assemblage, sur les Nox au niveau membranaire, de facteurs cytosoliques d'activation, p67phox/NoxA1, p40phox, p47phox/NoxO1 et d'une protéine G monomérique Rac1/2 [21]. Dans l'édifice moléculaire stabilisé de la forme active, p47phox est l'élément organisateur pour Nox2, comme l'est également NoxO1 pour Nox1 et Nox3. P47phox et NoxO1 se lient avec une spécificité différente aux phospholipides membranaires et se fixent sur le domaine riche en proline de p22phox. P47phox présente une région auto-inhibitrice et subit, dans les neutrophiles, plusieurs

étapes de phosphorylation qui débutent sur la sérine 345 dans un environnement riche en prolines. Dans la réaction inflammatoire, une peptidyl prolyl-cis-trans isomérase (Pin1) [45] se fixerait sur cette sérine phosphorylée, conduisant au déploiement de p47phox et à sa liaison avec p22phox, puis à la phosphorylation progressive des sérines voisines [22]. P67phox est un élément déterminant : son interaction avec Nox2 induit l'assemblage du complexe oxydase et son activation. Dans cet assemblage, la liaison de p67phox sur Nox2, favorisée par Rac2, est coopérative ; elle engage le transfert d'électrons. Le changement de conformation de Nox2 qui en résulte a été étudié par microscopie à force atomique [23, 24] et suggéré à l'aide d'anticorps conformationnels [25, 26] (Figure 3B-C). Les protéines à calcium S100A8/A9 stimulent aussi l'activité NADPH oxydase de Nox2 dans une interaction spécifique, bien que transitoire, avec Nox2 ; ce sont des effecteurs de régulation allostérique de Nox2 dans laquelle S100A8 est l'élément déterminant et, plus particulièrement, quatre résidus de l'extrémité carboxy-terminale 87-HEES-90, qui seraient stratégiques dans l'interface entre S100A8 et Nox2 [27].

Mécanismes de régulation des autres Nox

Les mécanismes de régulation de Nox1, Nox2 et Nox3 sont proches mais, contrairement à Nox2, Nox1 et Nox3 ont une activité constitutive faible à l'état basal. L'activation de Nox1 est contrôlée par la phosphorylation des facteurs cytosoliques d'activation, homologues à ceux de Nox2 : NoxA1 et le variant NoxO1β. La phosphorylation de NoxA1 prévient, dans un mécanisme de régulation négative de Nox1, une hyperactivation impliquant NoxO1 [28]. Les protéines TKS4 (tyrosine kinase substrate 4) et TKS5 ont été décrites comme de nouveaux partenaires d'activation de Nox1 [29]. Quant à Nox3, une production significative de O₂^{•-} est observée après colocalisation de l'hétérodimère Nox3/p22phox avec NoxO1 et NoxA1. Mais NoxO1 peut aussi induire l'activation de Nox3 en l'absence de NoxA1. La protéine G monomérique Rac1 serait nécessaire au fonctionnement de Nox1 et Nox3 (Tableau I).

• L'activité NADPH oxydase de Nox4 est constitutive [9], le niveau de transcription de son gène constitue alors l'étape limitante [30]. Le turnover de Nox4 est cependant 50 à 100 fois inférieur à celui de l'activité oxydase induite de Nox2 (130 à 150 s⁻¹) [23, 31, 32]. Le caractère constitutif des activités oxydase et diaphorase de Nox4 est lié à la présence, dans sa structure, de 22 acides aminés stratégiques en position carboxy-terminale, avec deux résidus essentiels, H557 et E571 [31, 33]. Certains dérivés de la famille des quinones

¹ Un complexe de coordination se définit par le nombre de ligands liés à l'atome central. Dans un complexe hexacoordiné (de coordination 6), la structure adoptée est celle d'un octaèdre plus ou moins régulier. Ainsi, dans le cas du fer, les ligands se situent aux 4 coins d'un carré dont le fer occupe le centre, et les deux autres de part et d'autre du plan ainsi défini, réalisant un complexe hexacoordiné.

Figure 3. Structure et mécanisme de transfert d'électrons. **A.** Mécanisme de transfert d'électrons d'après [12, 44]. Nox2/gp91phox est supposé être organisé en dimère. Le transfert des deux électrons fournis par le NADPH (étape 1) s'effectue en sept étapes avec un transport du premier électron à partir du $FADH_2$ (étapes 2, 3 et 4) pour former le premier $O_2^{\cdot-}$. Le deuxième électron est transporté à la suite du premier à partir du radical $FADH^+$ (étapes 5, 6 et 7) pour générer le deuxième $O_2^{\cdot-}$. L'activité diaphorase (étape 1) est portée par la portion cytosolique de la protéine. **B.** Image de microscopie à force atomique (AFM) montrant, en 3D, le complexe de la NADPH oxydase, reconstitué dans des liposomes après assemblage dans les neutrophiles stimulés. La hauteur estimée du complexe oxydase assemblé est de 4 nm [23]. **C.** Modèle d'organisation topologique de l'interaction entre les deux sous-unités du cytochrome b_{558} , Nox2 et p22phox dans le complexe activé. La génération d'anticorps monoclonaux dirigés contre les deux sous-unités du cytochrome b_{558} , Nox2 et p22phox, marquant préférentiellement le cytochrome b_{558} dans sa forme active, a permis, après détermination des épitopes reconnus par ces anticorps, de proposer un modèle d'activation du cytochrome b_{558} qui favoriserait un rapprochement spatial entre des régions extracellulaires de Nox2 (2^e boucle extracellulaire, boucle C) et de p22phox ($^{110}GTACLAIAS^{118}$) (Acm 13B6) [26], et entre les parties cytosoliques des deux sous-unités (Nox2, $^{559}GPR^{561}$ et p22phox, $^{155}PPRPP^{160}$) (Acm 12E6) [25].

sont capables, selon leur potentiel redox, d'augmenter cette activité (Figure 4A). Le mécanisme impliqué suggère le rôle d'une NADPH quinone oxydo-réductase, NQO1, qui utiliserait ces quinones, et une cascade de réduction impliquant les cystéines C226 et C270 de la boucle E de Nox4. L'état oxydé ou réduit des cystéines pourrait réguler la nature et la quantité des ROS générés ($O_2^{\cdot-}$ ou H_2O_2) [19]. L'inhibition de NQO1 par le dicoumarol supprimerait le phénotype malin du cancer du pancréas et induirait l'apoptose. La delta polymérase, Poldip2, partenaire de p22phox, activerait Nox4 dans les cellules musculaires lisses [34], de même que le récepteur TLR4 (*Toll-like receptor 4*) et la protéine PDI (*protein disulfide isomerase*) [35]. Enfin, l'induction de l'hème oxygénase, HO-1, impliquée dans la dégradation de l'hème et la formation d'oxyde de carbone CO, diminue de manière significative dans les chondrocytes l'activité de Nox4, mais n'affecte pas son niveau d'expression, contrairement à ce qui est observé avec Nox2 [36] ; le mécanisme d'action reste encore débattu [17, 36]. Ce changement d'activité oxydase de Nox4 induit par HO-1 serait associé à une diminution de synthèse des métalloprotéases MMP1 et MMP13, suggérant ainsi que Nox4 pourrait être un acteur de la dégénérescence du car-

tilage. L'arthrose est considérée comme la maladie du chondrocyte : Nox4 pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans cette pathologie (Figure 4C) [36, 37].

• L'activation de Nox5 dépend de la liaison du calcium sur les sites *EF-hand*, ce qui conduit à un changement de conformation de la protéine ; la phosphorylation de l'hémoprotéine potentialiserait cet effet [8]. Le modèle fonctionnel propose une interaction intramolécule, induite par le calcium, entre le domaine amino-terminal (séquence polybasique) et le domaine catalytique de Nox5 (domaine régulateur REHBD [*regulatory EF-hand binding domain*, acides aminés 637-660] et un segment phosphorylable PhosR [acides aminés 490-505 de la région catalytique]) (Figure 1). Le domaine régulateur serait donc auto-inhibiteur pour l'activité de Nox5, et l'activation serait associée à une levée d'inhibition [38]. Une concentration de 7 μM de calcium permet d'atteindre un niveau d'activité comparable à celui de l'activité induite de Nox2 [8]. La sensibilité de

Figure 4. Régulation de l'activité oxydase de Nox4 par les quinones. **A.** Structures de différentes quinones ayant la capacité de stimuler l'activité oxydase de Nox4. **B.** Modèle expliquant le mécanisme moléculaire de la stimulation de Nox4 par les quinones. Nox4 présente une activité oxydase constitutive, mais génère une faible quantité basale de ROS. Une production accrue de ROS par Nox4 est observée en présence de certains dérivés quinones ayant un potentiel redox inférieur à -180 mV

(potentiel redox de liaison de deux cystéines) et de NADPH quinone oxydoréductase 1, NQO1. NQO1 permettrait de régénérer le pouvoir réducteur des quinones et donc, dans une cascade de réduction impliquant les deux cystéines de la boucle E, d'amplifier l'activité NADPH oxydase de Nox4 [19]. **C.** Schéma illustrant la formation des ROS par Nox4 dans les chondrocytes stimulés par l'IL-1β (interleukine-1β) et l'inhibition de l'activité NADPH oxydase de Nox4 par HO-1 (heme oxygenase 1).

Nox5 au calcium serait augmentée par la calmoduline et la protéine chaperonne HSP90 (*heat shock protein of 90-kDa*). À l'image de ce qui est observé avec Nox5, l'activité des Duox dépend aussi de la présence du calcium qui se fixe sur les deux motifs *EF-hand* et de la phosphorylation de la protéine. Selon les protéines kinases impliquées, cette phosphorylation activerait l'une ou l'autre des Duox. Comme avec Nox5, elle augmente leur sensibilité au calcium. Dans les poumons, NoxA1 inhibe l'activité des Duox. Cette inhibition serait levée par le calcium [16].

Ainsi, l'interrelation entre la signalisation relayée par les espèces radicalaires de l'oxygène, les ROS et la signalisation calcique, est observée dans le fonctionnement de la plupart des Nox, soit de manière directe, comme avec Nox5, les Duox et DdNox, soit de manière indirecte avec les protéines S100A8/A9 pour Nox2 et la calmoduline pour Nox5.

Les Nox, nouvelles cibles thérapeutiques

Si le déficit de l'une ou l'autre des Nox a permis de comprendre leur fonctionnement et certains mécanismes enzymatiques fondamentaux de régulation, l'activité NADPH oxydase des Nox peut aussi être augmentée et cette augmentation entraîner un stress oxydant via le déséquilibre créé entre la production de ROS et leur dégradation. C'est ce que l'on observe dans les maladies inflammatoires, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, ou encore les maladies du vieillissement, comme certaines formes de cancer, l'arthrose, la néphropathie diabétique, l'hypertension, les maladies cardiovasculaires, ou les maladies neurodégénératives. Dans la granulomatose

septique, les infections multiples, graves et répétées observées dès le plus jeune âge, résultent d'une incapacité des phagocytes à tuer et digérer les microorganismes ingérés. Elles sont dues à un défaut de fonctionnement ou d'activation de la NADPH oxydase Nox2 [39, 40, 46]. Nox1 est impliquée dans la régulation de la pression artérielle et dans le remodelage vasculaire, sans oublier l'hypertension et l'athérosclérose [2]. Nox3 est fortement exprimée au niveau de l'oreille interne, et son absence conduirait à des troubles de l'équilibre [41]. Dans le rein, Nox4 joue un rôle de senseur de l'oxygène ; Nox4 interviendrait aussi dans la sénescence et l'apoptose, la prolifération cellulaire et l'immunité innée. Une expression élevée de Nox4 est rapportée dans l'athérosclérose, la fibrose pulmonaire et l'hypertension [9]. Si les fonctions de Nox4 restent encore mal comprises chez l'homme, des observations contradictoires sont observées chez les souris dont le gène codant pour Nox4 est invalidé ou au contraire surexprimé. Ces observations conduisent à une protection contre le stress oxydant ou la survenue d'un accident vasculaire cérébral ischémique, mais aussi à une meilleure résistance aux risques d'une atteinte cardiaque. Nox5 serait impliquée dans diverses fonctions vitales de la reproduction et de la maturation du sperme, bien que son absence chez les rongeurs interpelle sur son rôle dans l'organisme. Nox5

comme Nox1 jouerait un rôle significatif dans la prolifération cellulaire [8]. Enfin, l'hypothyroïdisme congénital aurait pour origine des mutations dans le gène de Duox2, affectant la formation de H₂O₂ et confirmant le rôle primordial de cette protéine dans la synthèse des hormones thyroïdiennes [16].

Un défi pour le futur est de définir le rôle spécifique des isoenzymes Nox dans les pathologies humaines. Des stratégies d'inhibition pharmacologique des Nox et de manipulation génétique dans des modèles animaux (souris invalidées pour ou surexprimant l'un des gènes Nox) ont été appliquées. Mais, des anticorps spécifiques contre chaque isoforme sont nécessaires pour une meilleure caractérisation des Nox dans ces modèles. La première validation d'une NADPH oxydase en tant que cible thérapeutique a été introduite avec les souris déficientes en Nox2, puis en Nox1 [2]. Un large champ pharmacologique concentré sur le développement d'inhibiteurs des Nox (petites molécules ou peptides) pourrait offrir une option thérapeutique prometteuse, en dépit d'une sélectivité encore limitée des composés vis-à-vis des isoformes des Nox [35, 42, 43]. Certaines molécules, cependant, sortent du lot comme le VAS2870 (Vasopharm GmbH), le ML171 (Scripps research institute) ou encore l'Ébselen. Parmi eux, la molécule GKT137831 (Genkyotek), ciblant Nox1/Nox4, est le premier inhibiteur en phase de développement clinique. Le champ des anticorps thérapeutiques ouvre aussi des perspectives fascinantes : parmi ceux-ci, des anticorps monoclonaux obtenus récemment et dirigés contre Nox2 [26] ou Nox4 [11, 14] devraient prendre une place importante en clinique humaine dans le futur. ♦

SUMMARY

NADPH oxidases, Nox: new isoenzymes family

NADPH oxidases, Nox, are a family of isoenzymes, composed of seven members, whose sole function is to produce reactive oxygen species (ROS). Although Nox catalyze the same enzymatic reaction, they acquired from a common ancestor during evolution, specificities related to their tissue expression, subcellular localization, activation mechanisms and regulation. Their functions could vary depending on the pathophysiological state of the tissues. Indeed, ROS are not only bactericidal weapons in phagocytes but also essential cellular signaling molecules and their overproduction is involved in chronic diseases and diseases of aging. The understanding of the mechanisms involved in the function of Nox and the emergence of Nox inhibitors, require a thorough knowledge of their nature and structure. The objectives of this review are to highlight, in a structure/function approach, the main similar and differentiated properties shared by the human Nox isoenzymes. ♦

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient tous les acteurs, collègues et partenaires, ainsi que les nombreux chercheurs qui ont pris une part active, depuis son origine, à cette histoire fascinante.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Segal AW, Jones OT. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 1978 ; 276 : 515-7.
2. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007 ; 87 : 245-313.
3. Morel F. Molecular aspects of chronic granulomatous disease. The NADPH oxidase complex. *Bull Acad Natl Med* 2007 ; 191 : 377-90 ; discussion 90-2.
4. Bedard K, Lardy B, Krause KH. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie* 2007 ; 89 : 1107-12.
5. Kawahara T, Quinn MT, Lambeth JD. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evol Biol* 2007 ; 7 : 109.
6. Lardy B, Bof M, Aubry L, et al. NADPH oxidase homologs are required for normal cell differentiation and morphogenesis in Dictyostelium discoideum. *Biochim Biophys Acta* 2005 ; 1744 : 199-212.
7. Goyal P, Weissmann N, Rose F, et al. Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 329 : 32-9.
8. Bedard K, Jaquet V, Krause KH. NOX5: from basic biology to signaling and disease. *Free Radic Biol Med* 2012 ; 52 : 725-34.
9. Chen F, Haigh S, Barman S, Fulton DJ. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. *Front Physiol* 2012 ; 3 : 412.
10. Lassegue B, San Martin A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res* 2012 ; 110 : 1364-90.
11. Zhang L, Nguyen MV, Lardy B, et al. New insight into the Nox4 subcellular localization in HEK293 cells: first monoclonal antibodies against Nox4. *Biochimie* 2011 ; 93 : 457-68.
12. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002 ; 59 : 1428-59.
13. Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* 2008 ; 275 : 3249-77.
14. Takac I, Schroder K, Zhang L, et al. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 13304-13.
15. Jackson HM, Kawahara T, Nisimoto Y, et al. Nox4 B-loop creates an interface between the transmembrane and dehydrogenase domains. *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 10281-90.
16. De Deken X, Corvilain B, Dumont JE, Miot F. Roles of DUOX-mediated hydrogen peroxide in metabolism, host defense, and signaling. *Antioxid Redox signal* 2014 ; 20 : 2776-93.
17. Morel F, Vignais PV. Examination of the oxidase function of the b-type cytochrome in human polymorphonuclear leucocytes. *Biochim Biophys Acta* 1984 ; 764 : 213-25.
18. Kawahara T, Jackson HM, Smith SM, et al. Nox5 forms a functional oligomer mediated by self-association of its dehydrogenase domain. *Biochemistry* 2011 ; 50 : 2013-25.
19. Nguyen MV, Lardy B, Rousset F, et al. Quinone compounds regulate the level of ROS production by the NADPH oxidase Nox4. *Biochem Pharmacol* 2013 ; 85 : 1644-54.
20. Baillet A, Xu R, Grichine A, et al. Coupling of 6-phosphogluconate dehydrogenase with NADPH oxidase in neutrophils: Nox2 activity regulation by NADPH availability. *FASEB J* 2011 ; 25 : 2333-43.
21. Pick E. Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: Outsourcing a key task. *Small GTPases* 2014 ; 5.
22. Boussetta T, Gougerot-Pocidalo MA, Hayem G, et al. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF- α -induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood* 2010 ; 116 : 5795-802.
23. Paclet MH, Coleman AW, Vergnaud S, Morel F. P67-phox-mediated NADPH oxidase assembly: imaging of cytochrome b558 liposomes by atomic force microscopy. *Biochemistry* 2000 ; 39 : 9302-10.
24. Berthier S, Paclet MH, Lerouge S, et al. Changing the conformation state of cytochrome b558 initiates NADPH oxidase activation: MRP8/MRP14 regulation. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 25499-508.
25. Campion Y, Jesaitis AJ, Nguyen MV, et al. New p22-phox monoclonal antibodies: identification of a conformational probe for cytochrome b 558. *J Innate Immun* 2009 ; 1 : 556-69.
26. Campion Y, Paclet MH, Jesaitis AJ, et al. New insights into the membrane topology of the phagocyte NADPH oxidase: characterization of an anti-gp91-phox conformational monoclonal antibody. *Biochimie* 2007 ; 89 : 1145-58.

RÉFÉRENCES

27. Berthier S, Nguyen MV, Baillet A, et al. Molecular interface of S100A8 with cytochrome b558 and NADPH oxidase activation. *PLoS One* 2012 ; 7 : e40277.
28. Debbabi M, Krowiarski Y, Bournier O, et al. NOXO1 phosphorylation on serine 154 is critical for optimal NADPH oxidase 1 assembly and activation. *FASEB J* 2013 ; 27 : 1733-48.
29. Gianni D, DerMardirossian C, Bokoch GM. Direct interaction between Tks proteins and the N-terminal proline-rich region (PRR) of NoxA1 mediates Nox1-dependent ROS generation. *Eur J Cell Biol* 2011 ; 90 : 164-71.
30. Serrander L, Cartier L, Bedard K, et al. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J* 2007 ; 406 : 105-14.
31. Nguyen MV, Zhang L, Lhomme S, et al. Recombinant Nox4 cytosolic domain produced by a cell or cell-free base systems exhibits constitutive diaphorase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2012 ; 419 : 453-8.
32. Nisimoto Y, Jackson HM, Ogawa H, et al. Constitutive NADPH-dependent electron transferase activity of the Nox4 dehydrogenase domain. *Biochemistry* 2010 ; 49 : 2433-42.
33. von Lohneysen K, Noack D, Hayes P, et al. Constitutive NADPH oxidase 4 activity resides in the composition of the B-loop and the penultimate C terminus. *J Biol Chem* 2012 ; 287 : 8737-45.
34. Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, et al. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2009 ; 105 : 249-59.
35. Altenhofer S, Radermacher KA, Kleikers PW, et al. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxid Redox Signal* 2014, sous presse.
36. Rousset F, Nguyen MV, Grange L, et al. Heme oxygenase-1 regulates matrix metalloproteinase MMP-1 secretion and chondrocyte cell death via Nox4 NADPH oxidase activity in chondrocytes. *PLoS One* 2013 ; 8 : e66478.
37. Grange L, Nguyen MV, Lardy B, et al. NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxid Redox Signal* 2006 ; 8 : 1485-96.
38. Tirone F, Radu L, Craescu CT, Cox JA. Identification of the binding site for the regulatory calcium-binding domain in the catalytic domain of NOX5. *Biochemistry* 2010 ; 49 : 761-71.
39. Morel F, Boulay F, Doussière J, et al. Bases moléculaires de la granulomatose septique chronique. *Med Sci (Paris)* 1992 ; 8 : 912-20.
40. Stasia MJ, Li XJ. Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin Immunopathol* 2008 ; 30 : 209-35.
41. Banfi B, Malgrange B, Knisz J, et al. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 46065-72.
42. Cifuentes-Pagano E, Meijles DN, Pagano PJ. The quest for selective NOX inhibitors and therapeutics: challenges, triumphs and pitfalls. *Antioxid Redox Signal* 2014 ; 20 : 2741-54.
43. Krause KH, Lambeth D, Kronke M. NOX enzymes as drug targets. *Cell Mol Life Sci* 2012 ; 69 : 2279-82.
44. Cross AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 2004 ; 1657 : 1-22.
45. Marsolier J, Weitzman J. Pin1 : une peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase multifonctionnelle et une cible anticancéreuse prometteuse. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 772-8.
46. Stasia MJ. La granulomatose septique chronique X*. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 526-32.

TIRÉS À PART
F. Morel

De la jaunisse à l'hépatite C

5 000 ans d'histoire

2^e édition mise à jour
Jean-Louis Payen

ISBN : 978-2-8425-4136-1 128 pages

La jaunisse est un symptôme facilement identifiable ; il paraissait bien naturel que l'homme, confronté à une modification de la couleur de ses yeux et de sa peau ait de tous temps recherché les causes de cette transformation.

Il n'est donc pas surprenant que le premier traité de médecine, écrit 3 000 ans avant J.C. par un médecin sumérien, décrive déjà la jaunisse. À chaque époque de l'histoire de la médecine, les praticiens, influencés par les concepts médicaux de leur temps, attribuèrent une ou plusieurs explications particulières à ce symptôme. Ainsi, du démon *Ahhâzu* des Sumériens à la sophistication des biotechnologies qui permirent la découverte du virus de l'hépatite C, le lecteur cheminera sur une période de 5 000 ans au travers des différents continents. Ici encore, l'histoire se révèle une formidable source de réflexion : le foie souvent impliqué dans l'apparition des jaunisses est-il le siège de l'âme ?

Les expérimentations humaines chez des volontaires ou chez des enfants handicapés mentaux étaient-elles justifiées pour permettre la découverte des virus des hépatites ?

Le formidable développement de la transfusion sanguine, des vaccinations, mais aussi de la toxicomanie explique-t-il les épidémies d'hépatites du XX^e siècle ?

Autant de questions qui sont abordées dans ce livre passionnant et accessible à tous.

À retourner à EDK, 109, avenue Aristide Briand - 92541 Montrouge Cedex
Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 43 29 32 62 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **De la jaunisse à l'hépatite C, 5 000 ans d'histoire** : 12 € + 3 € de port = **15 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

☐ Par chèque, à l'ordre de **EDK**

☐ Par carte bancaire : ☐ Visa ☐ Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |

BON DE COMMANDE