

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	5
Table des illustrations	9
Table des tableaux	13
Liste des abréviations	15
CHAPITRE I : Introduction	19
1. Mort cellulaire programmée et apoptose.....	21
1.1. Généralités.....	21
1.2. Modifications morphologiques	22
1.3. Modifications biochimiques	23
1.4. Apoptose : fonctions physiologiques et pathologiques	27
2. Phagocytose et élimination des cellules apoptotiques.....	31
2.1. Généralités.....	31
2.2. Modifications de surface	32
2.3. Molécules de reconnaissance.....	37
2.4. Signalisation intracellulaire	40
3. Cellules apoptotiques et réponse immunitaire.....	44
4. Cellules apoptotiques et C1q	46
4.1. Généralités.....	46
4.2. C1q et reconnaissance des cellules apoptotiques.....	47
5. Le double jeu de la calréticuline.....	49
5.1. Généralités.....	49
5.2. Calréticuline et phagocytose des cellules apoptotiques	51
6. Résultats à la base du projet et objectifs du travail.....	54
CHAPITRE II : Matériel et Méthodes	55
1. Biologie cellulaire	57
1.1. Lignées et cultures cellulaires.....	57
1.2. Transfection des cellules	59
1.2.1. Principe	59
1.2.2. Transfection d'ADN.....	59
1.2.3. Transfection d'ARN interférents (ARNi).....	60
1.3. Induction de l'apoptose	61
2. Biologie moléculaire	63
2.1. Matériel de biologie moléculaire	63
2.2. Construction des différents plasmides codant pour une calréticuline de fusion.....	64
2.2.1. Construction du plasmide psig-EGFP-CRT-C1 codant pour psig-GFP-CRT	64
2.2.2. Construction du plasmide psig-CRT-EGFP-N1 codant pour psig-CRT-GFP.....	67
2.2.3. Construction du plasmide psig-CRT-SNAP-N1 codant pour psig-CRT-SNAP.....	69
2.3. Construction du plasmide codant pour GST-ERp57 et certains de ses domaines.....	69
3. Analyses biochimiques	71
3.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	71
3.1.1. Préparation des échantillons	71
3.1.2. Préparation du gel d'électrophorèse	71

3.2.	Techniques de transfert sur membrane	71
3.3.	Spectrométrie de Masse.....	72
4.	Analyses immuno-cytochimiques.....	73
4.1.	Analyse par microscopie.....	73
4.1.1.	Marquage par immunofluorescence indirecte	73
4.1.2.	Utilisation d'une protéine fluorescente.....	74
4.1.3.	Marquage par étiquette protéique (tag protéique)	74
4.2.	Analyse par cytométrie en flux.....	75
4.2.1.	Principe de la cytométrie en flux	75
4.2.2.	Marquages pour la cytométrie en flux	76
5.	Analyses fonctionnelles.....	78
5.1.	Mesure de l'apoptose.....	78
5.2.	Expériences de phagocytose	79
5.3.	Obtention des surnageants de phagocytose pour l'analyse des cytokines.....	81
6.	Obtention des protéines d'intérêt	83
6.1.	Purification d'une protéine plasmatique : C1q et ses domaines.....	83
6.2.	Préparation des protéines cellulaires.....	83
6.2.1.	Préparation des lysats cellulaires.....	83
6.2.2.	Dosage des lysats cellulaires.....	83
6.2.3.	Libération des protéines en interaction avec la membrane externe des cellules par une technique dite de « shaving »	83
6.3.	Purification des protéines recombinantes	84
6.3.1.	Calréticuline entier et ses différents domaines.....	84
6.3.2.	ERp57 entière et ses différents domaines.....	84
6.4.	Détermination de la concentration des protéines purifiées	85
7.	Interactions protéiques.....	86
7.1.	Mesure d'un signal de FRET.....	86
7.1.1.	Principe	86
7.1.2.	Obtention d'un signal de FRET.....	87
7.2.	Analyse par co-immunoprécipitation.....	89
7.3.	Analyse par dosage immuno-enzymatique	90
7.4.	Analyse par Biacore/SPR.....	90
7.4.1.	Principe du Biacore	90
7.4.2.	Immobilisation des ligands sur la sensor chip CM5	92
7.4.3.	Conditions expérimentales des interactions	93
7.4.4.	Analyses cinétiques des interactions	94
8.	Anticorps utilisés	95
9.	Principaux tampons et solutions.....	97
CHAPITRE III : Résultats		99
1.	Mise en évidence d'une interaction directe entre la calréticuline et la région globulaire de C1q à la surface des cellules apoptotiques.....	101
1.1.	Stratégies mises en place pour la détection d'une interaction par FRET.....	101
1.1.1.	Expression d'une calréticuline en fusion avec la GFP	101
1.1.2.	Expression d'une calréticuline en fusion avec SNAP	111
1.1.3.	Conclusion.....	114
1.2.	Détection d'une interaction par FRET	115
1.2.1.	Définition des zones de photoblanchiment.....	115
1.2.2.	Mesure des efficacités de FRET	116
1.2.3.	Conclusion.....	121
1.3.	Bilan	122

2.	Caractérisation de la calréticuline de surface	123
2.1.	Analyse des conditions de rétention de la calréticuline à la surface	123
2.2.	Analyse de la présence de la séquence KDEL en position C-terminale sur la calréticuline de surface	125
2.3.	Bilan	126
3.	Etude fonctionnelle de l'interaction C1q-calréticuline au cours de la phagocytose.	128
3.1.	Développement d'un test de phagocytose	128
3.1.1.	Les cellules phagocytaires.....	128
3.1.2.	Etat d'apoptose des cellules phagocytées.....	133
3.1.3.	Effet de C1q.....	137
3.1.4.	Niveau d'expression de la calréticuline des cellules phagocytées.....	139
3.2.	Etude de l'effet de C1q et de la calréticuline sur la phagocytose des THP-1-m.....	141
3.2.1.	Phagocytose de cellules HeLa partiellement déplétées en calréticuline.....	141
3.2.2.	Phagocytose de cellules MEF déficientes en calréticuline.....	145
3.3.	Impact de C1q sur la phagocytose de monocytes humains purifiés	147
3.4.	Bilan des tests de phagocytose	149
4.	Etude de l'interaction C1q-calréticuline sur la réponse inflammatoire	150
4.1.	Analyse de la production de cytokines par les cellules de notre modèle	151
4.2.	Influence de la phagocytose des cellules HeLa ARNi sur l'expression de cytokines par les THP-1-m.....	151
4.3.	Analyse de la production de cytokines produites par les THP-1-m suite à la phagocytose de cellules MEF déficientes ou non en calréticuline.	154
4.4.	Bilan de la modulation des cytokines	157
5.	Mise en évidence d'un nouveau partenaire potentiel de C1q pouvant jouer un rôle dans la phagocytose.....	158
5.1.	Colocalisation d'ERp57 et de la calréticuline avec C1q à la surface des cellules HeLa..	158
5.2.	Mise en évidence d'une interaction in vitro entre C1q et ERp57	160
5.3.	Détermination du site d'interaction d'ERp57 avec C1q	163
5.3.1.	Production et purification des différents domaines d'ERp57.....	163
5.3.2.	Expériences d'interaction in vitro	164
5.4.	Bilan	166
CHAPITRE IV : Discussion et perspectives		167
1.	La calréticuline et C1q, des protéines partenaires complexes.....	169
1.1.	La calréticuline de surface, encore mystérieuse	169
1.2.	La calréticuline et les régions globulaires de C1q sont partenaires à la surface des cellules en apoptose précoce	172
2.	La calréticuline et C1q influencent la phagocytose et le statut inflammatoire	173
2.1.	Questions posées par le modèle des cellules apoptotiques	173
2.2.	Questions posées par les cellules phagocytaires	175
3.	Pour la suite.....	176
4.	Le mot de la fin.....	177

Annexes.....	179
1. Vecteurs et séquences clés des constructions de la calréticuline	181
1.1. Vecteur pHFX-CRT :.....	181
1.2. Vecteur pEGFP-C1 :.....	181
1.3. Vecteur pEGFP-N1 :.....	182
1.4. Vecteur pSNAP-N1 :.....	183
2. Vecteurs et séquences clés des constructions d'ERp57.....	184
2.1. Vecteur pHisERp57 :.....	184
2.2. Vecteur pGEX-6P-2 :.....	184
Article.....	187
Références.....	203
Résumé.....	228

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique des modifications morphologiques induites au cours de l'apoptose	23
Figure 2 : Représentation schématique des voies d'induction de l'apoptose	26
Figure 3 : Représentation des maladies communes associées à une dérégulation de l'apoptose.....	29
Figure 4 : Modèle des mécanismes permettant la modification du glycocalyx.....	35
Figure 5 : Représentation schématique du rôle des différents signaux dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques.....	36
Figure 6 : Représentation schématique du modèle de « tethering and tickling » impliqué dans la reconnaissance et la signalisation de la phagocytose des cellules apoptotiques	37
Figure 7 : Représentation schématique de la synapse de phagocytose	41
Figure 8 : Représentation schématique de la signalisation intracellulaire de phagocytose	43
Figure 9 : Modèle structural de C1q [Gaboriaud <i>et al.</i> 2004]	46
Figure 10 : Représentation schématique de la cascade protéolytique du complément	47
Figure 11 : Localisation des sites de reconnaissance des signaux « eat-me » et modèle potentiel d'activation du complexe C1	48
Figure 12 : Structure linéaire et tridimensionnelle de la calréticuline.....	49
Figure 13 : Localisation de la calréticuline et fonctions associées	51
Figure 14 : Modèle schématique d'un mécanisme potentiel permettant la libération de la calréticuline lors de l'apoptose	53
Figure 15 : Schéma des différentes étapes du clonage pour l'obtention du plasmide pSig-EGP-CRT-C1	66
Figure 16 : Schéma des différentes étapes du clonage pour l'obtention du plasmide pSig-CRT-EGP-N1	68
Figure 17 : Schéma des différentes étapes du clonage pour l'obtention des plasmides pGEX-ERp57. 70	
Figure 18 : Réaction de la protéine SNAP-tag permettant son marquage	74
Figure 19 : Analyse en dot plot du marquage Annexine-V FITC/Pi de cellules HeLa irradiées aux UV. 78	
Figure 20 : Analyse en dot plot CFSE/CD11cPE de la phagocytose de cellules HeLa irradiées aux UV. 80	
Figure 21 : Analyse en dot plot APC-Cy7/APC des différentes cytokines d'intérêt.....	81
Figure 22 : Principe du marquage CBA.....	82
Figure 23 : Schéma représentatif des différents domaines disponibles de la calréticuline humaine recombinante	84
Figure 24 : Exemple de FRET entre deux fluorophores : A488 (Donneur) et Cy3 (Accepteur)	86
Figure 25 : Exemple de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur	86

Figure 26 : Illustration des coefficients de Pearson et Manders.....	88
Figure 27 : Principe de la détection d'une interaction par résonance plasmonique de surface	91
Figure 28 : Sensorgramme représentant un cycle d'analyse avec les phases d'association, de dissociation et de régénération.....	92
Figure 29 : Schéma des différentes constructions de calréticuline en fusion avec la GFP	102
Figure 30 : Analyse de la production transitoire de la calréticuline en fusion avec la GFP	102
Figure 31 : Localisation de la calréticuline endogène et de fusion avec la GFP exprimée transitoirement dans les cellules HeLa.....	104
Figure 32 : Analyse de l'expression en surface de la calréticuline endogène et de la calréticuline en fusion avec la GFP.....	106
Figure 33 : Analyse de l'immunoprécipitation de la calréticuline en solution avec Triton et EDTA ...	108
Figure 34 : Analyse de l'immunoprécipitation en solution de lyse avec NP-40 et EDTA	110
Figure 35 : Schéma de la construction de la calréticuline en fusion avec la protéine SNAP	111
Figure 36 : Analyse de la production transitoire de calréticuline en fusion avec SNAP.....	111
Figure 37 : Localisation de la calréticuline en fusion avec la protéine SNAP exprimée transitoirement dans les cellules HeLa	112
Figure 38 : Analyse de l'expression en surface du signal de la calréticuline et du signal SNAP.....	113
Figure 39 : Schéma représentatif de la stratégie développée pour obtenir un signal de FRET en utilisant la calréticuline endogène.....	115
Figure 40 : Analyse de la colocalisation en surface des signaux anti calréticuline et anti C1qGR	116
Figure 41 : Graphique représentatif de l'analyse des intensités de fluorescence après photoblanchiment sur des cellules témoins.....	117
Figure 42 : Graphique d'analyse de l'efficacité de FRET en fonction du pourcentage de fluorescence de l'accepteur après photoblanchiment sur cellules normales présentant un motif de colocalisation «en ligne »	118
Figure 43 : Graphique représentatif de l'analyse des intensités de fluorescence après photoblanchiment et analyse de l'efficacité de FRET sur des cellules apoptotiques	119
Figure 44 : Graphique représentatif de l'analyse des intensités de fluorescence observées sur un système confocal à roue de Nipkow après photoblanchiment et analyse de l'efficacité de FRET sur des cellules apoptotiques	120
Figure 45 : Graphiques représentatifs de l'analyse des intensités de fluorescence après photoblanchiment et analyse de l'efficacité de FRET sur cellules présentant des bourgeons apoptotiques.....	121
Figure 46 : Analyse de la libération de calréticuline après « shaving » de cellules HeLa.....	124
Figure 47 : Détection de la séquence C-terminale de la calréticuline libérée après « shaving » de cellules HeLa	125
Figure 48 : Présentation du modèle de phagocytose utilisé pour étudier l'interaction fonctionnelle de C1q et de la calréticuline	128

Figure 49 : Caractérisation morphologique par microscopie des THP-1 après 72h d'induction au PMA	129
Figure 50 : Caractérisation par cytométrie en flux des THP-1 avant et après traitement au PMA.....	130
Figure 51 : Détection par cytométrie en flux du C1q présent à la surface des THP-1-m en présence ou en absence de C1q exogène	131
Figure 52 : Analyse de la phagocytose de billes par des THP-1-m	132
Figure 53 : Evolution de l'apoptose des cellules HeLa traitées par ARNi CRT après irradiation aux UV	133
Figure 54 : Quantification du marquage Annexine-V/Pi des cellules HeLa en fonction de la concentration en mitoxantrone et du temps de traitement.....	134
Figure 55 : Evolution de l'apoptose des cellules MEF CRT -/- en fonction du temps de traitement à la mitoxantrone	135
Figure 56 : Quantification du marquage Annexine-V/Pi des différents types cellulaires en fonction des différents inducteurs et du temps post-induction	136
Figure 57 : Effet de C1q sur la phagocytose des cellules HeLa viables et apoptotiques.....	138
Figure 58 : Effet de C1q sur la phagocytose des cellules HeLa apoptotiques tardives	139
Figure 59 : Analyse de l'expression de la calréticuline dans les cellules HeLa	140
Figure 60 : Analyse de l'expression de la calréticuline dans les cellules MEF	140
Figure 61 : Quantification de la phagocytose de cellules HeLa ARNi viables ou apoptotiques par des THP-1-m en fonction de l'inducteur d'apoptose	141
Figure 62 : Analyse de la phagocytose de cellules HeLa ARNi apoptotiques par des THP-1-m	142
Figure 63 : Variation de la phagocytose en absence de calréticuline en fonction de l'état d'apoptose des cellules phagocytées	143
Figure 64 : Effet de C1q sur la phagocytose par des THP-1-m de cellules HeLa ARNi apoptotiques..	144
Figure 65 : Analyse de la phagocytose de cellules MEF apoptotiques par des THP-1-m.....	145
Figure 66 : Effet de C1q sur la phagocytose des MEF apoptotiques déficientes ou non en calréticuline	146
Figure 67 : Effet de C1q sur la phagocytose par des monocytes de cellules HeLa viables et apoptotiques.....	147
Figure 68 : Analyse de la variation de la phagocytose de en présence de C1q cellules MEF par des monocytes	148
Figure 69 : Analyse de l'impact de l'absence de calréticuline sur la production d'IL-6, IL-8 et MCP-1/CCL2 par les THP-1-m suite à la phagocytose de cellules HeLa déplétées ou non en calréticuline	152
Figure 70 : Analyse l'impact de la présence de C1q sur la production d'IL-6, IL-8 et MCP-1/CCL2 par les THP-1-m suite à la phagocytose de cellules HeLa traitées HeLa déplétées ou non en calréticuline	153

Figure 71 : Analyse de l'impact de l'absence de calréticuline sur la production d'IL-1 β , IL-8 et MCP-1/CCL2 par les THP-1-m suite à la phagocytose de cellules MEF dont l'apoptose a été induite par UV ou mitoxantrone	155
Figure 72 : Analyse de l'impact de la présence de C1q sur la production d'IL-1 β , IL-8 et MCP-1/CCL2 par les THP-1-m suite à la phagocytose de cellules MEF dont l'apoptose a été induite par UV ou mitoxantrone	156
Figure 73 : Localisation de la calréticuline, d'ERp57 et de C1q à la surface des cellules HeLa	159
Figure 74 : Analyse de la colocalisation de la calréticuline, d'ERp57 et de C1q à la surface des cellules HeLa	160
Figure 75 : Analyse par test ELISA de l'interaction entre ERp57 et C1q.....	161
Figure 76 : Analyse par SPR de l'interaction entre ERp57 et C1q	162
Figure 77 : Schéma représentatif des différents domaines d'ERp57 humaine ainsi que des constructions en fusion avec la GST	163
Figure 78 : Production et purification de GST-ERp57 et de ses domaines.....	164
Figure 79 : Analyse par test ELISA de l'interaction entre ERp57 et C1q en compétition avec le Pdomaine de la calréticuline	165
Figure 80 : Analyse par test ELISA de l'interaction des différents domaines d'ERp57 avec C1q	166
Figure 81 : Rôle de la calréticuline à la surface des cellules apoptotiques et des macrophages.....	171
Figure 82 : Proposition d'un modèle de reconnaissance des ACAMPs à la surface des cellules apoptotiques par C1q	177
Figure 83 : Représentation schématique du plasmide pHFX-CRT	181
Figure 84 : Carte de restriction et du site multiple de clonage (MCS) de pEGFP-C1	181
Figure 85 : Séquence du plasmide pEGFP-CRT-C1 au niveau des sites de restriction EcoRI et KpnI ..	182
Figure 86 : Séquence du plasmide psig-EGFP-CRT-C1 au niveau du peptide signal après son insertion par mutagenèse dirigée.....	182
Figure 87 : Carte de restriction et du site multiple de clonage (MCS) de pEGFP-N1	182
Figure 88 : Séquence du plasmide pEGFP-CRT-N1 au niveau des sites de restriction Eco RI et Acc I	182
Figure 89 : Séquence du plasmide psig-CRT-EGFP-N1 au niveau des sites de restriction NheI et AccI	183
Figure 90 : Schéma de la carte du plasmide pSNAP-N1	183
Figure 91 : Séquence du plasmide psig-CRT-SNAP-N1 au niveau des sites de restriction NheI et AccI	183
Figure 92 : Schéma de la carte du plasmide pHIS-ERp57	184
Figure 93 : Carte de restriction et du site multiple de clonage (MCS) de pGEX-6P-2	184
Figure 94 : Séquence du plasmide pGEX-ERp57 en fonction de différents domaines clonés au niveau des sites de restriction BamHI et XhoI.....	185

Table des tableaux

Tableau 1 : Paramètres de transfection pour l'ADN	59
Tableau 2 : Paramètres de transfection pour les ARNi	61
Tableau 3 : Séquences des ARNi	61
Tableau 4 : Conditions d'induction d'apoptose	61
Tableau 5 : Conditions de milieu pour l'irradiation en fonction du récipient de culture	62
Tableau 6 : Amorces utilisées pour les constructions de calréticuline	64
Tableau 7 : Protocole PCR pour obtenir l'ADN de la calréticuline nécessaire à la construction du plasmide psig-EGFP-CRT-C1.....	65
Tableau 8 : Protocole PCR pour la mutagenèse dirigée permettant l'insertion du peptide signal nécessaire à la construction du plasmide psig-EGFP-CRT-C1.....	65
Tableau 9 : Protocole PCR pour obtenir l'ADN de la calréticuline nécessaire à la construction du plasmide psig-CRT-EGFP-N1	67
Tableau 10 : Protocole PCR pour obtenir l'ADN du peptide signal de la calréticuline nécessaire à la construction du plasmide psig-CRT-EGFP-N1.....	67
Tableau 11 : Amorces utilisées pour les constructions des domaines d'ERp57.....	69
Tableau 12 : Protocole PCR pour obtenir l'ADN codant pour les différents domaines d'ERp57.	70
Tableau 13 : Configuration du FACScan	76
Tableau 14 : Caractérisation des monocytes et des cellules dendritiques effectuée par l'EFS	79
Tableau 15 : Coefficients d'extinction molaire et masses molaires des protéines purifiées	85
Tableau 16 : Conditions d'immobilisation des ligands sur la Chip CM5 pour les analyses d'interaction en Biacore.....	93
Tableau 17 : Marqueurs de surface des macrophages	130
Tableau 18 : Détermination des conditions d'apoptose des cellules.....	137
Tableau 19 : Cytokines et chémokines d'intérêt.....	150
Tableau 20 : Détermination des constantes d'affinité.....	162

Liste des abréviations

A488	Alexa 488
ABC	ATP Binding Cassette transporter
Ac	Anticorps
ACAMPS	Apoptotic Cell Associated Molecular Pattern
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
ADNc	ADN codant
ALPS	Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
APAF1	Apoptotic Protease-Activating Factor-1
APC	AlloPhycoCyanin
ARN	Acide RiboNucléique
ARNi	ARN interférant
ARNm	ARN messenger
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine TriPhosphate
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BAD	Bcl-2-Associated Death promoter
BAI1	Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1
BAK	Bcl-2 homologous Antagonist Killer
BAX	Bcl-2-Associated X protein
BCA	Acide bicinchonique
BCL	B-cell Lymphoma 2
BG	Benzylguanine
BIA	Biospecific Interaction Analysis
BID	BH3-Interacting Domain death agonist
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C1qCLF	partie collagène de C1q
C1qGR	têtes globulaires de C1q
Caspases	Cysteine-aspartic protéases
CBA	Cytometric Bead Array
cC1qR	Receptor of the C1q collagenous domain
CD	Cluster de différenciation
ced	<i>C. elegans</i> cell death
CFSE	CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNX	Calnéxine
CP	Benzylchloropyrimidine
CR	Complement Receptor
CRP	Complement Reactive Protein
CrkII	CT10 regulator of kinase II
CRT	Calréticuline
Cter	C-terminal
Cy3	Cyanine 3
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
Da	Dalton
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DAF	decay-accelerating factor
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DC	Cellules dendritiques

DIC	Contraste interférentiel différentiel
DISC	Death-Inducing Singaling Complex
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DO	Densité Optique
DR	Death Receptor
DTT	Dithiothréitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDC	1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	Ethylene-diaminetetraacetic acid
EFS	Etablissement Français du Sang
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELMO	Engulfment and Cell Motility
ERp57	Endoplasmic Reticulum protein 57 kDa, PDIA 3
ESI	Ionisation par Electronébulisation
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FADD	Fas Associated protein with Death Domain
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FL	Fluorescence
FLIM	Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy
FRET	Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer
FSC	Forward Scatter
G418	Généticine/néomycine
GADD34	Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein
GAS	Growth Arrest-Specific gene
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol (ancree)
GR	Têtes globulaires de C1q
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosine Triphosphate
GULP	Engulfment adaptor Protein
HAT	Histone AcetylTransferases
HBS	Hepes Buffer Saline
HeLa	Henrietta Lacks cells
Hepes	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HLA-DR	MHC class II cell surface receptor
HRP	Horse Radish Peroxidase, peroxydase du raifort
IAB	Institut Albert Bonniot
IBS	Institut de Biologie Structurale
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukine
INF	Interféron
IP	Immunoprécipitation
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
K41	Cellules MEF WT pour la calréticuline
K42	Cellules MEF KO pour la calréticuline
k_a	Constante d'association
K_D	Constante d'affinité
k_d	Constante de dissociation
kDa	kilo Dalton
KDEL	Séquence (Lys-Asp-Glu-Leu) de rétention dans le réticulum endoplasmique

LB	Lysogeny broth
LC	Chromatographie Liquide
LDL	Low Density Lipoprotein
LOX	Lectin like oxidized LDL receptor
LPC	Lysophosphatidylcholine
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	Lipoprotein Receptor-related Proteins
M _{V/R}	Coefficient de Manders
MAC	Complexe d'attaque membranaire
MASP	MBL associated serine protease
MBL	Mannose-binding lectin
MCP	Membrane Cofactor Protein
MCS	Site multiple de clonage
MEF	Mouse embryonic Fibroblast
MFG-E8	Milk fat globule-EGF-factor 8
MFI	Moyennes d'intensité de fluorescence
MHC	Major histocompatibility complex
moDC	Cellules dendritiques obtenues à partir de la différenciation de monocytes
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
MS	Spectométrie de masse
MTX	Mitoxantrone
NBT/BCIP	Nitro-Blue Tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NK	Natural Killer
NP-40	Nonidet P-40
Nter	N-terminal
NZ amine	Casein hydrolysate
oxyLDL	LDL oxydés
p/v	poids/volume
PAF	Platelet activating factor
PAMPS	Pathogen associated molecular pattern
pb	paire de bases
PBMC	Peropheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline comprenant du Tween
PCC	Pearson's Correlation Coefficient
PCD	Programmed cell death
PCR	Polymerase chain reaction
Pdomaine	Domaine structural P de la calréticuline
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
PFA	Paraformaldéhyde
PGE	Prostaglandine
Pi	Iodure de propidium
pI	Point isoélectrique
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PMSF	PhenylMethylSulfonyl Fluoride (inhibiteur de protéases)
PP1	Phosphoprotein Phosphatase 1
PRR	Pattern Recognition Receptors
PS	Phosphatidylsérine
psig ou Psignal	Peptide signal
PSR	Récepteur à la PS

PTX	Pentraxine
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RCA	Regulators of Complement Activation Proteins
RE	Réticulum endoplasmique
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RU	Unité de résonance
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
SAP	Serum amyloid P component
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
shRNA	small hairpin RNA (ARN en épingle)
siRNA	Small interfering RNA
SLE	Lupus systémique érythémateux
SP-A/D	Surfactant protein A/D
SPR	Surface Plasmon Résonance (Résonance plasmonique de surface)
SR	Scavenger receptor
SSC	Side Scatter
SVF	Sérum de veau foetal
TAE	Tris-acetate-EDTA
TAM	Tyro-3 Axl Mer
TCA	Trichloroacetic acid
TCR	Récepteur des cellules T
TEMED	NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine
TGF	Transforming Growth Factor
THP-1	Human acute monocytic leukemia cell line
THP-1-m	THP-1 différencié en macrophages
TOF (MALDI)	Time-of-Flight (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
Tm	Température de fusion
TMB	Tétraméthylbenzidine
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRADD	TNFR1-Associated Death Domain
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand receptor
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
TSP	Thrombospondine
UTP	Uridine triphosphate
UV	Ultra violet
v/v	volume/volume
WT	Wild-type (sauvage)
β2-GPI	β2 glycoprotein I
ΔPdom	Domaine globulaire de la calréticuline

CHAPITRE I : Introduction

1. Mort cellulaire programmée et apoptose

1.1. Généralités

La « mort cellulaire programmée » est un processus biologique fondamental des organismes multicellulaires dans lesquels une séquence d'événements hautement régulés, contrôlés par un programme génétique, conduit à la mort de la cellule [Lockshin *et al.* 2001]. Focalisés sur l'étude du « vivant », les biologistes ont cependant longtemps négligé le phénomène de mort cellulaire. Bien que les premières descriptions morphologiques datent de la moitié du XIXe siècle, principalement par Walther Flemming, la notion même de « mort cellulaire programmée » n'a en effet été formulée que bien plus tard en 1964 par Lockshin. C'est uniquement en 1973 que la première classification de mort cellulaire a été établie par Schweichel et Merker [Schweichel *et al.* 1973].

Cette première classification morphologique proposée suite à l'étude d'embryons de rats exposés à des substances toxiques est divisée en 3 types de mort cellulaire : le type I associé à l'hétérophagie, le type II associé à l'autophagie et le type III caractérisé par une absence de digestion des cellules mortes. Aujourd'hui, ces modes de mort cellulaire sont considérés, respectivement, comme l'apoptose, la mort cellulaire autophagique et la nécrose [Galluzzi *et al.* 2007].

Le terme d'apoptose, dérivé du grec ancien et qui évoque "la chute des feuilles", a été utilisé pour la première fois par Kerr et collaborateurs en 1972 pour décrire une forme morphologiquement particulière de mort cellulaire. Notre compréhension des mécanismes impliqués dans le processus d'apoptose des cellules de mammifères est issue notamment de l'étude du développement du nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) par le laboratoire d'Horvitz dans les années 80 [pour revue Lettre *et al.* 2006]). L'apoptose a depuis été reconnue et acceptée comme un mode de mort cellulaire programmée, qui implique une élimination génétiquement déterminée des cellules.

En quelques mots, l'autophagie du grec « auto » soi-même et « phagie » manger, permet à une cellule en manque de nutriments, ou à une cellule privée de facteurs de croissance, de survivre en utilisant ses propres composants (organites, matériel non essentiel, etc.). Cependant, les cellules qui ne reçoivent pas de nutriments pendant des périodes prolongées, finissent par mourir d'une mort cellulaire associée à l'autophagie [Kroemer *et al.* 2005].

La nécrose, du grec « nekros » cadavre, a été définie comme un type de mort cellulaire qui ne possède pas les caractéristiques de l'apoptose et de l'autophagie, et est généralement considérée comme incontrôlée. Toutefois, des recherches récentes suggèrent que son apparition et son évolution peuvent être strictement régulées, en impliquant notamment RIP1 ; on parle ainsi de nécroptose [Galluzzi *et al.* 2008; Hitomi *et al.* 2008; Vandenabeele *et al.* 2010].

Il est important de garder en mémoire qu'il existe également, à plusieurs niveaux, un échange croisé (cross talk) entre les différents types de voies et qu'un mode particulier de mort cellulaire peut prédominer, en fonction du type cellulaire, ou des stimuli endogènes et exogènes et ainsi influencer le type de mort [Lockshin *et al.* 2004; Hotchkiss *et al.* 2009].

Bien que l'apoptose soit considérée comme l'exemple type de mort cellulaire programmée, il est important de noter que d'autres formes de mort cellulaire programmée ont été décrites, telles que l'apoptose [Formigli *et al.* 2000] ou encore la paraptose [Sperandio *et al.* 2000]. D'autres formes de mort cellulaire programmée pourraient également encore être découvertes.

Dans la suite de cette partie, un aperçu général des connaissances actuelles sur le processus d'apoptose, y compris la morphologie, la biochimie mais également son rôle dans les phénomènes physiologiques et pathologiques de l'apoptose, va être développé.

1.2. Modifications morphologiques

Les différents types de mort cellulaire sont principalement décrits par des critères morphologiques définis par le comité de la nomenclature de la mort cellulaire (NCCD : Nomenclature Committee on Cell Death) [Kroemer *et al.* 2009].

De toutes les morts cellulaires, l'apoptose reste celle qui est la plus fréquemment rencontrée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. La microscopie électronique montre que les changements structuraux de l'apoptose se déroulent en trois étapes distinctes. La première étape comprend un arrondissement et la condensation de la cellule, la rétraction des pseudopodes, la réduction du volume cellulaire (pycnose) ainsi que la condensation de la chromatine. La deuxième étape également appelée étape de fragmentation comprend : la fragmentation nucléaire (caryorrhexie), peu ou pas de modifications ultra-structurales des organites cytoplasmiques et le bourgeonnement de la membrane plasmique en corps apoptotiques (zéose). Enfin, la troisième étape correspond, *in vivo*, à l'élimination par les phagocytes résidents. En absence de prise en charge par les macrophages, les corps apoptotiques finissent *in vitro*, par gonfler et perdre leur intégrité membranaire. On parle alors de nécrose secondaire [Kerr *et al.* 1972]. Il est également important de signaler que lors d'une mort cellulaire par apoptose, l'intégrité de la membrane plasmique est conservée tout au long du processus. Toutes ces modifications décrites en 1972 par Kerr et collaborateurs sont aujourd'hui toujours d'actualité et sont présentées sur la Figure 1.

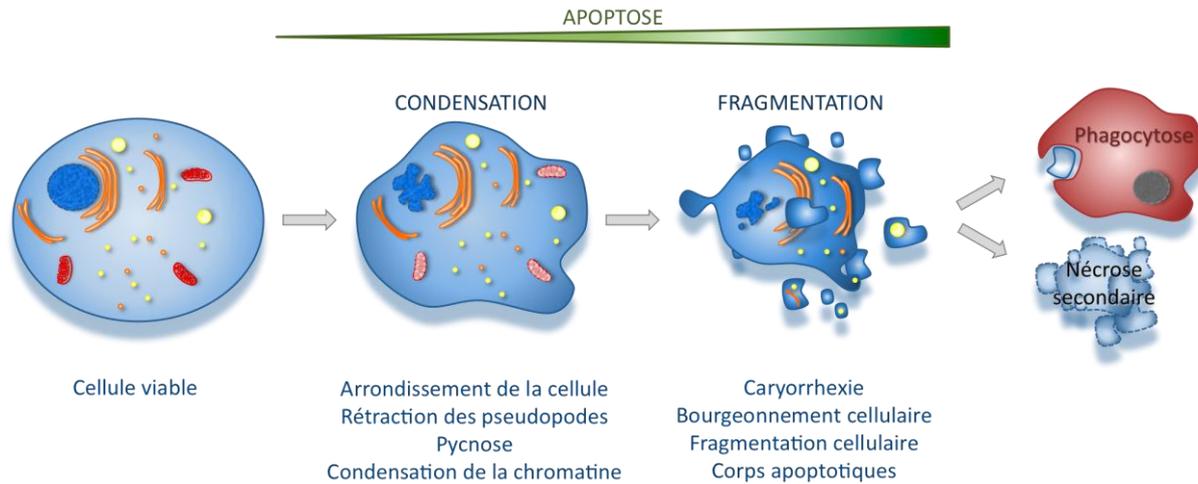


Figure 1 : Représentation schématique des modifications morphologiques induites au cours de l'apoptose

La principale caractéristique morphologique de l'apoptose est le rétrécissement de la cellule et de son noyau. L'intégrité de la membrane plasmique est conservée tout au long du processus. *In vivo*, la cellule est éliminée par les phagocytes résidents, *in vitro*, l'absence de prise en charge par les macrophages conduit à une nécrose secondaire [Figure adaptée de Hotchkiss *et al.* 2009].

L'autophagie est ainsi décrite par une absence de condensation de la chromatine, une vacuolisation massive du cytoplasme, une accumulation de vésicules à double membrane (nommées autophagosome) et *in vivo* à une faible prise en charge par les cellules phagocytaires [Debnath *et al.* 2005; Klionsky *et al.* 2008; Klionsky *et al.* 2011]. La nécrose est généralement, quant à elle, définie par un gonflement (swelling) des organites ou de la cellule, également appelé oncose (pour gonflement en grec), puis par la rupture des membranes et un déversement du contenu intracellulaire avec une condensation modérée de la chromatine [Majno *et al.* 1995; Lemasters 2005; Golstein *et al.* 2007; Van der Meer *et al.* 2010].

De toutes les morts cellulaires, l'apoptose a d'abord été étudiée pour ces changements morphologiques caractéristiques. Ces études ont ensuite été élargies afin de mieux comprendre l'implication et la régulation des modifications biochimiques qui conduisent au démantèlement ordonné et séquentiel de la cellule.

1.3. Modifications biochimiques

Les mécanismes de l'apoptose sont très complexes et sophistiqués, impliquant une cascade d'événements moléculaires. En général, on décrit deux voies de l'apoptose : la voie extrinsèque ou des récepteurs de mort et la voie intrinsèque médiée principalement par les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Cependant, il est maintenant prouvé que les deux voies sont liées et que les molécules dans une voie peuvent influencer l'autre [Igney *et al.* 2002].

Les voies extrinsèque et intrinsèque diffèrent dans l'implication de caspases initiatrices et de molécules d'adaptation distinctes, mais convergent sur la même voie d'exécution. Cette voie est initiée par le clivage de la caspase-3 et résulte en la fragmentation de l'ADN, la dégradation des protéines nucléaires et du cytosquelette, la réticulation des protéines, la formation de corps apoptotiques et l'expression de ligands pour les cellules phagocytaires [Elmore 2007].

Les caspases (« cystéine-aspartic protéases ») sont des protéases à cystéine cruciales pour l'apoptose des cellules eucaryotes. Leur suppression par recombinaison homologue a révélé des fonctions importantes dans l'apoptose, dans la maturation des cytokines et dans la croissance et la différenciation cellulaire [Wang *et al.* 2000]. Les caspases sont synthétisées sous forme zymogène contenant un prodomaine et un domaine protéase. Elles clivent des protéines cibles au niveau d'un résidu aspartate spécifique, ce sont les trois résidus d'acides aminés qui se trouvent en amont qui permettent de déterminer la reconnaissance spécifique du substrat. Une fois que les caspases sont activées, il semble y avoir un engagement irréversible vers la mort cellulaire.

La voie extrinsèque est également appelée voie des récepteurs de mort en raison de l'implication de récepteurs transmembranaires dans l'initiation du signal d'apoptose. Les récepteurs de mort sont membres de la superfamille des récepteurs du TNF (« Tumor necrosis factor »). Les membres de cette famille partagent des domaines extracellulaires similaires riches en cystéine et sont caractérisés par un domaine cytoplasmique d'environ 80 acides aminés appelé « domaine de mort », qui joue un rôle crucial dans la transmission du signal de la surface de la cellule vers les voies de signalisation intracellulaire [Ashkenazi *et al.* 1998]. Les récepteurs de mort les mieux caractérisés sont CD95 (APO-1/Fas), le récepteur 1 du TNF (TNFR1), le « TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor 1 » (TRAIL-R1) et TRAIL-R2, tandis que le rôle de DR3 (TRAMP/Apo-3/WSL-1/LARD) ou de DR6 n'a pas exactement été défini.

La fixation du ligand déclenche la trimérisation du récepteur de mort. Le regroupement des domaines de mort (Death domaine) de ces récepteurs permet le recrutement de molécules adaptatrices telles que FADD (« Fas-Associated protein with Death Domain »). L'agrégation de ce complexe provoque des changements conformationnels de ses composants et permet la formation du « death-inducing signaling complex » (DISC) et l'activation de la caspase-8 un médiateur central de l'apoptose. La caspase-8 active alors les caspases effectrices en aval telles que la caspase-3 [Fulda *et al.* 2006]. Dans certains cas, les mitochondries sont utilisées comme des amplificateurs du signal via le clivage de BID (« BH3-interacting domain death agonist ») par la caspase-8 activant ainsi la voie intrinsèque.

La voie intrinsèque est également appelée voie mitochondriale en référence au rôle que jouent ces organites. Elle est activée par un large éventail de stimuli non-médiés par les récepteurs, tels qu'une infection virale, des dommages de l'ADN, une augmentation intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène, une privation en facteurs de croissance ou la présence d'agents génotoxiques. Ces stimuli produisent des signaux intracellulaires strictement contrôlés par les membres de la famille de protéines BCL-2 (« B-cell lymphoma 2 »). Les protéines de la famille BCL-2 ont été intensivement étudiées au cours de la dernière décennie pour leur importance dans la régulation de l'apoptose et surtout pour leur activité pro- ou anti-apoptotique. Les membres de la famille BCL-2 sont couramment regroupés en trois classes. Une première classe anti-apoptotique (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL1, BCL-B/BCL-2L10 et A1/BCL-2A1), une deuxième classe pro-apoptotique (BAX, BAK et BOK/MTD) et une troisième classe divergente de protéines BH3-only (BAD, BIK/BLK ou NBK, BID, HRK/DP5, BIM/DBO, BMF, NOXA et PUMA/BBC3) possédant un domaine BH3 conservé permettant la liaison et la régulation des protéines BCL-2 anti-apoptotiques. C'est l'équilibre entre les protéines pro-apoptotiques (BH3-only) et anti-apoptotiques (membres de la famille BCL-2) qui détermine la vie ou la mort d'une cellule. La voie intrinsèque commence donc par l'induction de protéines BH3-only ou une activation post-traductionnelle menant à la perméabilisation de la membrane mitochondriale (MOMP) et au relargage dans le cytosol du cytochrome-C présent dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. La libération du cytochrome-C conduit à l'activation d'APAF1 (« apoptotic protease-activating factor-1 ») au sein de l'apoptosome et permet l'activation de la caspase-3 [Youle *et al.* 2008; Tait *et al.* 2010].

De plus, la perturbation d'une des fonctions, de contrôle des protéines nouvellement synthétisées ou de stockage du calcium, du réticulum endoplasmique (RE) peut conduire au stress de l'organite et ainsi induire l'apoptose de la cellule. Dans des conditions normales de stress, le réticulum est capable d'adapter sa réponse. Cependant un stress prolongé va induire une signalisation conduisant à l'apoptose de la cellule [Ron *et al.* 2007]. IRE1 et CHOP sont des protéines majeures dans la détection du stress du réticulum et de l'activation de la signalisation d'apoptose [Tabas *et al.* 2011]. L'apoptose induite par un stress du réticulum est régulée par les protéines de la famille BCL-2 et implique la voie mitochondriale. L'activation des caspases est un élément clé de l'apoptose déclenchée par un stress du réticulum. Cependant à ce jour, la cohorte des caspases liées à l'apoptose induite par un stress du réticulum n'a pas été établie de façon concluante et la caspase apicale reste encore à définir [Szegezdi *et al.* 2006; Gorman *et al.* 2012]. Une vue synthétique de ces différentes voies est présentée sur la Figure 2.

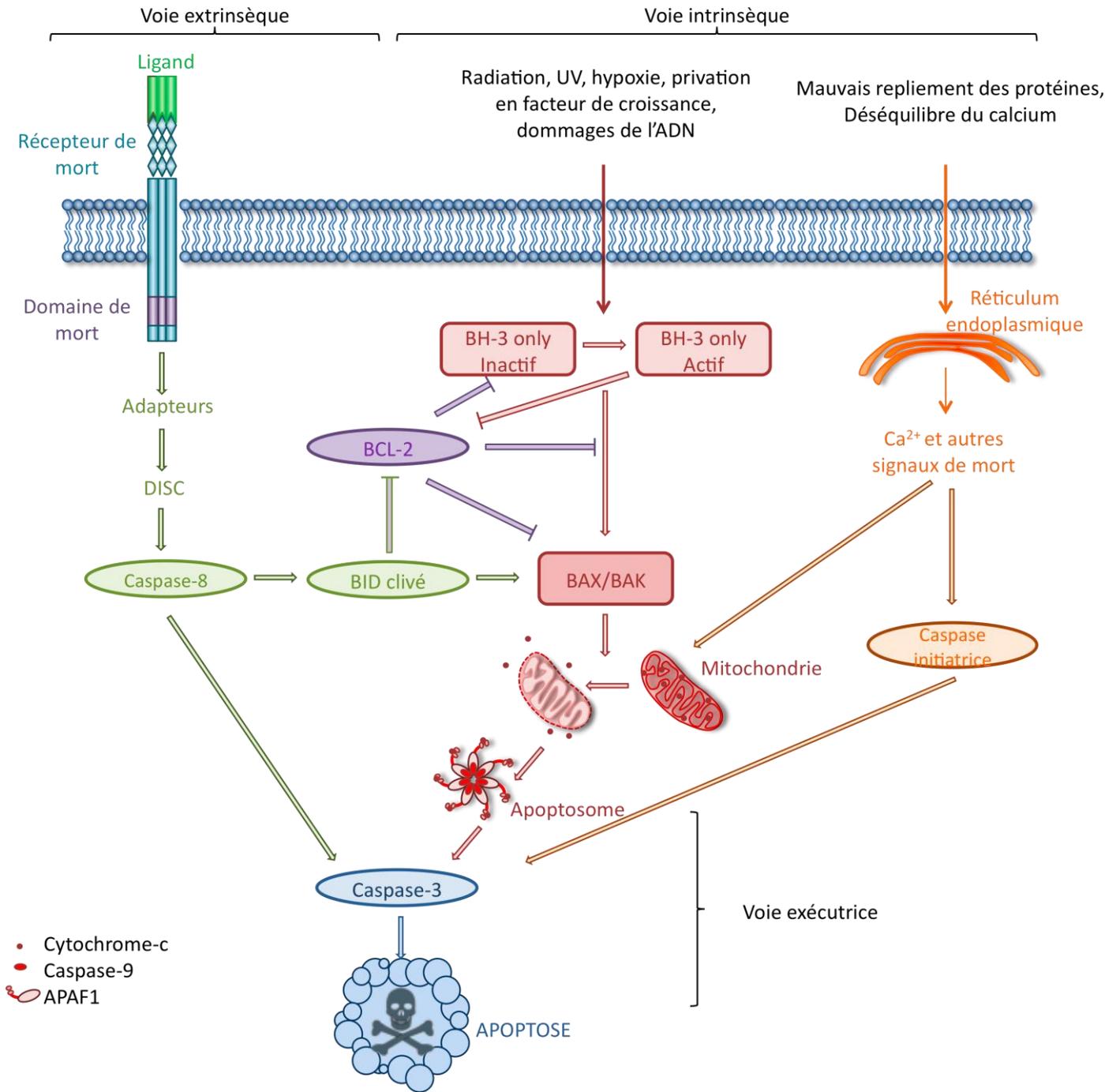
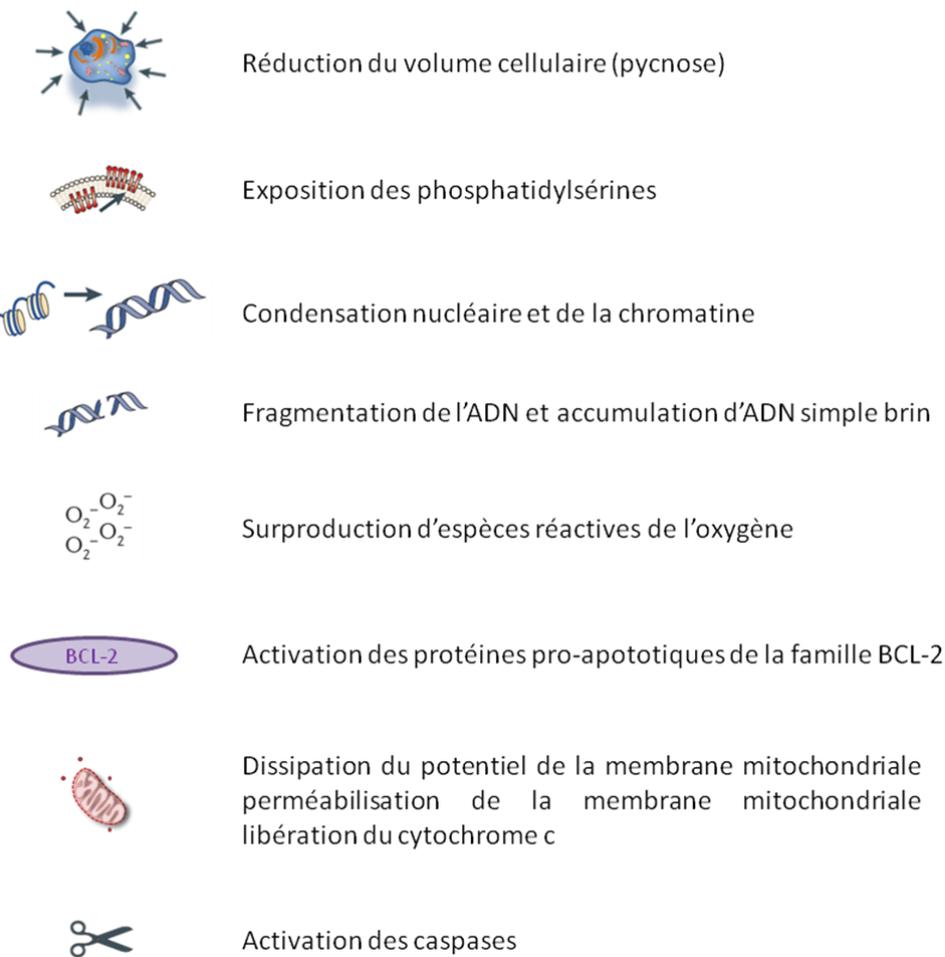


Figure 2 : Représentation schématique des voies d'induction de l'apoptose

Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose : la voie extrinsèque est médiée par la voie des récepteurs de mort, alors que la voie intrinsèque est médiée par les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Différents ensembles de molécules adaptatrices et caspases initiateuses sont impliqués, mais toutes les voies impliquent une caspase effectrice commune [Figure adaptée de Oliveira *et al.* 2008].

Les caractéristiques biochimiques de l'apoptose ont été résumées, sans chronologie absolue, par Kepp et collaborateurs [Kepp *et al.* 2011] de la façon suivante :



L'étude de ces différentes voies et des modifications biochimiques qu'elles impliquent est donc essentielle pour une meilleure compréhension de l'induction et du rôle de l'apoptose.

1.4. Apoptose : fonctions physiologiques et pathologiques

L'apoptose, extrêmement conservée durant l'évolution, est une mort cellulaire impliquée dans de nombreux systèmes biologiques des organismes multicellulaires. Elle joue un rôle important dans l'embryogenèse, l'homéostasie cellulaire et l'élimination des cellules mutées ou indésirables ainsi que dans le bon fonctionnement du système immunitaire. Elle peut également jouer un rôle dans divers troubles pathologiques [Rastogi *et al.* 2009].

Apoptose et développement :

L'apoptose, comme la prolifération cellulaire, est une partie intégrante du développement [pour revue Vaux *et al.* 1999]. Un équilibre précaire entre la division cellulaire et la mort cellulaire est un principe fondamental du développement des métazoaires. Un *modus operandi* général du développement des métazoaires est la surproduction de cellules, suivi d'une apoptose massive durant les derniers stades de développement afin d'obtenir le nombre relatif des différents types cellulaires pour parvenir au bon fonctionnement des organes. Les cellules apoptotiques sont alors rapidement phagocytées par les cellules voisines ou les macrophages avant toute fuite de leur contenu.

Des exemples classiques, sont la morphogenèse des doigts lors du développement des membres [Zuzarte-Luis *et al.* 2002], du système nerveux et notamment des neurones [Hutchins *et al.* 1998] et des organes reproducteurs [Jacobson *et al.* 1997; Meier *et al.* 2000].

Apoptose et homéostasie :

Dans un organisme adulte, l'homéostasie est maintenue par un équilibre entre division cellulaire et mort cellulaire. Une prolifération excessive ou une croissance inappropriée induit l'apoptose des cellules dans les sites affectés. De plus le vieillissement des organismes entraîne une augmentation de la détérioration des cellules et donc de l'apoptose nécessitant une élimination rapide de ces cellules.

Apoptose et cellules indésirables :

L'apoptose se produit normalement lorsqu'une cellule est irréversiblement endommagée (ADN non réparable), infectée par un virus ou victime d'un stress trop important (privation de nutriments). Elle permet alors l'élimination de la cellule endommagée ou l'arrêt de la propagation de l'infection virale. Elle joue également un rôle dans la prévention du cancer et s'avère être une composante essentielle du phénomène de cicatrisation (élimination des cellules inflammatoires et évolution du tissu cicatriciel).

Apoptose et système immunitaire :

L'apoptose peut avoir différentes implications au sein du système immunitaire. Certaines cellules parviennent à contourner les contraintes liées à une prolifération illimitée ou suite à une infection par un virus, pour lesquelles aucune mort cellulaire n'est activée. C'est alors le système immunitaire qui va prendre le relais et induire l'apoptose de ces cellules indésirables, on parle d'immunosurveillance. Les cellules effectrices principales sont les lymphocytes T cytotoxiques du système immunitaire adaptatif et les « Natural Killer » (cellules NK) du système immunitaire inné. Ces cellules induisent l'apoptose principalement via la voie extrinsèque des récepteurs de mort [Igney *et al.* 2002].

L'apoptose joue un rôle clé dans le développement, la différenciation et l'homéostasie des cellules du système immunitaire et notamment des cellules T. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le contrôle de l'apoptose des différentes sous-populations de cellules T et une même sous-population peut utiliser des mécanismes différents dans des circonstances différentes. C'est dans le thymus que les cellules réagissant aux antigènes du soi sont éliminées par apoptose, on parle de sélection négative. Une sélection identique est effectuée avec les lymphocytes B au niveau de la moelle osseuse. Seuls les lymphocytes capables de reconnaître des antigènes étrangers et tolérants envers les antigènes du soi, survivent. Dans la périphérie, le nombre de lymphocytes est étroitement régulé et, malgré une expansion périodique durant la réponse immunitaire, celui-ci reste relativement constant. La grande majorité des lymphocytes générés lors de l'expansion clonale est éliminée par apoptose et seules quelques cellules survivent afin de conserver une mémoire immunologique [Rathmell *et al.* 2002; Xu *et al.* 2007].

Dérégulation de l'apoptose :

Des anomalies dans la régulation de l'apoptose peuvent causer de nombreuses maladies. Une classification non exhaustive de certaines de ces maladies est présentée sur la Figure 3.

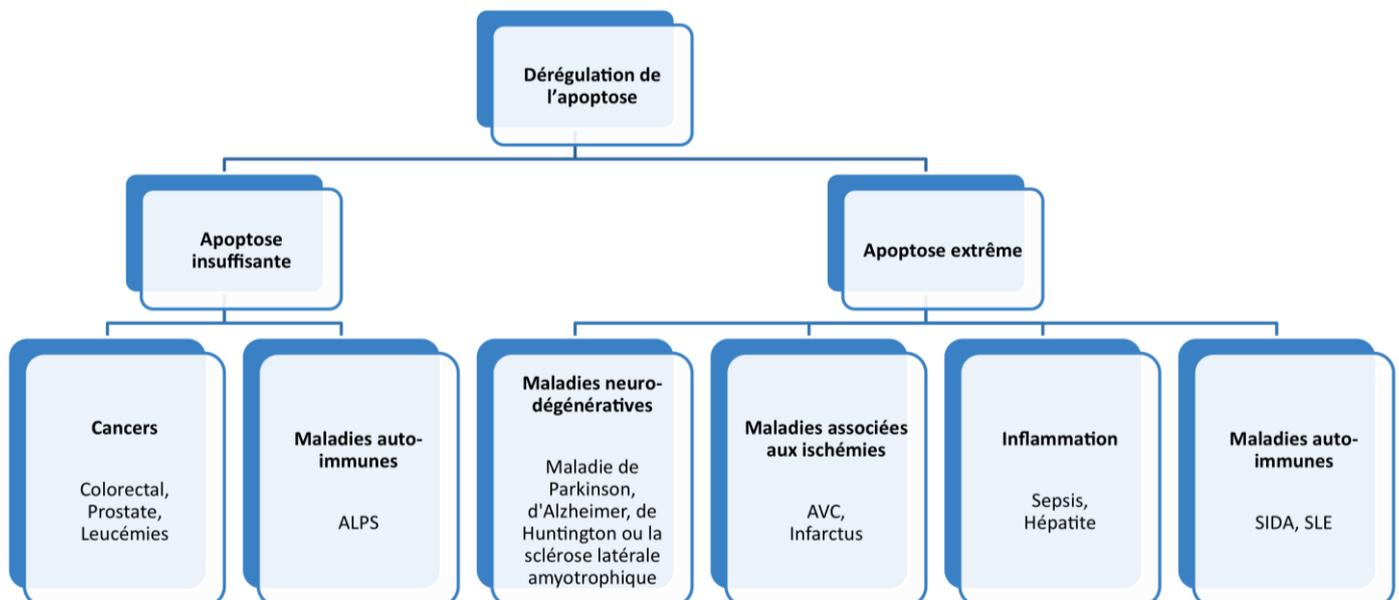


Figure 3 : Représentation des maladies communes associées à une dérégulation de l'apoptose

Figure adaptée de [Elmore 2007; Rastogi *et al.* 2009].

Une prolifération excessive des cellules ou une diminution de l'efficacité de l'élimination des cellules apoptotiques peut être à l'origine de diverses pathologies. Les cellules tumorales utilisent

une variété de mécanismes moléculaires pour réprimer l'apoptose. Des modifications des voies de signalisation cellulaires peuvent entraîner une dérégulation de l'apoptose et conduire au cancer. Les cellules tumorales peuvent également acquérir une résistance à l'apoptose par l'expression de protéines anti-apoptotiques comme BCL-2, par la diminution ou la mutation des protéines pro-apoptotiques du type de BAX ou encore la diminution de la réponse à l'activation de la voie des récepteurs de mort. En plus du cancer, une apoptose trop faible peut également entraîner des maladies telles que le syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS) quand l'apoptose des lymphocytes auto-réactifs est insuffisante.

A l'inverse, une apoptose excessive peut aussi être une caractéristique de certaines maladies neurodégénératives. Il est maintenant généralement admis que la mort neuronale massive due à l'apoptose est une caractéristique commune des cerveaux de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer ou d'Huntington par exemple. En revanche contrairement à la majorité des maladies impliquant l'apoptose, une analyse de l'apoptose neuronale *in vivo* est beaucoup plus difficile [Shimohama 2000]. Une apoptose excessive apparaît également comme jouant un rôle important dans diverses lésions associées à l'ischémie (infarctus du myocarde mais également accident vasculaire cérébral - AVC). Le sepsis est quant à lui caractérisé par une apoptose massive des cellules immunitaires effectrices suite à une infection sévère. La perte profonde de cellules immunitaires effectrices dans le sepsis, inhibe la capacité du système immunitaire à éradiquer l'infection primaire et rend la personne susceptible à d'autres infections. Enfin, le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est un exemple de maladie résultant de l'apoptose excessive des cellules T suite à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le lupus érythémateux systémique (SLE) est également un exemple de maladie auto-immune due à une apoptose excessive et à un défaut d'élimination des cellules apoptotiques.

Ainsi, il existe de nombreuses conditions physiologiques et pathologiques dans lesquelles l'apoptose joue un rôle primordial. Des efforts considérables ont été accomplis ces dernières années pour élucider les mécanismes moléculaires qui régissent ce mode de disparition cellulaire ainsi que l'identification des protéines clés. La reconnaissance et l'élimination des corps apoptotiques ont reçu moins d'attention mais sont actuellement très étudiées.

2. Phagocytose et élimination des cellules apoptotiques

2.1. Généralités

Le phénomène de phagocytose a été observé pour la première fois par Elie Metchnikoff (Prix Nobel en 1908) il y a plus de 100 ans. Depuis lors, il a été reconnu comme une composante biologique essentielle de la réponse immunitaire innée et adaptative à des agents pathogènes. La phagocytose est définie comme l'ingestion de particules $\geq 0,5 \mu\text{m}$ telles que des billes, des cellules apoptotiques ou des microorganismes.

La phagocytose est utilisée à des fins différentes par un grand nombre d'organismes allant de l'amibe aux vertébrés. La capacité d'engloutir de grosses particules est apparue comme une fonction nutritionnelle dans les organismes unicellulaires, comme en témoigne l'amibe *Dictyostelium discoideum*, qui se nourrit de bactéries, jusqu'à la clairance des cellules apoptotiques au cours du développement embryonnaire dans les organismes complexes. La structure moléculaire de la phagocytose semble avoir été conservée à travers l'évolution et c'est notamment grâce à l'étude du modèle de *C. elegans* que les mécanismes impliqués dans la phagocytose ont été déchiffrés [Jutras *et al.* 2005; Flannagan *et al.* 2012].

La phagocytose, suite normale de l'apoptose : l'élimination physique et la dégradation des cellules apoptotiques par phagocytose représente la dernière étape de l'apoptose. Avec plus de 10^9 cellules apoptotiques produites chaque jour, la clairance des cellules apoptotiques paraît extrêmement efficace car leur détection histologique est extrêmement rare dans les tissus normaux. Par contre, un défaut dans l'élimination des cellules apoptotiques conduit à l'apparition de maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique (SLE) et l'arthrite rhumatoïde [Elliott *et al.* 2010].

La phagocytose des cellules apoptotiques peut être exécutée à la fois par des phagocytes professionnels (tels que les macrophages et cellules dendritiques) et non professionnels présents à proximité (comme les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes). Les données actuelles suggèrent que les étapes impliquées dans la clairance des cellules apoptotiques par les phagocytes sont similaires entre phagocytes professionnels et non professionnels. Bien que la cinétique et les molécules impliquées puissent varier, la signalisation doit elle aussi très certainement différer [Parnaik *et al.* 2000].

Il semble donc que dans un premier temps le macrophage détecte la présence de la cellule apoptotique, puis entre en contact avec celle-ci grâce à la formation de liaisons spécifiques permettant sa reconnaissance. Le phagocyte va ensuite engager l'activation du processus de phagocytose et ainsi permettre l'élimination de la cellule apoptotique [Toda *et al.* 2012].

2.2. Modifications de surface

Généralement, la cellule apoptotique et le phagocyte ne sont pas situés à proximité immédiate, soulevant ainsi une question : comment le phagocyte arrive à proximité de la cellule apoptotique avant que celle-ci ne subisse une nécrose secondaire ? Une solution séduisante serait la sécrétion de signaux d'attraction solubles provenant de la cellule apoptotique, qui pourraient par la suite diriger le phagocyte vers celle-ci. En effet, des signaux « find-me » jouant ce rôle ont été mis en évidence [Lauber *et al.* 2003]. Se pose ensuite le problème de la reconnaissance spécifique des cellules apoptotiques par rapport aux cellules viables : pour cela, les cellules apoptotiques vont réduire l'expression des signaux limitant leur reconnaissance, signaux « don't eat-me », mais également exposer à leur surface des molécules qui vont leur permettre d'être reconnues par les phagocytes, signaux « eat-me » [Lauber *et al.* 2004; Ravichandran *et al.* 2007; Devitt *et al.* 2011].

C'est par homologie avec les motifs des pathogènes PAMPs (« Pathogen-associated molecular pattern ») que le terme d'ACAMPs, se référant aux motifs associés à la mort cellulaire (« Apoptotic cell-associated molecular pattern »), a été proposé pour désigner collectivement les différents marqueurs des cellules apoptotiques [Franc *et al.* 1999]. Il est tout de même important de noter que tous les marqueurs ne doivent pas nécessairement être simultanément exposés pour permettre l'élimination efficace des cellules apoptotiques.

Les signaux « find-me » :

C'est en 2003 que Lauber et collaborateurs ont identifié le premier signal « find-me » : la lysophosphatidylcholine (LPC), libérée à partir de cellules apoptotiques par l'activation de la phospholipase A2 (dépendante de la caspase-3) qui convertit la phosphatidylcholine en LPC [Lauber *et al.* 2003]. C'est seulement en 2008 que le récepteur de la LPC a été découvert : G2A (protéine d'accumulation G2 ou récepteur 132 couplé aux protéines G) [Peter *et al.* 2008]. Deux autres molécules ont également été proposées pour avoir un rôle chimioattractant : la sphingosine-1-phosphate (S1P) et CX3CL1/fractalkine [Gude *et al.* 2008; Truman *et al.* 2008]. Par ailleurs, l'ATP et l'UTP relargués à partir de cellules apoptotiques ont été récemment décrits comme étant des signaux « find-me » [Elliott *et al.* 2009]. Ces molécules semblent activer le recrutement non seulement des macrophages mais aussi des neutrophiles et des lymphocytes [Florey *et al.* 2009; Lecut *et al.* 2009].

La lactoferrine a également été identifiée comme faisant partie de la signalisation des cellules apoptotiques, cependant sa sécrétion inhiberait la migration des granulocytes et pourrait ainsi jouer un rôle dans le recrutement spécifique des cellules phagocytaires. Pour le moment on ne connaît que très peu de choses sur son rôle [Bournazou *et al.* 2009; Ravichandran 2011].

Derrière la notion de signaux « find-me » on suppose qu'un gradient chimiotactique permet l'attraction des phagocytes, cependant la gamme du gradient reste inconnue. Elle est très probablement déterminée par la concentration tissulaire et la rapidité avec laquelle la molécule

donnée est dégradée mais cela reste à démontrer. Une autre question intéressante serait de savoir comment ces signaux sont libérés à partir des cellules apoptotiques. Il est clair à partir des travaux existants que ces médiateurs solubles sont, en effet, libérés lorsque les cellules apoptotiques sont intactes, sans fuite apparente du contenu cellulaire, et que cette libération est dépendante des caspases. Cela donne à penser qu'il peut y avoir des canaux qui interviendraient dans la libération de ces médiateurs solubles mais à ce jour rien de tel n'a été mis en évidence. Une autre question serait de savoir si toutes les cellules apoptotiques ont besoin d'envoyer des signaux « find-me » [Ravichandran 2010] et d'étudier si ces signaux sont redondants, additifs et/ou synergiques [Nagata *et al.* 2010].

Les signaux « don't eat-me » :

Les cellules vivantes peuvent également empêcher activement leur propre reconnaissance par la présentation de signaux « don't eat-me » aux phagocytes. Ainsi, CD31/PECAM-1, membre de la superfamille des immunoglobulines, peut fonctionner comme un signal « don't eat-me » via une interaction homotypique. Au cours de l'apoptose, ce signal de détachement/répulsion est en quelque sorte désactivé, ce qui conduit à l'élimination des cellules apoptotiques. Cependant, ce mécanisme de désactivation est peu clair [Brown *et al.* 2002]. Il a également été montré que les cellules qui affichent la protéine membranaire CD47 échappent à la phagocytose [Oldenborg *et al.* 2000; Tsai *et al.* 2008; Azuma *et al.* 2011]. De plus, la sialylation des glycoprotéines est un autre marqueur caractéristique des cellules viables qui les protège d'une phagocytose inappropriée [Crocker *et al.* 2001]. Par ailleurs, afin de prévenir une activation inappropriée du complément, certaines molécules appelées régulateurs des protéines d'activation du complément (RCA) sont également exprimées en surface. Parmi ces protéines, on trouve CD59, CD55/DAF ou CD46/MCP [Elward *et al.* 2005; Griffiths *et al.* 2010].

Ainsi, les expériences futures pourraient démontrer que la régulation négative de la phagocytose est un mécanisme général activement utilisé pour prévenir l'ingestion de cellules non-apoptotiques [Grimsley *et al.* 2003].

Les signaux « eat-me » :

Les cellules apoptotiques présentent à leur surface des signaux « eat-me » permettant aux macrophages de les identifier et de les éliminer. Ces signaux se composent principalement de nouveaux motifs qui apparaissent sur la surface tels que : la phosphatidylsérine (PS), des changements dans l'oxydation des macromolécules, une exposition de matériel nucléaire, une modification du profil de glycosylation et également l'exposition d'une protéine résidente du réticulum endoplasmique à savoir la calréticuline [pour revue Gardai *et al.* 2006; Paidassi *et al.* 2009].

La phosphatidylsérine (PS) est un composant de la membrane plasmique maintenu exclusivement sur le feuillet interne de la bicouche lipidique des cellules normales via une aminophospholipide

translocase ATP dépendante (également appelée flippase) [Fadok *et al.* 1992]. L'exposition de la PS à la surface externe des cellules se produit très tôt au cours du processus apoptotique et est presque universellement nécessaire pour la reconnaissance et la phagocytose [Fadok *et al.* 1998a; Fadok *et al.* 2001]. Les mécanismes précis favorisant l'exposition de la PS à la surface externe de la membrane restent encore mal connus. L'inhibition de la flippase qui normalement confine la PS au niveau du feuillet interne et l'activation d'une scramblase bidirectionnelle non spécifique des phospholipides semble cependant nécessaire [Bratton *et al.* 1997; Williamson *et al.* 2002]. Il a notamment été établi que la PS doit au moins être huit fois plus exprimée à la surface des cellules apoptotiques par rapport aux cellules viables témoins afin de fournir la spécificité de reconnaissance permettant aux phagocytes de les éliminer [Borisenko *et al.* 2003]. Certaines études ont également suggéré le regroupement des PS à la surface, mais la taille des clusters et le nombre de molécules impliquées restent inconnus. Cependant certains travaux ont mis en évidence une diminution de la phagocytose lorsque la PS était masquée [Azuma *et al.* 2002]. A ce jour la PS reste le signal « eat-me » le plus étudié.

Des changements dans l'oxydation des lipides membranaires (oxyLDL) ont également été décrits, notamment avec la découverte récente d'une famille structurellement conservée de phospholipides oxydés servant de ligands endogènes de haute affinité [Li *et al.* 2007]. La présence de ces motifs oxydés est considérée comme essentielle pour permettre la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques [Chang *et al.* 1999; Kagan *et al.* 2002], cependant les voies moléculaires qui contrôlent la signalisation induite par la reconnaissance de ces signaux lipidiques, mais aussi les mécanismes impliqués dans le processus de peroxydation, restent à déchiffrer [Fadok *et al.* 2007].

L'exposition de matériel nucléaire par les cellules apoptotiques est considérée comme étant à l'origine de la production d'auto-anticorps dans certaines maladies auto-immunes [Von Muhlen *et al.* 1995]. La présence de nucléosomes, d'ADN, mais également d'histones à la surface des cellules apoptotiques, a également été mise en évidence [Radic *et al.* 2004; Leffler *et al.* 2010]. Le matériel nucléaire nouvellement exposé semble être un bon candidat pour la reconnaissance des cellules apoptotiques. La mise en évidence d'une interaction entre l'ADN et les phospholipides pourrait permettre d'expliquer l'exposition en surface de molécules d'ADN mais ces mécanismes d'exposition restent encore à élucider [Furnrohr *et al.* 2007].

La modification du profil de glycosylation est un changement essentiel de la surface des cellules apoptotiques. La surface de toutes les cellules humaines est caractérisée par une couche dense de carbohydrates, négativement chargés, dénommée glycocalyx. Ces sucres, presque exclusivement exposés à la surface sont liés de manière covalente à des protéines membranaires ou à des lipides (sur le groupement NH_2 de la chaîne latérale d'un résidu asparagine). Leur synthèse commence dans le réticulum endoplasmique, où les molécules de sucre sont liées à des composants membranaires. Ces membranes immatures sont ensuite modifiées dans l'appareil de Golgi et finalement transportées à la surface cellulaire. Le glycocalyx joue un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la communication intercellulaire, l'interaction cellule-matrice ou encore la reconnaissance du soi et du non-soi [Varki 1993]. L'étude des sucres exposés à la surface des cellules apoptotiques a mis en évidence une désialylation générale [Azuma *et al.* 2000; Meesmann *et al.* 2010]. Cette désialylation permet l'exposition de nouveaux sucres [Franz *et al.* 2007], la diminution de la charge négative à la surface cellulaire pouvant ainsi influencer les interactions adhésives avec les phagocytes et donc faciliter leur élimination [Duvall *et al.* 1985; Hart *et al.* 2000]. L'exposition de membranes internes contenant des glycoprotéines immatures, une modification *in situ* des glycosidases ou l'apparition d'une activité sialidase dépendante des caspases, sont pour l'instant les seuls mécanismes proposés permettant la modification du glycocalyx (Figure 4).

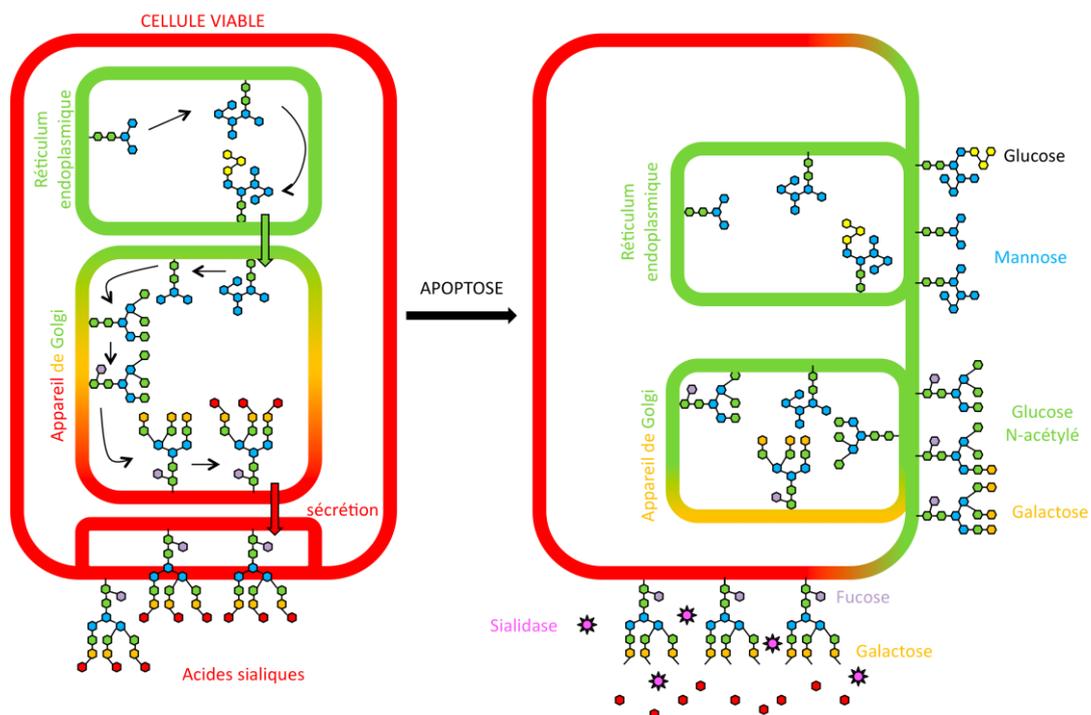


Figure 4 : Modèle des mécanismes permettant la modification du glycocalyx

Le profil de glycosylation est modifié avec l'apoptose des cellules. Les cellules normales exposent des sucres matures sialylés. Lors de l'apoptose, des sucres acétylés ou neutres sont exposés suite à la désialylation des glycoprotéines ou à l'exposition d'oligosaccharides partiellement transformés suite à la fusion des compartiments intracellulaires avec la membrane cellulaire [Figure adaptée de Bilyy *et al.* 2012].

L'exposition de la calréticuline est un phénomène qui attire tous les feux des projecteurs. La calréticuline, pensée comme étant uniquement résidente du réticulum endoplasmique de part sa fonction de chaperonne, a été retrouvée dans d'autres compartiments cellulaires mais également à la surface de la plupart des cellules de mammifères [Burns *et al.* 1994; Johnson *et al.* 2001]. C'est en 2005 que Gardai et collaborateurs ont suggéré la calréticuline comme un possible signal « eat-me » suite à sa redistribution et à son augmentation totale à la surface des cellules apoptotiques, et pouvant travailler conjointement avec la phosphatidylsérine [Gardai *et al.* 2005]. La calréticuline a tout d'abord été considérée comme un récepteur des macrophages en association avec CD91/LRP [Ogden *et al.* 2001; Vandivier *et al.* 2002]. Toutefois, sa large diffusion à la surface cellulaire a également soulevé la possibilité que cette molécule, présente à la surface des cellules apoptotiques, puisse lier directement et stimuler CD91/LRP sur les cellules phagocytaires. Par ailleurs, la calréticuline étant une protéine soluble ne possédant ni domaine transmembranaire ni ancre GPI, son exportation et sa rétention à la membrane restent encore à expliquer. L'étude de l'exposition de la calréticuline a également soulevé la question de son immunogénicité lors de la mort cellulaire [Obeid *et al.* 2007]. L'évolution de ces différents signaux est résumée sur la Figure 5.

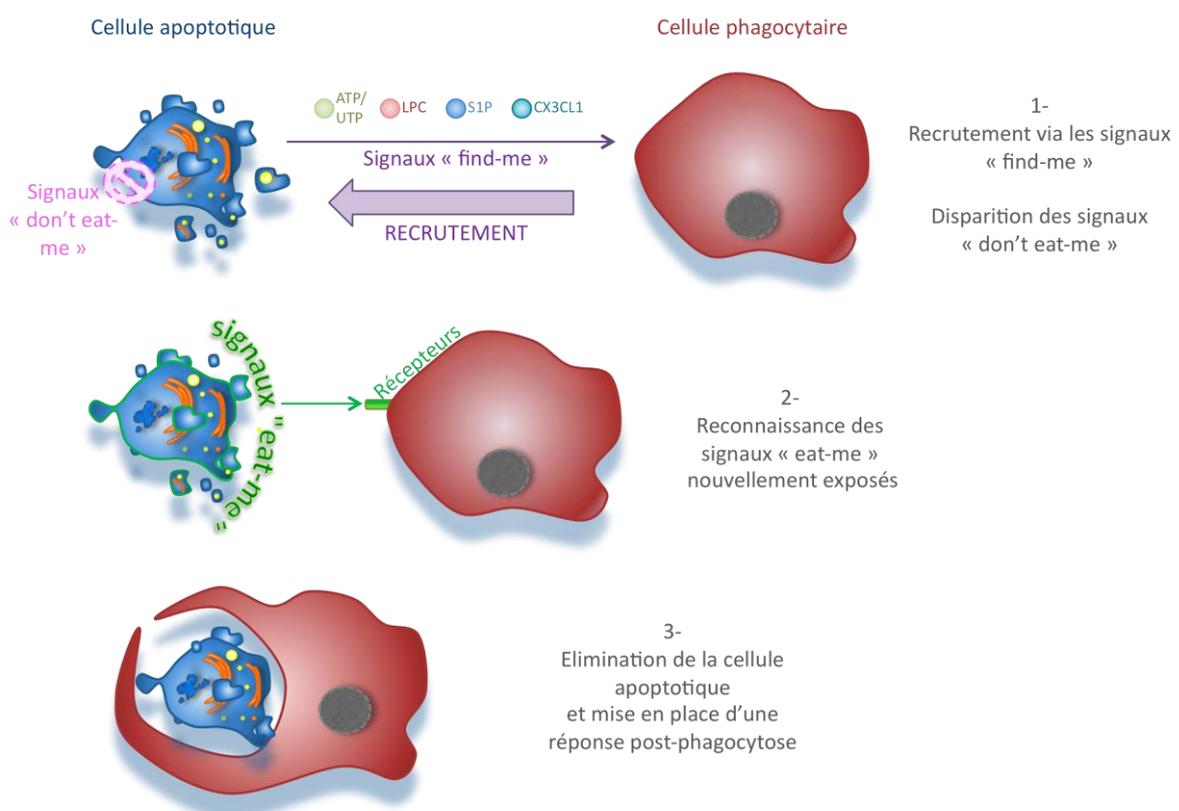


Figure 5 : Représentation schématique du rôle des différents signaux dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques

Lorsque les cellules deviennent apoptotiques, elles libèrent des signaux « find-me » mais perdent également leurs signaux « don't eat-me ». En réponse aux signaux « find-me » les macrophages migrent à proximité des cellules apoptotiques et les reconnaissent grâce aux signaux « eat-me ». Les cellules apoptotiques sont ensuite phagocytées. Leur reconnaissance et leur phagocytose va induire la mise en place d'une réponse post-phagocytose [Figure adaptée de Nagata *et al.* 2010].

2.3. Molécules de reconnaissance

Les phagocytes doivent pouvoir discriminer les différents signaux présents à la surface des cellules. Pour cela, ils utilisent une large gamme de récepteurs impliquant également des molécules solubles afin de détecter les modifications exprimées. Ainsi, plusieurs récepteurs peuvent avoir les mêmes ligands et plusieurs ligands peuvent avoir le même récepteur ; on appelle ces récepteurs PRR pour « Pattern Recognition Receptors ». Il apparaît également que ces récepteurs ne sont pas tous exprimés sur un phagocyte donné, ce qui nécessite donc plusieurs modes de reconnaissance.

Au début des années 2000, Peter Henson a proposé un modèle de « tethering and tickling » (Figure 6) où certains récepteurs servent à la reconnaissance des cellules apoptotiques et d'autres permettent la signalisation, cependant le rôle dans la détection et/ou la signalisation de ces récepteurs reste encore à élucider [Henson *et al.* 2001].

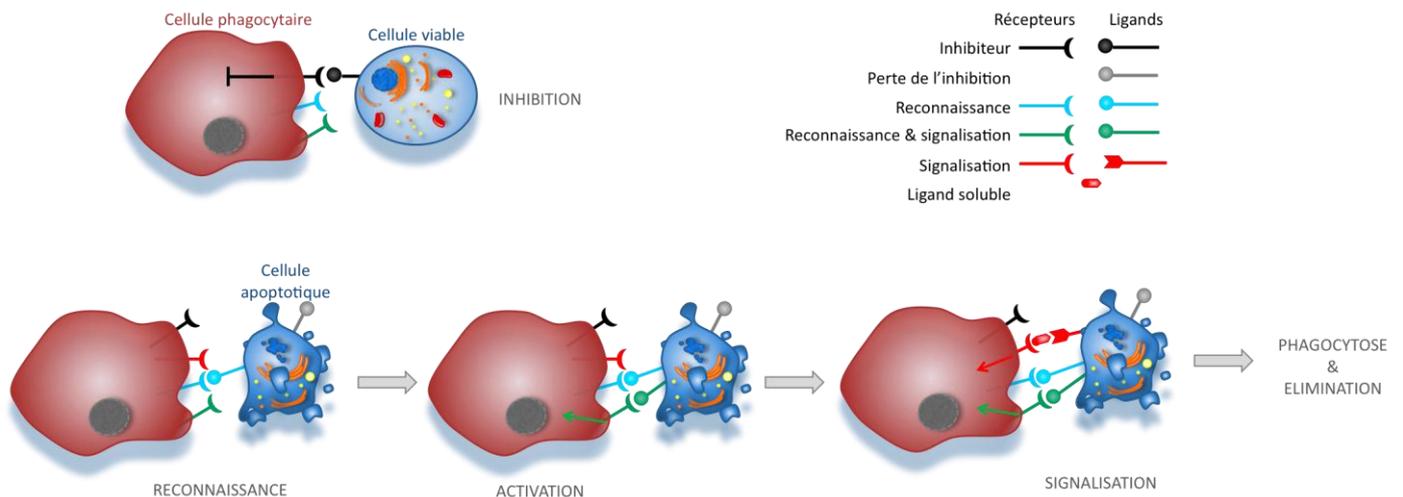


Figure 6 : Représentation schématique du modèle de « tethering and tickling » impliqué dans la reconnaissance et la signalisation de la phagocytose des cellules apoptotiques

De nombreuses molécules sont impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes. Une fois la reconnaissance établie, d'autres molécules de reconnaissance et de signalisation vont entrer en jeu, permettant l'activation du macrophage puis la phagocytose. Les cellules apoptotiques vont ensuite être phagocytées puis éliminées [Figure adaptée de Gregory *et al.* 2005].

Les molécules impliquées dans la reconnaissance des signaux de surface peuvent être regroupées en trois principaux groupes : les molécules de reconnaissance de la phosphatidylsérine, les récepteurs membranaires à reconnaissance directe et les molécules pontantes solubles.

Les molécules de reconnaissance de la phosphatidylsérine :

Les molécules de reconnaissance des phosphatidylsérines (PS) peuvent être regroupées en deux catégories : les protéines membranaires qui peuvent directement reconnaître et lier la PS et celles reconnaissant la PS indirectement via des molécules adaptatrices solubles.

Les récepteurs capables de reconnaître directement la PS comprennent des membres de la famille des immunoglobulines des cellules T et de la mucine (TIM) : TIM-4, ainsi que TIM-1 et TIM-3 [Kobayashi *et al.* 2007; Miyanishi *et al.* 2007; Santiago *et al.* 2007; Ichimura *et al.* 2008; DeKruyff *et al.* 2010; Freeman *et al.* 2010; Rodriguez-Manzanet *et al.* 2010; Wong *et al.* 2010]; l'inhibiteur de l'angiogenèse cérébrale 1 (BAI1) qui est une protéine possédant sept domaines transmembranaires et qui appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G de type II [Park *et al.* 2007a]; et la stabiline-2/HARE [Park *et al.* 2008]. Le récepteur à la phosphatidylsérine (PSR) a été initialement révélé comme un récepteur spécifique de la PS [Fadok *et al.* 2000], mais cette découverte a depuis été récusée [Bose *et al.* 2004; Williamson *et al.* 2004].

Les molécules solubles interagissant avec la PS sont pour l'instant au nombre de six. MFG-E8 (« milk fat globule-EGF-factor-8 ») qui a beaucoup été étudié récemment car certains de ses mutants provoquent des maladies auto-immunes; c'est le récepteur à la vitronectine, également appelé intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui permet sa reconnaissance par le phagocyte [Hanayama *et al.* 2002; Akakura *et al.* 2004; Asano *et al.* 2004; Hanayama *et al.* 2006]. GAS-6 (« growth arrest-specific gene 6 ») et la protéine S sont également impliqués et c'est ensuite par l'intermédiaire des récepteurs de type TAM tels que Tyro-3, Axl et Mer qu'elles sont reconnues [Nagata *et al.* 1996; Nakano *et al.* 1997; Ishimoto *et al.* 2000; Anderson *et al.* 2003; Lemke *et al.* 2008]. La thrombospondine (TSP), reconnue par le complexe CD36- $\alpha_v\beta_3$, a également été identifiée comme un ligand de la PS même si à l'heure actuelle son rôle est peu connu [Savill *et al.* 1991; Savill *et al.* 1992; Gayen Betal *et al.* 2008]. La PS est également reconnue par β_2 -GPI (« β_2 glycoprotein I) ou alipoprotéine H, mais également l'Annexine I pour lesquelles aucun récepteur n'est connu mais dont le rôle dans la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages est décrit [Balasubramanian *et al.* 1998; Bouma *et al.* 1999; Arur *et al.* 2003]. Dernièrement, la protéine du complément C1q a aussi été identifiée au laboratoire comme pouvant reconnaître la PS [Paidassi *et al.* 2008a].

Les récepteurs membranaires à reconnaissance directe :

En plus des récepteurs de la phosphatidylsérine, il existe un certain nombre de récepteurs membranaires impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques.

Les récepteurs « scavenger » (charognards) comprenant : SR-A et B (« scavenger receptors A/B ») [Platt *et al.* 1996], CD36 [Endemann *et al.* 1993; Greenberg *et al.* 2006], CD68/macrosialine [Ramprasad *et al.* 1995] et LOX-1 (« Lectin-like oxidized LDL receptor-1 ») [Oka *et al.* 1998], tous reconnaissant des motifs oxydés exposés en surface.

Le récepteur CD14 a également été mis en évidence pour son rôle dans la phagocytose des cellules apoptotiques et notamment via la reconnaissance d'ICAM-3 (« intercellular adhesion molecule-3 ») considéré comme un signal « eat-me » à la surface des cellules apoptotiques [Devitt *et al.* 1998; Moffatt *et al.* 1999; Torr *et al.* 2012].

Le récepteur ABC1 (« ATP binding cassette transporter 1 ») semble également impliqué dans la phagocytose mais sa fonction reste encore à préciser [Luciani *et al.* 1996; Hamon *et al.* 2000].

Les molécules pontantes solubles :

Beaucoup de protéines pontantes solubles de l'immunité innée sont également impliquées dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques.

Le facteur H [Leffler *et al.* 2010] comme la properdine [Xu *et al.* 2008] ont récemment été considérés comme des ligands des cellules apoptotiques.

Les protéines de la famille des pentraxines jouent un rôle dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques principalement tardives en reconnaissant des antigènes nucléaires [Rovere *et al.* 2000; Gillmore *et al.* 2004; Marnell *et al.* 2005]. La CRP (C-reactive protein) est également impliquée dans la reconnaissance des motifs oxydés type oxyLDL [Robey *et al.* 1984; Gershov *et al.* 2000; Chang *et al.* 2002]. SAP (« serum amyloid P »), PTX3 et CRP sont toutes reconnues par des récepteurs de la famille des FcγR [Bharadwaj *et al.* 1999; Bharadwaj *et al.* 2001; Marnell *et al.* 2005; Lu *et al.* 2008a].

Les collagènes de défense avec SP-A et SP-D [Schagat *et al.* 2001; Palaniyar *et al.* 2004; Palaniyar *et al.* 2005; Gil *et al.* 2009], la MBL (« mannan-binding lectine ») [Palaniyar *et al.* 2004] et les ficolines [Honore *et al.* 2007; Jensen *et al.* 2007] sont aussi impliqués dans la reconnaissance de structures nucléaires à la surface des cellules apoptotiques par l'intermédiaire de leurs régions globulaires. SP-A et D ainsi que la MBL reconnaissent également des sucres modifiés présents à la surface des cellules apoptotiques [Turner 2003]. Les récepteurs du complément ou le récepteur CRT-CD91/LRP à la surface des phagocytes sont connus pour reconnaître leur partie collagène [Ghiran *et al.* 2000; Ogden *et al.* 2001; Gardai *et al.* 2003; Kuraya *et al.* 2005].

L'importance de C1q dans la reconnaissance des cellules apoptotiques a été mise en évidence par Korb *et al.* en 1997 [Korb *et al.* 1997]. Il apparaît même que C1q puisse moduler l'expression d'autres molécules impliquées dans la phagocytose des cellules apoptotiques afin d'accélérer leur élimination [Galvan *et al.* 2012]. C1q est une protéine du système du complément composée d'une queue collagène et de six têtes globulaires, celui-ci sera décrit plus en détail dans le paragraphe 4.1 de l'introduction. Plusieurs récepteurs de ses queues collagènes ont ainsi été identifiés tels que CR1 [Klickstein *et al.* 1997] et CRT-CD91 [Ogden *et al.* 2001] voir CD91 seul [Duus *et al.* 2010]. Cependant les cibles reconnues par C1q semblent extrêmement diverses. Il a été montré que les têtes globulaires de C1q reconnaissent la PS [Paidassi *et al.* 2008a], l'ADN exposé à la surface des cellules apoptotiques [Paidassi *et al.* 2008b] mais également des motifs oxydés (oxyLDL) [Biro *et al.* 2010;

Arlaud *et al.* 2011]. Plus récemment il a été mis en évidence que les têtes de C1q pouvaient également interagir *in vitro* avec la calréticuline (CRT) [Paidassi *et al.* 2011]. Il est très intéressant de voir que la calréticuline peut donc interagir à la fois du côté de la cellule apoptotique et du phagocyte avec C1q.

La reconnaissance des cellules apoptotiques par les molécules solubles du complément peut également conduire à l'activation du complément menant jusqu'au dépôt de C3b principalement, impliquant alors une reconnaissance par les récepteurs 3 et 4 du complément (CR3, CR4) [Mevorach *et al.* 1998a; Stuart *et al.* 2005].

La majorité des molécules impliquées dans la synapse apoptotique est représentée sur la Figure 7.

2.4. Signalisation intracellulaire

La phagocytose est un processus extrêmement complexe et aucun modèle unique ne peut rendre compte de la diversité des structures et des résultats associés à l'ingestion de particules. Néanmoins, indépendamment de la cellule ingérée et des conséquences fonctionnelles impliquées, un certain nombre de principes communs ont été établis : après la reconnaissance de la cible par les récepteurs, on observe une polymérisation de l'actine permettant l'englobement de la cible puis une ingestion toujours dépendante de l'actine.

C'est également l'étude de *C. elegans* qui a permis de mieux comprendre les voies de signalisation qui participent à l'ingestion des cellules apoptotiques. Sept gènes indépendants et nécessaires à la phagocytose ont été identifiés [Ellis *et al.* 1986; Ellis *et al.* 1991]. Ce sont ensuite des analyses de doubles mutants qui ont permis de mettre en évidence un fonctionnement selon deux voies de signalisation partiellement redondantes, la première comprenant *ced-1*, *ced-6* et *ced-7*, et la seconde avec *ced-2*, *ced-5*, *ced-10* et *ced-12* [pour revue Lauber *et al.* 2004].

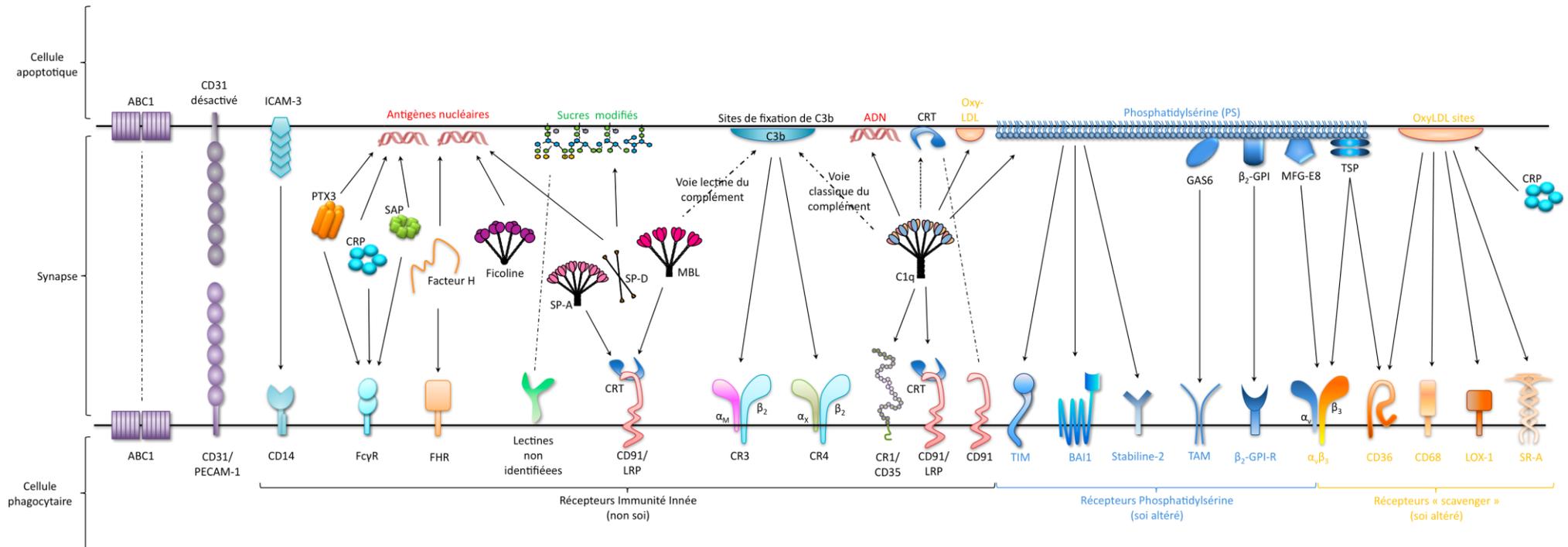


Figure 7 : Représentation schématique de la synapse de phagocytose

Les signaux « eat-me » sont de natures différentes et variées. Ainsi, plusieurs récepteurs peuvent avoir les mêmes ligands et plusieurs ligands peuvent avoir le même récepteur. Les signaux « eat-me » exprimés par les cellules apoptotiques sont présentés en haut de la figure. Les ligands solubles sont représentés au niveau de la synapse phagocytaire et les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des signaux à la surface des cellules phagocytaires sur le bas de la figure [adaptée de Lauber *et al.* 2004].

La première voie est constituée de CED-1, CED-6 et CED-7, qui sont chez les mammifères CD91/LRP (« LDL-receptor-related protein »), la protéine adaptatrice GULP (« engulfment adaptor protein ») et la protéine transporteur ABC1 (« ATP-binding cassette transporteur 1 ») respectivement [Liu *et al.* 1998; Zhou *et al.* 2001b].

Le récepteur transmembranaire CD91/LRP (CED-1) reconnaît sans doute un ligand sur la cellule apoptotique et transmet ensuite le signal par l'intermédiaire de sa queue cytoplasmique à la protéine adaptatrice GULP (CED-6) [Su *et al.* 2002]. ABC1 (CED-7) est proposée comme jouant un double rôle à la fois à la surface des cellules apoptotiques et des phagocytes dans la dynamique de la membrane ; son implication exacte dans la phagocytose restant à établir. Une étude a également suggéré un rôle de ABC1 dans le regroupement de CD91/LRP à la surface des phagocytes [Wu *et al.* 1998a].

Hengartner et collaborateurs ont ainsi montré que CD91/LRP, GULP et ABC1 sont requis pour la réorganisation de l'actine autour de cellules apoptotiques [Lettre *et al.* 2006].

La seconde voie comprend CED-2, CED-5, CED-10 et CED-12, ou ses homologues CrkII, DOCK180, Rac et ELMO respectivement [Wu *et al.* 1998b; Reddien *et al.* 2000; Gumienny *et al.* 2001]. Ces protéines sont responsables de la réorganisation du cytosquelette lors de la phagocytose mais également de la migration cellulaire chez *C. elegans* [Wu *et al.* 2001; Zhou *et al.* 2001a].

CrkII (« CT10 regulator of kinase II ») (CED-2) a été définie comme une protéine adaptatrice capable d'interagir avec DOCK180 (CED-5) et ELMO (CED-12) qui une fois recrutés à la membrane pourraient activer Rac (CED-10) [Reddien *et al.* 2000]. Cependant, le mécanisme ou le rôle précis de régulation de l'activation de Rac par CrkII reste encore à éclaircir [Tosello-Tramont *et al.* 2007].

Dock180 et ELMO quant à eux forment un complexe qui permet via une activité d'échange GEF (« guanine-nucleotide-exchange factor ») d'activer spécifiquement la protéine Rac [Brugnera *et al.* 2002].

Récemment il a été montré que BAI1 et $\alpha_v\beta_5$, en plus de détecter les modifications présentes à la surface des cellules apoptotiques, jouent un rôle important dans la signalisation intracellulaire notamment via ELMO/Dock180/Rac et CrkII/Dock180/Rac [Albert *et al.* 2000; Park *et al.* 2007a].

Rac est une cible en aval de ces interactions. C'est une petite GTPase qui appartient à la famille des protéines Rho/Rac/cdc42 dont le rôle est crucial pour les réarrangements du cytosquelette d'actine nécessaires à la phagocytose et à la migration [Grimsley *et al.* 2004]. De plus, il semble que les deux voies convergent au niveau de Rac [Kinchen *et al.* 2005], mais des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le lien précis entre les deux voies de signalisation (Figure 8).

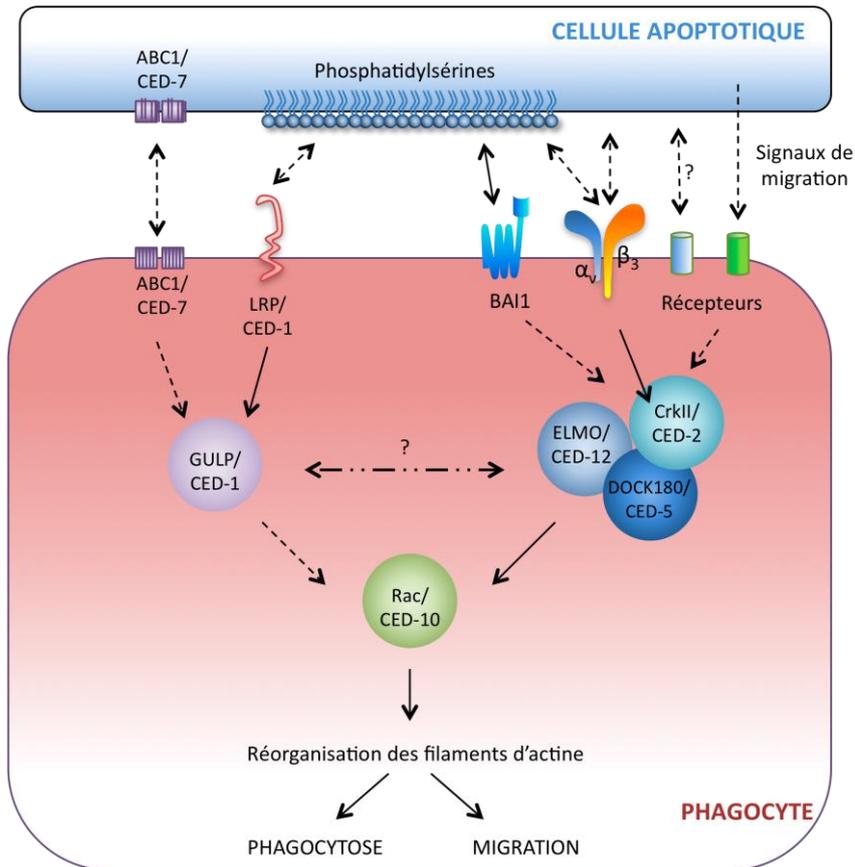


Figure 8 : Représentation schématique de la signalisation intracellulaire de phagocytose

Les sept protéines impliquées dans la phagocytose ont été mises en évidence chez *C. elegans*. C'est par homologie que ces protéines ont été identifiées chez les mammifères. Ces protéines sont impliquées dans deux voies de signalisation, la première avec CED-1/CD91, CED-6/GULP et CED-7/ABC1 et la deuxième avec CED-2/CrkII, CED-5/DOCK180, CED-10/Rac et CED-12/ELMO. Les membres de la deuxième voie sont connus pour réguler les réarrangements du cytosquelette d'actine et également jouer un rôle dans les processus de migration. Les récepteurs identifiés comme impliqués dans cette voie sont également représentés. Le rôle de Rac en aval des deux voies a également été mis en évidence mais le lien précis en amont entre les deux voies de signalisation reste encore à déterminer [Figure adaptée de Lauber *et al.* 2004].

Malgré la grande diversité des récepteurs et des molécules de signalisation des cellules apoptotiques et leur apparente redondance, très peu de choses sont connues sur leurs rôles *in vivo*. Il apparaît également qu'en fonction des cellules, les motifs et les récepteurs varient. En outre, la façon dont certains récepteurs peuvent influencer la réponse immunitaire lors de la reconnaissance des cellules apoptotiques reste une question importante.

3. Cellules apoptotiques et réponse immunitaire

A l'origine, on pensait que l'élimination des cellules apoptotiques était un mécanisme contrôlé, totalement silencieux permettant l'élimination de cellules dangereuses en absence de réponse inflammatoire. Cette absence de réponse inflammatoire lors de l'apoptose a été attribuée à la phagocytose rapide des cellules apoptotiques avant leur lyse, empêchant ainsi la libération du contenu cellulaire susceptible d'entraîner une réponse inflammatoire. Cependant, il a maintenant été mis en évidence, *in vitro*, que la phagocytose des cellules apoptotiques peut augmenter la sécrétion de molécules immunomodulatrices et anti-inflammatoires telles que le TGF- β (« transforming growth factor β »), l'interleukine-10 (IL-10), la prostaglandine E2 (PGE2), PAF (« Platelet activating factor »), leucotriène C4, thromboxane B2 mais également diminuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α (« tumor necrosis factor- α »), GM-CSF (« granulocyte macrophage colony-stimulating factor »), l'IL-1 β , l'IL-8 et l'IL-12 [Voll *et al.* 1997; Fadok *et al.* 1998b; Zhang *et al.* 2005].

La fixation des récepteurs de la PS a été proposée comme le principal mécanisme bloquant la libération de cytokines pro-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* [Huynh *et al.* 2002; Maderna *et al.* 2003]. Ainsi deux voies ont été proposées pour la suppression de la réponse pro-inflammatoire des phagocytes : la première impliquant une reconnaissance de la PS à la surface des cellules apoptotiques via Mer et GAS-6 ou via CD31 induisant la suppression directe du signal inflammatoire ; la seconde proposant une suppression indirecte suite à la reconnaissance de la PS par CD36 et/ou $\alpha_v\beta_3$ via la libération de TGF- β [Savill *et al.* 2002]. Le TGF- β apparaît ainsi comme essentiel dans l'inhibition de la réponse pro-inflammatoire suite à la phagocytose des cellules apoptotiques [Cvetanovic *et al.* 2004]. Récemment, il a également été montré que la signalisation via le récepteur nucléaire LXR (« liver X receptor ») était importante à la fois pour l'élimination des cellules apoptotiques et le maintien de la tolérance immunitaire [A-Gonzalez *et al.* 2009]. Par ailleurs, l'activité modulatrice des cellules apoptotiques se manifeste par une inhibition précoce et immédiate de la transcription des gènes des cytokines pro-inflammatoires, et s'exerce directement dès la liaison au macrophage, indépendamment de la phagocytose [Savill *et al.* 2002].

Des mécanismes similaires ont été proposés pour l'IL-10 avec notamment un contact phagocyte-cellule apoptotique suffisant pour induire sa production. Cette induction étant en partie dépendante de CD36 [Chung *et al.* 2006]. De nombreux éléments suggèrent que l'IL-10 est un inhibiteur d'un large éventail de fonctions des monocytes/macrophages, y compris pour la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, la production d'oxyde nitrique, l'expression du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation telles que CD80/CD86 [Bogdan *et al.* 1991; de Waal Malefyt *et al.* 1991; Kuhn *et al.*

1993]. Un rôle conjoint du TGF- β et de l'IL-10 a également été mis en évidence dans la modulation de la réponse Th1 [Fuss *et al.* 2002].

L'IL-12 est quant à elle une cytokine charnière entre l'immunité innée et adaptative. Elle est un facteur clé de la réponse Th1 via l'expression de l'INF- γ (interféron) [Trinchieri 1995]. Cependant la façon dont les cellules apoptotiques régulent l'expression de l'IL-12 reste encore à éclaircir. Il apparaît néanmoins qu'un contact phagocyte-cellule apoptotique soit suffisant pour induire l'inhibition de sa production mais cette inhibition n'implique aucune action autocrine ou paracrine du TGF- β ou de l'IL-10 [Kim *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005; Chung *et al.* 2006].

La modulation des cytokines et la présentation des antigènes issus de la dégradation des cellules apoptotiques sont des éléments importants de la réponse immunitaire médiée par les cellules T [Albert 2004]. En effet, des études ont montré que des macrophages ayant phagocyté des cellules apoptotiques ne présentent aucun des antigènes contenus dans les cellules apoptotiques internalisées [Albert *et al.* 2000; Barker *et al.* 2002; Lee *et al.* 2009]. Il est maintenant bien démontré que les cellules dendritiques (DC), considérées comme les sentinelles du système immunitaire, sont capables de phagocyter à grande échelle les cellules apoptotiques et peuvent initier et réguler la réponse du système immunitaire en présentant du matériel apoptotique via les CMH-I (complexe majeur d'histocompatibilité de type I) [Banchereau *et al.* 2000]. Contrairement aux macrophages, les cellules ingérées par les DC peuvent à la fois prévenir et favoriser l'induction d'une réponse immunitaire. Ainsi, la diminution de la production d'IL-12 et la diminution de l'expression de molécules de co-stimulation telles que CD86 permettraient d'inhiber la maturation des DC, mais également la présentation d'antigènes du soi. Les DC ayant ingéré des cellules apoptotiques ont ainsi une capacité réduite à activer les cellules T [Albert *et al.* 1998; Lutz *et al.* 2002]. La phagocytose de cellules apoptotiques a également été montrée comme jouant un rôle essentiel dans l'élimination des cellules T auto-réactives et donc dans le maintien de la tolérance au soi [Steinman *et al.* 2000].

Les mécanismes impliqués dans la réponse immunitaire suite à la phagocytose de cellules apoptotiques sont variés et dépendent de la nature du phagocyte mais également de l'état d'apoptose et des signaux exprimés par les cellules. Néanmoins, il reste encore à définir la valeur de cette réponse immunitaire *in vivo* et notamment son implication dans l'apparition des phénomènes auto-immuns.

Les molécules du complément jouent un rôle dans la reconnaissance des cellules apoptotiques et peuvent être impliquées dans le développement de maladies auto-immunes [Bickerstaff *et al.* 1999; Chen *et al.* 2000; Vandivier *et al.* 2002]. C1q joue un rôle central dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques. Sa présence permet de moduler la réponse inflammatoire [Fraser *et al.* 2006; Fraser *et al.* 2009] alors que sa déficience est impliquée dans l'apparition de maladies auto-immunes [Botto 1998; Botto *et al.* 1998; Lu *et al.* 2008b].

4. Cellules apoptotiques et C1q

4.1. Généralités

C1q est une protéine d'environ 460 kDa composée de 18 chaînes polypeptidiques : six chaînes A, six chaînes B et six chaînes C, regroupées trois par trois, on parle d'un hexamère d'hétérotrimères. Chaque chaîne est composée d'une région N-terminale de type collagène possédant une cystéine impliquée dans une liaison inter-chaînes et une région C-terminale globulaire [Sellar *et al.* 1991; Kishore *et al.* 2000]. Sa structure en « bouquet de tulipes » est présentée sur la Figure 9.

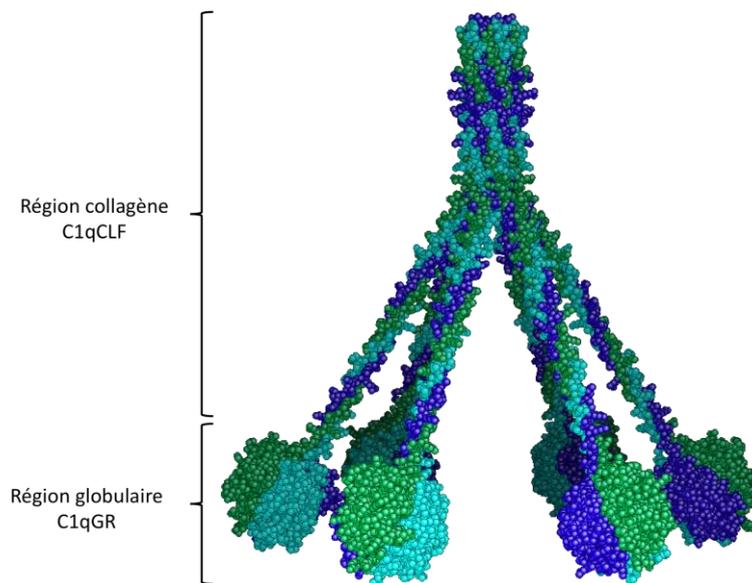


Figure 9 : Modèle structural de C1q [Gaboriaud *et al.* 2004]

La chaîne A est représentée en vert, la chaîne B en bleu foncé et la chaîne C en bleu clair.

C1q est une molécule clé du système du complément, une déficience en C1q entraîne une susceptibilité accrue aux infections [Warren *et al.* 2002]. Le système du complément est reconnu comme un élément majeur de l'immunité innée impliqué dans la défense de l'hôte contre les microorganismes en raison de sa capacité à lier les agents pathogènes, soit directement soit après une reconnaissance préalable par des anticorps. L'activation du complément déclenche des mécanismes effecteurs visant à limiter l'infection mais permet également d'enclencher et de stimuler la réponse immunitaire acquise fournissant ainsi un lien entre le système immunitaire inné et adaptatif [Ricklin *et al.* 2010]. Différentes voies permettent l'activation du complément : la voie classique, la voie lectine et la voie alterne.

La fixation de C1q permet l'activation de la voie classique du complément. Celui-ci est capable de fixer les IgG et les IgM contenus dans les immuns complexes, mais également la CRP et les pentraxines liées aux pathogènes. Il peut aussi reconnaître directement des structures associées aux pathogènes, les PAMPs (« pathogen-associated molecular patterns »). L'activation de la voie

classique du complément entraîne l'opsonisation de la cible et facilite ainsi sa phagocytose ; l'induction d'un signal d'inflammation via les fragments C5a, C4a, C3a produits lors de la cascade d'activation ; et enfin la lyse via la formation du complexe d'attaque membranaire MAC (« membrane attack complex ») qui perfore la membrane de la cible sur laquelle le complément est activé (Figure 10).

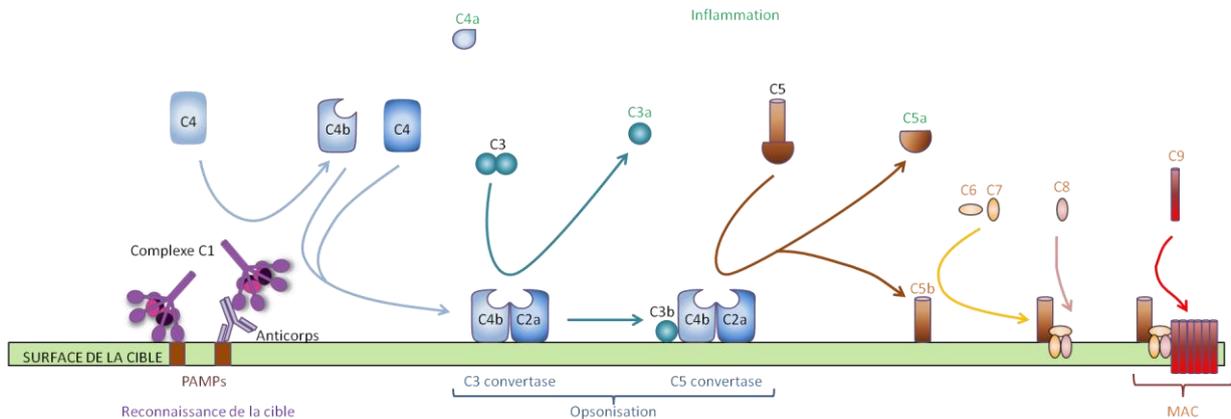


Figure 10 : Représentation schématique de la cascade protéolytique du complément

Les molécules C4b et C3b sont impliquées dans l'opsonisation de surface, les molécules C4a, C3a et C5a dans la signalisation de surface et les molécules C5b, C6, C7, C8 C9 dans le complexe d'attaque membranaire (MAC) et la lyse de la cible [Adaptée de Walport 2001]

En plus de son rôle biologique traditionnel, C1q a la capacité de détecter de nombreuses structures altérées du soi, y compris la forme pathologique de la protéine du prion [Klein *et al.* 2001; Erlich *et al.* 2010], des fibrilles β -amyloïdes [Tacnet-Delorme *et al.* 2001] et les cellules apoptotiques [Taylor *et al.* 2000].

4.2. C1q et reconnaissance des cellules apoptotiques

C1q est fortement impliqué dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques [Roumenina *et al.* 2011]. Une déficience en C1q est associée à l'apparition de maladies auto-immunes de type lupus également appelées SLE (« systemic lupus erythematosus ») ou associées [Kirschfink *et al.* 1993]. Or, une accumulation de cellules apoptotiques est source d'auto-antigènes et favorise l'apparition de maladies auto-immunes [Mevorach *et al.* 1998b]. La présence de C1q est donc essentielle pour le maintien d'un équilibre entre reconnaissance du soi et du non soi.

La reconnaissance de la surface des cellules apoptotiques par C1q a été montrée par Korb et collaborateurs [Korb *et al.* 1997]. Navratil *et al.* ont ensuite mis en évidence le rôle des têtes globulaires dans cette fixation [Navratil *et al.* 2001]. Cependant, il a été mis en évidence que l'activation du complément est extrêmement réduite lorsque les cellules sont en apoptose précoce. Il apparaît donc que C1q soit capable de moduler l'activation du complément en fonction de la cible reconnue [Zwart *et al.* 2004]. Depuis, la structure 3D des C1qGR a été obtenue [Gaboriaud *et al.*

2003] et différentes études, en particulier au laboratoire, ont montré leur interaction avec des héparanes sulfates [Garlatti *et al.* 2010], mais surtout avec des signaux « eat-me » [Paidassi *et al.* 2008a; Paidassi *et al.* 2008b; Paidassi *et al.* 2011]. Un site commun de reconnaissance de ces signaux par la chaîne C sur la face interne de la molécule de C1qGR a ainsi été mis en évidence et un modèle d'activation du complexe C1 a été proposé et est présenté, en fonction des sites impliqués, sur la Figure 11 [pour revue Gaboriaud *et al.* 2011]. La reconnaissance des fragments Fc entraînerait une « ouverture » de C1q et permettrait l'activation de C1 alors qu'une fixation de signaux « eat-me » limiterait cette activation.

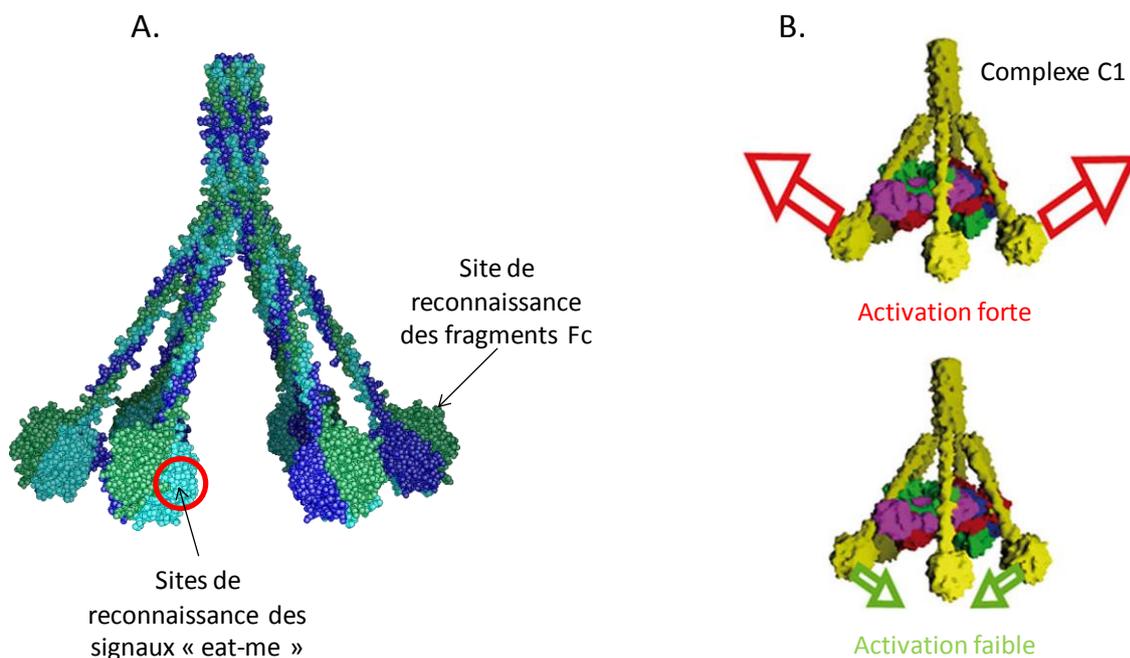


Figure 11 : Localisation des sites de reconnaissance des signaux « eat-me » et modèle potentiel d'activation du complexe C1

(A) Localisation des sites de reconnaissance des signaux « eat-me » et des fragments Fc des anticorps au niveau des C1qGR. (B) Proposition d'un modèle d'activation du complexe C1 en fonction des sites impliqués. La reconnaissance des fragments Fc entraînerait une « ouverture » de C1q et permettrait l'activation de C1 alors qu'une fixation de signaux « eat-me » limiterait cette activation. Adapté de [Gaboriaud *et al.* 2011].

Ce modèle permettrait d'expliquer la faible activation du complément suite à la reconnaissance des cellules apoptotiques et la capacité de C1q à discriminer le soi altéré du non soi. De plus, avec un regroupement des signaux « eat-me » dans certaines zones de la membrane, il est possible d'imaginer une reconnaissance de différents ligands par différentes C1qGR au sein d'une même molécule de C1q.

Enfin la reconnaissance de C1q par les phagocytes via ses récepteurs est essentielle. Un défaut de reconnaissance de C1q par son récepteur CRT-CD91 peut également conduire à l'apparition de SLE [Donnelly *et al.* 2006]. C'est ainsi que le rôle primordial de la calréticuline dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques a été souligné.

5. Le double jeu de la calréticuline

5.1. Généralités

La calréticuline est une protéine de 46 kDa. Sa séquence a été divisée en 3 domaines : N, P et C mais structuralement seuls 2 domaines sont visibles : un Pdomaine et un domaine globulaire (Figure 12). La calréticuline possède en outre en position N-terminale une séquence signal clivable de 17 acides aminés et en position C-terminale une séquence KDEL de rétention dans le réticulum endoplasmique [Michalak *et al.* 1999]. La calréticuline ne possède que peu de modifications post-traductionnelles : aucune glycosylation ou phosphorylation n'a été observée et un seul pont disulfure entre les deux premières cystéines du domaine N est présent. Une forme tronquée de calréticuline a néanmoins été identifiée, l'hexapeptide comprenant la séquence KDEL en position C-terminale étant absent [Hojrup *et al.* 2001].

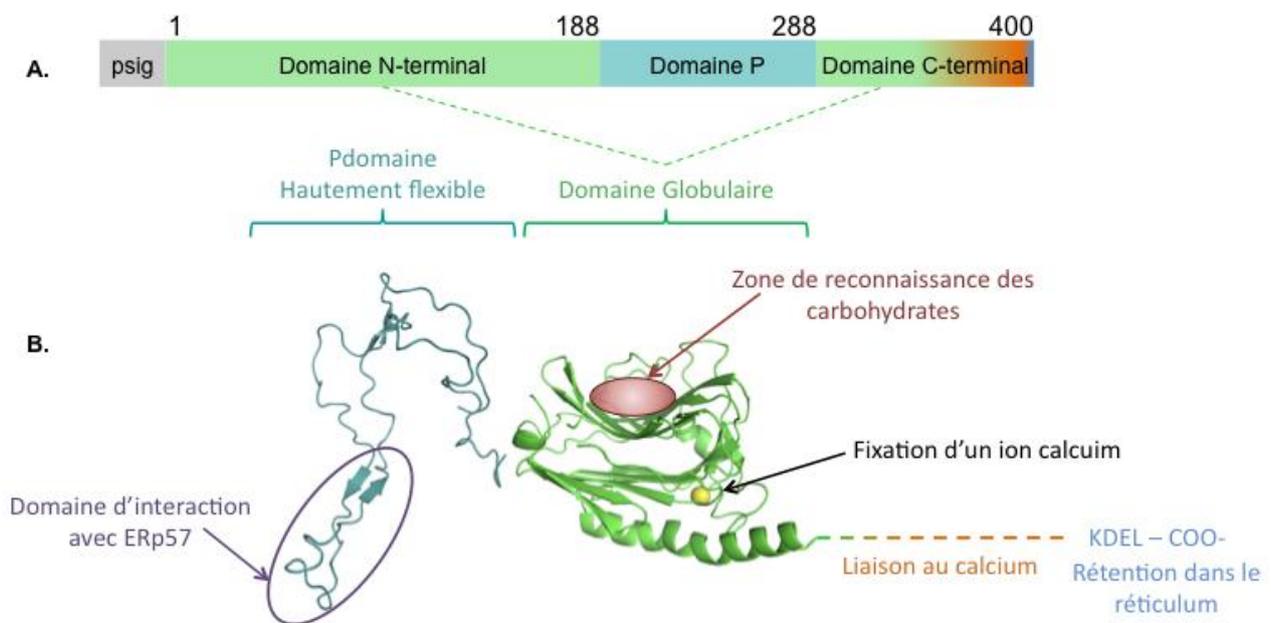


Figure 12 : Structure linéaire et tridimensionnelle de la calréticuline

(A) Structure linéaire de la calréticuline divisée en 3 domaines. (B) Structure 3D de la calréticuline. La partie globulaire a été cristallisée au laboratoire, le Pdomaine est représenté grâce à l'homologie de la calréticuline avec la calnexine. Les différentes fonctions dont la localisation est connue sont représentées sur la figure [Adaptée de Chouquet *et al.* 2011].

La calréticuline est une protéine multifonctionnelle de structure homologue à la protéine du réticulum, la calnexine (CNX). La calnexine peut comme la calréticuline être retrouvée à la surface des cellules. Mais contrairement à la calréticuline, la calnexine ne possède pas de domaine de liaison au calcium, à la place elle possède un domaine transmembranaire permettant son ancrage à la membrane du réticulum [Okazaki *et al.* 2000].

La calréticuline est impliquée dans l'homéostasie intracellulaire du calcium [Llewelyn Roderick *et al.* 1998] et notamment via la capacité de son domaine C-terminal à lier avec une faible affinité, de grandes quantités de calcium [Baksh *et al.* 1991; Nakamura *et al.* 2001; Villamil Giraldo *et al.* 2010].

Son domaine globulaire joue un rôle dans le contrôle du repliement et de la glycosylation des protéines au sein du réticulum. Cette activité chaperonne de type lectine est dépendante du calcium [Kozlov *et al.* 2010]. La présence du Pdomaine n'est pas nécessaire mais permet d'optimiser cette activité [Leach *et al.* 2002; Pocanschi *et al.* 2011]. Son domaine globulaire peut également lier un ion zinc, cependant le rôle de cette interaction reste peu connu, il a uniquement été mis en évidence une modification du repliement de la calréticuline suite à cette interaction [Baksh *et al.* 1995; Li *et al.* 2001; Tan *et al.* 2006]. Elle joue également un rôle dans l'assemblage du CMH-I (complexe majeur d'histocompatibilité de type - I) suite à son interaction avec une thiol-oxidoréductase, ERp57 [Williams 2006; Rutkevich *et al.* 2011], via l'extrémité de son Pdomaine [Wearsch *et al.* 2008; Del Cid *et al.* 2010].

Sa présence est essentielle lors du développement embryonnaire dans l'angiogenèse, la cardiogenèse, le développement neuronal, la genèse du squelette et la formation des adipocytes. Une déficience totale en calréticuline est létale [Mesaeli *et al.* 1999]. Par ailleurs, les niveaux d'expression de celle-ci peuvent varier en fonction des tissus. Elle est par exemple très faiblement exprimée dans le cerveau ou le cœur contrairement à d'autres tissus hautement différenciés ou lors de l'induction d'un stress du réticulum où son expression est élevée. Elle est aussi impliquée dans une variété de processus qui se produisent en dehors de la lumière du réticulum, y compris dans le cytoplasme, le noyau et à la surface cellulaire [pour revue Michalak *et al.* 2009]. Afshar et collaborateurs ont même proposé un mécanisme de rétro-translocation de la calréticuline vers le cytoplasme [Afshar *et al.* 2005]. La localisation de la calréticuline et les différentes fonctions qui en découlent sont présentées sur la Figure 13.

Les déterminants moléculaires et structuraux impliqués dans ces diverses propriétés doivent encore, pour la plupart, être déchiffrés.

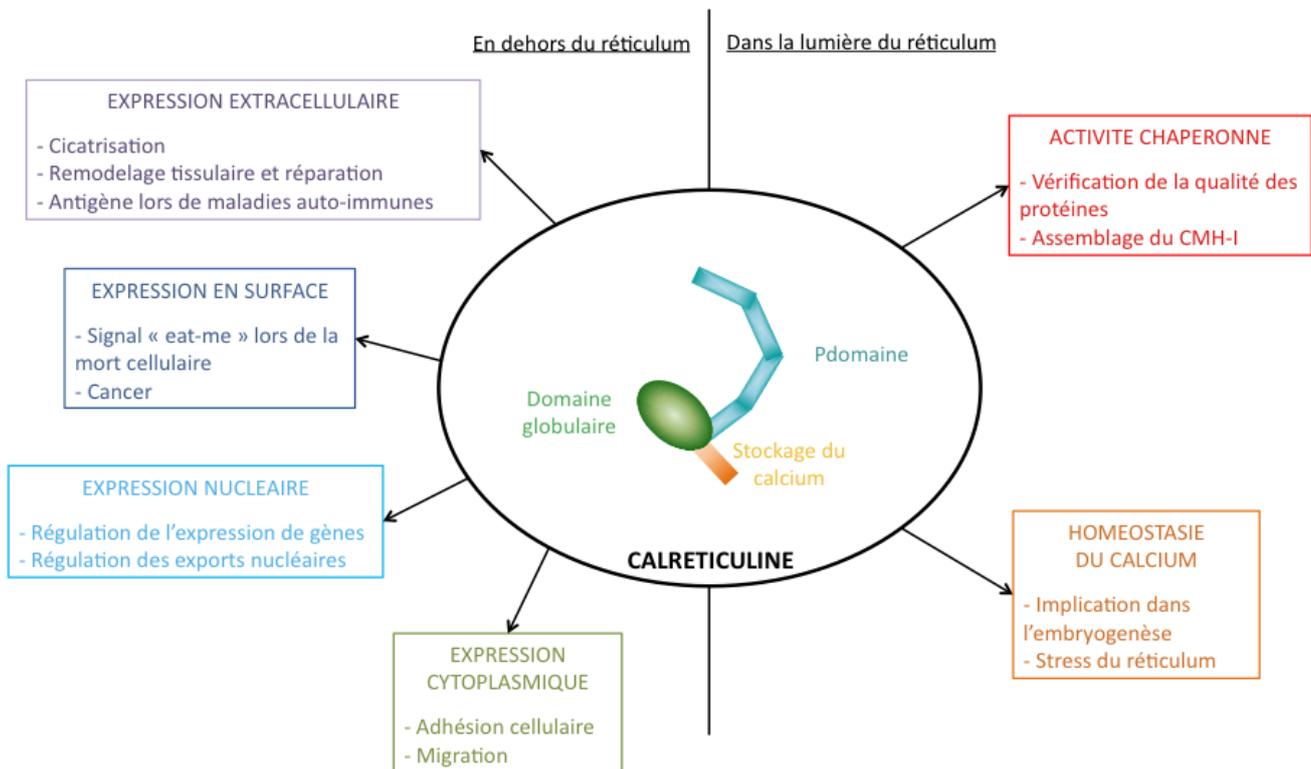


Figure 13 : Localisation de la calréticuline et fonctions associées

Résumé des fonctions de la calréticuline et de leurs effets [adapté de Wang *et al.* 2012]

5.2. Calréticuline et phagocytose des cellules apoptotiques

L'implication de la calréticuline dans la phagocytose et l'élimination des cellules apoptotiques n'est pas récente. Les premières études datent en effet de 1997 avec les travaux de Kishore et Eggleton décrivant sa présence dans le milieu extracellulaire, ou à la surface des cellules apoptotiques. Chez des patients atteints de maladies auto-immunes, la calréticuline est source d'auto-anticorps, et semble interférer dans les processus inflammatoires médiés par C1q [Eggleton *et al.* 1997; Kishore *et al.* 1997].

Plus tard, la calréticuline a été proposée comme récepteur potentiel de la partie collagène de C1q : cC1qR [Sim *et al.* 1998; Kishore *et al.* 2000] et ce en association avec CD91/LRP [Ogden *et al.* 2001; Vandivier *et al.* 2002].

C'est ensuite en 2005, qu'une augmentation de la calréticuline à la surface des cellules apoptotiques a été mise en évidence comme jouant un rôle dans leur élimination par phagocytose. Elle a alors été considérée comme un signal « eat-me ». Une interaction directe, en trans, de la calréticuline à la surface des cellules apoptotiques avec LRP à la surface des phagocytes a même été proposée comme mécanisme de reconnaissance [Gardai *et al.* 2005; Gardai *et al.* 2006].

Kroemer et collaborateurs ont par la suite identifié la calréticuline comme un signal déterminant dans la mort immunogénique des cellules cancéreuses [Obeid *et al.* 2007] et ont mis en évidence l'importance de l'agent anti-cancéreux dans l'exposition de la calréticuline à la surface des cellules

apoptotiques [Martins *et al.* 2010]. Ainsi, l'injection sous cutanée de cellules cancéreuses dont l'apoptose a été induite par des anthracyclines (molécules intercalantes de l'ADN inhibant l'activité de la topoisomérase II et à caractère oxydant induisant un stress du réticulum) chez des souris immunocompétentes, génère une protection contre la croissance tumorale face à une nouvelle injection de cellules cancéreuses viables. Cette protection a été interprétée comme un signe de vaccination anti-tumorale et l'exposition de la calréticuline à la surface des cellules apoptotiques a alors été qualifiée d'immunogène.

Par ailleurs, l'exportation de la calréticuline a été identifiée comme essentielle dans la reconnaissance et l'élimination par les cellules dendritiques. Elle permettrait en effet la présentation d'antigènes tumoraux spécifiques aux lymphocytes T CD8+, essentielle à l'élimination des cellules tumorales résiduelles et à la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale permanente [Obeid *et al.* 2007; Zitvogel *et al.* 2010].

La calréticuline pourrait ainsi jouer un double rôle dans la phagocytose, à la fois à la surface des cellules apoptotiques mais également à la surface des phagocytes.

Les mécanismes permettant l'exposition en surface de la calréticuline sont actuellement très étudiés. Une exportation via la voie SNARE et l'implication de la voie PERK, avec la phosphorylation de eIF2 α et l'inhibition du complexe PP1 (Protein Phosphatase 1) / GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage Gene 34) suite à une induction de l'apoptose par un traitement aux anthracyclines ont notamment été proposées. Ceci suggèrerait une exportation par les voies classiques d'exocytose [Kepp *et al.* 2009; Panaretakis *et al.* 2009]. Kroemer et collaborateurs ont également soulevé, dans ces conditions, la nécessité d'une co-exportation de la calréticuline avec ERp57 (protéine résidente du réticulum) à la surface des cellules apoptotiques. Ainsi, ERp57 pourrait également être considéré comme un signal « eat-me », même si celui-ci n'est pas considéré comme immunogène [Obeid 2008; Panaretakis *et al.* 2008].

A l'inverse, David Ron et collaborateurs ont pour leur part réfuté l'implication de PP1/GADD34 dans l'exportation de la calréticuline (données en cours de publication, présentées lors du 1^{er} congrès international Cell Death in Cancer 2012).

L'équipe d'EGgleton a, quant à elle, proposé une externalisation de la calréticuline dépendante de la phosphatidylsérine (PS). Suite à un stress oxydatif et en présence de calcium, la calréticuline pourrait rétro-transloquer du réticulum vers le cytoplasme suite au clivage de la séquence KDEL et ainsi s'associer avec la membrane plasmique. L'exposition en surface de la PS suite à l'apoptose des cellules permettrait alors à la calréticuline d'être exportée à la surface en même temps qu'elle. A l'extérieur de la cellule, la concentration en calcium étant diminuée, la calréticuline pourrait ensuite être libérée de la membrane [Tarr *et al.* 2010] comme présentée sur la Figure 14. Il apparaît également que la calréticuline exposée dans ces conditions ne possède plus sa séquence KDEL, du moins celle-ci n'est plus détectée par western blot.

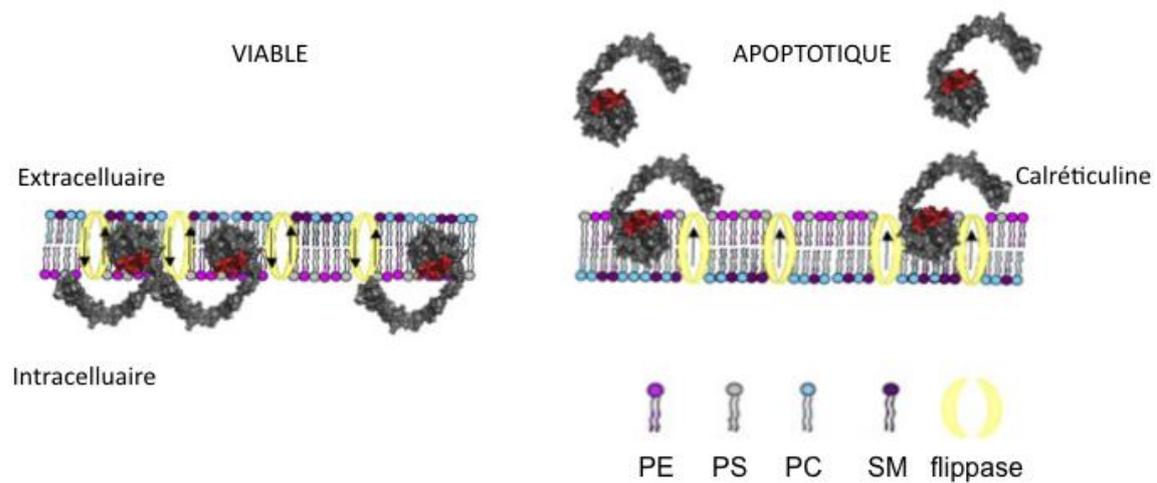


Figure 14 : Modèle schématique d'un mécanisme potentiel permettant la libération de la calréticuline lors de l'apoptose

La CRT a une région lipophile et hydrophobe (en rouge) qui pourrait permettre à la CRT de s'associer à PS. Selon [Gold *et al.* 2010]. Phosphatidylcholine (PC), phosphatidylsérine (PS), phosphatidyléthanolamine (PE), sphingolipide (SM).

Une étude récente a mis en évidence un nouveau mécanisme d'exportation de la calréticuline en surface suite à une induction de l'apoptose par un stress photo-oxydatif du réticulum. Dans ce cas, la calréticuline serait externalisée en même temps que la sécrétion d'ADN selon la voie antérograde classique d'exocytose dépendante de l'activation de PERK et PI3K-p110 α , et ce bien avant l'exposition en surface de la PS comme l'avait pareillement suggéré Obeid [Obeid *et al.* 2007]. De plus, la séquence KDEL semble toujours présente après l'exportation en surface de la calréticuline. L'association de la calréticuline avec CD91/LRP est aussi apparue comme essentielle pour sa rétention à la membrane de la cellule apoptotique. La mort cellulaire induite par un stress photo-oxydatif du réticulum a également été montrée comme immunogène suite à la stimulation de cellules dendritiques permettant d'obtenir une réponse immunitaire anti-tumorale. Par ailleurs, l'élimination de ces cellules apoptotiques a mis en évidence une production importante d'IL-1 β et l'absence de sécrétion d'IL-10 [Garg *et al.* 2012].

Différentes voies d'exportation pourraient ainsi permettre l'exposition de la calréticuline à la surface des cellules apoptotiques. Le choix du mode d'induction de l'apoptose apparaît également comme essentiel dans l'obtention d'une mort cellulaire immunogène. Cependant les mécanismes permettant d'expliquer les changements de compartiments ou le clivage de la séquence KDEL de la calréticuline restent encore à découvrir.

6. Résultats à la base du projet et objectifs du travail

Au laboratoire, il a été mis en évidence par résonance plasmonique de surface (SPR) une interaction entre le domaine globulaire de la calréticuline avec à la fois la partie collagène (C1qCFL) et les parties globulaires de C1q (C1qGR) ; en accord avec le rôle double de récepteur et de signal « eat-me » de la calréticuline. Une interaction entre la calréticuline et la PS, avec une affinité 10 fois plus forte que celle observée entre la calréticuline et C1qCFL ou C1qGR, a également été démontrée par SPR [Paidassi *et al.* 2011]. Ensemble, ces observations indiquent que la calréticuline, C1q, et la PS sont étroitement impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques. Cela suggère fortement un rôle combinatoire de ces trois molécules dans l'étape de reconnaissance.

La fixation de C1q à la surface des cellules apoptotiques a été montrée dans plusieurs études. Malgré une interaction *in vitro*, montrée par des expériences de SPR, aucune interaction directe entre C1q et la calréticuline à la surface des cellules apoptotiques n'a été établie.

Mon travail de thèse a consisté dans un premier temps, à évaluer dans le contexte cellulaire l'interaction entre C1q et la calréticuline à la surface des cellules apoptotiques et dans un second temps, à étudier le rôle fonctionnel de cette interaction directe ou indirecte sur la phagocytose de cellules apoptotiques et la réponse inflammatoire induite par cette phagocytose.

CHAPITRE II : Matériel et Méthodes

1. Biologie cellulaire

1.1. Lignées et cultures cellulaires

Les cellules sont conservées par congélation à -192 °C (azote liquide) en milieu contenant 10 % de sérum de veau fœtal et 10 % de DMSO. Après décongélation, elles sont cultivées dans un incubateur à 37 °C sous 80 % d'humidité en présence de 5 % de CO_2 , en boîtes ou flasques de culture selon les besoins.

Régulièrement, les cellules en culture sont testées afin de détecter une éventuelle contamination par des mycoplasmes. Le test est réalisé selon le protocole du Kit « Myco Alert Sample Kit » de Lonza. Toutes les cellules utilisées pour ce travail sont négatives pour ce test.

Les milieux de culture seront appelés « complets » lorsqu'ils sont supplémentés avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Dominique Dutscher) décomplémenté et des antibiotiques (pénicilline 3 U/ml, streptomycine $3\text{ }\mu\text{g/ml}$, Invitrogen). On parle de sérum décomplémenté, lorsque celui-ci est au préalable chauffé 20 min à 56 °C afin de désactiver les protéines du complément.

Les cellules HeLa (clone ATCC # CCL-2, provenant d'épithélium utérin humain) sont cultivées en monocouche dans du milieu D-MEM complet (Dulbecco's Modified Eagle Medium GlutaMAX, Invitrogen). Le repiquage s'effectue après un lavage par du PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, sans calcium, sans magnésium (Gibco)), puis d'un tampon PBS contenant 0,5 mM d'EDTA et 0,05 % (p/v) de trypsine (Invitrogen) permettant de décoller les cellules. L'action de la trypsine est bloquée par l'ajout de milieu de culture complet. Les cellules recueillies par centrifugation (5 min à 300 g) sont ensuite mises en suspension, à la concentration adéquate, dans du milieu.

Les cellules THP-1 (ATCC # TIB-202) sont une lignée cellulaire de monocytes issue d'un patient atteint d'une leucémie aigue. Elles sont cultivées en suspension, à une concentration de 1×10^5 à 1×10^6 cellules par mL, dans le milieu RPMI-1640 GlutaMAX complet (Invitrogen).

Les cellules MEF K41 et MEF K42 sont des lignées cellulaires de fibroblastes embryonnaires de souris [Nakamura *et al.* 2000]. Ces cellules nous ont été fournies par le Pr Marek Michalak (Département de Biochimie, Université d'Alberta, Edmonton, Canada). Les cellules K42 totalement déficientes en calréticuline sont issues des embryons KO (CRT -/-) et les cellules K41 sont les cellules contrôle possédant la calréticuline (CRT WT). Ces cellules sont cultivées en monocouche dans du milieu RPMI-1640 complet.

Les monocytes sont préparés à partir de poches de sang fraîchement prélevées à l'EFS (Etablissement Français du Sang - cette étude a été réalisée selon une procédure approuvée par le conseil institutionnel de l'EFS. Tous les donateurs ont signé un formulaire de consentement éclairé). Tout d'abord, les cellules mononucléées (PBMC) sont purifiées par centrifugation sur gradient de type Ficoll-Hypaque (Eurobio) afin d'éliminer le plasma, les granulocytes et les érythrocytes. Puis les monocytes sont purifiés :

- soit par une période d'adhérence de 2h suivie de trois lavages en PBS permettant d'éliminer les lymphocytes et les plaquettes (également appelées thrombocytes),
- soit congelés après enrichissement par déplétion avec des anticorps conjugués à une particule magnétique selon le protocole « Human monocyte Enrichment Kit without CD16 depletion » de Stemcell. Ce kit contient des complexes d'anticorps contre les antigènes de surface cellulaire présents sur les cellules sanguines humaines (CD2 - molécule d'adhésion cellulaire (anti Lymphocytes T, B, Natural Killer), CD3 - association TCR (anti Lymphocytes T), CD19 - marqueur de surface des Lymphocytes B, CD20 - Lymphocytes B précoces, CD56 - molécule d'adhésion des NK, CD66b - marqueur de l'activation des granulocytes et exprimé à la surface des éosinophiles (anti polynucléés résiduels), CD123 - récepteur IL-3 (anti sous-population DC et polynucléés), glycophorine A - marqueurs des érythrocytes). Il va permettre l'élimination des lymphocytes T, cellules NK (Natural Killer), lymphocytes B et ainsi permettre l'enrichissement en monocytes CD14 + CD16 + par sélection négative.

Les monocytes ainsi obtenus sont contrôlés par cytométrie en flux.

La décongélation des monocytes enrichis est très délicate. Tout d'abord, les cellules sont décongelées à 37°C. Une fois à 37°C, 15 mL de RPMI-20 % SVF est ajouté goutte à goutte. Après un lavage par 10 mL RPMI-20 % SVF les cellules sont incubées 1h à 37°C. Elles sont ensuite comptées puis incubées 2h en RPMI-10 % SVF (pour permettre leur adhérence) avant d'être utilisées pour les tests de phagocytose.

Les cellules dendritiques (moDC) utilisées ont également été fournies par l'EFS. Elles sont appelées moDC car elles sont différenciées à partir de monocytes purifiés induits par 500 Unité/mL de GM-CSF et 10 ng/mL d'IL-4 (TEBU Peprotech) durant 5 jours en RPMI-1640 complet.

Au laboratoire, le RPMI-1640 complet est utilisé pour les expériences de phagocytose, avec les macrophages issus de THP-1 comme avec les monocytes et les moDC.

1.2. Transfection des cellules

1.2.1. Principe

On appelle transfection l'introduction, non-médiée par un virus, d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes. Plusieurs méthodes sont par exemple disponibles : l'électroporation, le phosphate de calcium et les liposomes artificiels.

La transfection peut permettre la surexpression de protéines absentes du type cellulaire transfecté ou de protéines présentes mais modifiées (par exemple : ajout d'une étiquette (tag) ou mutation). Elle peut également permettre l'inhibition de l'expression d'un gène existant.

La plupart du temps, l'ADN codant la protéine d'intérêt n'est transfecté que de manière transitoire. L'ADN introduit n'est habituellement pas intégré dans le génome cellulaire, il est normalement perdu au plus tard lors des divisions cellulaires. Si l'on souhaite que le gène demeure dans le génome des cellules mères ainsi que des cellules filles, il faut réaliser une transfection stable. Dans ce cas, après la transfection il faudra effectuer une sélection par un antibiotique. Généralement, le gène transfecté se trouve sur un vecteur portant également un gène de résistance à un antibiotique donné. Seules les cellules, dont l'ADN exogène se sera inséré dans leur génome, pourront proliférer et être maintenues en culture.

1.2.2. Transfection d'ADN

Les cellules sont mises en culture 24 h avant la transfection, à la concentration souhaitée, afin d'obtenir 80-95 % de confluence lors de la transfection.

Pour nos expériences, nous avons choisi d'utiliser des liposomes artificiels, l'agent de transfection utilisé pour l'ADN est le jetPrime (Polyplus). L'ADN d'intérêt est dilué dans du jetPRIME™ Buffer (Polyplus), puis le jetPRIME™ reagent est ajouté selon les proportions présentées dans le Tableau 1, le mélange est vortexé et ensuite maintenu à température ambiante pendant 10 min.

Tableau 1 : Paramètres de transfection pour l'ADN

Récepteur de culture	Surface par puits	Volume final de milieu	Cellules 80-95 % de confluence	Volume jetPRIME™ Buffer (µL)	ADN (µg)	jetPRIME™ reagent (µL)
24 puits	2 cm ²	500 µL	5 x 10 ⁴	50	0,4	0,5
Ø 35 mm	9 cm ²	2 mL	2 x 10 ⁵	200	1	2
Ø 100 mm	56 cm ²	10 mL	15 x 10 ⁵	500	5	10

Quatre heures après la transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu D-MEM complet frais. 48 h après la transfection l'antibiotique nécessaire pour la sélection de clones stables est ajouté au milieu de culture. Pour les constructions de la calréticuline en fusion avec la GFP (plasmide pEGFP-C1 ou N1) en plus du gène de sélection Kanamycine permettant une sélection en système bactérien, le vecteur possède un gène de résistance à la Néomycine, permettant une sélection en système mammifère. Pour obtenir des clones stables, les cellules HeLa transfectées sont sélectionnées avec 1600 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de G418 (Invitrogen).

1.2.3. Transfection d'ARN interférents (ARNi)

La transfection d'ARNi permet d'inhiber l'expression d'un gène existant, notamment en utilisant des petits ARN interférents appelé ARNi ou également siRNA. Ces ARN double brin, à l'origine, vont être reconnus au sein du cytoplasme par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) qui va s'activer et libérer le brin complémentaire. Le complexe activé va ensuite reconnaître sa cible : l'ARN messager (ARNm), par complémentarité des bases nucléiques.

Une fois la cible liée, la protéine Argonaute, faisant partie du complexe RISC, va couper l'ARNm. Celui-ci une fois clivé va rapidement être dégradé via ses extrémités par des exonucléases. La transfection d'ARNi va ainsi empêcher l'expression de gènes en clivant leurs ARNm.

Il est également possible d'inhiber l'expression d'un gène de manière stable. Pour cela l'ADN du vecteur permettant l'expression de petits ARN en épingle (shRNA) devra s'intégrer dans le génome. Le shRNA sera ensuite transcrit dans le noyau par la polymérase. Ce produit imite le pré-microARN (pré-miRNA) et est traité par Drosha. Il est ensuite traité par Dicer et chargé dans le complexe RISC.

Pour nos expériences, les cellules sont mises en culture le jour même à la concentration souhaitée dans un milieu contenant 10 % de SVF mais sans antibiotique.

Dans notre cas, nous n'utiliserons que des ARNi et des liposomes artificiels. L'agent de transfection utilisé pour les ARNi est la Lipofectamine RNAimax (Invitrogen), car c'est elle qui nous a donné les meilleurs taux de survie et d'efficacité de transfection.

L'ARNi d'intérêt est dilué dans de l'Opti-MEM (Gibco), puis la Lipofectamine RNAimax est ajoutée. Le mélange est délicatement homogénéisé, selon les proportions présentées dans le Tableau 2 et est ensuite maintenu à température ambiante pendant 20 min avant d'être ajouté aux cellules en culture.

Récipient de culture	Surface par puits	Volume final de milieu	Cellules	Opti-MEM (μL)	ARNi à 20 μM (μL)	Lipofectamine RNAimax (μL)
\varnothing 35 mm	9 cm^2	2 mL	2×10^5	500	3	4
\varnothing 60 mm	25 cm^2	6 mL	6×10^5	1000	6	8
\varnothing 100 mm	56 cm^2	12 mL	15×10^5	2000	12	16

La concentration en lipofectamine RNAimax est de 8 μL par mL de réaction et la concentration finale en ARNi doit être de 10 nM.

La séquence utilisée pour l'ARNi et dirigée contre l'ARNm de la calréticuline est décrite par Harada et collaborateurs [Harada *et al.* 2006]. La séquence de l'ARNi contrôle étant la séquence inverse complémentaire. Les séquences sont présentées dans le Tableau 3, le protocole d'obtention a été mis au point au laboratoire et est décrit en détail dans la publication en référence [Paidassi *et al.* 2011].

ARNi CRT sens	5' -CAUGAGCAGAACAUCGACUdTdT-3'
ARNi CRT anti-sens	5' -AGUCGAUGUUCUGCUCAUGdTdT-3'
ARNi contrôle sens	5' -UCAGCUACAAGACGAGUACdTdT-3'
ARNi contrôle anti-sens	5' -GUACUCGUCUUGUAGCUGAdTdT-3'

1.3. Induction de l'apoptose

L'induction de l'apoptose permet d'obtenir des cellules dans différents états physiologiques (viables, en apoptose précoce ou en apoptose tardive) nécessaires pour cette étude.

Les cellules sont soit exposées à une irradiation d'ultraviolets B (UV) à 312 nm (lampe portative double longueur d'onde de Fischer Bioblock Scientific VL-6.MC) pendant 9 minutes, soit traitées chimiquement à la mitoxantrone (Sigma).

Les différentes conditions utilisées sont indiquées dans le Tableau 4.

Agent inducteur	Dose utilisée
Irradiation UV (312 nm)	1000 mJ/cm^2
Mitoxantrone	1 μM ou 5 μM en DMSO (Sigma)

Pour l'irradiation, les quantités de milieu présentes dans les boîtes de culture ont également été définies et sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Conditions de milieu pour l'irradiation en fonction du récipient de culture	
24 puits	1 mL
Ø 35 mm	2 mL
Ø 60 mm	5 mL
Ø 100 mm	12 mL

Après l'induction, les cellules sont ensuite remises en culture. Les conditions optimales pour rendre les cellules apoptotiques ont été déterminées par des études préliminaires.

L'analyse de l'état apoptotique des cellules utilisées pour les différentes expériences est décrite dans le paragraphe 3.1.2 du chapitre des résultats.

2. Biologie moléculaire

2.1. Matériel de biologie moléculaire

Les milieux de culture LB, LB-Agar et l'agarose proviennent d'Invitrogen. Le tampon d'électrophorèse 1X (TAE) provient d'Euromedex. Les enzymes de restriction proviennent de New England Biolabs. Les antibiotiques, kanamycine et ampicilline, sont fournis par Sigma. Le « SYBR Safe DNA gel stain » et les marqueurs de taille proviennent respectivement d'Invitrogen et New England Biolabs.

Les kits de purification de plasmides à petite échelle « QIAprep Spin Miniprep Kit » ou « NucleoSpin®Plasmid » proviennent respectivement de chez Qiagen ou Macherey Nagel et les kits de purification à grande échelle « HiSpeed Plasmid Midi Kit » de Qiagen ou « NucleoBond® Xtra Midi » de Macherey Nagel. Les purifications endotoxines free de plasmides pour les transfections sont effectuées avec le kit « NucleoBond® Xtra Midi EF » de Macherey Nagel. Les amorces oligonucléotidiques ont été synthétisées par Eurogentec SA ou eurofins.

Dans toutes les expériences, les vecteurs sont déphosphorylés selon le protocole de la phosphatase alcaline « Alkaline Phosphatase, Shrimp » de Roche et purifiés sur gel d'agarose ou par le « QIAquick Nucléotide Removal Kit » de Qiagen. Les amorces sont généralement utilisées à 1 μ M pour les amplifications par PCR. Les PCR quant à elles sont effectuées selon le protocole du kit « Phusion High Fidelity PCR Master Mix » de Finnzymes. Les produits PCR sont généralement purifiés par le « QIAquick PCR Purification Kit » de Qiagen ou avec le « Kit NucleoSpin Gel and PCR clean-up » de Macherey-Nagel, digérés par des enzymes de restriction ou/et analysés sur gel d'agarose 1 ou 2 %. L'extraction du gel se fait avec le « QIAquick Gel Extraction Kit » de Qiagen ou le « Kit NucleoSpin Extract II » de Macherey-Nagel. Le vecteur et les fragments de PCR sont ligués, classiquement pour un ratio molaire de 1 : 3 selon le protocole du « Quick ligation Kit » de Roche. Les bactéries compétentes DH5 α ou Top10 (50 μ L) sont ordinairement transformées avec 2 à 5 μ L du mélange de ligation. Après une agitation rapide, elles sont incubées 5 min sur la glace à 4°C, puis 5 min à 37°C. Après ajout de LB ou [10 g de tryptone ; 5 g d'extrait de levure ; 5 g de NaCl ; pour 1 litre ; pH 7,5], qsp 500 μ L, elles sont incubées 1h à 37°C. Une partie ou la totalité du mélange de transformation (selon les besoins) est déposé sur boîte LB-Agar avec un antibiotique kanamycine ou ampicilline pour permettre la sélection. Certaines colonies résistantes seront analysées par mini préparation des plasmides et le clonage sera vérifié par une digestion de contrôle avant de vérifier les constructions par séquençage ; celui-ci est effectué par Genome Express, MWG-Biotech ou GATC.

Les vecteurs d'origine pEGFP-C1, pEGFP-N1, pSNAP-N1, pGEX-6P-2, pHFX-CRT et pHisERp57 sont présentés avec plus de détails en annexes ainsi que les séquences obtenues suite aux différents clonages.

2.2. Construction des différents plasmides codant pour une calréticuline de fusion

Les séquences codant pour la calréticuline et son peptide signal, nécessaires à la construction des différents plasmides, ont été obtenues par amplification PCR.

Les différentes amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 6, les séquences reconnues par les différents enzymes de restriction, utilisées pour les clonages, sont présentées en gras.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour les constructions de calréticuline		
Nom des amorces	Tm (°C)	Séquence 5' -> 3'
EcoRI-NterCRT-forw	58	CCG GAATTC CGAGCCTGCCGTCTACTTC
CterCRT-KpnI-rev	58	G GGGTACC CTACAGCTCGTCCTTGGC
Ins-SignalP-forw	82,2	GCTAGCGCTACCGGTCGCCACCATGCTGCTATCCGTGCCGCTGCTG CTGGGCCTCCTCGGCCTGGCCGTCGCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGC TGTCACCGG
Ins-SignalP-rev		Inverse de Ins-SignalP-forw
CRT-Eco-N1-for	68	GCTTC GAATTC CCATGGAGCCTGCCGT
CRT-BglII-N1-rev	66,3	GCGGTA AGATCT AGCTCGTCCTTGG
pSIG-for-N1	69,5	CCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT'TTTTGGCAC
pSIG-rev-N1	75	GTGAACAGCTC GTAGAC GGCCGGCTCGGCGACGG

2.2.1. Construction du plasmide psig-EGFP-CRT-C1 codant pour psig-GFP-CRT

2.2.1.1. Clonage de l'ADNc codant pour la calréticuline dans pEGFP-C1

L'insert correspondant à la séquence de la calréticuline est obtenu par amplification PCR à partir du plasmide pHFX-CRT (fourni par le Dr Gunnar Houen du Department of Autoimmunology, Statens Serum Institut, Copenhague, Danemark – Présenté en annexe 1.1). Ce vecteur contient la séquence codante de la calréticuline humaine à l'exclusion de son peptide signal et permet son expression en système bactérien. Les amorces utilisées pour extraire la séquence de la calréticuline sont EcoRI-NterCRT-forw et CterCRT-KpnI-rev. Le protocole PCR est présenté dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Protocole PCR pour obtenir l'ADN de la calréticuline nécessaire à la construction du plasmide psig-EGFP-CRT-C1		
Etapes	T (°C)	Durée
Etape 1 : dénaturation	95	1 min
Etape 2 : dénaturation des amplicons	95	1 min
Etape 3 : hybridation	55	1 min
Etape 4 : élongation	72	2 min 30 sec
Etape 5 : élongation finale	72	5 min
Les étapes 2 à 4 sont répétées sur 30 cycles		

2.2.1.2. Insertion par mutagenèse dirigée du peptide signal de la calréticuline en amont de la GFP

Les amorces utilisées pour insérer le peptide signal sont Ins-SignalP-forw et Ins-SignalP-rev. Le kit utilisé pour la mutagenèse est le « QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit » de Stratagène.

L'insertion étant importante (48 bases), le protocole original du kit a été modifié comme décrit ci-dessous dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Protocole PCR pour la mutagenèse dirigée permettant l'insertion du peptide signal nécessaire à la construction du plasmide psig-EGFP-CRT-C1				
Etapes	En parallèle : 2 réactions d'amplification avec une seule amorce		Mélange des produits d'amplification ratio 1 : 1 et poursuite de la PCR	
	T (°C)	Durée	T (°C)	Durée
Etape 1 : dénaturation	95	1 min	95	1 min
Etape 2 : dénaturation des amplicons	95	30 secs	95	1 min 30 sec
Etape 3 : hybridation	60	1 min	60	1 min 30 sec
Etape 4 : élongation	68	12 min	68	12 min
	Les étapes 2 à 4 sont répétées sur 5 cycles		Les étapes 2 à 4 sont répétées sur 18 cycles	

Le produit de la réaction de PCR est ensuite digéré par DpnI 1 µL (10 U/µL) pendant 1h à 37°C. Des bactéries XL10-GOLD ultracompetentes fournies avec le Kit sont transformées selon le protocole du Kit et étalées sur boîte LB-Agar à 30 µg/mL de kanamycine.

Les différentes étapes d'obtention du plasmide psig-EGFP-CRT-C1 sont résumées dans la Figure 15.

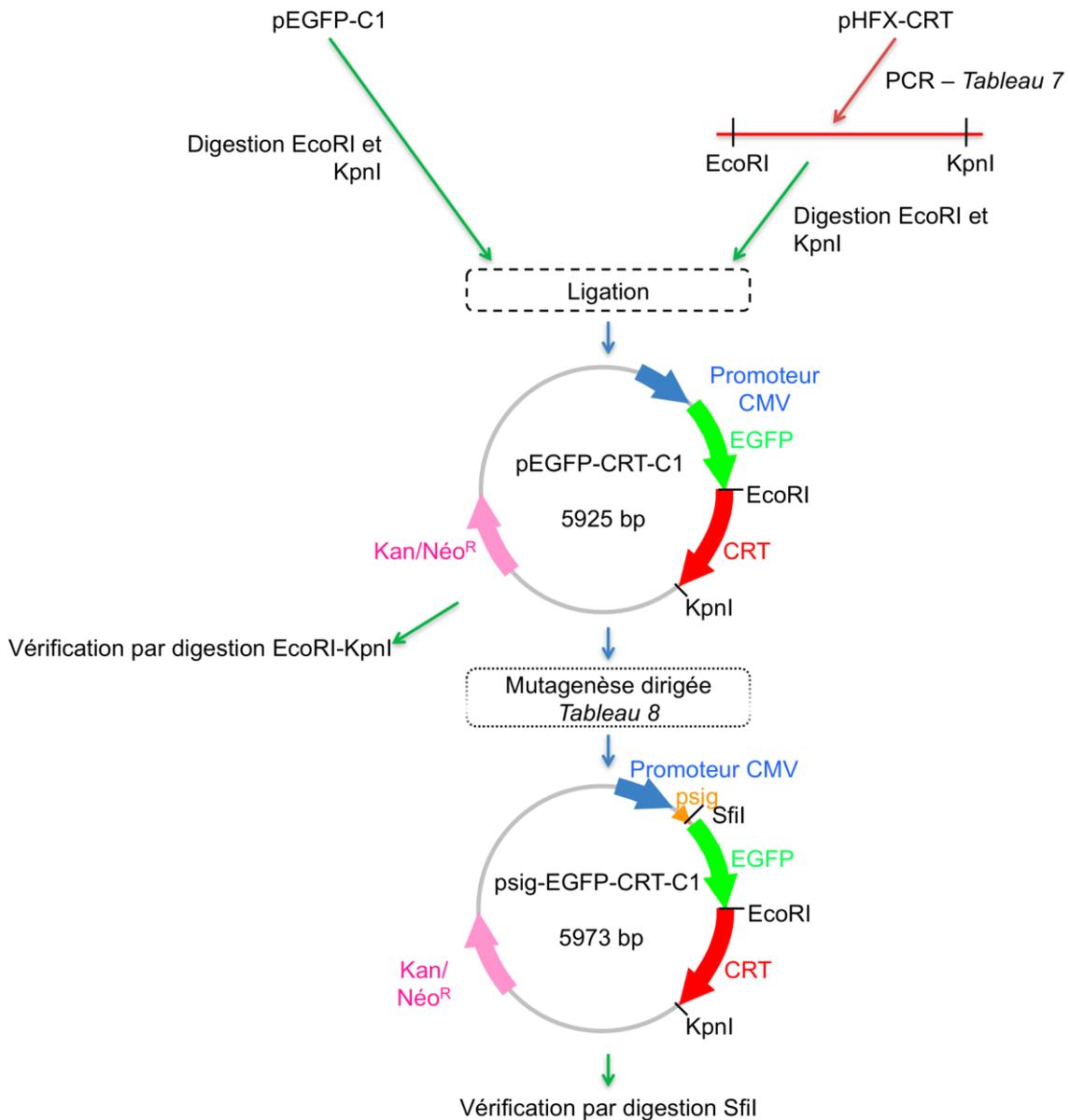


Figure 15 : Schéma des différentes étapes du clonage pour l'obtention du plasmide psig-EGFP-CRT-C1

L'ADN codant pour la séquence de la CRT est issu de pHFX-CRT (Annexe 1.1- Figure 83). Il est inséré dans le plasmide pEGFP-C1 (Annexe 1.2- Figure 84) afin de permettre l'expression d'une CRT dans un système eucaryote. Une digestion contrôlée par EcoRI-KpnI a ensuite été effectuée. L'ADN codant pour la séquence du peptide signal est, quant à lui, inséré en amont de la séquence de la GFP par mutagenèse dirigée. La dernière étape de vérification est effectuée avec une digestion par SfiI (le deuxième site étant apporté par la séquence du peptide signal). Les séquences introduites suite au clonage au niveau des sites de restriction d'intérêt sont présentées en annexe 1.2.

2.2.2. Construction du plasmide psig-CRT-EGFP-N1 codant pour psig-CRT-GFP

Les amorces CRT-Eco-N1-for et CRT-BglII-N1-rev sont utilisées pour amplifier l'ADN de la calréticuline à partir du plasmide psig-EGFP-CRT-C1 selon le protocole PCR présenté dans le Tableau 9 ci-dessous.

Tableau 9 : Protocole PCR pour obtenir l'ADN de la calréticuline nécessaire à la construction du plasmide psig-CRT-EGFP-N1		
Etapes	T (°C)	Durée
Etape 1 : dénaturation	98	45 secs
Etape 2 : dénaturation des amplicons	98	10 secs
Etape 3 : hybridation	59	20 secs
Etape 4 : élongation	72	45 secs
Etape 5 : élongation finale	72	5 min
Les étapes 2 à 4 sont répétées sur 35 cycles		

L'ADN correspondant à la séquence du peptide signal est obtenue à partir du plasmide psig-EGFP-CRT-C1 par amplification PCR avec les amorces pSIG-for-N1 et pSIG-rev-N1 selon le protocole PCR présenté dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Protocole PCR pour obtenir l'ADN du peptide signal de la calréticuline nécessaire à la construction du plasmide psig-CRT-EGFP-N1		
Etapes	T (°C)	Durée
Etape 1 : dénaturation	98	45 secs
Etape 2 : dénaturation des amplicons	98	10 secs
Etape 3 : hybridation	68	20 secs
Etape 4 : élongation	72	15 secs
Etape 5 : élongation finale	72	5 min
Les étapes 2 à 4 sont répétées sur 35 cycles		

Les différentes étapes d'obtention du plasmide psig-CRT-EGFP-N1 sont résumées dans la Figure 16.

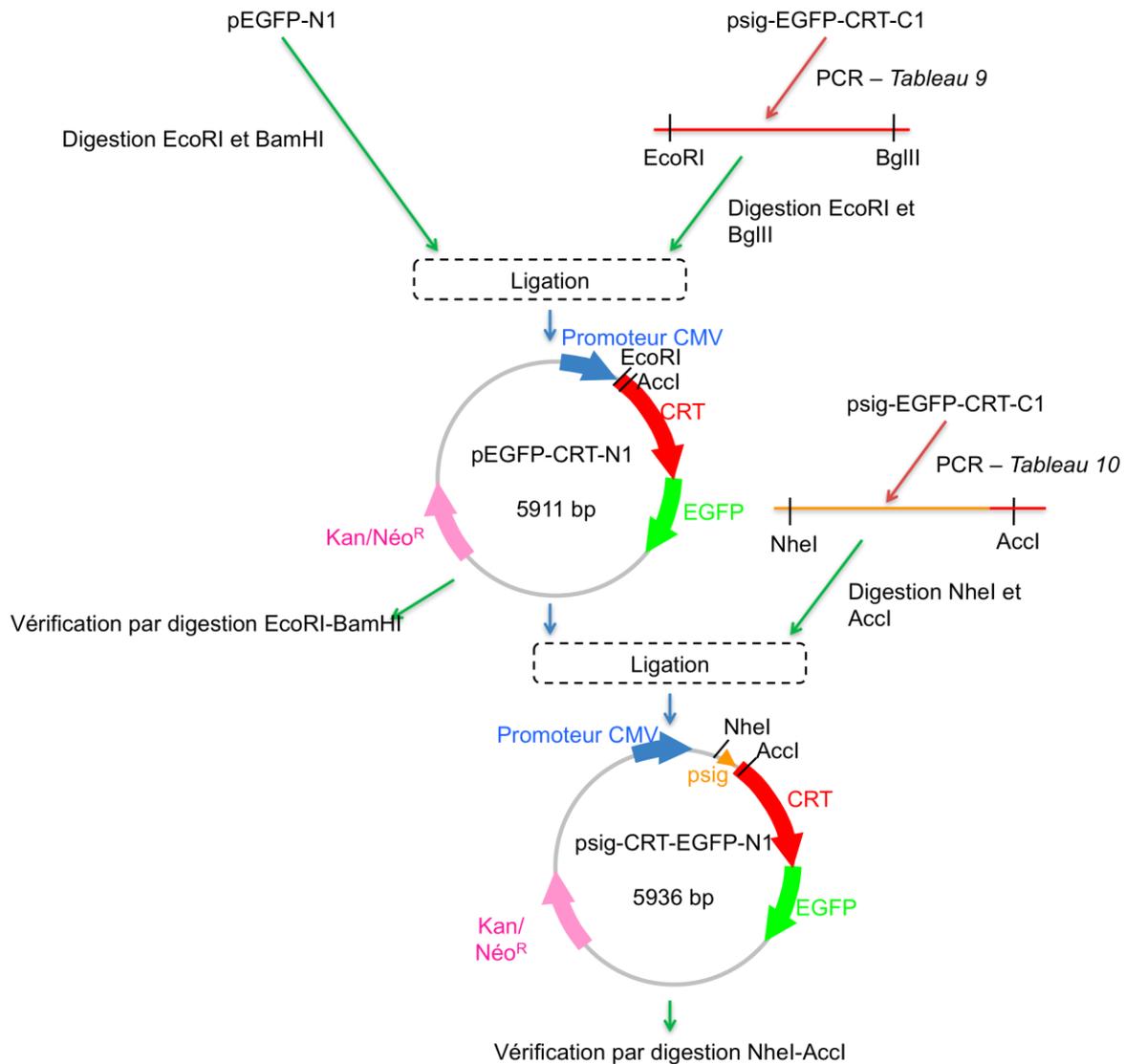


Figure 16 : Schéma des différentes étapes du clonage pour l'obtention du plasmide psig-CRT-EGFP-N1

L'ADN codant pour la séquence de la CRT est issu de psig-EGFP-CRT-C1. Il est ensuite inséré dans le plasmide pEGFP-N1 (Annexe 1.3 - Figure 87). Une digestion contrôle par EcoRI-BamHI permet de vérifier l'insertion. L'ADN codant pour la séquence du peptide signal est également issu de psig-EGFP-CRT-C1. Il est par la suite inséré en amont de l'ADN codant pour la séquence de la CRT. La dernière étape de vérification est effectuée avec une digestion par NheI et AccI. Les séquences introduites suite au clonage au niveau des sites de restriction d'intérêt sont présentées en annexe 1.3.

2.2.3. Construction du plasmide psig-CRT-SNAP-N1 codant pour psig-CRT-SNAP

Le processus d'obtention du plasmide psig-SNAP-CRT-N1 est identique à celui de psig-CRT-EGFP-N1 présenté dans la Figure 16. Le plasmide dans lequel sera insérée la séquence de la calréticuline avec son peptide signal est cette fois le pSNAP-N1 (présenté en annexe 1.4 - Figure 90). Ce plasmide, fourni par Jean-Philippe Kleman (IBS), est identique à pEGFP-C1, seule la séquence codant pour la GFP a été modifiée et remplacée par la séquence codant pour SNAP, le cadre de lecture et les sites de restriction restent identiques. La séquence SNAP a été obtenue à partir du plasmide pSNAP de New England Biolabs.

2.3. Construction du plasmide codant pour GST-ERp57 et certains de ses domaines

Les différents domaines d'ERp57 ont été obtenus après amplification par PCR à partir du plasmide pHisERp57 (fourni par le Dr Lars Elgaard de la Section for Biomolecular Sciences du Department of Biology, Copenhagen Biocenter, Copenhagen, Denmark – Présenté en annexe 2.1). Ce vecteur contient la séquence codante d'ERp57 humain et permet son expression en système procaryote. Les amorces utilisées pour extraire la séquence codante des domaines d'ERp57 [Grillo *et al.* 2002] sont présentées dans le Tableau 11, les séquences reconnues par les enzymes de restriction, utilisées pour les clonages, sont présentées en gras.

Tableau 11 : Amorces utilisées pour les constructions des domaines d'ERp57		
Nom des amorces	Tm (°C)	Séquence 5' -> 3'
P1 A5'	69,5	CC GGATCC GACGTGCTAGAACTCACG
P8X A3'	69,5	GC CTCGAG TTACTTCAAGTGGCTGACAATTCC
P2b B5'	72,3	AG GGATCCC AGCTTCAGTGCCTCTCAGG
P4X B'3'	70,9	CC CTCGAG TTACCCATCATTGCTCTCTGGG
P7 A'5'	66,7	GA AGATCT CCTGTGAAGGTAGTGGTAGCA
P3X A'3'	68	CCC TCGAG TTAGAGATCCTCCTGTGC

Le protocole PCR utilisé pour amplifier l'ADN des différents domaines d'ERp57 est présenté dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Protocole PCR pour obtenir l'ADN codant pour les différents domaines d'Erp57.		
Etapes	T (°C)	Durée
Etape 1 : dénaturation	98	45 secs
Etape 2 : dénaturation des amplicons	98	10 secs
Etape 3 : hybridation	65	20 secs
Etape 4 : élongation	72	45 secs
Etape 5 : élongation finale	72	5 min
Les étapes 2 à 4 sont répétées sur 35 cycles		

Les amorces P1 A5' et P8X A3' ont été utilisées pour amplifier l'ADN du domaine A (A-ERp57), les amorces P2b B5' et P4X B3' pour amplifier l'ADN du domaine BB' (BB'-ERp57) ; les amorces P7 A'5' et P3X A'3' pour le domaine A' (A'-ERp57) et enfin les amorces P1 A5' et P3X A3' pour ERp57 entier soit (ABB'A'-ERp57).

Les différentes étapes d'obtention des plasmides pGEX-ERp57 sont résumées dans la Figure 17.

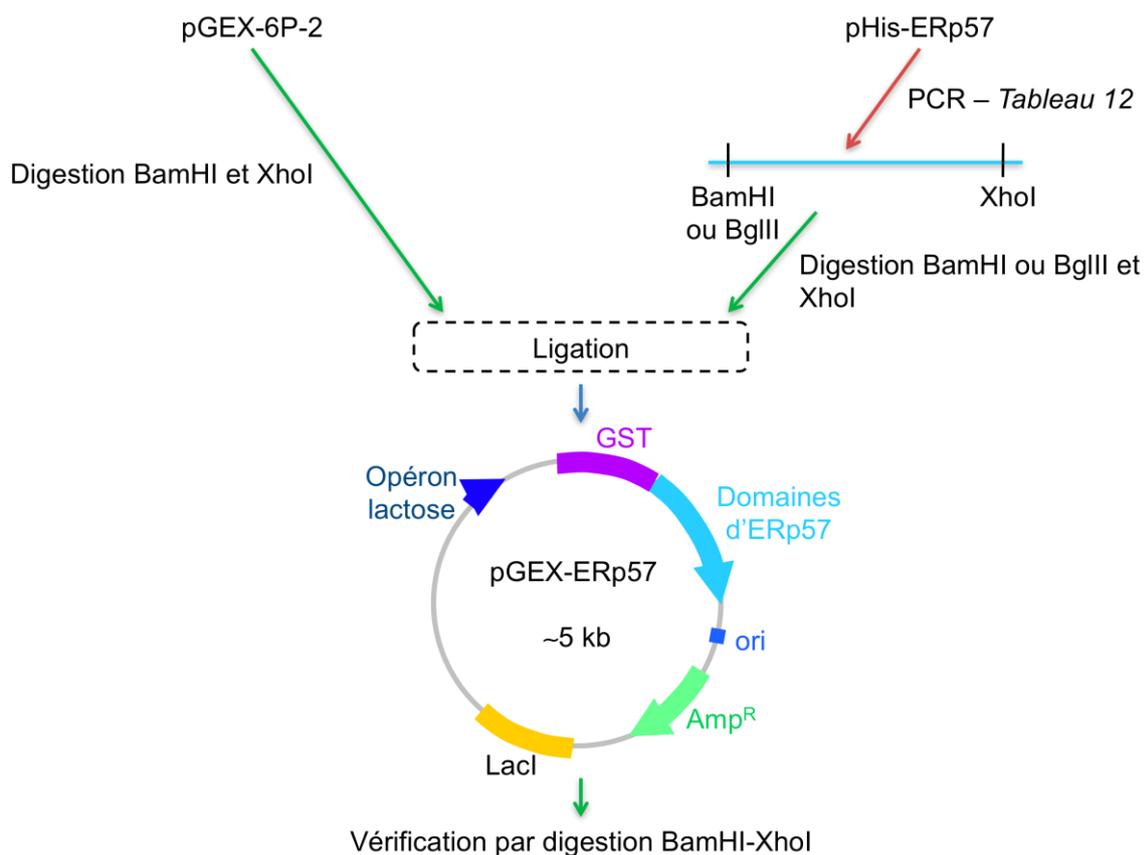


Figure 17 : Schéma des différentes étapes du clonage pour l'obtention des plasmides pGEX-ERp57

L'ADN codant pour la séquence d'Erp57 est issu de pHis-ERp57 (Annexe 2.1 - Figure 92). Il est ensuite inséré dans le plasmide pGEX-6P-2. Une digestion contrôle par BamHI-XhoI permet de vérifier l'insertion des différents domaines d'Erp57. Seule le produit PCR permettant d'obtenir l'ADN codant pour le domaine A' d'Erp57 est digéré par BglIII, les autres sont digérés par BamHI. Le plasmide pGEX-6P-3 est présenté en annexe 2.2 ainsi que les séquences introduites suite au clonage au niveau des sites de restriction d'intérêt.

3. Analyses biochimiques

3.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

3.1.1. Préparation des échantillons

Les échantillons protéiques sont dénaturés par incubation à 95°C pendant 5 min en Laemmli 2X concentré fourni par Sigma. Un standard de masse moléculaire prêt à l'emploi de 2 couleurs est utilisé comme référence (Prestained Protein Ladder Plus 06P-0211, Euromedex) contenant des protéines de masses moléculaires connues [10 kDa, 15 kDa, 27 kDa, 25 kDa, 35 kDa, 55 kDa, 70 kDa, 100 kDa, 130 kDa et 250 kDa].

3.1.2. Préparation du gel d'électrophorèse

Afin de séparer les protéines en fonction de leur masse molaire, les échantillons protéiques sont déposés sur un gel de polyacrylamide constitué d'un gel de concentration [3 % acrylamide (p/v) ; 125 mM Tris-HCl ; 0,1 % SDS (p/v) ; 0,04 % persulfate d'ammonium (p/v) ; 0,4 % TEMED (v/v) ; pH 6,8] et d'un gel de séparation dont le pourcentage d'acrylamide est fonction de la masse molaire des protéines à séparer [10-14 % acrylamide (p/v) ; 375 mM Tris-HCl ; 0,1 % SDS (p/v) ; 0,025 % persulfate d'ammonium (p/v) ; 0,2 % TEMED (v/v) ; pH 8,8].

La migration des échantillons protéiques s'effectue sous une tension constante de 200 Volts, à l'aide d'un appareil d'électrophorèse C.B.S Scientific Co. (Dual Vertical Mini-Gel unit) dans un tampon de migration [25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 0,1 % SDS (p/v) ; pH non ajusté].

Après migration le gel est soit :

- coloré pendant 1 h dans une solution d'Instant Blue (Euromedex). Le gel est ensuite lavé par plusieurs bains d'eau distillée.
- utilisé pour le transfert des protéines sur membrane.

3.2. Techniques de transfert sur membrane

A l'aide d'un appareil de transfert BioRad (Mini Transfert Blot) les protéines sont électrotransférées, à 4°C pendant 1 h à 100 Volts ou durant une nuit à 12 Volts.

Le transfert est réalisé en tampon de transfert [25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 20 % éthanol (v/v) ; pH non ajusté] sur une membrane de nitrocellulose 0,45 µm (Whatman).

A la fin du transfert, afin de visualiser les protéines transférées, la membrane est colorée de façon réversible à l'aide d'une solution de rouge Ponceau 0,2 % (Sigma). La membrane est ensuite rincée à l'eau puis immergée dans une solution de saturation [PBS ; 0,05 % Tween 20 (p/v) ; 5 % lait écrémé en poudre (p/v)] durant 1 h à température ambiante ou à 4°C durant une nuit.

Elle est ensuite mise en présence de l'anticorps primaire, dilué dans la solution de saturation à 4°C sur la nuit. Après trois lavages de 10 min avec une solution de lavage PBS-T [PBS ; 0,05 % Tween 20 (p/v)], la membrane est ensuite incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de saturation.

Après trois lavages en PBS-T, la révélation s'effectue par chimioluminescence à l'aide du système « Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit » de GE Healthcare et d'un lecteur de luminescence (Kodak) ou sur la paillasse à l'aide d'une solution de NBT/BCIP (Thermo Scientifique).

3.3. Spectrométrie de Masse

Les différents domaines d'ERp57 ont été analysés en spectrométrie de masse par LC ESI-TOF MS (6210, Agilent Technologies). Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme de Spectrométrie de Masse de l'IBS par L. Signor.

4. Analyses immuno-cytochimiques

4.1. Analyse par microscopie

Les lames sont observées soit au microscope optique à épifluorescence de la plateforme d'Imagerie cellulaire de l'IBS soit au microscope confocal de la plateforme de microscopie de l'IAB (avec la participation d'Alexeï Grichine).

Plusieurs types de marquages pourront être réalisés suivant le type d'observation souhaité. Le montage des échantillons est réalisé avec le liquide de montage DABCO [1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane 25 mg/mL en PBS ; glycérol 1 : 9 (v/v) ; pH 8,6] de chez Sigma ou avec le liquide de montage Vectashiel HardSet Mounting Medium ou Vectachield Mounting Medium avec DAPI vendu par Vector Laboratories. Afin d'avoir un marquage des noyaux dans un montage en DABCO, les cellules sont mises en contact, juste avant le montage, avec une solution de Hoechst 33258 (1 µg/mL en PBS) pendant 15 min à température ambiante. Pour la conservation, les lamelles sont scellées avec du vernis à ongle.

Avant la mise en culture des cellules, les lamelles sont incubées sur la nuit à 37°C avec du milieu de culture complet.

Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le paragraphe 8 du matériel et méthodes.

4.1.1. Marquage par immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence permet de mettre en évidence une ou plusieurs cibles antigéniques (simple ou multiple marquage) présentes à la surface cellulaire par l'utilisation d'un fluorochrome porté par un anticorps.

Dans ce cas, on a deux anticorps : l'anticorps primaire dirigé contre l'antigène recherché et un deuxième anticorps, dit secondaire, possédant une haute affinité pour l'anticorps primaire (spécifique de l'isotype de l'anticorps primaire) et couplé à un fluorochrome.

L'immunomarquage est réalisé sur des cultures cellulaires à 70-80 % de confluence, à différents temps après induction de l'apoptose, ensemencées sur des lamelles de 14 mm de diamètre dans une plaque 24 puits.

Après un lavage en PBS, les cellules sont fixées par une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4 % diluée en PBS à pH 7,4 [Paraformaldéhyde 16 % aqueous solution, EM Grade (Electron Microscopie Science)], durant 15 min à 37°C. Cette étape est cruciale si l'on veut éviter la perméabilisation des

cellules, la PFA est fraîchement préparée ou décongelée et la fraction aliquote n'est pas réutilisée. Après chaque étape, les échantillons sont lavés trois fois dans du PBS.

Si l'on souhaite perméabiliser les cellules, celles-ci sont incubées après la fixation dans une solution de perméabilisation [PBS-Triton 0,1 %] 10 min à température ambiante.

Lorsque cela est nécessaire, après la fixation, 10 µg/mL de C1q ou C1qGR dilués en PBS – 1 % BSA (p/v) sont incubés à température ambiante avec les cellules, 45 min sous agitation.

Les échantillons sont ensuite incubés avec le ou les anticorps (Ac) primaires dilués en PBS – 1 % BSA pendant 45 min à température ambiante. Plusieurs anticorps primaires sont utilisés dans les expériences de colocalisation. Les anticorps secondaires appropriés couplés à un fluorochrome et dilués en PBS - 1 % BSA sont ensuite incubés pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière.

4.1.2. Utilisation d'une protéine fluorescente

L'expression et la localisation de la calréticuline en fusion avec la GFP sont analysées par microscopie. Il n'y a pas de protocole spécifique de marquage puisque la GFP est fluorescente. Les cellules sont fixées comme présenté dans le paragraphe précédent. Dans certains cas, un marquage supplémentaire utilisant des anticorps a été effectué.

4.1.3. Marquage par étiquette protéique (tag protéique)

Le tag protéique a été utilisé dans le cas de la calréticuline en fusion avec SNAP. Le SNAP-tag est une forme mutante de 20 kDa ; issue de la protéine de réparation d'ADN humain O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase (hAGT), elle réagit spécifiquement et rapidement avec un substrat possédant des dérivés benzylguanane (BG) et benzylchloropyrimidine (CP), conduisant à l'association covalente de la protéine SNAP-tag avec la sonde synthétique fluorescente (Figure 18).

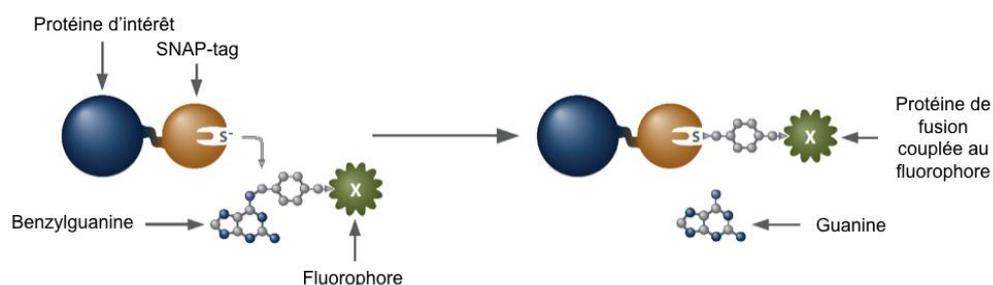


Figure 18 : Réaction de la protéine SNAP-tag permettant son marquage

Selon la figure du protocole de New England Biolabs

La protéine SNAP-tag a un certain nombre de caractéristiques permettant une variété d'applications pour le marquage de protéines. Il est ainsi possible d'utiliser des substrats perméants, permettant une imagerie des cellules vivantes et l'observation de l'expression intracellulaire des protéines et de leur localisation : les tags SNAP-Cell[®]. D'autres substrats peuvent être non-perméants, permettant une imagerie des cellules vivantes ainsi que l'observation de l'expression et de la localisation des protéines de surface : les tags SNAP-Surface[®]. Ici seul le SNAP-Cell[®] TMR-Star et le SNAP-Surface[®] Alexa Fluor[®] 488 seront utilisés.

Le marquage est réalisé uniquement sur cellules vivantes. Une dilution au 1/200 de la solution fournie est effectuée extemporanément en milieu complet. Le milieu de culture est remplacé par le milieu contenant la solution de marquage diluée, puis les cellules sont incubées pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois en milieu complet et incubées une nouvelle fois pendant 30 min à 37°C. Après un lavage en PBS, le protocole classique de fixation est utilisé et si nécessaire il est possible d'utiliser le protocole d'immunomarquage avant le montage et l'observation au microscope.

4.2. Analyse par cytométrie en flux

Toutes les acquisitions sont réalisées sur un cytofluorimètre de Flux FACScan (Becton Dickinson) à l'aide du logiciel Cell Quest (Becton Dickinson) et analysées via le logiciel FlowJo (Tree Star).

Les analyses de dosage des cytokines ont été effectuées à l'EFS sur un cytofluorimètre de Flux FACScanto II (Becton Dickinson) et analysées à l'aide du logiciel BD FACSDiVa™ (Becton Dickinson) et FCAP Array (Soft Flow).

4.2.1. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de caractériser des cellules de façon individuelle, quantitative et qualitative selon les paramètres présentés dans le Tableau 13.

Cette technique repose sur un système micro-fluidique et un système de détection optique (laser et photomultiplicateurs). Les cellules en suspension mono-dispersées sont entraînées à grande vitesse. Les données sont reconstituées par combinaison des paramètres (FSC, SSC, FL) sous la forme de distribution mono (histogramme) ou bi paramétrique (dot plot).

Tableau 13 : Configuration du FACScan			
λ excitation (nm)	Détecteur	Fluorochrome	Filtre d'émission/ bande passante (nm)
488	FSC	-	-
488	SSC	-	488/10
488	FL-1	FITC, A 488, CFSE	530/30
488	FL-2	PE, PI, Cy3	585/42
488	FL-3	PI	> 670
FSC : forward scatter, taille des cellules ; SSC : side scatter, granularité ; FL : fluorescence émise par les fluorophores			

La lumière absorbée (FSC – Forward Scatter) est mesurée dans l'axe du rayon incident, l'intensité du signal peut être corrélée avec la taille (supposée sphérique) et la viabilité cellulaire.

Alors que la lumière diffusée (SSC – Side Scatter) est mesurée sous un angle de 90°. La mesure renseigne sur la morphologie et la structure de la particule, elle correspond à la structure intracellulaire de la cellule (réfringence du cytoplasme, granulosité, morphologie, rapport nucléocytoplasmique).

La fluorescence émise (FL) peut être spontanée, mais le plus souvent, celle-ci est apportée à la cellule par un fluorophore. Le fluorophore absorbe l'énergie du laser et réémet l'énergie absorbée sous forme de photons à une longueur d'onde plus élevée. Certains fluorophores possèdent une affinité propre pour un constituant cellulaire : par exemple pour les mesures d'ADN, d'ARN, de protéines, du pH, de calcium contenus dans la cellule mais la majorité des fluorophores sont couplés à un ligand spécifique (anticorps le plus généralement).

A l'aide d'un dot plot FSC/SSC, une sélection est définie afin d'éliminer de l'analyse les débris cellulaires. La suite de l'analyse des caractéristiques des cellules est effectuée à partir de cette sélection. Enfin, à partir des histogrammes ou dot plots obtenus, il est possible de mesurer les distributions d'évènements dans des régions prédéfinies.

4.2.2. Marquages pour la cytométrie en flux

L'évaluation de l'apoptose en cytométrie en flux se fait grâce au marquage des cellules à l'iodure de propidium (PI) et à l'Annexine-V FITC, le protocole et l'analyse sont présentés plus en détail dans le paragraphe 5.1 du matériel et méthodes.

Le dosage des cytokines nécessite également un marquage spécifique, le marquage et l'analyse sont développés dans le paragraphe 5.3 du matériel et méthodes.

Les cellules marquées par tag protéique SNAP présenté précédemment peuvent également être analysées par cytométrie en flux en utilisant par exemple les marqueurs couplés à l'Alexa Fluor 488.

Pour le marquage avec des anticorps, les cellules sont récoltées à différents temps après induction de l'apoptose (paragraphe 3.1.2 des résultats). Par la suite elles sont fixées, si nécessaire, par 100µL de PFA 4 % pendant 15 min à température ambiante. Les marquages avec les anticorps primaires et secondaires sont effectués dans un volume de 100 µL de PBS - 1 % BSA, pour 1×10^6 cellules. Lors des lavages en PBS, les cellules sont centrifugées 5 min à 300g. Pour l'analyse, les cellules sont reprises par 500µL de PBS. Il est possible de déposer un échantillon de 30µL sur une lamelle de verre par centrifugation (2 min à 300 g) pour une observation au microscope optique à épifluorescence (Olympus).

Pour permettre la visualisation des cellules lors des expériences de phagocytose, un marquage différentiel des populations a été effectué. Les cellules à phagocyter sont marquées covalentement au carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (C34554), Invitrogen). Le CFSE diffuse passivement dans les cellules, il est incolore et non fluorescent jusqu'à ce que le groupement acétate soit clivé par des estérases intracellulaires rendant le carboxyfluorescéine succinimidyl ester très fluorescent. Le groupe ester succinimidyl peut ainsi réagir avec des amines intracellulaires et former des liaisons covalentes fluorescentes qui sont bien conservées et peuvent être fixées avec des fixateurs aldéhydiques.

Le marquage au CFSE sera effectué avant la transfection ARNi mais également avant l'induction de l'apoptose sur des cellules en suspension. Le marquage pourra être effectué jusqu'à 48 h avant l'expérience de phagocytose. 1×10^6 cellules sont marquées en suspension dans 1 mL de PBS (préchauffé à 37°C) avec 5 µM ou 3 µM de CFSE pendant 15 min à 37°C. Après cette étape de marquage, les cellules sont lavées 3 fois en milieu complet puis sont mises en culture et traitées selon les protocoles habituels en fonction des conditions nécessaires pour les expériences de phagocytose.

Les cellules phagocytaires sont marquées à la fin de la phagocytose par un anticorps CD11c ou CD14 (couplé à un fluorophore), selon le type de cellule phagocytaire, pendant 30 min à 4°C (développé plus en détail dans le paragraphe 5.2 du matériel et méthodes).

5. Analyses fonctionnelles

5.1. Mesure de l'apoptose

La caractérisation et la quantification des cellules apoptotiques est réalisée à l'aide d'un double marquage Annexine-V/Pi sur la base des instructions d'« Annexin V-FITC Kit » (MACS Miltnyi Biotec). L'Annexine-V va reconnaître la phosphatidylsérine exposée à la surface des cellules en apoptose. Dans les cellules viables (normales) la phosphatidylsérine est uniquement présente au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique, il n'est donc pas possible de la détecter à la surface des cellules. Le couplage de l'Annexine-V avec le FITC permet la détection directe et l'analyse en cytométrie en flux. L'iodure de propidium (Pi) est un agent intercalant de l'ADN relativement lipophile. Celui-ci ne peut pas pénétrer et se lier à l'ADN des cellules viables, car celles-ci possèdent une intégrité membranaire, au contraire des cellules mortes dont la membrane perméabilisée pourra le laisser entrer et se lier à l'ADN.

Une fois le marquage Annexine-V/Pi effectué, les cellules sont immédiatement analysées en cytométrie en flux. Les débris sont éliminés et les événements sont représentés en nuage de point (dot plot) en fonction de la fluorescence de l'Annexine-V FITC et de l'iodure de propidium. Le double marquage Annexine-V et iodure de propidium permet donc de caractériser quatre sous populations de cellules présentées sur la Figure 19 : Pi^- , AV^- ; Pi^- , AV^+ ; Pi^+ , AV^+ et Pi^+ , AV^- .

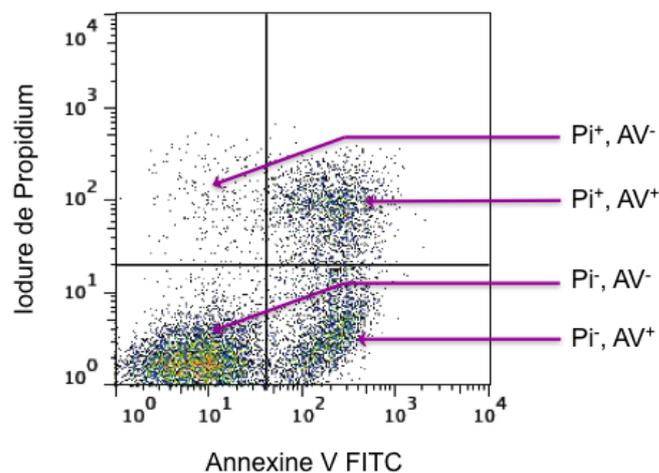


Figure 19 : Analyse en dot plot du marquage Annexine-V FITC/Pi de cellules HeLa irradiées aux UV

Le double marquage Annexine-V et Pi permet de caractériser quatre sous populations de cellules : Pi^- , AV^- ; Pi^- , AV^+ ; Pi^+ , AV^+ et Pi^+ , AV^- .

Les différentes populations présentées dans la Figure 19 sont comptabilisées et vont permettre de définir l'état d'apoptose des cellules. L'apoptose précoce et tardive sera définies dans les résultats au paragraphe 3.1.2.

5.2. Expériences de phagocytose

Pour leur différenciation en macrophages, les cellules THP-1 sont induites en RPMI-1640 complet pendant 72h avec 10 nM de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). L'expression des marqueurs de surface CD11c, CD11b, CD14, CD54 et HLA-DR, a également été mesurée afin de vérifier leur induction [Tsuchiya *et al.* 1982; Schwende *et al.* 1996]. La production de C1q par les THP-1 après leur induction a également été vérifiée.

Les monocytes et les moDC sont utilisés directement après réception au laboratoire. Leur caractérisation est effectuée par l'EFS avant le transfert (Tableau 14).

Marqueurs de surface	Monocytes	Cellules dendritiques
CD16	-	
CD14	+	+
CD11c	-	+
DC-sign		+
HLA-DR		+/-
Les anticorps anti CD14 et HLA-DR proviennent de Beckman coulter, les autres ainsi que les contrôles isotypiques proviennent de BD Biosciences		

Les cellules à phagocyter, apoptotiques ou non, préalablement marquées avec du CFSE (voir paragraphe 4.2.2 matériel et méthodes), sont mises en présence des cellules phagocytaires dans un ratio 1 :1 dans 1 mL de milieu complet. Dans certains cas, les cellules à phagocyter sont pré-incubées ou non avec 25 µg/mL de C1q en milieu complet pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont ensuite mises en contact pendant 1h à 37°C en milieu complet après une centrifugation de 5 min à 300 g [Protocole adapté de Fraser *et al.* 2009]. A la fin de la phagocytose, les cellules sont récoltées par traitement à la trypsine et sont marquées avec 5 µL d'anti CD11c-PE (eBiosciences) dans 100µL PBS – 1 % BSA pour les THP-1 et les DC ou avec un anti CD14-PE (Beckman coulter) pour les monocytes.

Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie en flux, les débris sont éliminés et les évènements sont représentés en dot plot en fonction de la fluorescence du CFSE/CD11cPE ou CD14PE (Figure 20).

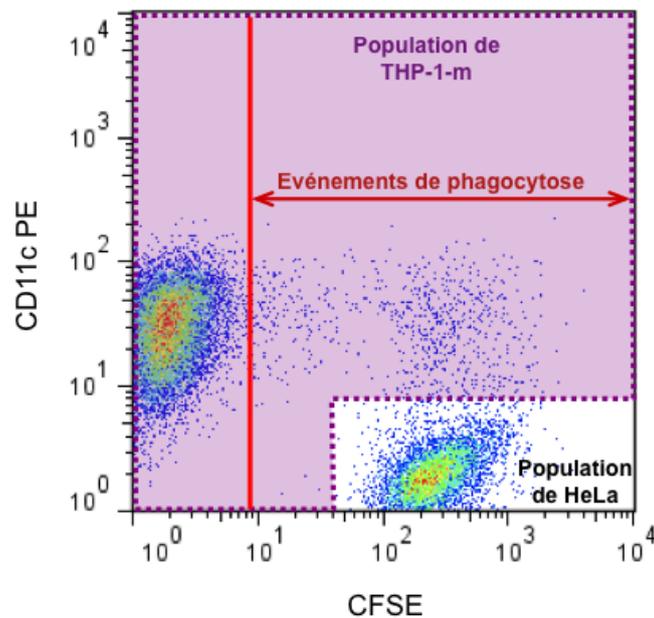


Figure 20 : Analyse en dot plot CFSE/CD11cPE de la phagocytose de cellules HeLa irradiées aux UV

L'analyse en cytométrie en flux permet de mettre en évidence deux populations cellulaires : les cellules HeLa et les THP-1-m. Il est ainsi possible de calculer le nombre d'événements de phagocytose.

A partir des graphiques ainsi obtenus, les deux populations peuvent être différenciées : la population de cellules à phagocyter (HeLa) et la population de cellules phagocytaires (THP-1-m). Le pourcentage de phagocytose peut ainsi être calculé.

Calcul du pourcentage de phagocytose pour un minimum de 20 000 événements comptabilisés :

$$\% \text{ de phagocytose} = \frac{\text{Evènements de phagocytose}}{\text{Population totale de cellules phagocytaires}} \times 100$$

Ce pourcentage est ensuite rapporté en index de phagocytose afin de mettre uniquement en évidence la phagocytose induite par l'apoptose des cellules phagocytées :

$$\text{Index de phagocytose} = \frac{\% \text{ de phagocytose des cellules en apoptose}}{\% \text{ de phagocytose des cellules témoins viables}}$$

Afin d'analyser l'effet de la calréticuline sur la phagocytose, nous avons dû également calculer la variation de la phagocytose en absence de calréticuline pour des conditions similaires d'apoptose :

$$\text{Variation de la phagocytose suite à la déplétion/déficience en calréticuline} = \log \left(\frac{\text{index de phagocytose des cellules déficientes/déplétées en calréticuline}}{\text{index de phagocytose des cellules contrôle}} \right)$$

5.3. Obtention des surnageants de phagocytose pour l'analyse des cytokines

A la fin de la phagocytose présentée en 5.2, au lieu de récupérer les cellules par la trypsine, celles-ci sont lavées en PBS puis remises en culture (1×10^6 cellules par mL de milieu complet) avec 0 ou 30 ng/mL de LPS de *E. coli* de sérotype O55:B5 (Sigma). Au bout de 18 h les surnageants sont récoltés, centrifugés 15 min à 13000 rpm [Fraser *et al.* 2009] puis congelés à -80°C en attendant de doser leurs cytokines à l'aide du Kit CBA (BD Biosciences).

Dans un premier temps, il faut vérifier la compatibilité des cytokines à analyser en fonction de leur marquage APC-Cy7/APC. Les cytokines suivantes seront dosées : IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF, MCP-1/CCL2 (Figure 21).

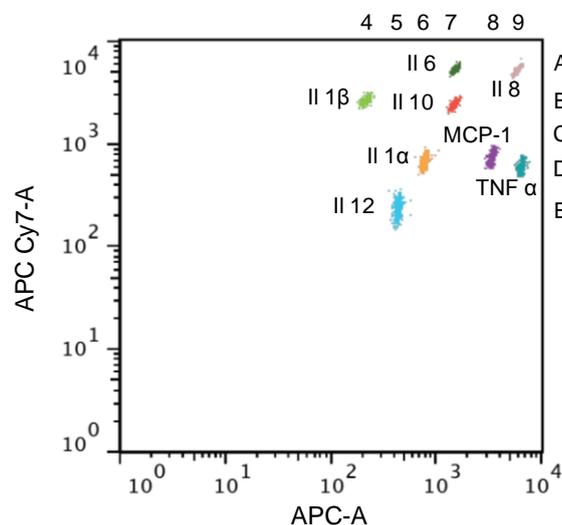


Figure 21 : Analyse en dot plot APC-Cy7/APC des différentes cytokines d'intérêt

Pour chaque cytokine, on possède une population spécifique de billes possédant une fluorescence APC-Cy7/APC unique avec un « revêtement » d'anticorps de capture spécifiques de la cytokine d'intérêt. Ce sont les intensités spécifiques de fluorescence des billes qui permettent de déterminer une position alphanumérique (de 4 à 9 et de A à E) indiquant la position des billes d'une cytokine par rapport à celle des billes d'une autre cytokine. Les positions relatives de chaque cytokine étant différente, il est ainsi possible de combiner les dosages et de créer un dosage multiplex. Les différentes cytokines d'intérêt sont retrouvées pour l'IL 1 α en D6, l'IL 1 β en B4, l'IL 6 en A7, l'IL 8 en A9, l'IL 10 en B7, l'IL 12p70 en E5, le TNF α en D9 et MCP-1/CCL2 en D8.

A partir du « standard » à 50 000 pg/mL fourni pour chaque cytokine, une gamme allant de 5 000 pg/mL à 2,4 pg/mL contenant toutes les cytokines analysées est effectuée.

Les surnageants d'intérêt, à la dilution souhaitée (1/10 ou non dilués), sont ensuite mis en contact avec les billes de capture (0,5 µL de billes de chaque cytokine/test) et incubés 1h à température ambiante à l'abri de la lumière. L'anticorps de détection est ensuite ajouté au mélange surnageant-billes (0,5 µL d'anticorps spécifique à chaque cytokine/test), puis le mélange est incubé 2h à température ambiante à l'abri de la lumière. Les échantillons sont ensuite lavés, le culot est récupéré dans 200 µL de tampon et est ensuite analysé par cytométrie en flux.

La bille de capture permet d'identifier la cytokine d'intérêt, grâce à son marquage APC-Cy7/APC, et l'anticorps de détection, de part sa fluorescence PE, permet la quantification de cette même cytokine. Le principe du dosage CBA est présenté sur la Figure 22.

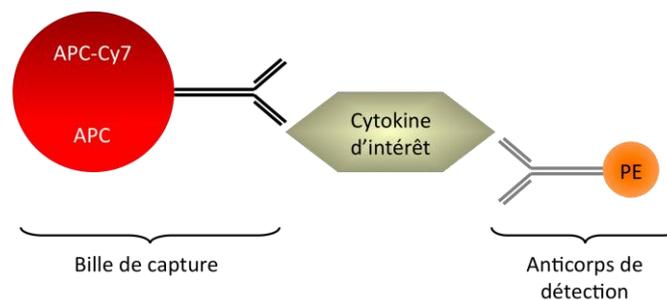


Figure 22 : Principe du marquage CBA

Le dosage CBA fonctionne comme un test ELISA soluble. La fluorescence des billes permet d'identifier sur un dot plot APC-Cy7/APC la cytokine d'intérêt et l'intensité de fluorescence PE de chaque complexe sandwich va ensuite permettre de déterminer la concentration en cytokine.

L'utilisation du logiciel FCAP Array (Soft Flow) permet grâce à la quantification du signal PE en fonction de la gamme d'étalonnage de déterminer avec précision la concentration en pg/mL des cytokines dosées au sein de chaque échantillon.

Les tests statistiques effectués sur les analyses fonctionnelles seront considérés comme statistiquement significatifs lorsque $p \text{ value} \leq 0,05$; faiblement significatifs lorsque $0,05 < p \text{ value} \leq 0,1$ et non significatifs lorsque $p \text{ value} > 0,1$.

6. Obtention des protéines d'intérêt

6.1. Purification d'une protéine plasmatique : C1q et ses domaines

La protéine plasmatique dont j'ai bénéficié pour mon travail a été purifiée au sein du laboratoire. La protéine C1q est purifiée à partir de sérum humain selon la méthode décrite par Arlaud et collaborateurs [Arlaud *et al.* 1979]. A partir du C1q préalablement purifié, les régions globulaires de C1q (C1qGR) sont obtenues selon la méthode décrite par Tacnet-Delorme et collaborateurs [Tacnet-Delorme *et al.* 2001]. Egalement à partir du C1q purifié, les queues collagènes (C1qCLF) sont obtenues à partir d'un protocole dérivé de celui décrit par Sasaki et Yonemasu [Sasaki *et al.* 1983].

6.2. Préparation des protéines cellulaires

6.2.1. Préparation des lysats cellulaires

Pour chaque condition, après un lavage au PBS, les cellules adhérentes sont directement lysées sur la boîte de culture dans une solution de lyse [1 % Triton X-100 ; 1 mM CaCl₂ ; 1 mM MgCl₂ ; pH 7,4] contenant des inhibiteurs de protéases (Roche) et récupérées en utilisant un grattoir « rubber policeman ». Afin d'assurer une lyse complète des cellules, la lyse est poursuivie pendant 1 h sur la glace. Après élimination des agrégats non solubles par centrifugation à 13000 g pendant 30 min à 4°C, les surnageants sont dosés, aliquotés et conservés à -80°C avant leur utilisation.

6.2.2. Dosage des lysats cellulaires

Les lysats cellulaires sont dosés avec le kit « QuantiPro BCA Assay Kit » de Sigma. Généralement 5 µL de lysat sont dosés par cette méthode avec une gamme de BSA allant de 0 à 20 µg/mL.

6.2.3. Libération des protéines en interaction avec la membrane externe des cellules par une technique dite de « shaving »

Les cellules sont mises en culture la veille à 3x10⁶ cellules en boîtes de Pétri de 100 mm diamètre. Le jour même, elles sont lavées avec 10 mL PBS puis incubées pendant 15 min à 37°C avec 1 mL de tampon de « shaving », selon les cas :

1. tampon 250 mM NaCl ; 0,01M Tris pH 7,4
2. tampon 150 mM NaCl ; 0,01 M phosphate pH 12

La solution de « shaving » est ensuite centrifugée pendant 30 min à 13000 rpm puis les protéines du surnageant sont précipitées par 1 mL de TCA 50 % la nuit à 4°C.

Le lendemain, l'ensemble est centrifugé 30 min à 13000 rpm puis lavé par 1 mL d'acétone froide avant d'être à nouveau centrifugé. Après séchage, le culot est directement repris en tampon Laemmli 2x réducteur pour être analysé par immunorévélation après électrotransfert (western-blot).

6.3. Purification des protéines recombinantes

6.3.1. Calréticuline entier et ses différents domaines

Ces différentes protéines étaient déjà disponibles dans le laboratoire [Paidassi *et al.* 2011] (Figure 23). La calréticuline entière (CRTrec) a été utilisée pour des contrôles en western blot ou en immunoprécipitation. Le Pdomaine a notamment été utilisé pour des expériences de compétition pour la fixation de C1q avec ERp57.

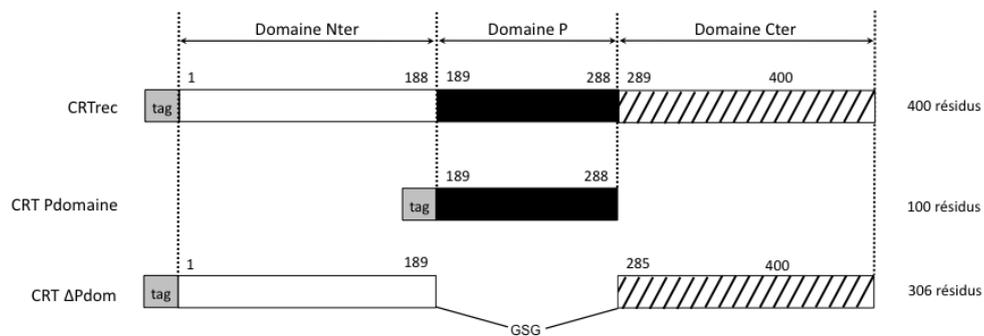


Figure 23 : Schéma représentatif des différents domaines disponibles de la calréticuline humaine recombinante

Schéma adapté de [Paidassi *et al.* 2011].

6.3.2. ERp57 entière et ses différents domaines

Dans un premier temps les tests utilisant la protéine ERp57 ont été effectués avec une protéine recombinante commerciale (Novus Biologicals).

Les différentes constructions des domaines d'ERp57 ont ensuite été produites chez des bactéries *E. coli* BL21 DE3. Les bactéries sontensemencées en LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline.

Lorsque la DO_{600} a atteint la valeur de 0,6 ; la culture est induite pendant 3h à 37 °C par 1 mM d'IPTG. La culture est centrifugée et le culot repris en tampon de lyse [20 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 100 mM NaCl ; 0,5 mM EDTA ; 0,5 % Triton X-100 ; 0,5 mM PMSF]. Le mélange de lyse est ensuite soniqué puis centrifugé. Le surnageant est ensuite déposé sur une colonne Protino Glutathion Agarose 4B (Macherey Nagel) préalablement équilibrée en tampon de lavage [20 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 100 mM NaCl ; 0,5 mM EDTA ; 0,5 % Triton X-100]. La colonne est ensuite lavée dans le même tampon et la protéine éluée en tampon d'éluion [20 mM glutathion réduit (GSH) ; 100 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 0,5 mM EDTA]. Les fractions d'éluion sont ensuite récupérées, rassemblées et dialysées en tampon [20 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 20 mM NaCl ; 1 mM DTT] ; 10 % de glycérol est ajouté pour la conservation à -20°C des échantillons.

6.4. Détermination de la concentration des protéines purifiées

La concentration d'une protéine purifiée est déterminée à 280 nm selon la loi de Béer Lambert :

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C$$

λ correspond à la longueur d'onde de la mesure, ici 280 nm ; ε au coefficient d'extinction molaire en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$; C est la concentration en $mol \cdot L^{-1}$ et l la longueur du trajet optique et par convention $l = 1$ cm.

Les coefficients d'extinction molaires, majoritairement obtenus par calcul grâce à l'outil ProtParam d'Expasy et les masses molaires expérimentales des protéines sont rassemblés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Coefficients d'extinction molaire et masses molaires des protéines purifiées		
Protéine	ε 280 nm ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Masse molaire (Da)
C1q	312 324	459 300 ¹
C1qGR	33 600	48 000 ²
C1qCLF	39 690	189 900 ³
His-ERp57	52 175	58 500 ⁴
GST-ERp57-ABB'A'	88 295	80 868 ⁵
GST-ERp57-A	54 820	38 065 ⁵
GST-ERp57-BB'	62 020	54 524 ⁵
GST-ERp57-A'	57 675	41 579 ⁵
¹ [Arlaud <i>et al.</i> 1979] ; ² [Reid <i>et al.</i> 1984] ; ³ [Thielens <i>et al.</i> 1993] ; ⁴ Données Novus Biologicals ; ⁵ Déterminées par spectrométrie de masse (LC-TOF)		

7. Interactions protéiques

7.1. Mesure d'un signal de FRET

7.1.1. Principe

Le FRET (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ou transfert d'énergie par résonance de type Forster) est défini comme un transfert d'énergie non radiatif (sans émission de lumière) résultant d'une interaction entre deux molécules (donneur et accepteur d'énergie) comme présenté sur la Figure 24.

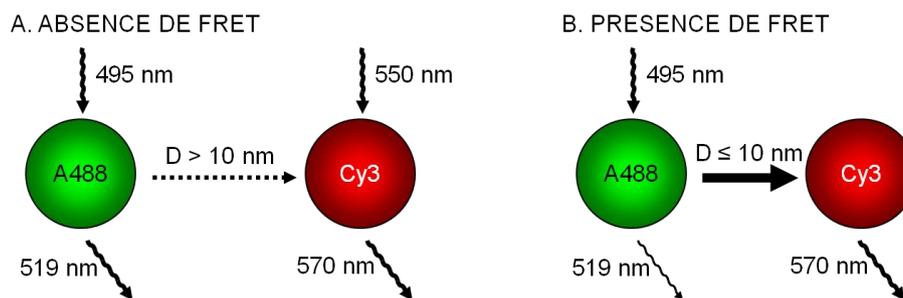


Figure 24 : Exemple de FRET entre deux fluorophores : A488 (Donneur) et Cy3 (Accepteur)

La distance joue un rôle important dans l'obtention de FRET. Aucun FRET ne peut apparaître si les fluorophores donneur et accepteur sont éloignés de plus de 10 nm (A). Un signal de FRET ne peut être obtenu que lorsque les 2 fluorophores sont suffisamment proches (B).

Ce phénomène physique nécessite une compatibilité énergétique entre ces molécules. Cela signifie que le spectre d'émission du donneur doit recouvrir, au moins partiellement, le spectre d'excitation (absorption) de l'accepteur (Figure 25).

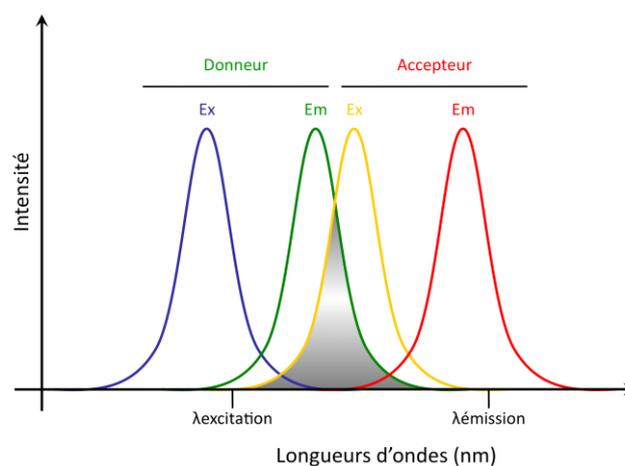


Figure 25 : Exemple de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur

La mesure d'un FRET entre deux fluorophores peut être effectuée de différentes manières. La première consiste à quantifier les variations de l'intensité de fluorescence en mesurant la diminution

de la fluorescence du donneur, l'augmentation de celle de l'accepteur ou en calculant un rapport ou ratio (ratio = fluorescence d'émission de l'accepteur/fluorescence d'émission du donneur). La principale difficulté d'analyse de ces signaux vient du recouvrement pouvant exister entre les spectres d'excitation et d'émission des fluorophores utilisés.

Plusieurs méthodes permettent de déterminer indirectement l'existence d'un FRET. Le photoblanchiment est une méthode qui consiste à éteindre un fluorophore par une exposition prolongée à une source lumineuse. Dans le cas du FRET par photoblanchiment de l'accepteur, les émissions de fluorescence du donneur et de l'accepteur sont mesurées avant et après photoblanchiment de l'accepteur. L'augmentation de la fluorescence du donneur après photoblanchiment de l'accepteur prouve l'existence d'un FRET entre les deux molécules. Une mesure répétée du même échantillon n'est pas envisageable en raison de la destruction des fluorophores par l'excitation continue, par contre sur une même préparation il est possible de répéter à différents endroits l'expérience afin de conforter les mesures.

L'utilisation de la durée de vie de fluorescence du donneur est aussi une approche adaptée à la mesure des événements de FRET. Cette méthode consiste à mesurer le déclin de fluorescence du donneur au cours du temps. La base physique de cette approche repose sur le fait que la durée de vie d'une molécule fluorescente dépend notamment de l'efficacité du processus de FRET. Par conséquent, plus le transfert d'énergie entre les deux molécules est efficace plus le déclin de fluorescence du donneur est rapide. Le FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) est un exemple de technologie basée sur l'analyse de la durée de vie. Il est préférable avec ce type d'approche d'utiliser des molécules fluorescentes dont le déclin de fluorescence est mono-exponentiel (ce qui est le cas de la GFP et de l'Alexa 488). Cependant ces mesures sont difficiles à effectuer dans notre cas, car suite à l'induction de l'apoptose de nos cellules HeLa, nous observons une auto fluorescence qui masque tout ou partie du signal de FLIM.

7.1.2. Obtention d'un signal de FRET

Nos expériences de FRET sont effectuées avec les C1qGR fixées sur les cellules et la calréticuline endogène. Les deux protéines d'intérêt sont reconnues par des anticorps primaires ensuite détectés par des anticorps secondaires de façon à avoir les C1qGR en rouge (Cy3 – accepteur) et la calréticuline en vert (Alexa 488 – donneur). Afin de limiter les mouvements de l'échantillon, les lamelles sont montées en Vectashield Hard set.

La colocalisation des signaux pour les mesures de FRET est évaluée via le coefficient de corrélation de Pearson (PCC) et les coefficients de Manders ($M1/M_V$ et $M2/M_R$ - dans le manuscrit M_V correspond au signal vert dans le signal rouge et M_R au signal rouge dans le signal vert). Etudier la corrélation entre deux variables aléatoires, c'est étudier l'intensité de la liaison qui peut exister

entre ces variables. Calculer le coefficient de corrélation revient à chercher à résumer la liaison qui existe entre les variables à l'aide d'une droite. L'étude du coefficient de Manders revient à étudier la superposition d'un signal par rapport à l'autre et inversement.

Le PCC est un outil très utilisé en microscopie pour quantifier la colocalisation [Barlow *et al.* 2010] en association avec les valeurs de M_V et M_R . Ces valeurs sont données directement par le logiciel d'analyse de microscopie Volocity (Perkin Elmer) en utilisant un seuillage automatique d'après la méthode développée par Costes et collaborateurs [Costes *et al.* 2004]. Afin de définir plus généralement le coefficient de corrélation de Pearson, sa valeur peut varier de 1 à -1. Une valeur de 1 correspond à une corrélation parfaite entre les deux paramètres étudiés, une valeur de 0 signifie une absence de corrélation, les variables sont alors dites indépendantes, et enfin une valeur de -1 signifie une corrélation inverse parfaite c'est-à-dire une exclusion des deux signaux. Plus la valeur du coefficient est proche des valeurs extrêmes -1 et 1, plus la corrélation entre les variables est forte. Sa représentation en scattered plot permet de donner une bonne estimation visuelle de la colocalisation.

Le coefficient de Manders mesure la proportion de colocalisation d'un fluorophore avec le second. Il varie entre 0 et 1. Une valeur de 0 signifie une absence de colocalisation entre les signaux alors qu'une valeur de 1 signifie une colocalisation parfaite. L'explication des valeurs est présentée sur la Figure 26.

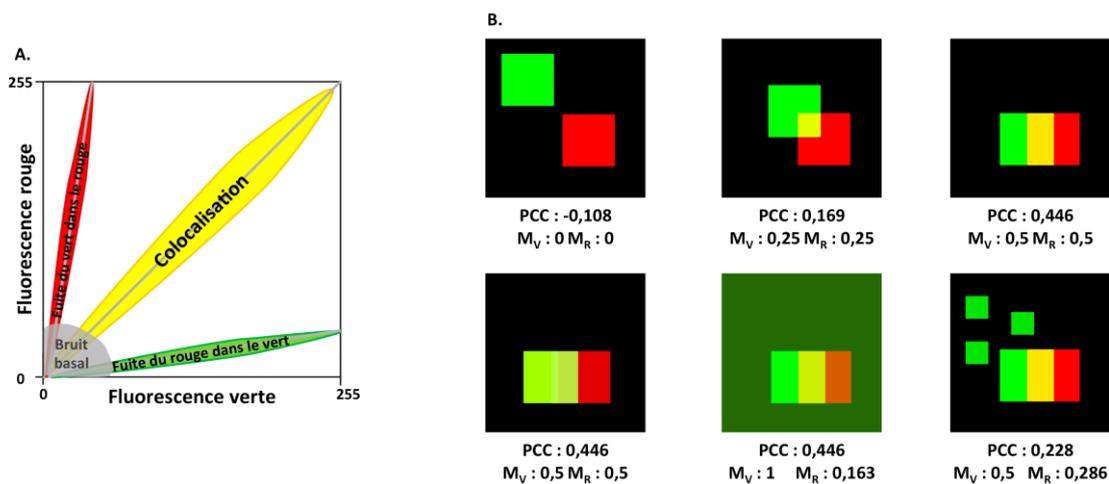


Figure 26 : Illustration des coefficients de Pearson et Manders

(A) Représentation schématique d'un scattered plot de colocalisation. (B) Illustration des calculs de Pearson et Manders : le PCC n'est pas dépendant du fond (background) et de la luminosité de l'image, il est par contre influencé par la présence de signaux ne colocalisant pas et ne permet pas d'avoir une perspective des deux canaux. Les coefficients de Manders sont plus faciles à interpréter que le PCC et ne sont pas sensibles à l'intensité des pixels chevauchant. Par contre, ils sont sensibles au fond et un seuil doit être fixé, d'où l'importance du seuillage automatique de Costes qui permet une approche statistique et qui permet de minimiser l'influence du fond.

Le signal de FRET a été obtenu par photoblanchiment graduel de l'accepteur à une longueur d'onde de 560 nm à 100 % d'intensité du laser répété au minimum une dizaine de fois après chaque acquisition.

On mesure ainsi en temps réel l'évolution de l'intensité de fluorescence du donneur et de l'accepteur. Les courbes d'intensité présentées dans les résultats ont été corrigées pour le blanchiment non spécifique mesuré avant le début du photoblanchiment de l'accepteur.

7.2. Analyse par co-immunoprécipitation

6×10^6 cellules sont cultivées en récipient de culture \varnothing 100 mm. Elles sont lavées avec 10 mL de PBS, puis incubées avec 400 μ L de solution d'immunoprécipitation pendant 5 min sur la glace. Plusieurs solutions ont été testées et seront présentées avec les résultats. Les cellules sont ensuite détachées du récipient avec un grattoir.

Les cellules sont récupérées dans un tube eppendorf de 1,5 mL puis vortexées toutes les 15 min pendant une heure. Elles sont ensuite centrifugées 30 min à 13 000 rpm à 4°C pour culotter les débris cellulaires. Le surnageant clarifié est récupéré dans un nouveau tube puis dosé par micro BCA (paragraphe 6.2.2 du matériel et méthodes). Un volume de 120 μ L de PureProteome Protein G Magnetic Beads (Millipore) est prélevé, puis les billes sont lavées trois fois avec 800 μ L de PBS-Tween 0,1 %. Elles sont ensuite reprises dans 120 μ L de solution d'immunoprécipitation puis séparées en trois fractions aliquotes de deux fois 30 μ L et une fois 60 μ L.

1 mg de lysat est préclarifié avec 60 μ L de billes, puis complété avec la solution d'immunoprécipitation utilisée afin d'avoir un volume de 1 mL. Le tout est mis sous agitation à 4°C pendant 2 h.

Le surnageant est ensuite récupéré puis séparé en deux avec 30 μ L de billes. L'une des conditions sert de contrôle, dans l'autre condition, 4 μ g d'anticorps pour l'immunoprécipitation sont ajoutés.

Les deux conditions, sont ensuite incubées sur la nuit sous agitation à 4°C. Le surnageant est conservé pour être déposé en contrôle.

Les billes sont ensuite lavées 6 fois avec la solution d'immunoprécipitation. Les billes sont ensuite reprises dans 35 μ L de Laemmli 2x non réducteur [125 mM Tris-HCl ; 20 % glycérol ; 4 % SDS ; 0,02 % Bleu de coomasie G-250 ; pH 6,8]. Les échantillons sont ensuite traités comme présenté dans le paragraphe 3.1.1 (matériel et méthodes) et la présence de calréticuline ou d'ERp57 est analysée par immunorévélation après séparation des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) comme décrit dans le paragraphe 3.1.2 du matériel et méthodes.

7.3. Analyse par dosage immuno-enzymatique

Ici, le test ELISA est utilisé afin de mettre en évidence une interaction entre deux protéines : ERp57 et C1q.

Le protocole a été adapté de l'article de Frickel et collaborateurs [Frickel *et al.* 2002]. En plaque de microtitration (96 puits MaxiSorp ; Nunc), la protéine d'intérêt (ERp57 et ses domaines) est immobilisée, dans un volume de 50 μ L, en tampon d'immobilisation [15 mM Na₂CO₃ ; 35 mM NaHCO₃ ; carbonate pH 9,4] sur la nuit à 4°C à 15 μ g/mL (250 nM). Entre chaque étape, 3 lavages de 200 μ L avec la solution de lavage [PBS ; 0,05 % Tween 20 (p/v)] ont été effectués. Les puits ont été saturés par une solution bloquante [PBS ; 5 % Lait ; 0,05 % Tween 20 (p/v)] 1h à 37°C.

La fixation de C1q est ensuite réalisée pendant 2h à 37°C avec différentes concentrations de C1q (de 0,5 à 5 μ g/mL soit 1 à 10 nM) en solution de lavage.

La détection est ensuite effectuée par un anticorps primaire (IgG polyclonaux de Lapin anti C1q Humain, 1979 au 1/100) puis secondaire (anticorps de chèvre anti IgG de lapin couplé HRP, Sigma au 1/20 000).

La révélation est réalisée avec 100 μ L de TMB (TMB Substrate One Component TMB100-0500, tebu-bio Laboratories). La réaction est stoppée au bout de 2 min par ajout de 100 μ L de H₂SO₄ (1M).

L'absorbance à 450 nm est ensuite lue sur un lecteur de microplaque (Perkin Elmer Wallac Victor 1420 Multilabel Counter with Computer and Software).

7.4. Analyse par Biacore/SPR

7.4.1. Principe du Biacore

Les différents systèmes BIA (Biospecific Interaction Analysis) développés par Biacore AB permettent de mesurer en temps réel la formation de complexes moléculaires sur une interface biospécifique et d'obtenir des informations sur la cinétique de ces interactions. La technique repose sur un système de détection utilisant la résonance plasmonique de surface (SPR) associé à un système micro fluidique de transfert de liquide.

Les appareils de la gamme BIA sont conçus pour visualiser en temps réel des interactions entre deux biomolécules non marquées, dans un débit continu de tampon au niveau d'une cellule microfluidique. L'un des réactifs, le ligand, est immobilisé sur une surface appelée « sensor chip ». Le partenaire soluble de l'interaction, ou analyte, est injecté à un débit constant. Au contact de

l'interface, les variations de masse induites par l'association ou la dissociation des complexes, modifient la réfringence de la surface et entraînent une variation de l'angle de réflexion (Figure 27).

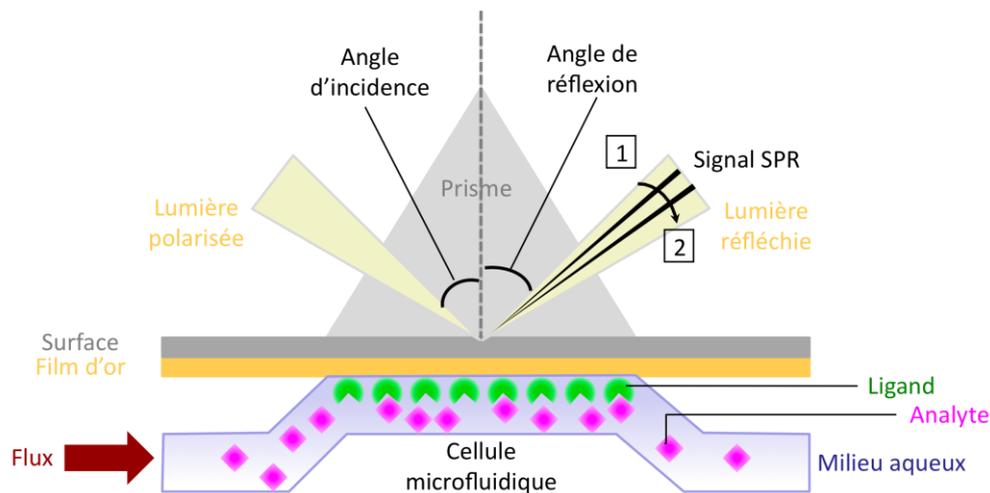


Figure 27 : Principe de la détection d'une interaction par résonance plasmonique de surface

La sensor chip, support de l'interaction, est prise en sandwich entre la cellule micro fluidique et le banc optique. La cellule microfluidique dessine la cellule de mesure et assure les flux de tampon et de molécules. Les positions 1 et 2 correspondent aux variations de l'angle de réflexion ou résonance en fonction de la concentration en analyte au voisinage de la sensor chip.

Après les phases d'association et de dissociation permettant de mettre en évidence l'interaction entre les deux partenaires, la sensor chip peut être régénérée : l'analyte est séparé du ligand, qui reste à la surface. La régénération permet de dissocier de façon exhaustive toutes les molécules d'analyte ayant interagi avec le ligand et de retrouver une surface disponible pour un nouveau cycle d'interactions ; il est ainsi possible de faire de nombreuses mesures avec la même protéine immobilisée. Les solutions le plus couramment utilisées pour la régénération font varier : la force ionique (NaCl), le pH, les concentrations en agents chaotropiques, en détergents (SDS) ou en chélateurs (EDTA).

Le tracé en continu des variations de l'angle de résonance dans le temps constitue le sensorgramme. Le signal de résonance est quantifié en unité de résonance (RU). Les différentes étapes d'un cycle d'analyse sont détaillées dans la Figure 28.

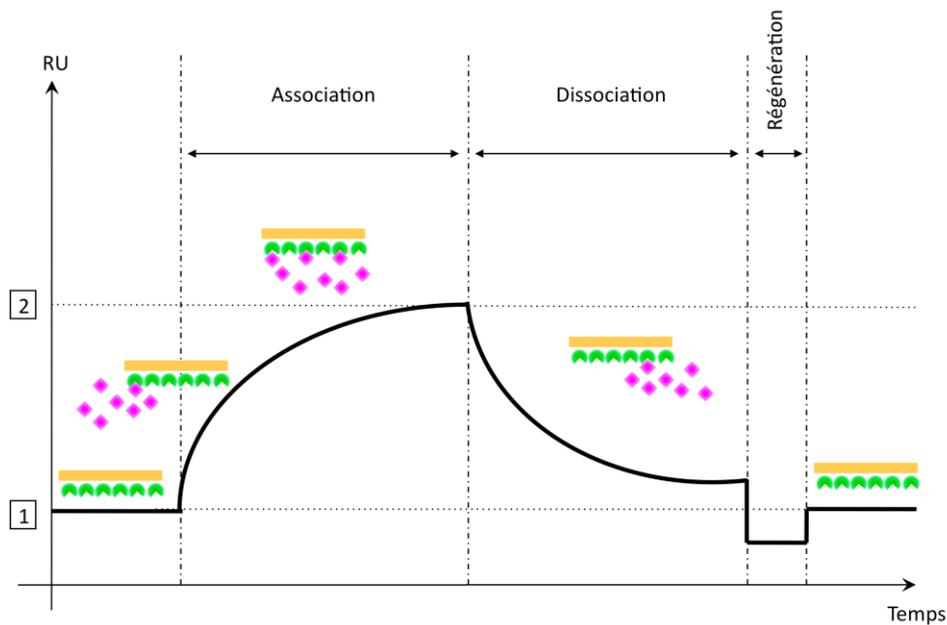


Figure 28 : Sensorgramme représentant un cycle d'analyse avec les phases d'association, de dissociation et de régénération

Les constantes cinétiques des interactions de C1q et de ses dérivés avec ERp57 ont été évaluées à l'aide d'un Biacore 3000. Cet appareil permet la mesure simultanée de 4 pistes, une de référence et 3 autres portant les protéines d'intérêt.

7.4.2. Immobilisation des ligands sur la sensor chip CM5

La sensor chip CM5 (BIAcore AB) est constituée d'un support de verre recouvert d'une fine couche d'or sur laquelle est greffée une couche de 100 nm d'épaisseur de dextrans carboxyles constituant un réseau lâche et flexible de polymères chargés négativement. Ces caractéristiques favorisent la diffusion des protéines qui, pour pouvoir pénétrer dans la couche de dextrans, doivent être chargées positivement. Le ligand doit donc être solubilisé dans un tampon dont le pH est inférieur au point isoélectrique de la protéine.

L'immobilisation des ligands par leurs amines primaires est réalisée en trois étapes successives, effectuées à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans un flux continu de tampon HBS-E [10 mM Hepes pH 7,4 ; 145 mM NaCl ; 5 mM EDTA] selon le protocole suivant :

- a. Activation de la matrice : les groupements carboxyles du dextran sont activés sous forme d'ester de succinimide par injection sur la sensor chip de 80 μL d'une solution contenant du 1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propyl)carbodiimide (EDC) à 200 mM et du N-hydroxysuccinimide (NHS) à 50 mM en proportion 1 : 1.
- b. Immobilisation des molécules : les ligands sont dilués à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans un tampon acétate de sodium [10 mM CH_3COONa pH 5] (on se place à 1 unité de pH en dessous du pI de la protéine à immobiliser), puis injectés sur la matrice activée (en moyenne 25 μL).

Les quantités de protéines immobilisées pour nos analyses sont présentées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Conditions d'immobilisation des ligands sur la Chip CM5 pour les analyses d'interaction en Biacore	
Ligands	Quantités de ligands immobilisées (RU)
C1q	~ 20 000
C1qGR	~ 11 000
C1qCLF	~ 13 000

La piste de référence est généralement activée/désactivée dans des conditions comparables à celles utilisées pour les autres pistes, mais aucune protéine n'y est fixée. Son signal est soustrait automatiquement de celui obtenu sur les autres pistes.

- c. Désactivation : les fonctions carboxyles du dextran n'ayant pas réagi avec les groupements amines du ligand sont neutralisées par injection sur la matrice de 80 μL d'une solution d'éthanolamine-HCl 1 M, pH 8,5.

7.4.3. Conditions expérimentales des interactions

Les interactions sont mesurées dans le tampon de course [10 mM Hepes pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 2 mM Ca^{2+} ; 0,005 % P20 (p/v)] à un débit de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Pour déterminer les constantes cinétiques d'interaction, différentes concentrations d'analyte sont injectées sur la surface. La gamme d'analyte utilisée pour les interactions entre ERp57 et les différents domaines de C1q est de 1 nM à 20 nM, les temps d'association et de dissociation ont été fixés à 120 secondes.

La régénération des surfaces entre deux analyses est effectuée par une injection de 10 μ L de solution de NaOH (de concentration variant de 5 mM à 17,5 mM).

7.4.4. Analyses cinétiques des interactions

Le suivi en temps réel des interactions permet la collecte de données utilisables pour l'analyse cinétique de l'association et de la dissociation des complexes.

Pour déterminer les constantes cinétiques d'interaction, différentes concentrations d'analytes sont injectées sur la surface biospécifique. Les sensorgrammes sont ensuite analysés par le logiciel BIAevaluation 3.1 (BIAcore AB), selon un modèle simple d'interaction 1 : 1 entre le ligand et l'analyte (modèle de Langmuir).

Le logiciel permet également de déterminer les paramètres cinétiques (k_a et k_d) et les constantes d'affinité (K_D) de l'interaction par une évaluation globale des différents sensorgrammes grâce à des méthodes d'intégration numérique.

Le paramètre χ_2 permet de vérifier le bon ajustement au modèle d'interaction donné. Celui-ci est considéré comme correspondant au modèle lorsqu'une valeur inférieure à 2 est obtenue.

8. Anticorps utilisés

	Nom	Références	Origine	Western Blot	Immunofluorescence/ Cytométrie en Flux
Anticorps primaires	IgY polyclonaux de Poulet anti CRT Cter Humaine et de Souris	NB120-2908	Novus Biologicals	1/2000	x
	IgY polyclonaux de Poulet anti CRT Nter Humaine	PA1-902A	Thermo Scientific	1/1000	1/250
	IgG monoclonaux de Souris anti CRT humaine	SPA-601	StressGen	1/1000	x
	IgG polyclonaux de Lapin anti CRT Nter Humaine	8891	Houen (Denmark)	1/400	x
	IgG polyclonaux de Lapin anti C1q Humain	1979	IRPAS (IBS)	x	1/100
	IgG monoclonaux de Souris anti C1q Humain clone JL-1	ab71940	Abcam	x	1/100
	IgG polyclonaux de Lapin anti ERp57 Humain et de Souris	ab10287	Abcam	1/2000	1/100
	IgG monoclonaux de Souris anti ERp57 Humain	P30101	Millipore	1/2000	x
	IgG polyclonaux de Lapin anti SNAP	P9310S	New England Biolabs	1/1000	x
	IgG monoclonaux de Lapin anti GFP	ab6556	Abcam	1/2500	
Anticorps primaires Contrôles isotypiques	Contrôle isotypique IgY polyclonaux de Poulet 5.6 mg/mL	003-000-003	Jackson Immunoresearch		
	Contrôle IgG polyclonaux isotypique de Lapin 1 mg/mL	011-000-003	Jackson Immunoresearch		
	Contrôle IgG1k polyclonaux isotypique de souris 1 mg/mL	M-9269	Sigma		
Anticorps secondaires couplés à une enzyme (western blot)	Ac de Chèvre anti IgG de Lapin (molécule entière) couplés HRP (Horse Radish Peroxydase = peroxydase du raifort)	A-0545	Sigma	1/5000	X
	Ac de Chèvre anti IgG de Lapin (molécule entière) couplés HRP	# 3053-1	Epitomics	1/20000	x
	Ac de Lapin anti IgG de souris (molécule entière) couplés HRP	A-9044	Sigma	1/5000	X
	Ac d'Âne anti IgY de Poulet couplés HRP	703-035-155	Jackson Immunoresearch	1/40000	X
	Ac de Chèvre anti IgG de lapin (molécule entière) Phosphatase Alcaline	A-3687	Sigma	1/5000	X
	Ac de Lapin anti IgY de Poulet (molécule entière) Phosphatase Alcaline	A-9171	Sigma	1/5000	x

Anticorps secondaires couplés à un fluorochrome	Polyclonaux de Chèvre anti-Lapin couplés Cyanine 3 (Cy3)	111-165-144	Jackson Immunoresearch	x	1/250
	Polyclonaux de Chèvre anti-Lapin couplés Dylight 488	111-486-144	Jackson Immunoresearch	x	1/200
	Polyclonaux d'Âne anti-Lapin couplés FluoProbes 647H	FP-SC5110	Interchim	x	1/50
	Polyclonaux d'Âne anti-Poulet couplés Dylight 488	703-486-155	Jackson Immunoresearch	x	1/200
	Polyclonaux de chèvre anti-Souris couplés Cy3	115-165-166	Jackson Immunoresearch	x	1/250
	Polyclonaux de chèvre anti-Souris couplés FITC	115-095-146	Jackson Immunoresearch	x	1/200
	Polyclonaux d'Âne anti-Poulet couplés Cy3	703-165-155	Jackson Immunoresearch	x	1/200
Anticorps primaires couplés à un fluorophore	IgG1k monoclonaux de Souris anti CD11c couplés Phycoérythrine (PE) clone 3.9	12-0166	eBiosceinces	x	5µL
	IgG1k Isotypique de Souris Contrôle couplés PE clone 3.6.2.8.1	12-4714	eBiosceinces	x	5µL
	IgG2a monoclonaux de Souris anti CD14 couplés PE clone RMO52	A07764	Beckman Coulter	x	5µL
	IgG2a Isotypique de Souris Contrôle couplés PE clone 7T4-1F5	A09142	Beckman Coulter	x	5µL
	IgG1k Isotypique de Souris Contrôle couplés PE Clone MOPC-21	555749	BD Pharmigen	x	5µL
	IgG1k monoclonaux de Souris anti CD54 couplés PE Clone HA58	555511	BD Pharmigen	x	5µL
	IgG1k monoclonaux de Souris anti CD11b/Mac-1 couplés PE Clone ICRF44	555388	BD Pharmigen	x	5µL
	IgG1k monoclonaux de Souris anti HLA-DR couplés PE Clone L243 (G46-6)	555812	BD Pharmigen	x	5µL

9. Principaux tampons et solutions

Biologie mol.	TAE 50 X (euromedex)	2M Tris pH 8,3 ; 5M Acétate ; 50 mM EDTA ; filtré à 0,2 µm
	NZY+	10 g de NZ amine ; 5 g d'extrait de levure ; 5 g de NaCl ; pour 1 litre ; pH 7,5
Microscopie	Liquide de montage DABCO	1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane 25 mg/mL en PBS ; glycérol 1 : 9 (v/v) ; pH 8,6
	Solution de perméabilisation	PBS ; 0,1 % Triton X-100
	Solution de Hoechst	1 µg/mL Hoechst en PBS
Biochimie	PBS	137 mM NaCl ; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 0,02 % KCl ; 0,02 % KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
	PBS 10 X (Euromedex)	NaCl ; KH ₂ PO ₄ ; Na ₂ HPO ₄ ; filtré à 0,2 µm
SDS-Page et Western Blot	Laemmli 2X réducteur (Sigma)	4 % SDS ; 20 % glycérol ; 10 % β-mercaptoethanol ; 0,004 % bleu de bromophénol ; Tris HCl 0,125 M ; pH ~6,8
	Laemmli 2X non-réducteur	125 mM Tris-HCl ; 20 % glycérol ; 4 % SDS ; 0,02 % Bleu de Coomassie G-250 ; pH 6,8
	Gel de concentration	3 % acrylamide (p/v) ; 125 mM Tris-HCl ; 0,1 % SDS (p/v) ; 0,04 % persulfate d'ammonium (p/v) ; 0,4 % TEMED (v/v) ; pH 6,8
	Gel de séparation	10-14 % acrylamide (p/v) ; 375 mM Tris-HCl ; 0,1 % SDS (p/v) ; 0,025 % persulfate d'ammonium (p/v) ; 0,2 % TEMED (v/v) ; pH 8,8
	Tampon de migration	25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 0,1 % SDS (p/v) ; pH non ajusté
	Tampon de transfert	25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 20 % éthanol (v/v) ; pH non ajusté
	Solution de saturation	PBS ; 0,05 % Tween 20 (p/v) ; 5 % lait (p/v)
	Solution de lavage PBS-T	PBS ; 0,05 % Tween 20 (p/v)
ELISA	Tampon d'immobilisation	15 mM Na ₂ CO ₃ ; 35 mM NaHCO ₃ ; pH 9,4
	Solution de lavage	PBS ; 0,05 % Tween 20 (p/v)
	Solution bloquante	PBS ; 5 % lait ; 0,05 % Tween 20 (p/v)
Biacore	Tampon HBS-E	10 mM Hepes pH 7,4 ; 145 mM NaCl ; 5 mM EDTA
	Tampon acétate de sodium	10 mM CH ₃ COONa pH 5
	Tampon de course	10 mM Hepes pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 2 mM Ca ²⁺ ; 0,005 % P20 (p/v)

Lyse cellulaire et immunoprécipitation	Solution de lyse	1 % Triton X-100 ; 1 mM CaCl ₂ ; 1 mM MgCl ₂ ; pH 7,4
	Solution de lyse avec Triton (Kroemer)	1 % Triton X-100 ; 150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 50 mM Tris ; pH 7,5
	Solution de lyse avec Triton sans EDTA	1 % Triton X-100 ; 1 mM Ca ²⁺ ; 1 mM Mg ²⁺ ; pH 7,4
	Solution de lyse avec NP-40	1 % NP-40 ; 50 mM Tris ; 150 mM NaCl ; 0,5 % acide déoxycholate ; pH 8,0
	Solution de lyse avec NP-40 et EDTA	1 % NP-40 ; 20 mM Tris ; 140 mM NaCl ; 10 % glycérol ; 2 mM EDTA ; pH 8,0
	Solution de lyse avec digitonine	1 % digitonine ; 150 mM NaCl ; 10 mM Tris ; pH 7,4
Shaving	Tampon 250 mM	250 mM NaCl ; 0,01M Tris pH 7,4
	Tampon pH 12	150 mM NaCl ; 0,01 M phosphate pH 12
Purification ERp57	Tampon de lyse	20 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 100 mM NaCl ; 0,5 mM EDTA ; 0,5 % Triton X-100 ; 0,5 mM PMSF
	Tampon de lavage	20 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 100 mM NaCl ; 0,5 mM EDTA ; 0,5 % Triton X-100
	Tampon d'éluion	20 mM GSH ; 100 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 0,5 mM EDTA
	Tampon de dialyse	20 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 20 mM NaCl ; 1 mM DTT

CHAPITRE III : Résultats

1. Mise en évidence d'une interaction directe entre la calréticuline et la région globulaire de C1q à la surface des cellules apoptotiques

La fixation de C1q à la surface des cellules apoptotiques a été montrée dans plusieurs études (cf. introduction). Malgré une interaction *in vitro*, montrée au laboratoire par des expériences de SPR (Biacore), aucune interaction directe à la surface des cellules apoptotiques n'a été établie. Pour autant, jusqu'à maintenant, seule la colocalisation des têtes globulaires de C1q (C1qGR) et de la calréticuline (CRT) à la surface des cellules apoptotiques a pu être mise en évidence [Paidassi *et al.* 2011]. Toutefois, afin de vérifier l'interaction à la surface cellulaire, une stratégie de FRET a été développée. Le FRET permet, lorsque les deux partenaires sont suffisamment proches, de mesurer un transfert d'énergie par résonance et de visualiser ainsi dans le contexte cellulaire l'interaction des protéines d'intérêt.

1.1. Stratégies mises en place pour la détection d'une interaction par FRET

Pour mettre en évidence l'interaction de deux protéines par FRET, celles-ci doivent être fluorescentes et le couple de fluorophores compatibles pour le FRET (cf. paragraphe 7.1.1 du matériel et méthodes). Afin de faciliter la détection et le marquage de ces protéines, il a été envisagé de produire des protéines recombinantes en fusion avec une protéine fluorescente.

La seule source actuelle de C1q provient de la purification à partir de sérum humain. Il ne m'a donc pas été possible d'envisager la production d'un C1q fluorescent. La production d'une protéine recombinante n'étant pas facilement envisageable (C1q est un hexamère de trimères), cette stratégie n'a été réalisée que pour la calréticuline. Dans un premier temps, la protéine de fusion choisie pour ces expériences est la GFP (utilisée en couple avec la Cy3).

1.1.1. Expression d'une calréticuline en fusion avec la GFP

1.1.1.1. Analyse de la production de la calréticuline de fusion

Nous savons que la calréticuline possède un peptide signal de 17 acides aminés permettant son adressage dans le réticulum endoplasmique où il est ensuite clivé [Houen *et al.* 1994]. La calréticuline possède également en position C-terminale un motif KDEL, connu pour retenir les protéines le possédant dans le réticulum endoplasmique. Il est également supposé que celui-ci soit clivé lorsque

la protéine est exportée à la surface des cellules apoptotiques [Tarr *et al.* 2010]. Plusieurs constructions de calréticuline en fusion avec la GFP ont donc été envisagées. Peu de choses étant connues sur le site ou le mode de clivage du KDEL, nous avons testé la GFP en position N-terminale ou C-terminale de la calréticuline et nous avons choisi de mettre le peptide signal (Psignal) en position N-terminale (Figure 29).

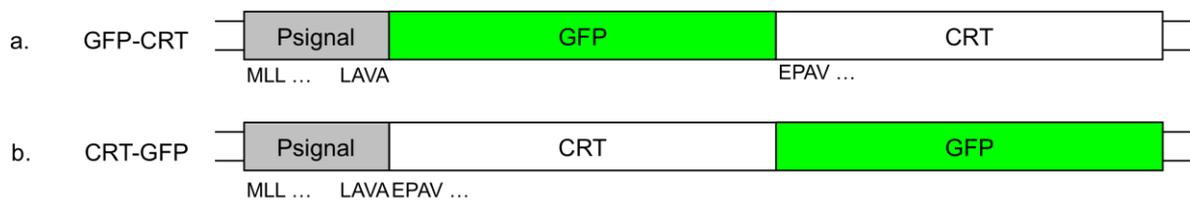


Figure 29 : Schéma des différentes constructions de calréticuline en fusion avec la GFP

(a) construction du plasmide codant pour la calréticuline en fusion avec la GFP en position Nter (GFP-CRT) : psig-CRT-EGFP-N1 (b) construction codant pour la calréticuline en fusion avec la GFP en position Cter (CRT-GFP) : psig-EGFP-CRT-C1.

La production des différentes calréticulines en fusion avec la GFP a été testée par une transfection transitoire de cellules HeLa. 48h après la transfection les cellules ont été lysées et l'expression de la calréticuline a été analysée par immunorévélation après séparation par électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).

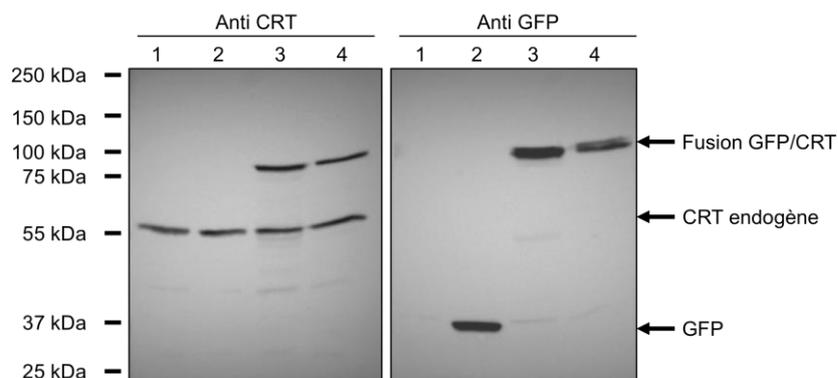


Figure 30 : Analyse de la production transitoire de la calréticuline en fusion avec la GFP

Détection de la CRT ou de la CRT en fusion avec la GFP, dans des cellules HeLa témoins non transfectées (1), transfectées avec pEGFP-C1 (2), psig-EGFP-CRT-C1 (3) ou psig-CRT-EGFP-N1 (4). 20 µg de chaque lysat cellulaire sont analysés par séparation sur gel d'acrylamide 10 % et immunorévélation par un anticorps dirigé contre la CRT ou la GFP. Les témoins de masse moléculaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure.

La calréticuline endogène est détectée à une masse apparente approximative de 55 kDa (Figure 30, quadrant de gauche) légèrement supérieure à la masse moléculaire calculée (47 kDa). Dans les transfections transitoires avec psig-EGFP-CRT-C1 ou avec psig-CRT-EGFP-N1 respectivement aux colonnes 3 et 4, on observe la présence d'une bande supplémentaire de calréticuline à environ 75 kDa correspondant à la taille attendue d'une fusion de la GFP avec la calréticuline (47 kDa +

27 kDa soit 74 kDa). De plus, le niveau d'expression des constructions N-terminale et C-terminale semble du même ordre.

Par ailleurs, la détection à l'aide d'un anticorps dirigé contre la GFP (Figure 30, quadrant de droite), nous permet de confirmer que la bande, à 75 kDa, précédemment observée sur le panneau de gauche, correspond bien à la calréticuline en fusion avec la GFP. Dans le cas des cellules transfectées avec pEGFP-C1 (Figure 30, panneau de droite, colonne 2) la GFP seule est détectée à environ 27 kDa.

Cette analyse permet de confirmer une expression comparable des deux constructions de calréticuline en fusion avec la GFP, cependant cela ne nous donne aucune information sur sa fonctionnalité, sa localisation ou son exportation en surface.

1.1.1.2. Analyse de la localisation cellulaire de la calréticuline de fusion

Cette analyse a été effectuée en microscopie confocale après transfection transitoire de cellules HeLa normales ou apoptotiques par les constructions N-terminale et C-terminale.

La notion d'apoptose sera abordée plus en détail dans le paragraphe 3.1.2 des résultats, ici nous nous sommes attachés uniquement à comparer l'évolution entre les cellules témoins normales et les cellules dont l'apoptose a été induite par irradiation aux UV. Ces cellules sont considérées en apoptose précoce car elles ne présentent aucune perméabilisation de la membrane.

Les calculs des coefficients de Pearson et Manders utilisées pour la description de la colocalisation sur les images de microscopie sont détaillés dans le matériel et méthodes au paragraphe 7.1.2.

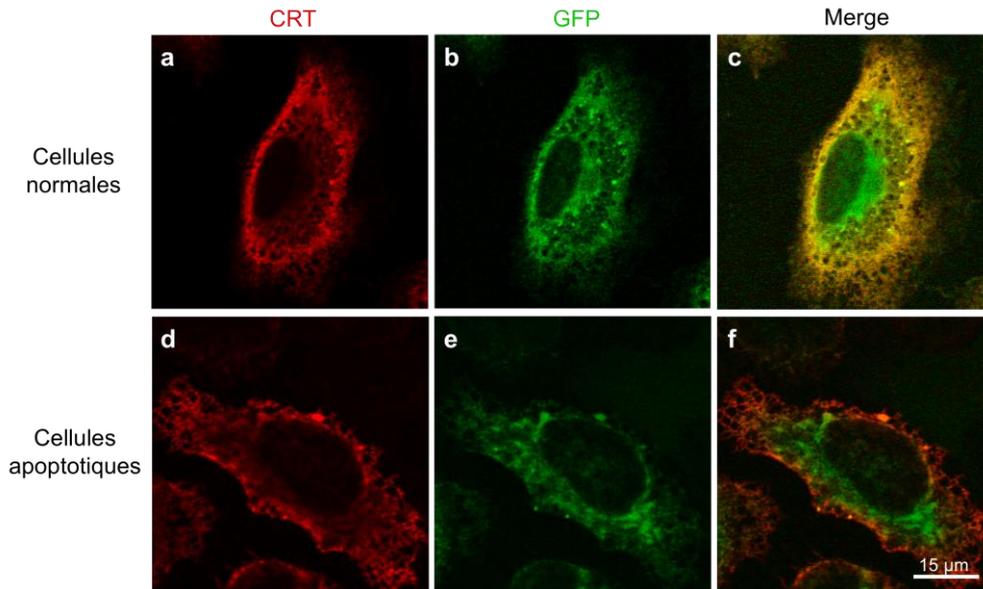


Figure 31 : Localisation de la calréticuline endogène et de fusion avec la GFP exprimée transitoirement dans les cellules HeLa

48h après la transfection par le plasmide psig-EGFP-CRT-C1, les cellules HeLa témoins normales (a-c) et apoptotiques (irradiation UV) (d-f), ont été fixées en PFA 4 %, perméabilisées en PBS-Triton 0,2 % puis immunomarquées pour la CRT (rouge). La GFP fluoresce en vert. Pour c) le coefficient de Pearson $PCC = 0,662$, et les coefficients de Manders $M_V = 0,889$ et $M_R = 0,936$ et pour f) $PCC = 0,210$, $M_V = 0,762$ et $M_R = 0,779$. Dans les expériences contrôles, aucun marquage n'est observé avec un anticorps primaire de même isotype et/ou avec l'anticorps secondaire seul. L'analyse en microscopie confocale est effectuée avec un objectif Plan-Apochromat 63x/1,4 à immersion (huile) avec un pinhole de 128 μm , la taille de la trame des images est de 512 x 512 pixels et la vitesse de balayage est de 1,26 microsecondes/pixel (330 ms par image).

On cherche tout d'abord à détecter la calréticuline avec un anticorps anti-calréticuline. On suppose que l'anticorps est capable de détecter de manière comparable à la fois la calréticuline endogène et la calréticuline de fusion. On remarque un signal au sein des cellules HeLa (Figure 31 a) qui semble principalement distribué dans le réticulum endoplasmique. Si l'on regarde le signal de l'anticorps anti-calréticuline, lorsque les cellules sont en apoptose précoce (Figure 31 d), celui-ci apparaît relocalisé en périphérie de la cellule.

On cherche ensuite à visualiser le signal de la GFP en fusion avec la calréticuline. Sur la Figure 31 b et e on peut voir que la calréticuline de fusion est exprimée en grande quantité dans les cellules HeLa transfectées.

De plus, lorsque les deux signaux sont superposés un marquage jaune, traduisant une colocalisation apparaît (Figure 31 c et f) ; les valeurs de Manders M_V et $M_R > 0,7$ confirmant cette observation. Néanmoins, sur nos images, nous observons une zone où seul le signal vert est détecté, indiquant qu'une partie du signal vert n'est pas colocalisé avec le signal rouge, confirmé par les valeurs de Manders où $M_V \neq M_R$ pour cette zone. Il est possible que l'anticorps ait des difficultés à reconnaître la calréticuline de fusion dans ce compartiment et qu'il y ait une différence de comportement entre la calréticuline endogène et la calréticuline de fusion.

De plus, lorsque les cellules sont en apoptose précoce, la zone de colocalisation se retrouve fortement réduite (Figure 31 f), le coefficient de Pearson passe de 0,6 pour les cellules normales à 0,21. La calréticuline-GFP (Figure 31 e) s'avère être relocalisée plus faiblement à la périphérie et avec une cinétique apparente différente de celle de la protéine endogène. Des signaux similaires ont été obtenus après la transfection par le plasmide psig-CRT-EGFP-N1 codant pour la CRT-GFP avec cette fois-ci la GFP en position C-terminale (résultats non montrés).

La calréticuline en fusion avec la GFP s'exprime donc correctement au sein de la cellule. Notre objectif étant de détecter la présence d'un signal de FRET sur la fraction de calréticuline de fusion exportée à l'extérieur de la cellule. La mise en évidence de sa présence à la surface des cellules HeLa a ensuite été recherchée.

1.1.1.3. Analyse de l'exposition de la calréticuline de fusion à la surface cellulaire

Afin de mettre en évidence une exportation à la surface cellulaire de la calréticuline en fusion avec la GFP et éventuellement une augmentation de cette exportation avec l'apoptose (observé pour la calréticuline endogène), les expériences précédentes ont été reconduites sur des cellules fixées mais non perméabilisées. Les résultats sont présentés dans la Figure 32. Dans ce cas, les anticorps ne peuvent pas pénétrer dans le cytoplasme pendant l'immunomarquage, seul la reconnaissance de la calréticuline (endogène ou de fusion) en surface est alors possible.

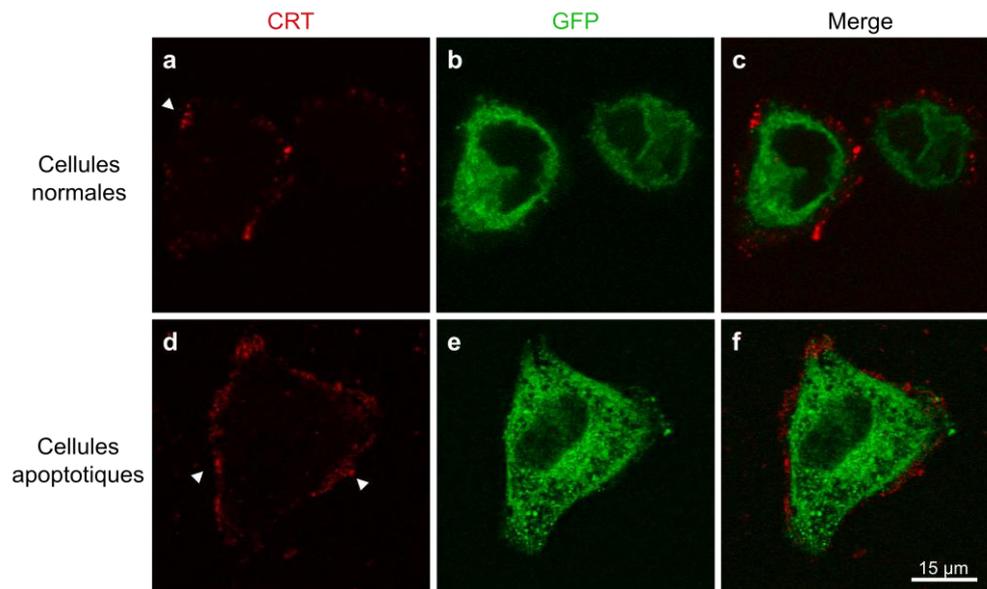


Figure 32 : Analyse de l'expression en surface de la calréticuline endogène et de la calréticuline en fusion avec la GFP

48h après la transfection par le plasmide psig-EGFP-CRT-C1, les cellules HeLa témoins normales (a-c) et apoptotiques précoces (irradiation UV) (d-f), ont été fixées en PFA 4 %, non perméabilisées, puis immunomarquées pour la CRT (rouge) ; la CRT endogène ainsi que la CRT recombinante sont marquées. La fluorescence verte correspond à la GFP en fusion avec la CRT. Les flèches blanches indiquent des zones de forte présence en surface de calréticuline. Pour c) le $PCC = -0,008$, $M_V = 0,092$ et $M_R = 0,09$ et pour f) $PCC = -0,067$, $M_V = 0,098$ et $M_R = 0,102$. Dans les expériences contrôles, aucun marquage n'est observé avec un anticorps primaire de même isotype et/ou avec l'anticorps secondaire seul. L'analyse en microscopie confocale est effectuée avec un objectif Plan-Apochromat 63x/1,4 à immersion (huile) avec un pinhole de 128 μm , la taille de la trame de images est de 512 x 512 pixels et la vitesse de balayage est de 1,26 microsecondes/pixel (330 ms par image).

J'ai cherché à détecter par microscopie confocale la présence de calréticuline de fusion à la surface des cellules HeLa. En vert, nous détectons la GFP de la calréticuline de fusion, à la fois intra- et extracellulaire (Figure 32 b et e). En rouge, nous détectons la calréticuline, endogène et/ou de fusion, décorant la surface des cellules normales ou apoptotiques (Figure 32 a et d). La calréticuline est détectée à la surface des cellules témoins et apoptotiques comme cela avait déjà été décrit dans la littérature sur des cellules HeLa [Frasconi *et al.* 2012]. De plus, la quantité et la taille des patches (flèches blanches) augmentent avec l'apoptose ; en accord avec la description de M. Obeid au sein de l'équipe de G. Kroemer sur des cellules cancéreuses CT26 [Obeid *et al.* 2007] mais également avec l'analyse effectuée au laboratoire à la surface de cellules HeLa [Paidassi *et al.* 2011].

Lorsque l'on examine la superposition des deux signaux sur la Figure 32 (images c et f), aucune colocalisation n'est visible. Cette observation est confirmée par des valeurs de corrélation de Pearson proches de zéro (-0,008 et -0,067) indiquant une absence de corrélation entre nos signaux. Cependant, au regard des coefficients de Manders ($0 < M_R, M_V \leq 0,1$), une petite proportion de la calréticuline de fusion pourrait être exportée en surface. Il semblerait également que celle-ci soit légèrement plus exportée à la surface des cellules apoptotiques ($M_{\text{normales}} < M_{\text{apoptotiques}}$). Ces différents

résultats sont en accord avec les travaux de l'équipe d'EGgleton sur l'exportation de la calréticuline de fusion [Tarr *et al.* 2010].

De plus, des expériences similaires ont été menées en microscopie à épifluorescence avec la deuxième construction (CRT-GFP) et des profils identiques de localisation et d'exportation ont été observés. L'influence du positionnement du peptide signal ou de la GFP n'a pas pu être appréciée (résultats non montrés).

Il semble que l'exportation de nos constructions à la surface des cellules HeLa, exprimant transitoirement de la calréticuline/GFP, soit peu efficace et donc inadaptées aux mesures de FRET envisagées. Cependant cette faible exportation soulève plusieurs interrogations : Est-ce que la calréticuline en fusion avec la GFP se comporte comme la calréticuline endogène et est capable d'interagir avec les mêmes partenaires ? Est-ce que l'expression transitoire de la calréticuline de fusion limite son exportation à la surface des cellules ?

1.1.1.4. Obtention de clones stables

Afin de déterminer si l'expression transitoire de GFP-CRT est limitante pour son exportation en surface (question évoquée dans le paragraphe 1.1.1.3), nous avons produit des clones stables en espérant pouvoir isoler des clones exprimant efficacement la calréticuline recombinante à leur surface (taux d'expression plus physiologique, cinétique plus appropriée...). Nous supposons que l'expression de la GFP-CRT dans nos clones aura des niveaux d'expression proches des conditions physiologiques d'expression de la calréticuline endogène et donc limitera les problèmes pouvant survenir suite à la surexpression.

H. Llewelyn Roderick et collaborateurs ont isolé par cytométrie en flux des clones stables exprimant la GFP-CRT [Llewelyn Roderick *et al.* 1998] (identique à notre construction), mais n'ont pas cherché à détecter sa présence en surface. Suivant leur protocole, nous avons mis en place une sélection afin d'obtenir des clones stables de HeLa exprimant la psig-GFP-CRT. Après un mois de sélection, une dizaine de clones différents ont été isolés.

Cependant, aucun des clones analysés ne semblant exprimer de la GFP-CRT en surface, cette stratégie a été, pour le moment, abandonnée.

1.1.1.5. Vérification par immunoprécipitation du comportement de la calréticuline de fusion

Dans un même temps, afin de déterminer si la calréticuline en fusion avec la GFP se comporte comme la calréticuline endogène et est capable d'interagir avec les mêmes partenaires, nous nous sommes intéressés aux partenaires connus de la calréticuline. Au sein de l'équipe de Kroemer, il a été mis en évidence que la calréticuline interagissait avec ERp57 et qu'elles étaient exportées ensemble à la surface des cellules [Panaretakis *et al.* 2008].

Dans l'espoir de mettre en évidence une interaction entre la calréticuline/GFP et ERp57 qui serait synonyme d'une exportation, nous avons tout d'abord cherché à mettre au point une co-immunoprécipitation de calréticuline (endogène) avec ERp57 dans nos cellules HeLa n'exprimant pas de calréticuline recombinante.

Dans un premier temps, les conditions de co-immunoprécipitation CRT/ERp57 décrites par l'équipe Kroemer, avec une solution d'immunoprécipitation à base de Triton et un anticorps anti-calréticuline de souris (différent de celui utilisé pour les immunofluorescences), ont été reproduites.

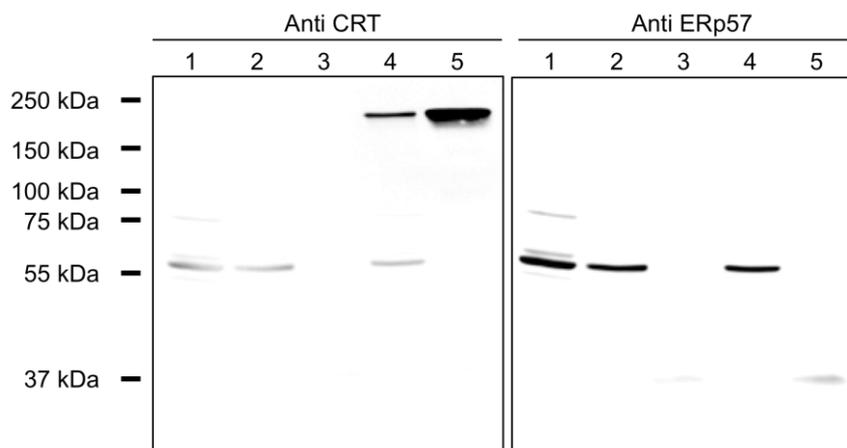


Figure 33 : Analyse de l'immunoprécipitation de la calréticuline en solution avec Triton et EDTA

Détection de la CRT et d'ERp57, dans un lysat total de cellules HeLa (1), dans le surnageant de l'IP contrôle (2), associées aux billes de l'IP contrôle (3) ou dans le surnageant des billes de l'IP (4), et associée aux billes de l'IP (5). L'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation est l'anti CRT de souris (SPA-601). 20 µg de lysat cellulaire en solution de lyse avec Triton (Kroemer) [1 % Triton X-100 ; 150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 50 mM Tris pH 7,5], ainsi que 20 µL de chacun des surnageants sont analysés par séparation sur gel d'acrylamide 10 % et immunorévéléation par un anticorps dirigé contre la CRT (souris) ou ERp57 (lapin) ; les témoins de masse moléculaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure.

Dans ces conditions, l'immunorévéléation anti calréticuline et anti ERp57 montre clairement la présence de calréticuline et d'ERp57 dans le lysat total de cellules HeLa, ainsi que dans les surnageants d'immunoprécipitation (Figure 33, colonne 1, 2 et 4), cependant, aucune immunoprécipitation de calréticuline n'est observée (Figure 33, quadrant gauche, colonne 5), et

comme attendu aucune co-immunoprécipitation d'ERp57 puisque la calréticuline n'a pas été immunoprécipitée (Figure 33, quadrant droit, colonne 5). Pour autant dans mes immunoprécipitations contrôles, aucune fixation non spécifique d'ERp57 ou de calréticuline aux billes n'est détectée (Figure 33, colonne 3). Par ailleurs, le signal détecté ligne 4 et 5, vers une masse moléculaire apparente de l'ordre de 200 kDa, lors de l'immunorévélation anti calréticuline correspond aux anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation (révélé par l'anticorps secondaire utilisé pour le western blot lors de la révélation de la calréticuline, d'espèce identique à celle de l'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation), permettant de certifier la fixation de notre anticorps aux billes.

Dans nos mains, selon les conditions décrites par l'équipe de Kroemer, nous n'arrivons pas à immunoprécipiter la calréticuline. Cela peut être lié soit à l'anticorps soit aux conditions de lyse.

Nous avons soulevé la possibilité que la solution de lyse utilisée ne soit pas optimale. Nous avons ainsi testé deux autres solutions, une première à base de Triton mais sans EDTA [1 % Triton X-100 ; 1 mM Ca^{2+} ; 1 mM Mg^{2+} ; pH 7,4] (utilisée classiquement pour l'obtention de nos lysats cellulaires) et une seconde à base de Nonidet-40 [1 % NP-40 ; Tris 50 mM pH 8,0 ; NaCl 150 mM ; 0,5 % acide déoxycholate], tout en conservant l'anticorps utilisé précédemment. Les deux solutions ont donné des résultats identiques à ceux précédemment obtenus.

N'arrivant pas à immunoprécipiter la calréticuline avec cet anticorps et ce quelle que soit la solution de lyse, nous avons décidé de mener de nouvelles immunoprécipitations avec un nouvel anticorps de lapin anti-calréticuline commercial disponible au laboratoire dans une solution de lyse à base de NP-40. Avec ce même anticorps, nous avons également essayé d'immunoprécipiter 2,5 μg de calréticuline recombinante diluée dans la même solution de lyse et une nouvelle fois, aucune immunoprécipitation de calréticuline n'a pu être observée.

Enfin, ayant obtenu un anticorps anti peptide fabriqué dans le laboratoire du docteur Houen (Danemark), nous avons effectué un dernier test avec une nouvelle solution de lyse contenant du NP-40 et de l'EDTA.

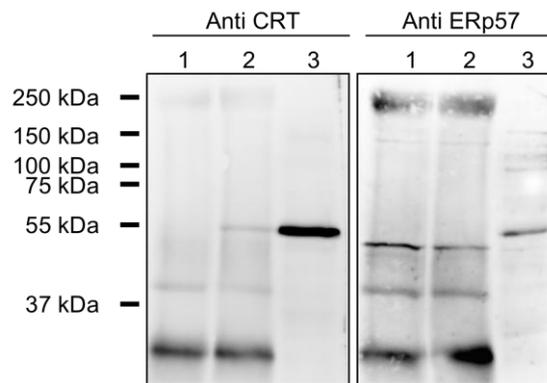


Figure 34 : Analyse de l'immunoprécipitation en solution de lyse avec NP-40 et EDTA

Détection d'ERp57 et de la CRT, associée aux billes de l'IP contrôle (1) associées aux billes de l'IP (2) et dans un lysat total de cellules HeLa (3). L'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation est l'anti CRT de lapin (8891). 20 µg de lysat cellulaire en solution de lyse NP-40 avec EDTA [1 % NP-40 ; 20 mM Tris pH 8,0 ; 140 mM NaCl ; 10 % glycérol ; 2 mM EDTA] ainsi que 20 µL de chacun des surnageants sont analysés par séparation sur gel d'acrylamide 10 % et immunorévélation par un anticorps dirigé contre la CRT (souris) ou ERp57 (souris) ; les témoins de masse moléculaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure.

Pour la première fois dans nos expériences d'immunoprécipitation, nous avons pu faiblement immunoprécipiter la calréticuline (Figure 34, quadrant gauche, colonne 2). Forts de cette réussite, nous avons cherché à vérifier la présence d'une éventuelle co-immunoprécipitation d'ERp57 avec la calréticuline, toutefois, il semblerait que celle-ci ne soit pas immunoprécipitée en association avec ERp57 (Figure 34, quadrant droit, colonne 2).

Un test inverse, où ERp57 était immunoprécipité en premier dans une solution de lyse contenant de la digitonine [1 % digitonine ; 150 mM NaCl ; 10 mM Tris ; pH 7,4] avec un anticorps anti ERp57 de souris, a également été mené mais aucune immunoprécipitation d'ERp57 n'a été obtenue. Dans la littérature, il a été montré qu'il était possible de co-immunoprécipiter la calréticuline à partir d'une immunoprécipitation d'ERp57 utilisant le même anti ERp57 que nous et dans des conditions de lyse identiques aux nôtres mais sur des cellules radio marquées [Diedrich *et al.* 2001].

Il est possible que nous n'ayons pas été assez sensibles dans nos expériences pour détecter l'immunoprécipitation de la calréticuline ou celle d'ERp57 et leur possible co-immunoprécipitation.

Ces différentes expériences ne nous ont malheureusement pas permis de montrer une interaction de la calréticuline endogène avec ERp57 au sein de nos cellules HeLa non transfectées. Ces expériences ayant été menées afin de montrer une éventuelle association de la calréticuline de fusion avec ERp57, nous ne pouvons toujours pas répondre aux questions concernant le comportement de notre calréticuline de fusion. Nous ne savons donc pas si celle-ci arrive à interagir

avec des partenaires de manière similaire à la calréticuline endogène et à emprunter les mêmes voies intracellulaires.

1.1.2. Expression d'une calréticuline en fusion avec SNAP

Une nouvelle stratégie a donc été mise en place afin de détecter uniquement la calréticuline de fusion présente en surface, car lorsque les cellules sont transfectées, la GFP est visible dans le cytoplasme des cellules à la fois perméabilisées et non perméabilisées. Il est donc impossible de visualiser la calréticuline en fusion avec la GFP uniquement présente à la surface des cellules.

Afin d'obtenir une calréticuline recombinante fluorescente uniquement lorsqu'elle est exposée à la surface cellulaire via l'utilisation des sondes fluorescentes incapables de traverser les membranes biologiques (non perméantes), une fusion avec la protéine SNAP a été mise en place (Figure 35).

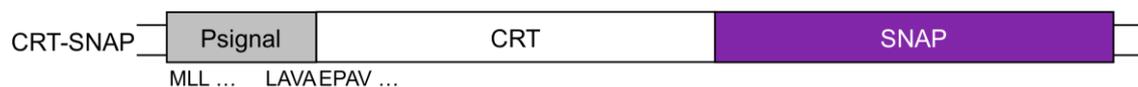


Figure 35 : Schéma de la construction de la calréticuline en fusion avec la protéine SNAP

Construction codant pour la calréticuline en fusion avec la protéine SNAP en position Nter (CRT-SNAP) : psig-CRT-SNAP-N1.

La production de la calréticuline en fusion avec SNAP a été testée par une transfection transitoire de cellules HeLa. 48h après la transfection, l'expression de la calréticuline a été analysée par immunorévélation après lyse et SDS-PAGE.

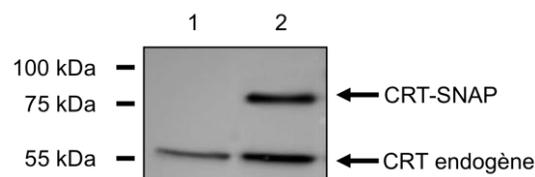


Figure 36 : Analyse de la production transitoire de calréticuline en fusion avec SNAP

Détection de la CRT ou de CRT-SNAP, dans des cellules HeLa témoins (1) ou transfectées avec psig-SNAP-CRT-N1 (2). 20 μ g de chaque lysat cellulaire est analysé par séparation sur gel d'acrylamide 10 % et immunorévélation par un anticorps dirigé contre la CRT ; les témoins de masse moléculaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure.

Comme précédemment observé, la calréticuline endogène est détectée avec une masse apparente approximative de 55 kDa (Figure 36, colonne 1) légèrement supérieure à la masse moléculaire calculée (47 kDa). Dans les transfections transitoires avec psig-CRT-SNAP-N1 (Figure 36,

colonne 2), on observe la présence d'une bande supplémentaire de calréticuline avec une masse apparente d'environ 75 kDa légèrement supérieure à la masse moléculaire attendue d'une fusion de la protéine SNAP avec la calréticuline (47 kDa + 20 kDa soit 67 kDa).

La protéine SNAP étant une protéine non fluorescente, nous avons ensuite vérifié l'expression et la localisation de la calréticuline de fusion en microscopie à épifluorescence à l'aide d'une sonde perméante (Figure 37).

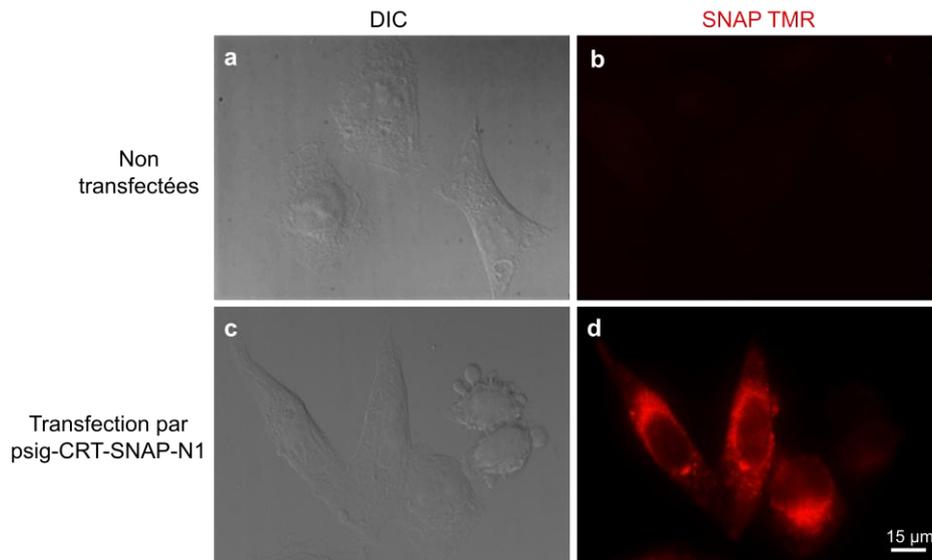


Figure 37 : Localisation de la calréticuline en fusion avec la protéine SNAP exprimée transitoirement dans les cellules HeLa

Les cellules HeLa non transfectées (a, b) ou 48h après la transfection par le plasmide psig-CRT-SNAP-N1 (c, d), sont marquées avec la sonde SNAP-TMR et sont observées après fixation en PFA 4 % en DIC (a, c) ou pour le marquage SNAP (b, d). L'analyse en microscopie à épifluorescence est effectuée avec un objectif PlanAPON60XO à immersion (huile).

Nous avons tout d'abord cherché à vérifier la spécificité du marquage SNAP de la sonde. Pour cela des cellules transfectées par un plasmide n'exprimant pas la protéine SNAP ont été mises en contact avec la sonde. Aucun marquage non spécifique n'est observé (Figure 37 b). Le marquage des cellules transfectées par psig-CRT-SNAP-N1 montre donc spécifiquement l'expression de CRT-SNAP. La localisation de CRT-SNAP (Figure 37 d) est tout à fait en accord avec la localisation, préalablement observée, de la fusion GFP. De plus, comme pour les constructions GFP, 80 % des cellules sont transfectées et expriment CRT-SNAP.

Puis, pour visualiser par microscopie à épifluorescence uniquement la calréticuline en fusion avec SNAP à la surface des cellules HeLa, une sonde non perméante a été utilisée.

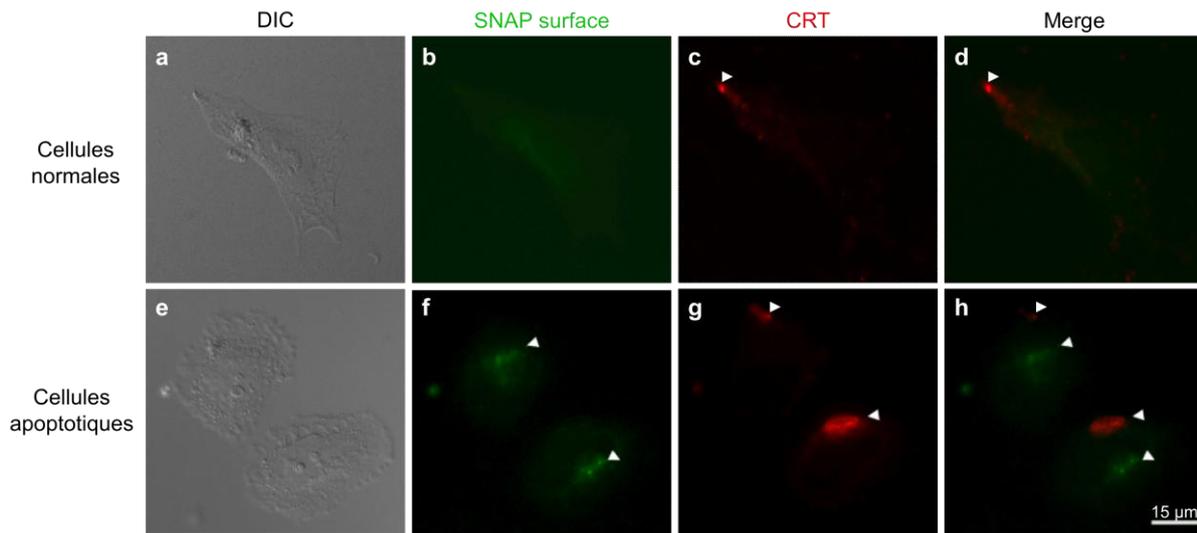


Figure 38 : Analyse de l'expression en surface du signal de la calréticuline et du signal SNAP

48h après la transfection par le plasmide psig-CRT-SNAP-N1, les cellules HeLa témoins normales (a-d) et apoptotiques (irradiation UV) (e-h), ont été marquées avec la sonde SNAP-surface Alexa Fluor 488 (vert) et fixées en PFA 4 %, non perméabilisées, puis immunomarquées pour la CRT (rouge). Les flèches blanches indiquent des zones de forte présence en surface de la calréticuline ou du signal SNAP. Pour d) et h) M_V et M_R ont une valeur de 0 et aucune relation n'a pu être établie pour le PCC. Dans les expériences contrôles, aucun marquage n'est observé avec la sonde SNAP-surface Alexa Fluor ou avec un anticorps primaire de même isotype et/ou avec l'anticorps secondaire seul. L'analyse en microscopie à épifluorescence est effectuée avec un objectif PlanAPON60XO à immersion (huile).

En vert, nous détectons la protéine SNAP présente en surface (Figure 38 b et f). En rouge, nous détectons la calréticuline, endogène et/ou de fusion, décorant la surface des cellules viables ou apoptotiques (Figure 38 c et g). Nous observons également une augmentation du signal de la calréticuline et de SNAP qui semble dépendante de l'état d'apoptose des cellules (flèches blanches).

Néanmoins, lorsque l'on regarde la superposition des deux signaux (Figure 38 d et h), on remarque que ceux-ci sont disjoints. Sur ces images, aucune superposition des signaux n'a pu être mesurée (M_V et $M_R = 0$) et aucune corrélation n'a pu être obtenue. Ces signaux apparaissent donc comme totalement indépendants.

Cependant, l'apparente ségrégation de nos signaux suggère un comportement différent de la calréticuline de fusion par rapport à la calréticuline endogène. Il semble alors possible que la séquence KDEL soit clivée, permettant d'expliquer cette exclusion des marquages. Cette observation nous a contraints à envisager une autre approche pour les mesures d'interaction par FRET.

1.1.3. Conclusion

Afin de faciliter la détection et le marquage de la calréticuline pour nos expériences de FRET, nous avons tout d'abord envisagé de produire des protéines recombinantes en fusion avec une protéine fluorescente.

Cependant, il semble que l'exportation de nos constructions à la surface des cellules HeLa, exprimant transitoirement de la calréticuline/GFP, soit peu efficace. L'utilisation de la CRT-SNAP quant à elle suggère un clivage de la séquence KDEL ou une exportation différente entre la calréticuline endogène et la calréticuline de fusion. Ces constructions en fusion étant ainsi incompatibles avec les mesures de FRET initialement prévues, une nouvelle stratégie devra donc être envisagée.

Le comportement de ces différentes constructions a par ailleurs amené beaucoup d'interrogations.

Nous nous sommes demandés, au regard de la faible exportation de la CRT-GFP, si nos protéines de fusion étaient fonctionnelles et si elles se comportaient comme la calréticuline endogène. Pour cela nous avons mis au point des expériences de co-immunoprécipitation de la calréticuline avec ERp57 mais celles-ci ne nous ont malheureusement pas permis de répondre à cette question.

Nous nous sommes également demandés si l'expression transitoire de la calréticuline de fusion pouvait être un frein à son exportation à la surface des cellules. Pour cela des clones stables ont été produits mais pour le moment, cette stratégie a été abandonnée.

Nous avons également remarqué, dans les cellules perméabilisées, une zone où seul le signal GFP était visible. Il est possible que l'anticorps ait des difficultés à reconnaître la calréticuline de fusion suite à un problème d'encombrement stérique ou également de conformation différente. Nous n'avons malheureusement pas pu apporter de réponses à ces interrogations.

Enfin, l'apparente ségrégation entre la calréticuline et SNAP nous a amené à chercher si le clivage de la séquence KDEL était nécessaire pour permettre l'exportation de la calréticuline à la surface des cellules, mais également à mettre en évidence les interactions mises en jeu pour sa rétention à la surface. Pour cela des expériences supplémentaires ont été menées afin d'analyser plus en détail la calréticuline endogène de surface. Les résultats obtenus sont présentés dans le paragraphe 2 des résultats.

1.2. Détection d'une interaction par FRET

Les stratégies utilisant une calréticuline en fusion avec la GFP ou SNAP n'ayant pas donné de résultats satisfaisants permettant d'effectuer des mesures de FRET sur nos cellules, nous avons décidé d'étudier l'interaction par FRET en marquant la calréticuline endogène à l'aide d'un anticorps (Figure 39).

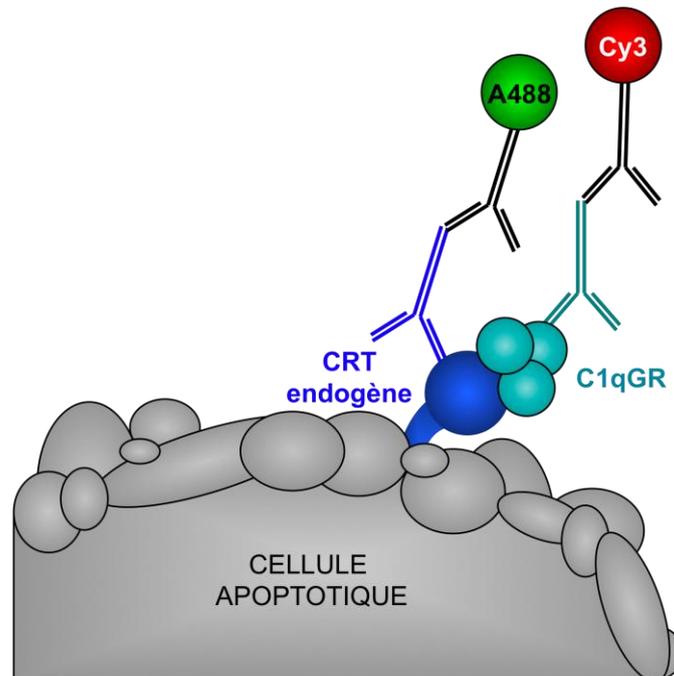


Figure 39 : Schéma représentatif de la stratégie développée pour obtenir un signal de FRET en utilisant la calréticuline endogène

Les cellules témoins viables ou apoptotiques sont fixées en PFA 4 %, incubées avec les C1qGR puis immunomarquées pour la CRT (vert) et les C1qGR (rouge) à l'aide d'un anticorps primaire spécifique de la calréticuline ou des C1qGR, puis d'un anticorps secondaire couplé à un fluorophore spécifique de l'espèce de l'anticorps primaire.

La technique de FRET étant basée sur un échange d'énergie entre deux fluorophores pour lesquels la distance joue un rôle essentiel, l'utilisation d'anticorps primaire et secondaire ajoute une difficulté supplémentaire en générant de la distance. Les molécules d'anticorps ayant une taille de l'ordre de 100 Angströms, il est possible que l'efficacité de FRET soit fortement diminuée dans cette stratégie.

1.2.1. Définition des zones de photoblanchiment

Nous avons donc cherché à détecter par microscopie confocale la présence d'une colocalisation entre la calréticuline endogène et le C1qGR à la surface des cellules HeLa normales et apoptotiques.

Afin de mesurer la présence d'un signal de FRET, les zones de photoblanchiment ont été déterminées comme étant des zones possédant un coefficient de Pearson compris entre 0,5 et 0,7 et avec des coefficients de Manders M_V et $M_R \geq 0,9$ et présentant une répartition en « nuage de points » équivalente à celle de la Figure 40.

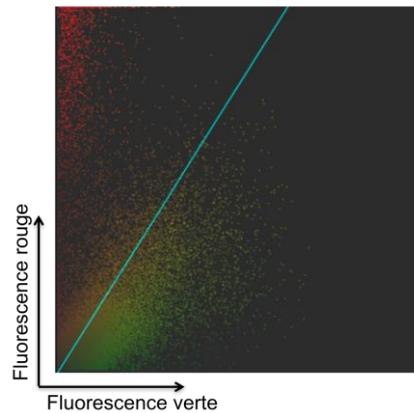


Figure 40 : Analyse de la colocalisation en surface des signaux anti calréticuline et anti C1qGR

Une représentation en nuage de points des fluorescences est établie en fonction des canaux observés et le coefficient de Pearson ainsi que les coefficients de colocalisation (M_V et M_R) sont établis par seuillage automatique selon la méthode de Costes. Ici le PCC est de 0,7, $M_V = 1$ et $M_R = 0,99$.

Le photoblanchiment est ensuite effectué de manière graduelle jusqu'à n'obtenir plus que 20 % de l'intensité initiale du fluorophore accepteur. En moyenne environ 10 à 15 itérations sont nécessaires pour obtenir un photoblanchiment de 80 % (ici Cy3). Au cours du photoblanchiment, les intensités des fluorescences des deux fluorophores sont mesurées afin d'analyser leur évolution et de déterminer l'existence d'un signal de FRET et éventuellement son efficacité.

En photoblanchissant le fluorophore accepteur nous espérons voir une augmentation de l'intensité du fluorophore donneur qui indiquerait la présence d'un transfert d'énergie entre les deux fluorophores. La détection d'un signal de FRET nous permettra ainsi de déterminer la présence d'une interaction entre les deux protéines d'intérêt.

1.2.2. Mesure des efficacités de FRET

1.2.2.1. Analyse sur des cellules témoins

Dans un premier temps, nous avons décidé d'analyser sur des cellules normales les intensités de fluorescence du fluorophore donneur (calréticuline représentée en vert) après photoblanchiment du fluorophore accepteur (C1qGR représentées en rouge). Les signaux obtenus sont présentés sur la Figure 41.

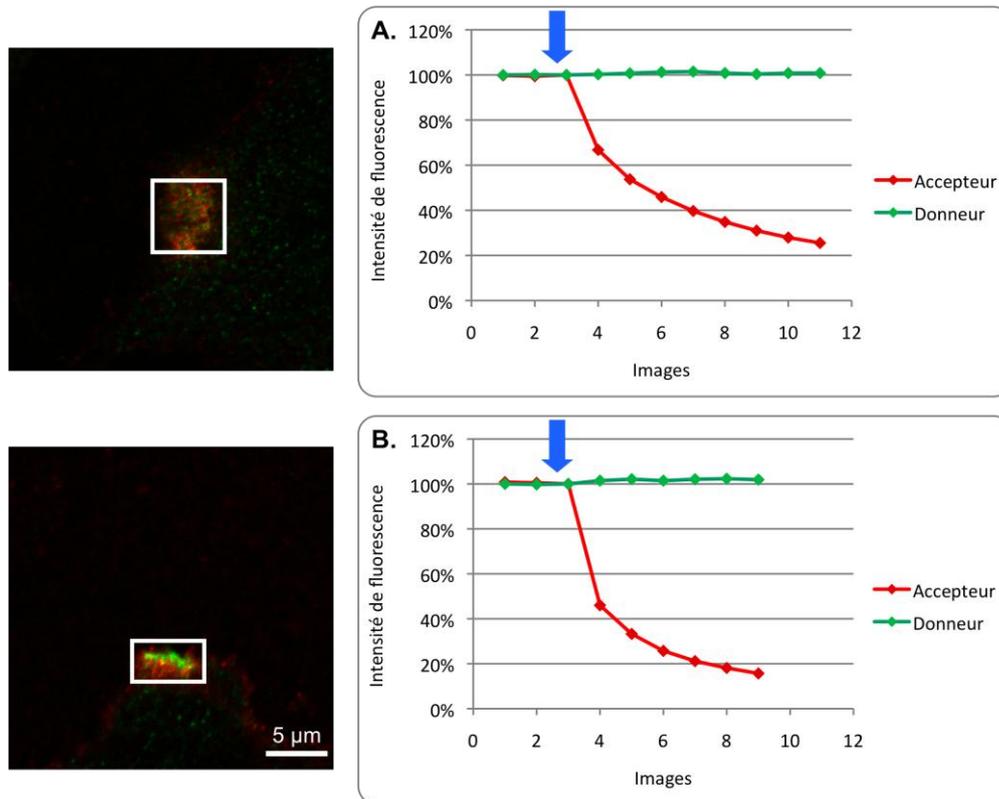


Figure 41 : Graphique représentatif de l'analyse des intensités de fluorescence après photoblanchiment sur des cellules témoins

Les cellules HeLa viables (témoins) ont été fixées en PFA 4 %, non perméabilisées, incubées avec les C1qGR puis immunomarquées pour la CRT et les C1qGR. La courbe en rouge représente l'intensité de fluorescence en pourcentage associée aux C1qGR (Accepteur). La courbe en vert représente l'intensité de fluorescence en pourcentage associée à la CRT (Donneur). La flèche bleue marque le début du photoblanchiment du fluorophore accepteur. (A) Motif de colocalisation « en rond » et (B) motif de colocalisation « en ligne ». Les rectangles blancs correspondent aux zones sélectionnées pour le photoblanchiment. L'analyse en microscopie confocale est effectuée avec un objectif Plan-Apochromat 63x/1,4 à immersion (huile) avec un pinhole de 48 μm , la taille de la trame des images est de 512 x 512 pixels et la vitesse de balayage est de 2,55 microsecondes/pixel.

Malgré une valeur du M_V et M_R supérieure à 0,9, aucun signal de FRET n'est observé pour les cellules présentant un motif de colocalisation « en rond » (Figure 41 A). Il semblerait que ces structures ne soient pas favorables à une interaction entre les C1qGR (rouge) et la calréticuline (vert). Il peut également être envisagé que la disposition des anticorps à la surface des cellules dans ces zones ne soit pas favorable à l'obtention d'un signal de FRET. Par contre, l'analyse des intensités de fluorescence nous a permis de mettre en évidence un faible signal de FRET à la surface des cellules présentant un motif de colocalisation « en ligne » (Figure 41 B). Lorsque nous regardons l'évolution de la fluorescence du fluorophore donneur, nous remarquons une augmentation graduelle de celle-ci suite au photoblanchiment du fluorophore accepteur. Afin de quantifier cette augmentation et de déterminer l'efficacité maximale apparente de FRET le graphique présenté en Figure 42 a été tracé.

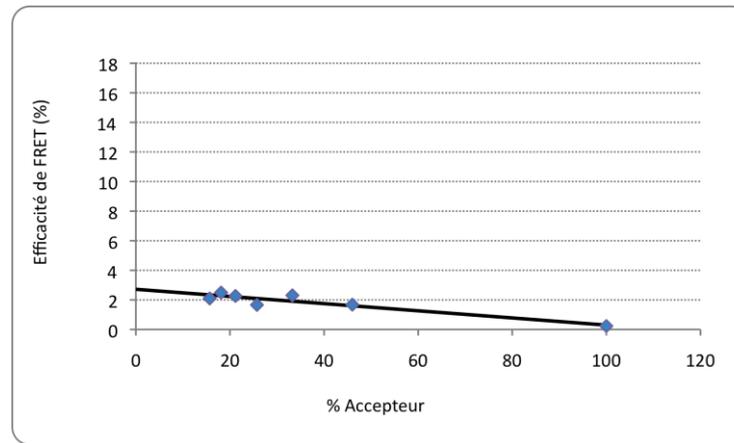


Figure 42 : Graphique d'analyse de l'efficacité de FRET en fonction du pourcentage de fluorescence de l'accepteur après photoblanchiment sur cellules normales présentant un motif de colocalisation « en ligne »

Après mesure des intensités de fluorescence du fluorophore accepteur et donneur l'efficacité de FRET obtenue a été représentée en fonction du pourcentage d'intensité de fluorescence du fluorophore accepteur (points bleus). La droite en noir représente la relation de proportionnalité qu'il existe entre l'efficacité du FRET et le pourcentage de fluorescence de l'accepteur. L'efficacité de FRET maximale apparente est ici de 2,7 %.

L'efficacité du FRET est directement proportionnelle à la fluorescence du fluorophore accepteur, celle-ci va augmenter linéairement en fonction du photoblanchiment du fluorophore accepteur. C'est grâce à cette propriété que nous pouvons définir l'efficacité maximale apparente de FRET. Sur graphique de la Figure 42 nous pouvons déterminer l'efficacité maximale apparente de FRET pour les motifs de colocalisation « en ligne », celle-ci est de 2,7 %.

L'efficacité maximale de FRET observée sur les cellules normales au niveau des motifs « en ligne » est comprise entre 1,5 et 3 %, il semble donc qu'il y ait une petite interaction entre les C1qGR et la calréticuline à la surface de ces cellules.

1.2.2.2. Analyse sur des cellules apoptotiques

Un signal de FRET ayant été obtenu sur certains motifs de colocalisation des cellules viables, nous avons cherché à détecter la présence éventuelle d'un signal de FRET sur des cellules apoptotiques (Figure 43).

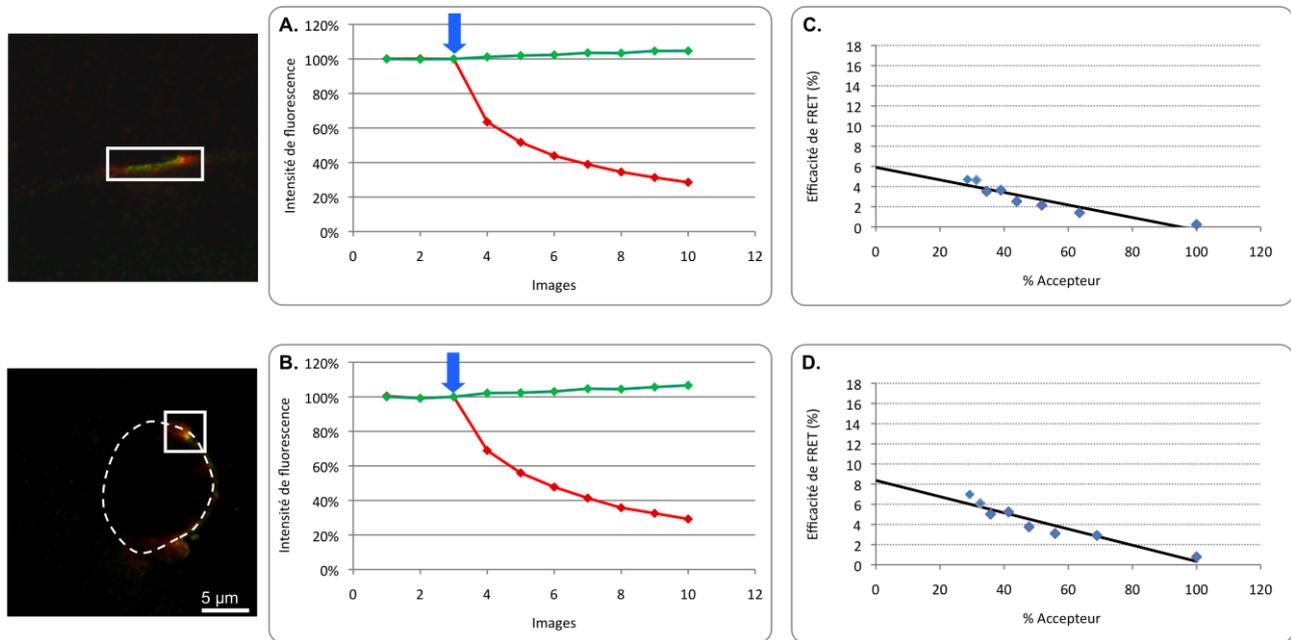


Figure 43 : Graphique représentatif de l'analyse des intensités de fluorescence après photoblanchiment et analyse de l'efficacité de FRET sur des cellules apoptotiques

Les cellules HeLa apoptotiques, présentant un motif de colocalisation « en ligne » sur une cellule étalée (A) ou sur une cellule ronde (B), ont été fixées en PFA 4 %, non perméabilisées, incubées avec les C1qGR puis immunomarquées pour la CRT et les C1qGR. La courbe en rouge représente l'intensité de fluorescence en pourcentage associée aux C1qGR (Accepteur). La courbe en vert représente l'intensité de fluorescence en pourcentage associée à la CRT (Donneur). La flèche bleue marque le début du photoblanchiment du fluorophore accepteur. Les rectangles blancs correspondent aux zones sélectionnées pour le photoblanchiment. Le trait blanc en pointillés permet de visualiser le pourtour de la cellule. Après mesure des intensités de fluorescence du fluorophore accepteur et donneur, l'efficacité de FRET obtenue sur des cellules apoptotiques, présentant un motif de colocalisation « en ligne » sur une cellule étalée (C) ou sur une cellule ronde (D), a été représentée en fonction du pourcentage d'intensité de fluorescence du fluorophore accepteur (points bleus). La droite en noir représente la relation de proportionnalité qu'il existe entre l'efficacité du FRET et le pourcentage de fluorescence de l'accepteur. L'efficacité de FRET maximale apparente est ici de 6 % pour (C) et 8 % pour (D).

Les cellules apoptotiques, présentent majoritairement des motifs de colocalisation « en ligne », seule la forme de la cellule change, plutôt étalée au plutôt ronde (Figure 43). Les quelques motifs « en rond » observés sur ces cellules ne présentent pas de signal de FRET (non montré).

Suite au photoblanchiment graduel du fluorophore accepteur, nous observons une augmentation proportionnelle de l'intensité de fluorescence du fluorophore donneur (Figure 43 A et B). L'efficacité maximale de FRET mesurée est comprise entre 5 et 12 %, ainsi, cela suggère que les C1qGR et la calréticuline interagissent fortement à la surface de ces cellules.

Pour limiter le photoblanchiment artificiel, dû aux temps d'acquisition élevés (~ 5-10 min par expérience de photoblanchiment), nous avons mis à profit le test de systèmes confocaux à roue de Nipkow (« spinning disk »), dont les temps d'acquisition sont très courts (< 30 sec pour le même type d'analyse). Dans ces conditions, nous avons mené des mesures de FRET sur les cellules apoptotiques de formes rondes et les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 44.

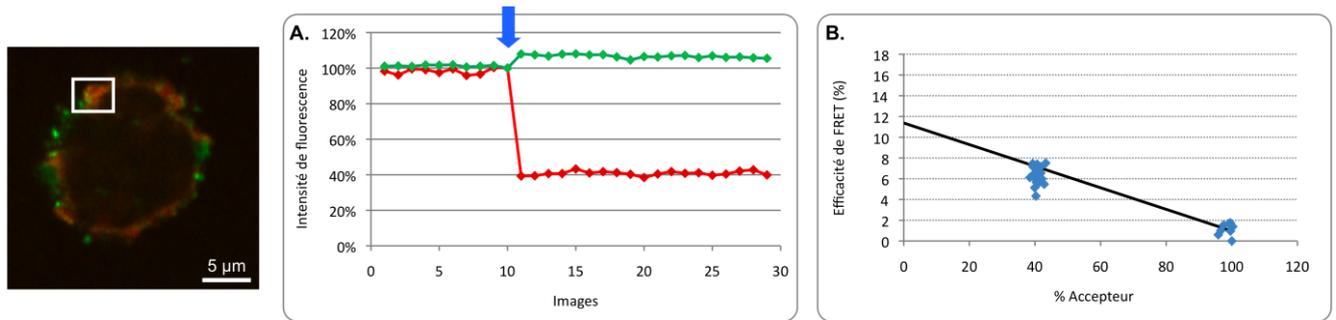


Figure 44 : Graphique représentatif de l'analyse des intensités de fluorescence observées sur un système confocal à roue de Nipkow après photoblanchiment et analyse de l'efficacité de FRET sur des cellules apoptotiques

Les cellules HeLa apoptotiques, présentant une forme ronde ont été fixées en PFA 4%, non perméabilisées, incubées avec les C1qGR puis immunomarquées pour la CRT et les C1qGR. (A) La courbe en rouge représente l'intensité de fluorescence en pourcentage associée aux C1qGR (Accepteur). La courbe en vert représente l'intensité de fluorescence en pourcentage associée à la CRT (Donneur). La flèche bleue marque le début du photoblanchiment du fluorophore accepteur. Le rectangle blanc correspond à la zone sélectionnée pour le photoblanchiment. L'analyse en microscopie confocale est effectuée sur un microscope Zeiss avec un objectif Plan-Apochromat 63x/1,4 à immersion (huile), caméra EMCCD, la taille de la trame des images est de 512 x 512 pixels. Le temps d'acquisition est de 14 images/sec avec une exposition de 35 msec/image. (B) Après mesure des intensités de fluorescence du fluorophore accepteur et donneur, l'efficacité de FRET obtenue sur ces cellules a été représentée en fonction du pourcentage d'intensité de fluorescence du fluorophore accepteur (points bleus). La droite en noir représente la relation de proportionnalité qu'il existe entre l'efficacité du FRET et le pourcentage de fluorescence de l'accepteur. L'efficacité de FRET maximale apparente est ici de 11,4%.

Sur la Figure 44 nous pouvons observer une augmentation nette de l'intensité de fluorescence du fluorophore donneur suite au photoblanchiment non graduel du fluorophore accepteur. L'efficacité de FRET observée est ici de 11,4%. Les temps d'acquisition étant beaucoup plus courts, aucun photoblanchiment expérimental n'a été observé. Nous pouvons ainsi confirmer la présence de FRET sur ces cellules.

Sur les cellules apoptotiques, nous avons donc obtenu des efficacités maximales de FRET comprises entre 5 et 12 %, ce qui suggère fortement que les C1qGR et la calréticuline interagissent à la surface de ces cellules.

Enfin, en observant nos cellules apoptotiques, nous avons remarqué certaines cellules présentant des bourgeonnements de la membrane. Afin de mieux caractériser l'interaction entre les C1qGR et la calréticuline, le même type d'analyse a ensuite été mené sur ces cellules, les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 45.

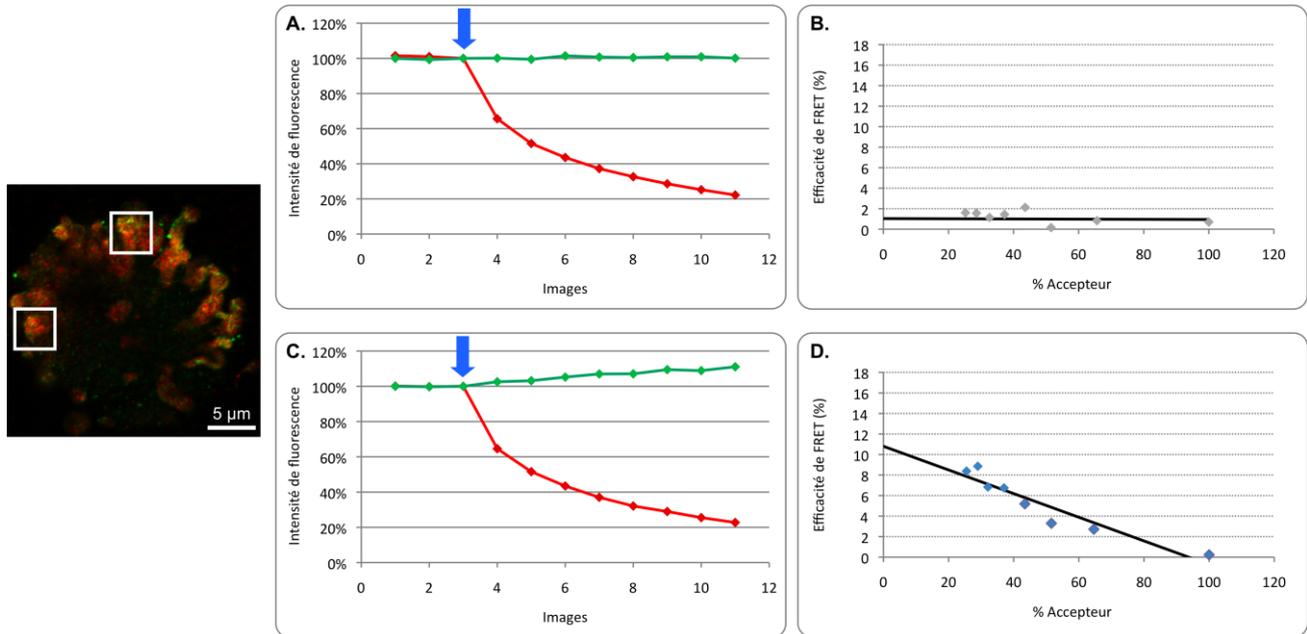


Figure 45 : Graphiques représentatifs de l'analyse des intensités de fluorescence après photoblanchiment et analyse de l'efficacité de FRET sur cellules présentant des bourgeons apoptotiques

Les cellules HeLa apoptotiques, présentant des bourgeonnements de la membrane, ont été fixées en PFA 4 %, non perméabilisées, incubées avec les C1qGR puis immunomarquées pour la CRT et les C1qGR. La courbe en rouge représente l'intensité de fluorescence en pourcentage associée aux C1qGR (Accepteur). La courbe en vert représente l'intensité de fluorescence en pourcentage associée à la CRT (Donneur). La flèche bleue marque le début du photoblanchiment du fluorophore accepteur (A et C). Après mesure des intensités de fluorescence du fluorophore accepteur et donneur, les efficacités de FRET obtenues en A et C, ont été représentées respectivement en (B) et (D) en fonction du pourcentage d'intensité de fluorescence du fluorophore accepteur (points bleus). La droite en noir représente la relation de proportionnalité qu'il existe entre l'efficacité du FRET et le pourcentage de fluorescence de l'accepteur. L'efficacité de FRET maximale apparente est ici nulle pour (B) et de 10.8 % pour (D).

Sur les cellules présentant des bourgeonnements membranaires, dans une phase plus tardive d'apoptose, deux types d'efficacité de FRET sont détectés. Le premier signal principalement observé est présenté sur la Figure 45 A et B et ne montre aucune présence de FRET. Le second signal détecté plus rarement et présenté sur la Figure 45 C et D. Ce signal est quand à lui proche des valeurs de FRET qui ont été obtenues et observées sur les cellules en apoptose plus précoce (~11 %).

1.2.3. Conclusion

Pour conclure, des différences importantes dans l'efficacité de FRET ont pu être observées. Les cellules viables présentent un signal de FRET peu significatif (maximum de 3 %). L'interaction entre C1qGR et la calréticuline est donc très peu présente à la surface de ces cellules.

Par contre, les cellules apoptotiques présentent une efficacité de FRET comprise entre 5 et 12 % indiquant la présence à leur surface d'une interaction forte entre les C1qGR et la calréticuline. Cependant, pour les cellules dont l'état d'apoptose est plus avancé, il semble que le choix de la cellule et même du bourgeon soit important pour observer la présence d'un signal de FRET. L'interaction entre les C1qGR et la calréticuline au niveau des bourgeons ne s'avère pas favorable.

Enfin, ces analyses suggèrent que l'interaction entre les C1qGR et la calréticuline existe à la surface de ces cellules mais que cette interaction dépend de l'avancement de l'apoptose. En effet, il semblerait que les motifs « en rond » disparaissent au profit des motifs « en ligne » avec l'apparition de l'apoptose. Par ailleurs, comme le signal de FRET n'est mesuré que dans des zones de colocalisation « en ligne », cela suggère que les colocalisations « en rond » correspondent à une autre organisation des protéines à la membrane. Cependant le rôle éventuel physiologique de ces motifs reste encore à déterminer.

1.3. Bilan

Les différentes stratégies développées utilisant des protéines de fusion ne nous ont pas permis d'effectuer des mesures de FRET. Les constructions exprimées transitoirement étant trop faiblement exportées à la surface ou encore donnant un signal disjoint de celui de la calréticuline, nous avons dû envisager une autre stratégie pour mesurer l'interaction de C1q et de la calréticuline à la surface des cellules.

Avec un marquage anticorps des C1qGR et de la calréticuline, nous avons pu obtenir un signal de FRET nous permettant de mettre en évidence une interaction à la surface des cellules. Nous avons également pu mettre en évidence une évolution de cette interaction à la surface des cellules en fonction de leur état d'apoptose.

2. Caractérisation de la calréticuline de surface

Les problèmes d'externalisation de nos constructions de calréticuline de fusion et leur comportement ont soulevé des questions sur leur exportation et sur la façon dont la calréticuline est retenue à la surface des cellules HeLa. Et notamment suite aux résultats obtenus avec les constructions SNAP, nous nous sommes demandés si la calréticuline de surface possède toujours sa séquence KDEL et si son clivage pourrait être à l'origine de son exportation à la surface des cellules.

2.1. Analyse des conditions de rétention de la calréticuline à la surface

La calréticuline ne possède pas de domaine transmembranaire permettant son ancrage à la membrane, une molécule adaptatrice résidente de la membrane plasmique et exprimée à la surface cellulaire apparaît donc nécessaire. Cependant, la façon dont celle-ci est retenue à la surface des cellules HeLa reste encore un mystère.

Afin de mettre en évidence les éventuelles interactions faibles de la calréticuline avec la membrane plasmique, des expériences utilisant une technique de « shaving » ont été mises en place.

Deux tampons différents ont été utilisés (voir le matériel et méthodes paragraphe 6.2.3) :

- un tampon de pH 7,4 et de force ionique supérieure à la force ionique physiologique soit 250 mM NaCl au lieu de 150 mM ;
- un tampon de pH 12 et de force ionique physiologique (150 mM NaCl).

La variation de la force ionique, va nous permettre de mettre en évidence l'implication d'interactions faibles dans la rétention à la membrane de la calréticuline. Si des interactions électrostatiques fortes permettent la rétention à la membrane de la calréticuline, une concentration en sel de 250 mM ne sera pas suffisante pour permettre la libération de la calréticuline. De plus une augmentation de la force ionique va augmenter l'organisation des molécules d'eau et va renforcer les interactions hydrophobes qui ont lieu avec la membrane et cela pourra éventuellement augmenter son interaction avec la membrane.

Le tampon de pH 12 va entraîner une modification de la protonation des chaînes latérales déstabilisant ainsi fortement les interactions qui peuvent avoir lieu à pH physiologique. Il est également possible que ce tampon entraîne une déstabilisation des structures protéiques, cette condition est considérée comme très drastique.

La libération de la calréticuline par les cellules HeLa viables dans le tampon de «shaving» a été analysée après précipitation au TCA par immunorévélation après séparation par électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).

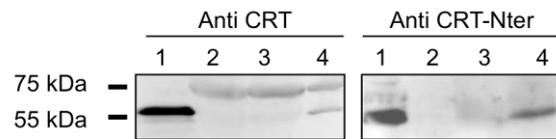


Figure 46 : Analyse de la libération de calréticuline après « shaving » de cellules HeLa

Détection de la CRT, dans un lysat total de cellules HeLa (1) libérée après un « shaving » avec du PBS (2), avec un tampon de plus forte concentration en sel entraînant une variation de la force ionique (3) et avec un tampon à pH basique (4). Les cellules HeLa viables ont été « shavées » puis le surnageant de « shaving » a été analysé après précipitation au TCA puis séparation sur gel d'acrylamide 10 % et immunorévélation par un anticorps dirigé contre la CRT humaine - épitope inconnu (SPA-601)- à gauche ou dirigé contre la partie Nter (8891)- à droite. 20 µg de lysat cellulaire sont déposés comme témoin de charge ; les témoins de masse moléculaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure.

Sur les deux immunorévélations, nous retrouvons en témoin la calréticuline de lysat de cellules HeLa à une masse apparente de 55 kDa (Figure 46, colonne 1).

On remarque, et ce quel que soit l'anticorps utilisé pour la détection, que lorsque les cellules sont « shavées » en PBS, aucune libération de calréticuline n'est observée (Figure 46, colonne 2). Les conditions dites « physiologiques » du PBS ne semblent pas avoir d'impact sur les interactions de la calréticuline avec la membrane.

Il en est de même pour les conditions faisant varier la force ionique (Figure 46, colonne 3). Cependant ces expériences n'ont pas pu être effectuées avec des concentrations plus élevées en sel, notamment 500 mM, car nos cellules ne le supportaient pas, une grande proportion des cellules (>50 %) étaient alors positives au bleu de trypan.

Le «shaving» avec un tampon basique semble être le seul à permettre la libération de la calréticuline (Figure 46, colonne 4). Des expériences en conditions acides (pH 5) ont également été effectuées mais la mortalité des cellules étant supérieure à 50 %, nous n'avons pas pu obtenir d'informations supplémentaires.

Par ailleurs, sur l'immunorévélation anti-calréticuline (SPA-601), on détecte faiblement dans les colonnes 2 à 4 (Figure 46, quadrant de gauche) une bande vers une masse apparente approximative de 75 kDa correspondant à la BSA (64 kDa) qui était présente en grande quantité dans le milieu de culture et qui a été solubilisée lors du «shaving».

Des expériences de «shaving» ont également été effectuées avec un tampon Trypsine-EDTA [0,5 mM EDTA ; 0,02 mM Trypsine ; PBS] et Versène [0,5 mM EDTA ; PBS]. La libération de la calréticuline n'a été observée qu'une seule fois, lors de 4 expériences indépendantes, avec le tampon

Trypsine-EDTA, il est fort probable que dans nos conditions la trypsine dégrade la calréticuline, ne nous permettant plus de la détecter. L'absence de libération de la calréticuline en tampon Versène a par contre été observée à plusieurs reprises. Il semblerait que les ions calcium ne soient pas impliqués dans des liaisons permettant la rétention de la calréticuline à la membrane.

Des expériences de « shaving » sur des cellules exprimant transitoirement les constructions de calréticuline ont également été menées mais la forte mortalité cellulaire n'a pas permis d'exploiter ces résultats.

Ces expériences de « shaving » nous permettent d'affirmer que toute la calréticuline n'est pas retenue à la membrane par des interactions covalentes, mais nous n'avons pas réussi à montrer un comportement similaire des fusions surexprimées.

2.2. Analyse de la présence de la séquence KDEL en position C-terminale sur la calréticuline de surface

Par ces expériences de « shaving », la présence de la séquence KDEL sur la calréticuline de surface a également été analysée.

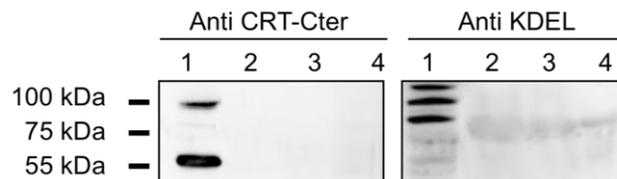


Figure 47 : Détection de la séquence C-terminale de la calréticuline libérée après « shaving » de cellules HeLa

Détection de la CRT, dans un lysat total de cellules HeLa (1) libérée après un « shaving » avec du PBS (2), avec un tampon à forte force ionique (3) et avec un tampon à pH basique (4). Les cellules HeLa viables ont été « shavées » puis le surnageant de « shaving » a été analysé après précipitation au TCA puis séparation sur gel d'acrylamide 10 % et immunorévélation par un anticorps dirigé contre la partie Cter de la CRT (Novus) ou dirigé contre la séquence KDEL stricte. 20 µg de lysat cellulaire sont déposés comme témoin de charge ; les témoins de masse moléculaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure.

Nous savons que de la calréticuline est libérée dans les conditions de «shaving» à pH 12, nous voulons donc déterminer si la séquence KDEL est toujours présente. Pour cela, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de la calréticuline murine reconnaissant une séquence de 16 acides aminés comprenant le KD du KDEL ou un anticorps dirigé contre la séquence KDEL stricte. Sur les deux immunorévélations, nous retrouvons en témoin la calréticuline de lysat de HeLa vers à une masse apparente approximative de 55 kDa, plus difficilement identifiable avec l'anti KDEL strict (Figure 47, colonne 1 sur les 2 quadrants). Après un « shaving » des cellules à pH 12 aucun signal n'est détecté (Figure 47, colonne 4). Si la séquence KDEL est clivée, il est possible qu'en absence d'une partie de l'épitope, à savoir le KD, l'anticorps anti CRT-C-terminale ne soit plus capable de reconnaître sa séquence cible. Par ailleurs, le faible signal obtenu pour la calréticuline du lysat par l'anti KDEL pose des questions sur son affinité pour le KDEL de la calréticuline et sur son éventuelle capacité à détecter celle-ci après shaving des cellules. Il est possible que les quantités de calréticuline libérées lors du «shaving» soient trop faibles pour obtenir un signal.

Ces expériences ne nous permettent malheureusement pas de statuer sur la présence ou non de la séquence KDEL au niveau de la calréticuline de surface, mais suggèrent que la partie C-terminale de la protéine solubilisée est soit tronquée soit masquée après un « shaving » à pH basique.

2.3. Bilan

Nous avons donc montré ici, par des expériences de « shaving », qu'une partie de la calréticuline n'est pas retenue à la membrane, par des interactions covalentes ou par des interactions dans lesquelles le calcium serait impliqué.

Ghiran et collaborateurs ont mis en évidence la rétention de la calréticuline à la surface des neutrophiles via des interactions de type ionique non dépendantes du calcium et nécessitant une interaction avec une protéine des rafts lipidiques et possédant une ancre GPI, identifiée comme CD59 [Ghiran *et al.* 2003]. Cependant, CD59 n'est pas exprimé par les cellules HeLa, il ne peut donc pas être son partenaire dans notre modèle. D'autres partenaires de la calréticuline de surface ont aussi été mis en évidence, notamment par Arosa et collaborateurs impliquant le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) à la surface de lymphocytes extraits du sang périphérique [Arosa *et al.* 1999]. Garg et collaborateurs ont également montré une interaction indépendante des rafts lipidiques entre la calréticuline et CD91/LRP à la surface des cellules MEF [Garg *et al.* 2012].

Dans notre modèle, ERp57 pourrait être un partenaire pouvant favoriser son exportation ainsi que sa rétention à la membrane [Panaretakis *et al.* 2008].

Dans le cas de nos protéines de fusion, l'interaction de la calréticuline avec ses partenaires membranaires potentiels pourrait être diminuée et permettrait d'expliquer les problèmes rencontrés pour l'exportation de nos protéines de fusion.

De plus, nos expériences ne permettent pas d'affirmer avec certitude l'absence de la séquence KDEL de la calréticuline exposée à la surface des cellules HeLa. Elles suggèrent uniquement l'absence du KDEL dans la fraction de calréticuline solubilisée à pH basique. Par des expériences de biotinylation de surface, l'équipe d'Eggleton affirme l'absence de celle-ci sur la calréticuline exposée à la surface de Jurkat [Tarr *et al.* 2010], par contre l'équipe d'Agostinis met en avant sa présence à la surface des cellules MEF [Garg *et al.* 2012]. La présence de la séquence KDEL au niveau de la calréticuline de surface ou son éventuel clivage restent encore mal connus et des études plus approfondies semblent encore nécessaires.

3. Etude fonctionnelle de l'interaction C1q-calréticuline au cours de la phagocytose.

3.1. Développement d'un test de phagocytose

Pour étudier le rôle de l'interaction de C1q avec la calréticuline au cours de la phagocytose, nous avons utilisé un modèle dans lequel plusieurs variables sont modulables.

Les différents éléments qui ont été modulés dans ce test sont : le type de cellules phagocytaires, l'état d'apoptose des cellules phagocytées, la quantité de C1q présente et enfin la quantité de calréticuline exprimée par les cellules phagocytées (Figure 48).

La phagocytose a ensuite été évaluée par cytométrie en flux comme présenté dans le matériel et méthodes paragraphe 5.2.

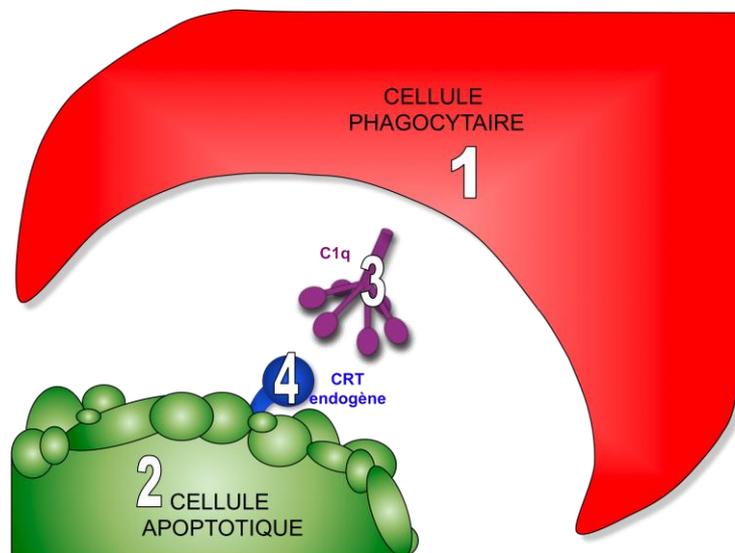


Figure 48 : Présentation du modèle de phagocytose utilisé pour étudier l'interaction fonctionnelle de C1q et de la calréticuline

Dans le modèle de phagocytose utilisé pour la caractérisation de l'interaction fonctionnelle de C1q-CRT plusieurs paramètres ont été modulés, à savoir : le type de cellules phagocytaires (1), l'état d'apoptose des cellules phagocytées (2), la quantité de C1q présente (3) et enfin la quantité de calréticuline exprimée par les cellules phagocytées (4).

3.1.1. Les cellules phagocytaires

Dans notre modèle, plusieurs types de cellules phagocytaires ont été utilisés : des cellules dendritiques (moDC), des monocytes et des macrophages dérivés de THP-1 (THP-1-m).

Les monocytes et les cellules dendritiques sont fournis par l'EFS certifiant la caractérisation de leurs cellules (les caractéristiques sont présentées dans le matériel et méthodes au paragraphe 1.1). Les macrophages issus de la différenciation des THP-1 après induction aux esters de phorbol (PMA) sont produits et caractérisés au laboratoire.

Dans un premier temps, les modifications morphologiques induites par 5 nM [Rehfeldt *et al.* 1993], 10 nM [Schwende *et al.* 1996; Park *et al.* 2007b] et 160 nM [Tsuchiya *et al.* 1982; Jones *et al.* 2008] de PMA pendant 72h ont été analysées en microscopie optique (Figure 49).

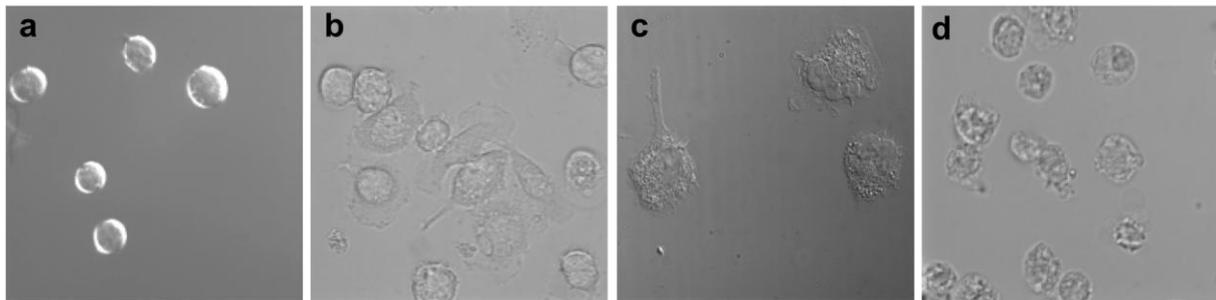


Figure 49 : Caractérisation morphologique par microscopie des THP-1 après 72h d'induction au PMA. Différentes concentrations de PMA ont été testées selon les données de la littérature pendant 72h. Les cellules THP-1 non induites (a) et induites par 5 nM (b), 10 nM (c) et 160 nM (d) ont été caractérisées en microscopie optique (60x) pour l'évolution de leur morphologie.

Sur la Figure 49 nous pouvons observer les modifications morphologiques induites par le PMA. Les cellules THP-1 sont des cellules que l'on cultive en suspension (Figure 49 a), 5 nM de PMA pendant 72h induit une adhérence de 85 % des cellules en culture (Figure 49 b), mais seule une concentration de 10 nM permet d'induire l'adhérence de toutes les cellules en culture (Figure 49 c). Un traitement avec 160 nM de PMA pendant 72h (Figure 49 d) entraîne bien l'adhérence des cellules mais également, contrairement aux autres conditions, une importante mort cellulaire (15 % de la population est marquée au bleu de trypan) ce qui ne permet pas d'envisager des analyses fonctionnelles.

Suite à ces observations, nous avons donc décidé de différencier nos THP-1 en macrophages par 10 nM de PMA pendant 72h.

Dans un second temps, la caractérisation phénotypique des THP-1 induits par 10 nM de PMA pendant 72h a été approfondie en analysant l'expression de différents marqueurs des macrophages : CD14, CD11b, CD11c, HLA-DR et CD54/ICAM-1 ; présentés dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Marqueurs de surface des macrophages		
Marqueurs de surface	Fonction	Expression
CD14	Corécepteur (avec TLR4 et MD-2) pour le lipopolysaccharide bactérien (LPS) et d'autres motifs moléculaires associés aux micro-organismes pathogènes.	Marqueur des lignées cellulaires myéloïdes, des monocytes et également des THP-1 induits au PMA ^{1,2}
CD11b	CD11b (chaîne αM) qui associé avec CD18 forme l'intégrine $\alpha M\beta 2$, intervenant dans la phagocytose.	Marqueur exprimé à la surface des macrophages dont l'expression augmente à la surface des THP-1 induits au PMA ¹
CD11c	CD11c (chaîne αX) qui associé avec CD18 forme l'intégrine $\alpha X\beta 2$, intervenant dans la migration, dans la production des cytokines mais également dans la phagocytose.	Marqueur exprimé à la surface des macrophages dont l'expression augmente à la surface des THP-1 induits au PMA ³
HLA-DR	Molécule d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) récepteur de surface cellulaire codé par le complexe antigène leucocytaire humain. Permet la présentation de peptides antigéniques.	Marqueur des macrophages dont l'expression est légèrement diminuée après induction des THP-1 au PMA ⁴
CD54/ICAM-1	Molécule d'adhésion cellulaire, présente principalement sur les cellules endothéliales.	Marqueur des monocytes et macrophages dont l'expression est augmentée après induction des THP-1 au PMA ^{5,6}

¹[Schwende *et al.* 1996], ²[Daigneault *et al.* 2010], ³[Prieto *et al.* 1994], ⁴[Kohro *et al.* 2004], ⁵[Cutolo *et al.* 2001], ⁶[Rutault *et al.* 2001]

La présence de ces marqueurs à la surface des THP-1 non induits et induits au PMA est donc analysée par cytométrie en flux et présentée sur la Figure 50.

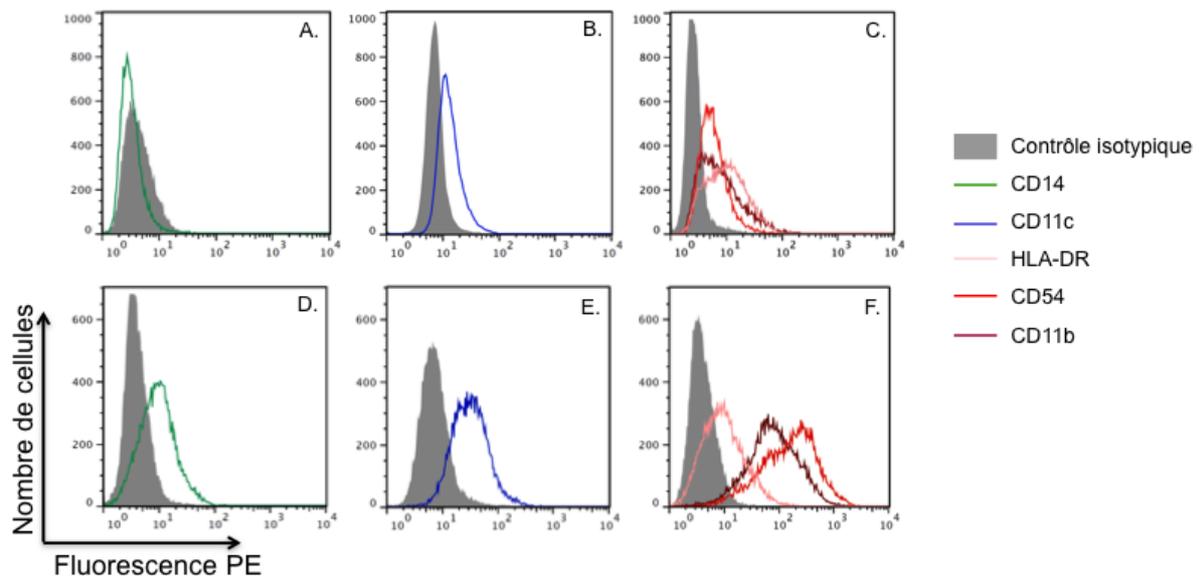


Figure 50 : Caractérisation par cytométrie en flux des THP-1 avant et après traitement au PMA

Les cellules THP-1 non induites (A-C) ont été caractérisées pour leur marquage CD14 (A), CD11c (B), HLA-DR, CD54 et CD11b (C). Ces mêmes cellules une fois induites en macrophages pendant 72h par 10 nM de PMA (D-F) ont été caractérisées pour leur marquage CD14 (D), CD11c (E), HLA-DR, CD54 et CD11b (F). Le contrôle isotypique est identique pour le marquage HLA-DR, CD54 et CD11b car les anticorps utilisés sont de même type. Les marquages CD14 et CD11c sont présentés séparément car les isotypes sont différents.

Sur la Figure 50 A, nous pouvons voir que les cellules THP-1 non induites sont dépourvues de marquage CD14, comme préalablement observé par Tamai et collaborateurs et également par Kremlev et Phelps [Kremlev *et al.* 1997; Tamai *et al.* 2003]. Cependant, un marquage basal pour le CD11c mais également HLA-DR, CD54 et CD11b est présent sur les cellules non induites (Figure 50 B et C).

Une fois les THP-1 traités au PMA, nous observons une augmentation de l'ensemble des marquages sauf celui d'HLA-DR (Figure 50 D à F). Les plus grandes augmentations sont observées pour le CD11b où le marquage est 9 fois supérieur une fois les cellules induites (MFI sans PMA = 13,9, MFI avec PMA = 125) et pour le CD54 (augmentation de 30 fois : MFI sans PMA = 7,41, MFI avec PMA = 251).

L'augmentation des marqueurs caractéristiques des macrophages confirme que l'induction au PMA des THP-1 entraîne bien leur différenciation en macrophages.

Dans la suite du manuscrit, les macrophages obtenus de cette façon seront annotés THP-1-m.

Sachant que les macrophages sont connus pour produire et exposer à leur surface du C1q [Walker 1998] mais qu'ils possèdent également des récepteurs pour C1q [Taylor *et al.* 2005], nous avons cherché à observer la présence de C1q à la surface des THP-1-m afin de vérifier si ceux-ci l'expriment et s'ils peuvent le fixer.

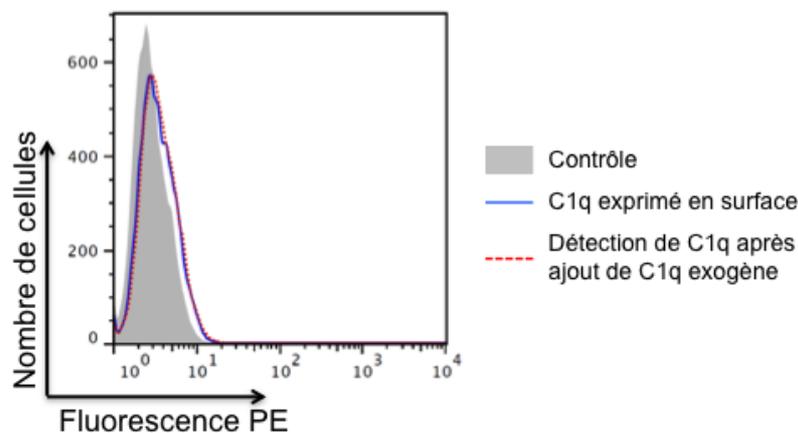


Figure 51 : Détection par cytométrie en flux du C1q présent à la surface des THP-1-m en présence ou en absence de C1q exogène

C1q est détecté à la surface des cellules THP-1 induites en macrophages par 10 nM de PMA pendant 72h (courbe bleu). La fixation de 25 µg/mL de C1q exogène à la surface est également évaluée (courbe rouge). C1q est détecté à l'aide d'un anticorps anti-C1q (JL-1) révélé par un anticorps secondaire couplé à la Cy3. Le contrôle est effectué uniquement avec l'anticorps secondaire.

Sur la Figure 51 nous pouvons voir que nos cellules exposent à leur surface du C1q (courbe bleu), cela est en accord avec les observations de D.G. Walker en 1998.

Cependant, l'ajout de C1q exogène n'accroît pas le signal (courbe rouge), ce qui suggère que les THP-1-m isolés ne présentent pas de récepteurs disponibles pour fixer le C1q exogène. Il est tout de même possible que cette situation évolue au cours d'une réaction de phagocytose.

Enfin, dans l'objectif d'évaluer la capacité de phagocytose des THP-1-m, un test a été effectué avec des billes de latex fluorescentes d'un diamètre de 2 μm et possédant des groupements carboxylate mimant les sucres présents à la surface des cellules (SIGMA L3030).

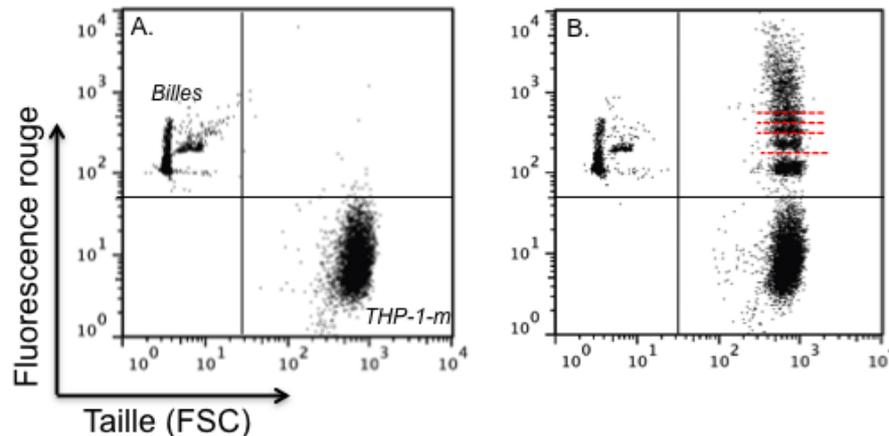


Figure 52 : Analyse de la phagocytose de billes par des THP-1-m

Phagocytose de billes (fluorescence rouge $\lambda_{\text{ex}} \sim 575 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} \sim 610 \text{ nm}$) par des cellules THP-1-m. Aucun marquage des THP-1-m n'est effectué. Les billes et les macrophages sont mélangés juste avant l'analyse en cytométrie en flux (A) ou sont mis en contact pendant 30 min à 37°C et sont ensuite analysés (B). Représentation en nuage de points selon la taille (FCS) et la fluorescence rouge. Les traits rouges mettent en évidence des populations de cellules ayant phagocyté une ou plusieurs billes.

Les billes utilisées pour ce test de phagocytose possédant une fluorescence rouge et étant de petite taille, il a été facile de les discriminer des THP-1-m. En absence d'incubation (Figure 52 - A), les billes apparaissent dans le quadrant en haut à gauche et les THP-1-m dans celui en bas à droite. Aucune interaction entre les billes et les THP-1-m n'est visible. Après une période de mise en contact de 30 min, les THP-1-m ayant phagocyté des billes se trouvent dans le quadrant en haut à droite, nous pouvons même différencier des populations de cellules ayant phagocyté 1, 2, 3, 4 billes et même plus, selon le niveau de fluorescence (séparation avec les traits rouges sur la Figure 52 - B).

Des tests identiques ont par ailleurs été effectués sur des cellules THP-1 non induites et aucune phagocytose n'a été observée (non montré).

Nous pouvons de ce fait valider une méthode d'induction des THP-1 en macrophages fonctionnels.

3.1.2. Etat d'apoptose des cellules phagocytées

Pour induire l'apoptose différentes techniques ont été utilisées : l'irradiation aux UV et le traitement à la mitoxantrone (selon les conditions décrites dans le matériel et méthodes au paragraphe 1.3). L'analyse de l'apoptose des différents types cellulaires (HeLa ARNi, MEF CRT WT ou MEF CRT^{-/-}) a été réalisée à l'aide d'un marquage à l'annexine-V et à l'iodure de propidium (Pi) en fonction de l'inducteur.

Plusieurs temps ont été testés après l'induction de l'apoptose afin de trouver des conditions d'apoptose applicables à nos différents types cellulaires (Figure 53 et Figure 55).

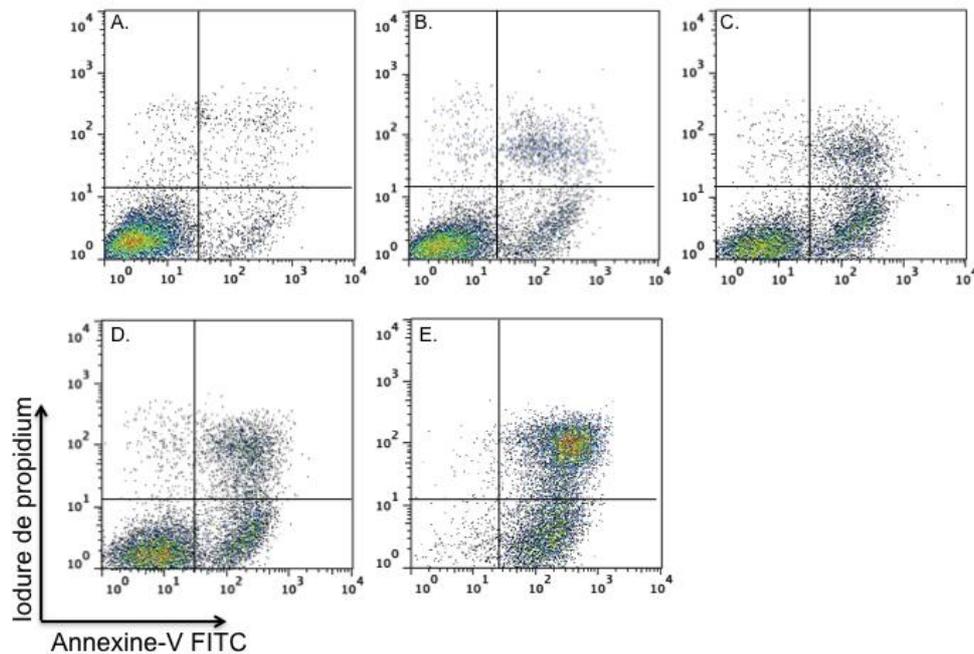


Figure 53 : Evolution de l'apoptose des cellules HeLa traitées par ARNi CRT après irradiation aux UV

Les cellules HeLa ARNi CRT non irradiées (A) ou irradiées et incubées pendant 2h (B), 4h (C), 6h (D) et 20h (E) sont représentées en nuage de points selon leur marquage Annexine-V/Pi. Les variations de couleurs correspondent à la fréquence relative des sous populations (en rouge les fortes fréquences et en bleu les faibles).

Lorsque nous regardons l'évolution de l'apoptose après induction par irradiation aux UV des cellules HeLa traitées par ARNi (Figure 53), nous remarquons dans un premier temps le déplacement de la population des cellules du quadrant en bas à gauche (AV⁻, Pi⁻) principalement vers le quadrant en bas à droite (AV⁺, Pi⁻) puis dans un second temps vers le quadrant en haut à droite (AV⁺, Pi⁺). Les cellules HeLa traitées ARNi contrôle ou ARNi CRT se comportent de façon similaire.

Par contre, l'apoptose des cellules HeLa induite par traitement à la mitoxantrone n'étant que peu décrite dans la littérature, une mise au point des conditions d'induction a été réalisée. Les résultats ainsi obtenus sont présentés en Figure 54.

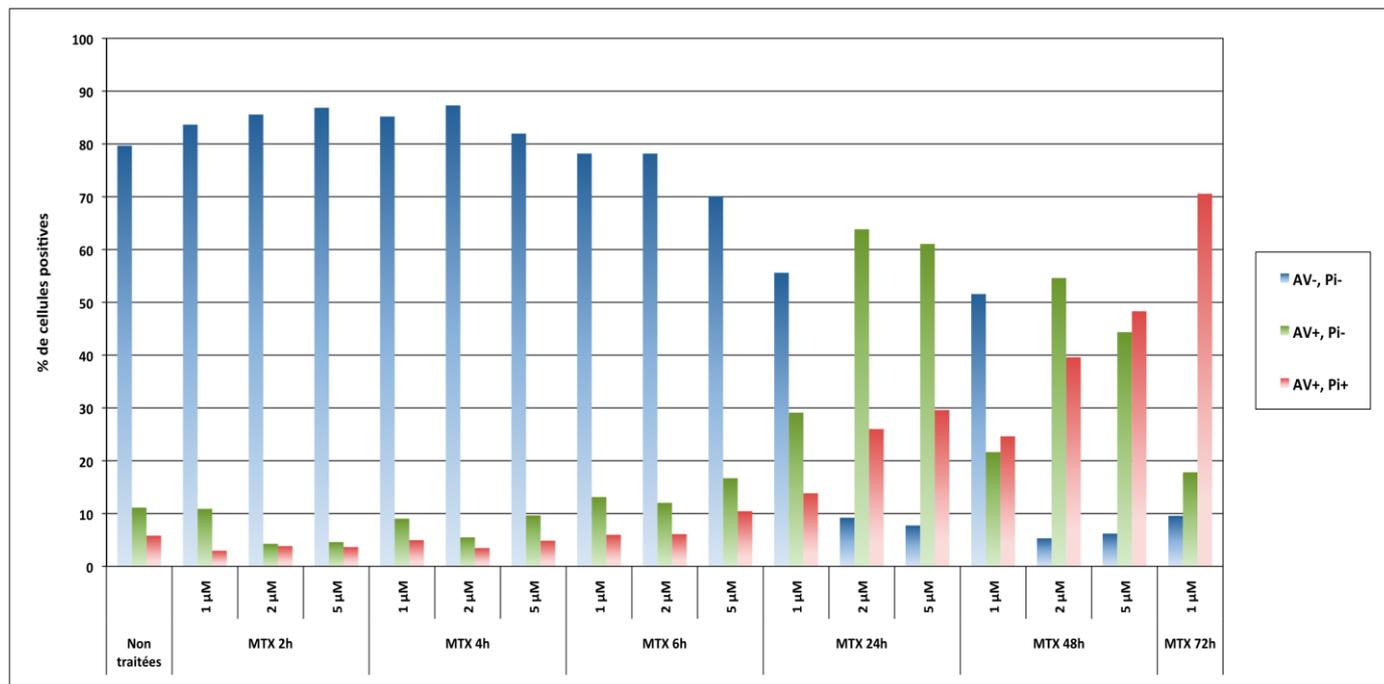


Figure 54 : Quantification du marquage Annexine-V/Pi des cellules HeLa en fonction de la concentration en mitoxantrone et du temps de traitement

Le marquage Annexine-V/Pi des cellules HeLa a été quantifié en fonction de différentes concentrations de mitoxantrone et temps de traitement courts (2, 4, 6h) ou longs (24, 48, 72h). Plusieurs catégories définies dans le matériel et méthodes ont été analysées : AV⁻, Pi⁻ (bleu) ; AV⁺, Pi⁻ (vert) et AV⁺, Pi⁺ (rouge).

Dans la littérature, la concentration de mitoxantrone principalement utilisée est de 1 μM. Nous avons donc testé en premier cette concentration. Comme nous pouvons le constater sur la Figure 54 l'induction des cellules HeLa par 1 μM de mitoxantrone nécessite des temps longs de traitement (72h) afin d'obtenir une population qui ne soit plus majoritairement AV⁻, Pi⁻.

Ces temps de traitement étant peu adaptés à notre test, d'autres concentrations de mitoxantrone ont été testées. Lorsque les cellules sont traitées avec 2 ou 5 μM de mitoxantrone, 3 grandes tendances deviennent visibles. Pour des temps de traitement inférieurs à 6h, nous observons majoritairement une population AV⁻, Pi⁻. Après un traitement de 24h, la population devient alors majoritairement AV⁺, Pi⁻. Pour des temps de traitement supérieurs à 24h la population présente principalement un marquage AV⁺, Pi⁺. Un effet de concentration est également visible dans l'évolution des populations. Une concentration de 5 μM semblant induire plus rapidement l'apparition d'une population AV⁺, Pi⁻ puis AV⁺, Pi⁺, nous avons choisi cette concentration pour induire l'apoptose des cellules HeLa ARNi.

L'induction de l'apoptose par irradiation des cellules MEF a été évaluée de la même façon que pour les cellules HeLa. Par contre, l'induction de l'apoptose par la mitoxantrone sur les cellules MEF étant très bien renseignée dans la littérature, nous avons choisi un traitement par 1 μM de

mitoxantrone et évalué l'évolution du marquage Annexine-V/iodure de propidium. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 55.

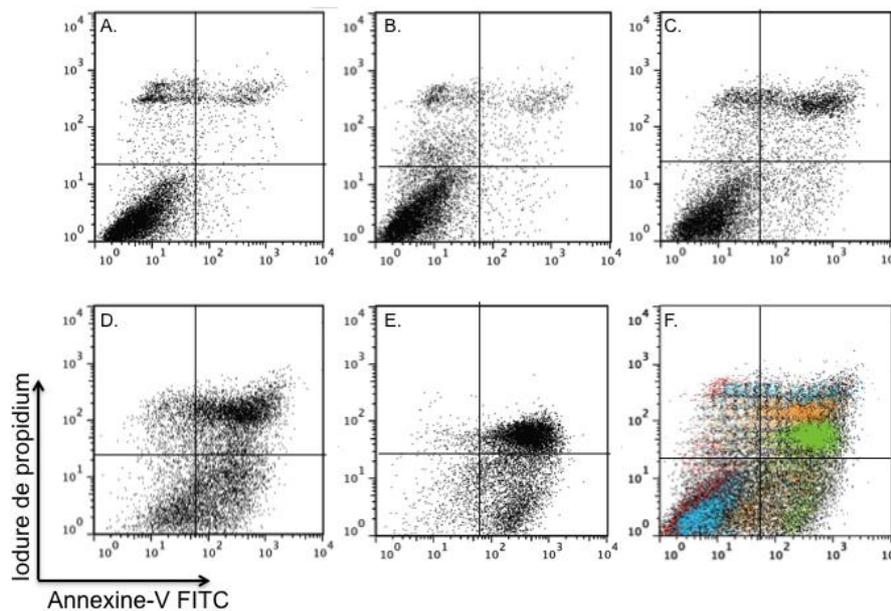


Figure 55 : Evolution de l'apoptose des cellules MEF CRT^{-/-} en fonction du temps de traitement à la mitoxantrone

Les cellules MEF CRT^{-/-} contrôles traitées DMSO pendant 24h (A) ou traitées par 1 μ M de MTX pendant 2h (B), 4h (C), 6h (D) et 24h (E) sont représentées en nuage de points selon leur marquage Annexine-V/Pi. La figure (F) représente l'évolution du marquage en fonction du temps d'induction (rouge : 2h, bleu : 4h, orange : 6h et vert : 24h).

Lorsque nous regardons l'évolution de l'apoptose des cellules MEF CRT^{-/-} après induction par traitement à la mitoxantrone (Figure 55), nous remarquons, comme précédemment observé pour les cellules HeLa traitées par ARNi, un déplacement de la population de cellules du quadrant en bas à gauche (AV⁻, Pi⁻) vers le quadrant en haut à droite (AV⁺, Pi⁺). Cependant, contrairement aux cellules HeLa, le déplacement de la population d'un marquage AV⁻, Pi⁻ vers un marquage AV⁺, Pi⁻ (quadrant en bas à droite) semble quasiment inexistant. Seul un faible nombre de cellules AV⁺, Pi⁻ est détecté au niveau de la Figure 55 D et E ; la population de cellules semble donc passer directement d'un marquage AV⁻, Pi⁻ à un marquage AV⁺, Pi⁺.

De plus, un autre type de population, non observé jusqu'ici, apparaît au niveau des Figure 55 A à C dans le quadrant en haut à gauche (AV⁻, Pi⁺). Ces cellules n'exposent pas la phosphatidylsérine sur la face externe de leur membrane plasmique et leur mort a été caractérisée comme un type de mort cellulaire non-apoptotique [Hirt *et al.* 2000; Degterev *et al.* 2008].

Il apparaît ainsi que nos différents types cellulaires réagissent différemment à l'induction de l'apoptose, l'ensemble des résultats obtenus est intégré à l'histogramme récapitulatif en Figure 56. Les conditions permettant d'obtenir des populations apoptotiques similaires (marquage Annexine-V/Pi homogènes), en fonction de nos différents types cellulaires, y sont également présentées.

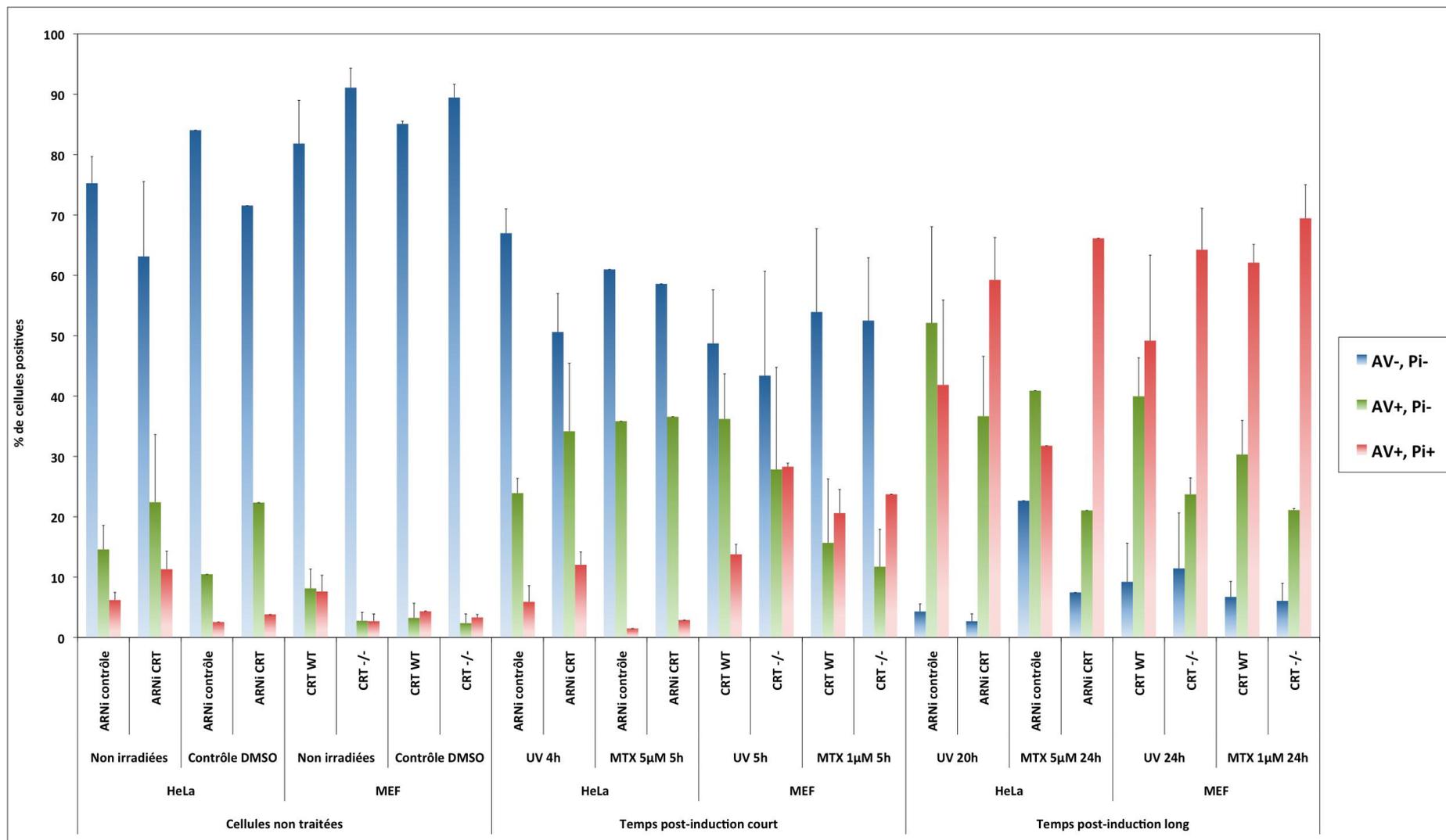


Figure 56 : Quantification du marquage Annexine-V/Pi des différents types cellulaires en fonction des différents inducteurs et du temps post-induction

Le marquage Annexine-V/Pi, des cellules HeLa ARNi et MEF CRT WT ou CRT-/- a été quantifié en fonction de différents inducteurs (irradiation aux UV ou MTX) et de temps post induction (court ou long). Plusieurs catégories définies dans le matériel et méthodes ont été analysées : AV⁻, Pi⁻ (bleu) ; AV⁺, Pi⁻ (vert) et AV⁺, Pi⁺ (rouge). Ici n = 1 ou 3 expériences ± SD.

La quantification de la population cellulaire en fonction du marquage Annexine-V/Pi nous a permis de mettre en évidence 3 grands types de populations :

- Les cellules analysées en absence d'induction « non traitées » qui présentent majoritairement un marquage AV⁻, Pi⁻ et peuvent ainsi être qualifiées de cellules viables. La faible proportion de marquage AV⁻, Pi⁺ et AV⁺, Pi⁺ étant une conséquence normale de l'évolution des cellules entretenues en culture.
- Les cellules analysées après un temps post-induction court qui présentent une diminution de la quantité de cellules viables et une augmentation principalement de la population AV⁺, Pi⁻. On parlera alors de cellules apoptotiques précoces.
- Les cellules analysées après un temps post-induction long qui présentent une population principalement répartie entre le marquage AV⁺, Pi⁻ et AV⁺, Pi⁺ et une disparition quasi-totale de la population AV⁻, Pi⁻. On parlera alors de cellules apoptotiques tardives.

Ainsi, il a été possible de déterminer les conditions d'induction nécessaires (UV ou mitoxantrone) définissant 3 populations caractérisées par des états apoptotiques différents. Les valeurs du marquage Annexine-V/Pi et les inductions associées permettant de déterminer ces états d'apoptose sont présentées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Détermination des conditions d'apoptose des cellules				
	Pi⁻, AV⁻	Pi⁻, AV⁺	Pi⁺, AV⁺	Induction
Viables	> 70 %	< 20 %	< 10 %	Absence d'irradiation Contrôle DMSO 24h
Apoptose précoce	< 65 %	20-40 %	< 25%	5 ou 4h post-irradiation UV 1 ou 5 μM MTX pendant 5h
Apoptose tardive	< 15 %	20-55%	> 40 %	24 ou 20h post-irradiation UV 1 ou 5 μM MTX pendant 24h

Les populations apoptotiques précoces et tardives étudiées dans la suite de mon manuscrit sont toutes définies selon les critères ci-dessus.

3.1.3. Effet de C1q

Afin de déterminer la quantité de C1q à utiliser dans notre modèle, un test préliminaire sur des cellules HeLa viables et apoptotiques en présence de différentes concentrations de C1q a été réalisé (Figure 57).

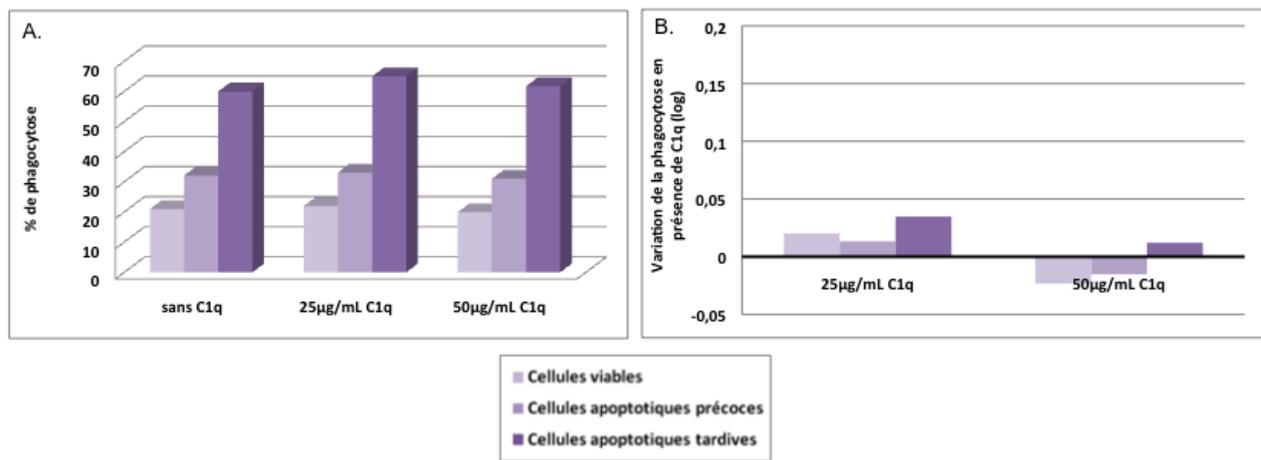


Figure 57 : Effet de C1q sur la phagocytose des cellules HeLa viables et apoptotiques

(A) Evaluation du pourcentage de phagocytose par des THP-1-m de cellules HeLa dont l'apoptose a été induite par MTX en présence de 25 ou 50 µg/mL de C1q. (B) Détermination de la variation de la phagocytose induite par la présence de C1q (voir matériel et méthodes paragraphe 5.2).

Les concentrations de C1q ont été choisies d'après les études publiées par l'équipe de Tenner [Fraser *et al.* 2009].

La phagocytose de cellules HeLa traitées ou non à la mitoxantrone a été évaluée en présence de différentes concentrations de C1q. Nous pouvons remarquer sur la Figure 57 A une augmentation du pourcentage de phagocytose en fonction de l'avancement de l'état d'apoptose. Le pourcentage de phagocytose s'échelonne de 20 % (cellules viables) à 60 % (cellules apoptotiques tardives). Néanmoins sur cette figure il est difficile de mettre en évidence les variations de la phagocytose en fonction de la dose de C1q.

Afin de mieux visualiser la faible variation induite en présence de C1q, nous avons représenté la valeur du log de la phagocytose en présence de C1q par rapport à la phagocytose sans C1q, les valeurs obtenues sont présentées sur la Figure 57 B. Ainsi, en présence de 25 µg/mL de C1q la phagocytose augmente très faiblement d'une valeur de 0,02 à 0,035 log. Cependant l'ajout de 50 µg/mL de C1q semble avoir un effet négatif sur la phagocytose (selon nos paramètres d'analyse). Néanmoins ces variations restent extrêmement faibles.

Une autre expérience uniquement sur des cellules HeLa en apoptose tardive (UV) a également été effectuée, les valeurs log de la variation induite par des concentrations croissantes de C1q sont présentées sur la Figure 58.

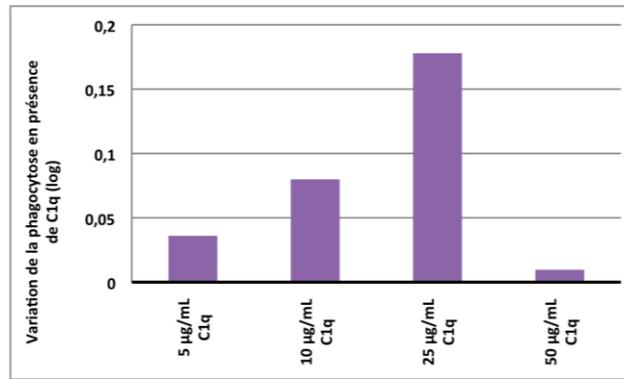


Figure 58 : Effet de C1q sur la phagocytose des cellules HeLa apoptotiques tardives

Variation de la phagocytose de cellules HeLa apoptotiques tardives (UV) en présence de concentrations croissantes de C1q (voir matériel et méthodes paragraphe 5.2).

Des résultats similaires à ceux obtenus précédemment sont observables, à savoir une augmentation croissante de la phagocytose d'une valeur de 0,03 à 0,17 log en présence de 5 µg/mL à 25 µg/mL de C1q. L'ajout de 50 µg/mL de C1q semble avoir moins d'effet sur la phagocytose car il entraîne une augmentation de seulement une valeur de 0,01 log.

D'autre part, il semblerait que l'effet de C1q sur la phagocytose soit plus prononcé sur les cellules HeLa dont l'apoptose a été induite aux UV par rapport à la mitoxantrone (valeurs de log plus élevées).

Nous avons donc choisi d'effectuer nos tests avec 25 µg/mL de C1q, quantité nous permettant d'observer un effet maximal de C1q dans nos conditions de phagocytose et ce quelque soit l'état d'apoptose de nos cellules et la méthode d'induction.

Des tests préliminaires ont également été effectués avec des cellules dendritiques mais aucun effet de C1q n'a été mis en évidence pour ces cellules, les expériences n'ont donc pas été poursuivies avec ces cellules (résultats non montrés).

3.1.4. Niveau d'expression de la calréticuline des cellules phagocytées

Deux modèles cellulaires (HeLa et MEF) ont été utilisés pour étudier l'effet de la calréticuline. Nous avons analysé pour chacun d'eux les variations relatives de calréticuline exprimée par les cellules déplétées ou déficientes en calréticuline comparativement au contrôle.

Afin d'obtenir des cellules déplétées en calréticuline, nous avons transfecté transitoirement les cellules HeLa avec des ARNi spécifiques de l'ARNm de la calréticuline. Le niveau d'expression de la calréticuline a été évalué par SDS-PAGE et immunorévélation. La Figure 59 montre une expérience représentative.

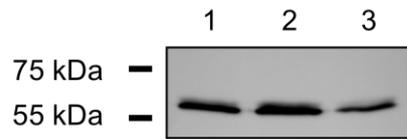


Figure 59 : Analyse de l'expression de la calréticuline dans les cellules HeLa

L'expression de la CRT, dans les cellules HeLa témoin (1) ARNi contrôle (2) ou ARNi CRT (3), est analysée par séparation sur gel d'acrylamide 10 % et immunorévélation par un anticorps dirigé contre la CRT humaine ; 20 µg de chaque lysat cellulaire sont analysés ; les témoins de masse moléculaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure, l'intensité des bandes a été évaluée avec ImageJ (RSB Software).

Sur la Figure 59 nous avons pu évaluer à 60 % la diminution de l'expression de la calréticuline, suite à la transfection d'ARNi spécifique de la calréticuline, par rapport à la quantité de calréticuline présente dans les cellules transfectées par ARNi contrôle.

L'expression de la calréticuline après traitement ARNi a été diminuée de 50 à 80 % dans nos expériences de phagocytose. La diminution de la calréticuline a également été analysée par microscopie à épifluorescence suite à un marquage intracellulaire dirigé contre la calréticuline. Une grande variabilité a été observée entre les cellules, certaines apparaissent positives et d'autres totalement négatives. Il est possible que la diminution observée en western blot ne soit qu'un taux moyen non représentatif de ce qui se passe à l'échelle cellulaire, mais en absence de témoin de transfection, cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée. Par ailleurs, la diminution en surface de la calréticuline a été confirmée au laboratoire par biotinylation de surface et confirme la réduction observée en western blot [Paidassi *et al.* 2011].

L'absence d'expression de la calréticuline par les cellules MEF CRT -/- a également été testée. Les cellules MEF étant des lignées stables, le contrôle de l'expression n'a pas été effectué à chaque expérimentation mais a été régulièrement vérifiée (Figure 60).

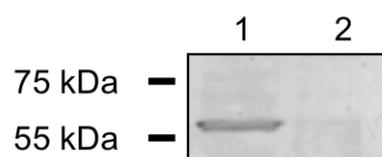


Figure 60 : Analyse de l'expression de la calréticuline dans les cellules MEF

L'expression de la CRT, dans les cellules MEF CRT WT (1) ou CRT -/- (2), est analysée par séparation sur gel d'acrylamide 10 % et immunorévélation par un anticorps dirigé contre la CRT murine ; 20 µg de chaque lysat cellulaire sont analysés ; les témoins de masse moléculaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure.

La calréticuline endogène est détectée dans les cellules MEF CRT WT (Figure 60) avec une masse apparente approximative de 55 kDa légèrement supérieure à la masse moléculaire calculée (47 kDa) comme précédemment observé pour les HeLa. La calréticuline n'est pas détectée dans les cellules MEF CRT^{-/-}, confirmant ainsi l'inactivation du gène de la calréticuline.

L'utilisation de cellules HeLa partiellement déplétées en calréticuline (HeLa traitées par ARNi) ou de cellules MEF totalement déficientes en calréticuline (CRT^{-/-}) nous permettra d'évaluer l'effet de la calréticuline au niveau de la cellule phagocytée sur la phagocytose.

3.2. Etude de l'effet de C1q et de la calréticuline sur la phagocytose des THP-1-m

3.2.1. Phagocytose de cellules HeLa partiellement déplétées en calréticuline

3.2.1.1. Quantification de la phagocytose et impact de la calréticuline

Dans un premier temps, nous avons évalué la phagocytose des cellules HeLa transfectées par ARNi suite à une induction de l'apoptose par irradiation aux UV ou par traitement à la mitoxantrone.

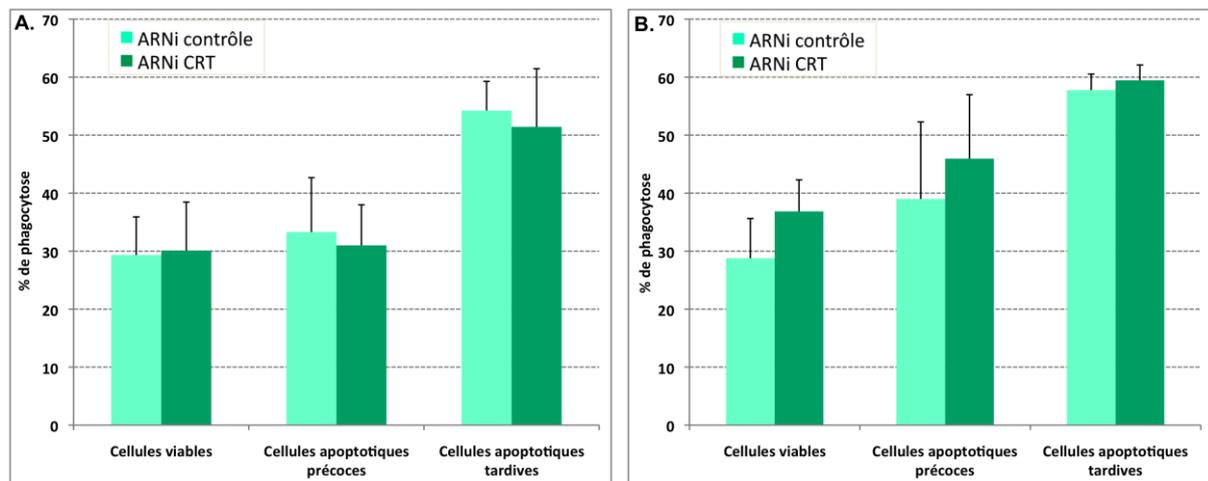


Figure 61 : Quantification de la phagocytose de cellules HeLa ARNi viables ou apoptotiques par des THP-1-m en fonction de l'inducteur d'apoptose

Les cellules HeLa transfectées 48h par des ARNi contrôle ou calréticuline (ARNi CRT) sont induites pour l'apoptose par irradiation aux UV (A) ou par traitement à la mitoxantrone (B). Les cellules viables, en apoptose précoce ou tardive sont mises en contact en absence de C1q avec des THP-1-m pendant 1h et la phagocytose est quantifiée par cytométrie en flux. Présentation de $n=6$ (A) et $n=4$ expériences (B) \pm SD, n étant le nombre d'expériences indépendantes effectuées.

Sur la Figure 61, nous observons une augmentation de la phagocytose des cellules HeLa ARNi contrôle et CRT en fonction de l'avancement de l'apoptose, la phagocytose s'échelonnant de 30 à 60 %. Une augmentation de cette phagocytose pour les cellules ARNi CRT par rapport au contrôle

principalement suite à un traitement mitoxantrone est également observée. Par ailleurs, cette expérience met en évidence une phagocytose de notre population de cellules viables.

Afin d'affiner l'analyse de ces résultats et pour tenir compte de ces variations, nous avons calculé un index de phagocytose, celui-ci est normalisé par rapport à la phagocytose des cellules viables (voir matériel et méthodes au paragraphe 5.2). L'index de phagocytose va nous permettre d'évaluer la phagocytose uniquement due à l'apoptose induite expérimentalement. L'index obtenu suite à la phagocytose des cellules HeLa ARNi est présenté sur la Figure 62.

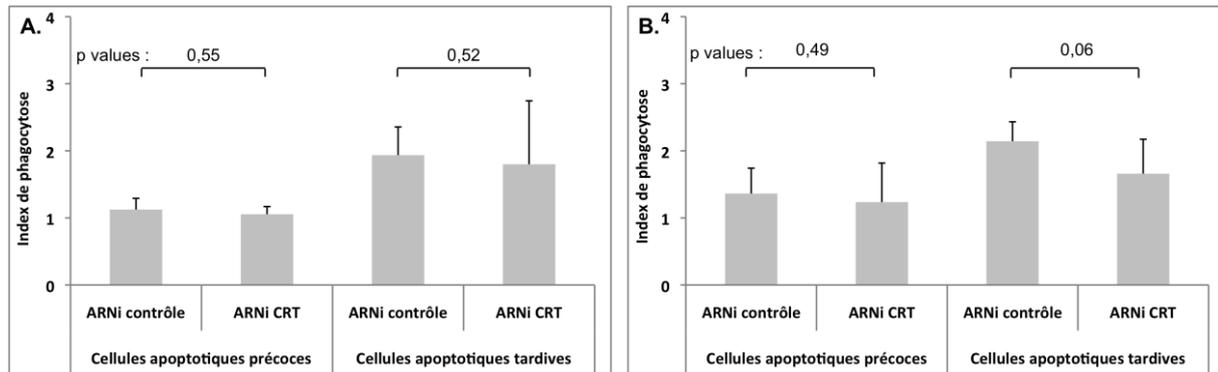


Figure 62 : Analyse de la phagocytose de cellules HeLa ARNi apoptotiques par des THP-1-m

Les cellules HeLa transfectées 48h par des ARNi contrôle ou CRT en apoptose précoce ou tardive - UV (A) ou MTX (B) - sont mises en contact en absence de C1q avec des THP-1-m pendant 1h, la phagocytose est quantifiée et l'index de phagocytose calculé (l'index de phagocytose est présenté plus en détail dans le paragraphe 5.2 du matériel et méthodes). Présentation de $n=6$ (A) et $n=4$ expériences (B) \pm SD, les valeurs p indiquées sur la figure entre les deux conditions proviennent d'un test t apparié.

L'index de phagocytose nous permet d'observer, lorsque les cellules sont apoptotiques, une diminution de la phagocytose des cellules déplétées en calréticuline par rapport aux cellules contrôle. Cependant cette diminution n'apparaît presque significative ($p = 0,06$) que pour les cellules apoptotiques tardives lorsque l'apoptose est induite par un traitement à la mitoxantrone (Figure 62 B).

Ainsi, la tendance est à la diminution de la phagocytose lorsque la calréticuline est déplétée.

Nous avons ensuite cherché à préciser si cette diminution était significativement modifiée avec l'état d'apoptose des cellules. Pour cela, nous avons évalué la variation de la phagocytose due à la déplétion en calréticuline dans les deux états d'apoptose (Figure 63).

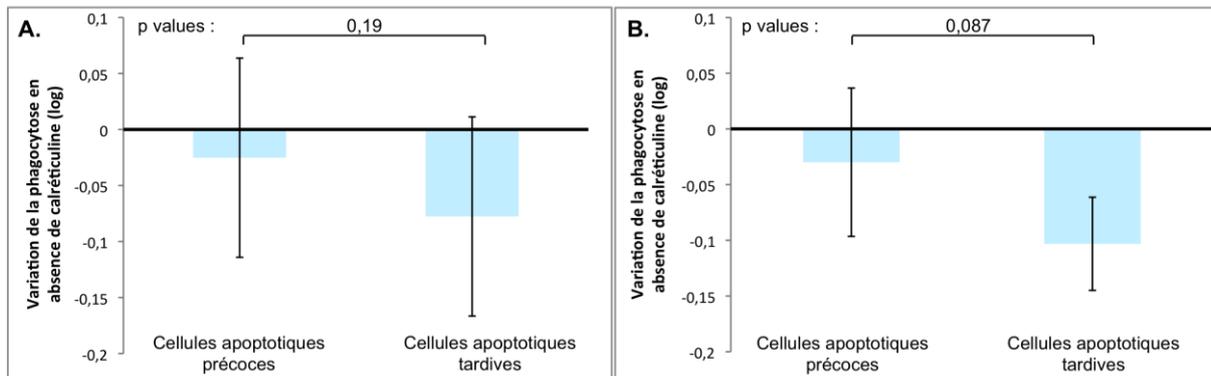


Figure 63 : Variation de la phagocytose en absence de calréticuline en fonction de l'état d'apoptose des cellules phagocytées

Les cellules HeLa transfectées 48h par des ARNi contrôle ou CRT en apoptose précoce ou tardive - UV (A) ou MTX (B) - sont mises en contact en absence de C1q avec des THP-1-m pendant 1h, la phagocytose est quantifiée par cytométrie en flux et la variation de la phagocytose en absence de calréticuline est calculée (le calcul est présenté plus en détail dans le paragraphe 5.2 du matériel et méthodes). Présentation de $n=6$ (A) et $n=4$ expériences (B) \pm SD, les valeurs p indiquées sur la figure entre les deux conditions proviennent d'un test t apparié.

Cette analyse nous permet de confirmer la diminution de la phagocytose des cellules partiellement déplétées en calréticuline. Nous pouvons même ajouter que cette diminution est plus importante lorsque les cellules sont en apoptose tardive, que ce soit suite à une induction de l'apoptose par les UV ou la mitoxantrone. Statistiquement, cette variation apparaît relativement significative pour l'induction à la mitoxantrone ($p = 0,087$) même si cette valeur reste toutefois en dessus du seuil de 0,05.

Ainsi, la déplétion en calréticuline des cellules HeLa apoptotiques diminue leur phagocytose par les THP-1-m et cet effet semble plus net en apoptose tardive.

3.2.1.2. Impact de C1q sur la phagocytose de cellules déplétées ou non en calréticuline

De la même façon que pour la calréticuline, nous avons ensuite cherché à évaluer l'influence de C1q dans la phagocytose des cellules apoptotiques traitées par ARNi (Figure 64).

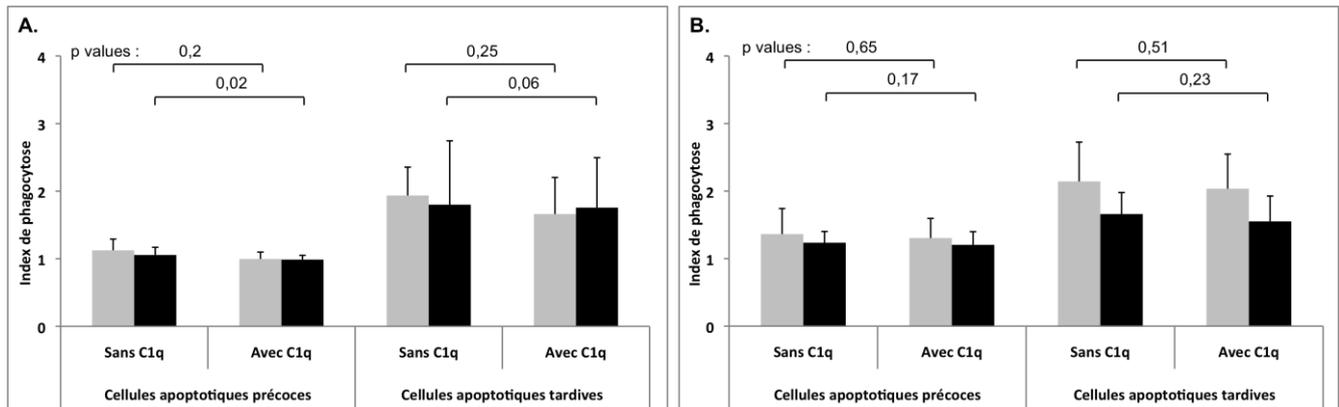


Figure 64 : Effet de C1q sur la phagocytose par des THP-1-m de cellules HeLa ARNi apoptotiques

Les cellules HeLa transfectées 48h par des ARNi contrôle (gris) ou CRT (noir) en apoptose précoce ou tardive - UV (A) ou MTX (B) - sont mises en contact en présence ou en absence de C1q avec des THP-1-m pendant 1h, la phagocytose est quantifiée par cytométrie en flux et l'index de phagocytose calculé. Présentation de $n=6$ (A) et $n=4$ expériences (B) \pm SD, les valeurs p indiquées sur la figure entre les deux conditions proviennent d'un test t apparié.

Dans la définition de notre modèle, nous avons choisi d'utiliser 25 μ g/mL de C1q pour mettre en évidence son rôle et quantifier son action sur la phagocytose. Lors de nos tests de caractérisation, nous avons utilisé des cellules HeLa non transfectées dont l'apoptose avait été induite par les UV ou par la mitoxantrone et nous avons pu mesurer une légère augmentation de la phagocytose.

Ici l'augmentation de la phagocytose en présence de C1q n'est plus visible, il apparaît même que C1q aurait plutôt tendance à diminuer très légèrement mais significativement la phagocytose des cellules HeLa ARNi lorsque l'apoptose est induite par irradiation aux UV. Par ailleurs, cette diminution ne varie pas avec l'état d'apoptose des cellules (résultats non montrés).

Il semblerait donc que la transfection affecte la capacité de reconnaissance de C1q, ou tout du moins son influence sur la phagocytose.

3.2.1.3. Conclusion

La déplétion des cellules HeLa en calréticuline induite par transfection d'ARNi a tendance à diminuer la phagocytose des THP-1-m et d'autant plus lorsque les cellules sont en apoptose tardive. De plus dans nos conditions, contrairement à la phagocytose des cellules HeLa non transfectées, C1q a tendance à diminuer la phagocytose et il semblerait que cette diminution soit moins importante lorsque les cellules présentent moins de calréticuline.

Par ailleurs, la variabilité importante entre les différentes expériences rend souvent l'analyse statistique difficile d'autant plus que les effets sont de faibles envergures. Cette variabilité peut en particulier être la conséquence des différents taux de déplétion en calréticuline dépendants de la technique utilisée.

3.2.2. Phagocytose de cellules MEF déficientes en calréticuline

3.2.2.1. Impact de la déficience en calréticuline sur la phagocytose

Afin de nous affranchir de la transfection des cellules, nous avons reproduit nos expériences avec des cellules embryonnaires de souris (MEF) déficientes en calréticuline (CRT^{-/-}) ou contrôle exprimant la calréticuline sauvage (CRT WT).

De la même façon que pour les cellules HeLa ARNi, le pourcentage de phagocytose des cellules MEF augmente avec l'avancement de l'apoptose. Nous avons dans un premier temps quantifié l'influence de la calréticuline sur la phagocytose des cellules MEF apoptotiques (UV et mitoxantrone).

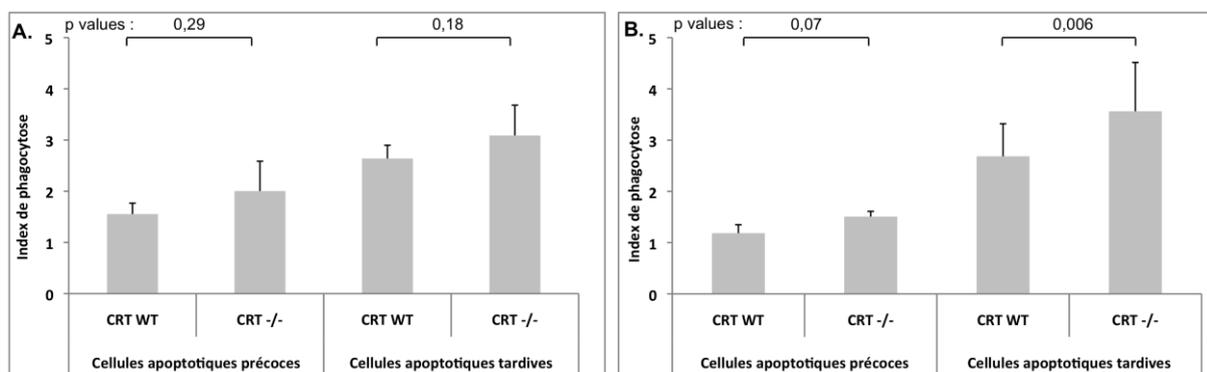


Figure 65 : Analyse de la phagocytose de cellules MEF apoptotiques par des THP-1-m

Les cellules MEF sauvages (CRT WT) ou déficientes en calréticuline (CRT^{-/-}) en apoptose précoce ou tardive - UV (A) ou MTX (B) - sont mises en contact en absence de C1q avec des THP-1-m pendant 1h, la phagocytose est quantifiée par cytométrie en flux et l'impact de l'apoptose sur la phagocytose est analysé. Présentation de $n=3$ (A) et $n=3$ expériences (B) \pm SD, les valeurs p indiquées sur la figure entre les deux conditions proviennent d'un test t apparié.

Sur la Figure 65 contrairement à la tendance observée avec les HeLa ARNi, ici la déficience en calréticuline entraîne une augmentation de la phagocytose statistiquement significative lorsque l'apoptose des cellules MEF est induite par traitement à la mitoxantrone. Une tendance identique est observée lorsque l'apoptose est induite aux UV mais celle-ci est moins significative.

Nous avons ensuite cherché si cette influence de la calréticuline sur la phagocytose est dépendante de l'état d'apoptose de ces cellules. Cependant, aucune différence significative n'a été mise en évidence, l'effet de la calréticuline ne semble donc pas différent selon le niveau d'apoptose (précoce ou tardive – non montré).

3.2.2.2. Impact de C1q sur la phagocytose de cellules déficientes ou non en calréticuline

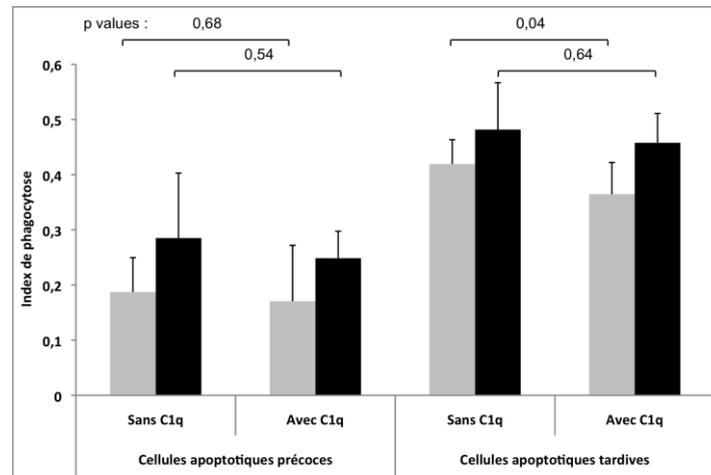


Figure 66 : Effet de C1q sur la phagocytose des MEF apoptotiques déficientes ou non en calréticuline

Les cellules MEF CRT WT (gris) ou CRT^{-/-} (noir) apoptotiques précoces ou tardives (UV) sont mises en contact en présence ou en absence de C1q avec des THP-1-m pendant 1h, la phagocytose est quantifiée par cytométrie en flux et l'index de phagocytose est calculé. Présentation de $n=3$ expériences \pm SD, les valeurs p indiquées sur la figure entre les deux conditions proviennent d'un test t apparié.

Comme vu précédemment (Figure 65), les cellules MEF CRT^{-/-} sont plus phagocytées que les cellules MEF CRT WT. L'ajout de C1q diminue globalement la phagocytose des cellules CRT WT et CRT^{-/-}, et ce quel que soit l'état d'apoptose, néanmoins nos analyses n'étant statistiquement pas assez robustes, nous ne pouvons pas en être assuré. Des expériences similaires après induction de l'apoptose par un traitement à la mitoxantrone n'ont pas montré d'effet de C1q.

Il nous est donc impossible de conclure sur un effet conjoint de C1q et de la calréticuline.

3.2.2.3. Conclusion

Ces résultats sont à l'opposé de ceux observés avec les cellules HeLa. Le type cellulaire et la méthode de déplétion de la calréticuline pouvant en être la cause.

Comme précédemment avec les cellules HeLa ARNi, aucun effet conjoint de C1q et de la calréticuline n'a pu être mis en évidence. L'effet de C1q ayant été principalement mis en évidence par l'équipe de Tenner lors de la phagocytose par des monocytes, nous avons changé de cellules phagocytaires pour reproduire nos expériences [Fraser *et al.* 2009].

3.3. Impact de C1q sur la phagocytose de monocytes humains purifiés

Nous avons dans un premier temps effectué des tests préliminaires afin de détecter, dans nos conditions, un rôle éventuel de C1q dans la phagocytose par des monocytes de cellules HeLa apoptotiques non transfectées (Figure 67).

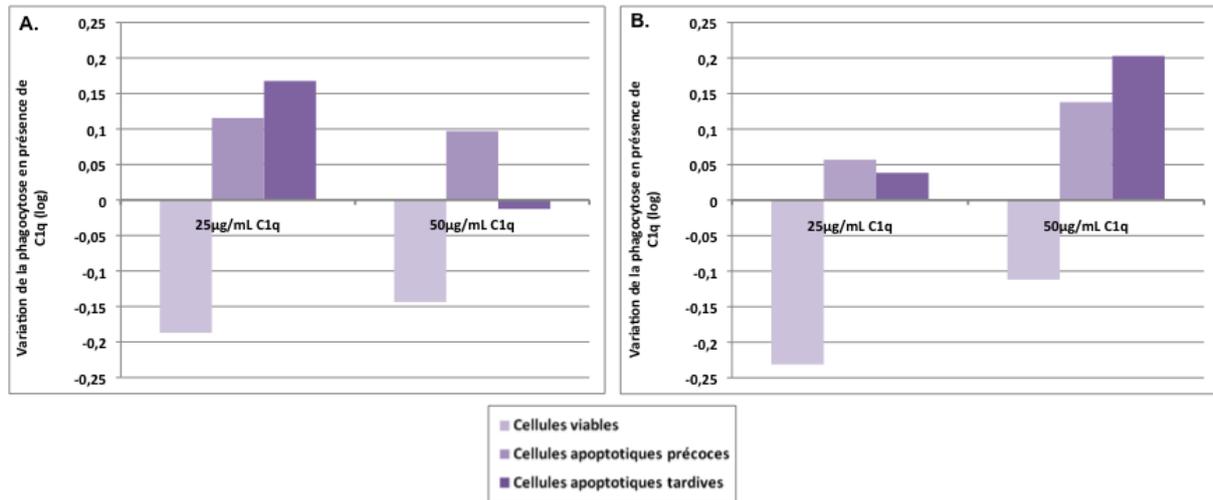


Figure 67 : Effet de C1q sur la phagocytose par des monocytes de cellules HeLa viables et apoptotiques

Variation en log de la phagocytose par des monocytes de cellules HeLa dont l'apoptose a été induite par irradiation aux UV (A) ou à la MTX (B) en présence de concentrations croissantes de C1q.

Sur la Figure 67 nous observons assez clairement une diminution de la phagocytose des cellules HeLa viables en présence de C1q, celle-ci étant un peu plus faible en présence de 50 µg/mL.

Lorsque l'apoptose est induite par irradiation aux UV, l'augmentation maximale de la phagocytose est observée en présence de 25 µg/mL de C1q. En présence de 50 µg/mL cette augmentation est beaucoup plus faible pour les cellules apoptotiques précoces et devient même négative pour les cellules apoptotiques tardives. Contrairement aux UV, lorsque l'apoptose est induite par traitement à la mitoxantrone, l'augmentation maximale de la phagocytose des cellules apoptotiques est observée en présence de 50 µg/mL de C1q, à 25 µg/mL cette augmentation étant beaucoup plus faible.

Cherchant avant tout à détecter un effet de C1q et de la calréticuline, et à nous affranchir d'une étape de transfection, nous avons choisi d'effectuer nos expériences de phagocytose avec les cellules MEF CRT -/- et CRT WT. De plus, sans avoir pu effectuer de test préliminaire sur l'effet de l'inducteur d'apoptose sur la phagocytose des cellules MEF par les monocytes en présence de C1q, afin d'avoir des conditions de phagocytose homogènes, nous avons choisi d'effectuer nos tests avec 25 µg/mL de C1q.

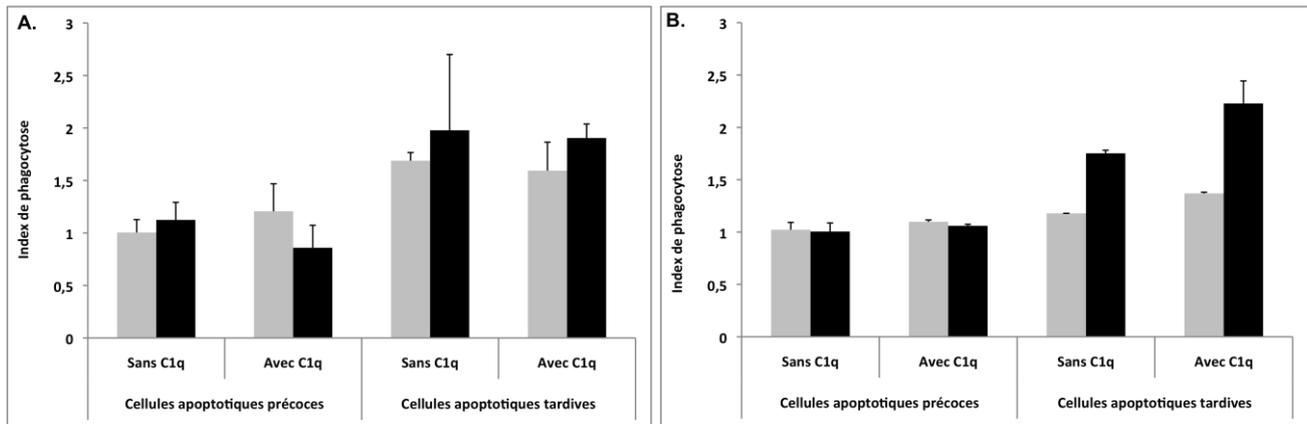


Figure 68 : Analyse de la variation de la phagocytose de en présence de C1q cellules MEF par des monocytes

Les cellules MEF CRT WT (gris) ou CRT -/- (noir) apoptotiques précoces ou tardives - UV (A) ou MTX (B) - sont mises en contact en présence ou en absence de C1q avec les monocytes pendant 1h, la phagocytose est quantifiée par cytométrie en flux et la variation de la phagocytose en absence de calréticuline est calculée. Présentation de $n=2$ expériences \pm SD.

Ces expériences ont été effectuées uniquement deux fois de façon indépendante pour des questions d'accessibilité aux cellules.

Sur la Figure 68, comme précédemment observé avec les THP-1-m, nous observons en absence de C1q une augmentation de la phagocytose des cellules apoptotiques tardives déficientes en calréticuline et ce quelle que soit la méthode d'induction (UV ou mitoxantrone).

Par ailleurs, les effets de C1q apparaissent assez différents selon le mode d'induction de l'apoptose. Lorsque l'apoptose est induite par irradiation aux UV, aucun effet de C1q n'est visible sur les cellules en apoptose tardive, mais lorsque les cellules sont en apoptose précoce, C1q tend à annuler l'augmentation de la phagocytose induite par la déficience en calréticuline. Par contre, lorsque l'apoptose est induite par traitement à la mitoxantrone, C1q a peu d'effet sur les cellules en apoptose précoce mais la phagocytose des cellules apoptotiques tardives CRT-/- et CRT WT est augmentée.

Enfin comme attendu, l'effet de C1q est plus visible lors de la phagocytose des cellules apoptotiques par des monocytes. Ces expériences devront tout de même être reconduites afin d'obtenir des informations statistiques sur les tendances observées. Ainsi, il est possible que 50 μ g /mL de C1q soient nécessaires pour observer un effet conjoint de C1q et de la calréticuline sur les cellules MEF lorsque l'apoptose est induite par traitement à la mitoxantrone. Ces expériences devront également être reconduites avec des cellules HeLa transfectées pour lesquelles l'effet de la déplétion en calréticuline sur la phagocytose est inversé.

3.4. Bilan des tests de phagocytose

En résumé, la déficience ou la déplétion en calréticuline induit une modification de la phagocytose des cellules apoptotiques par les THP-1-m. De manière surprenante cela conduit à des effets opposés selon le modèle. La phagocytose des cellules HeLa traitées par ARNi CRT diminue par rapport aux cellules contrôle alors que par rapport aux cellules MEF CRT WT la phagocytose des MEF CRT-/- augmente.

En ce qui concerne l'effet de C1q ou un effet combiné de C1q avec la calréticuline sur la phagocytose des THP-1-m, le modèle de HeLa transfectées est peu probant. Les cellules transfectées ne se comportant pas comme les cellules sauvages. Cependant rien de significatif n'a pu être mis en évidence avec les cellules MEF dans ce modèle.

Le modèle de phagocytose par des monocytes met en évidence des effets de C1q. Cependant en absence de données statistiques, nous ne pouvons que conclure sur des tendances. Ainsi, il apparaît qu'après une induction de l'apoptose par irradiation aux UV, C1q pourrait contrebalancer la déficience en calréticuline des cellules en apoptose précoce (ce qui pourrait conforter les mesures de FRET).

Néanmoins même si le rôle de C1q et de la calréticuline et/ou de leur interaction lors des premières étapes de la phagocytose reste encore à clarifier, il est possible que ces deux protéines jouent un rôle dans la signalisation qui s'en suit et la mise en place de la réponse immunitaire post-phagocytose.

4. Etude de l'interaction C1q-calréticuline sur la réponse inflammatoire

La phagocytose des cellules apoptotiques a longtemps été considérée comme immunologiquement neutre, cependant des études plus récentes ont montré la production de cytokines anti-inflammatoires. De plus, à la surface des cellules apoptotiques, la présence de la calréticuline ayant été décrite comme immunogénique (paragraphe 5.2 de l'introduction), nous avons cherché à mettre en évidence un rôle de la calréticuline et de C1q (connu pour moduler la réponse inflammatoire) dans la réponse induite suite à la phagocytose de cellules apoptotiques.

Pour cela, nous nous sommes intéressés à plusieurs cytokines et chémokines, celles-ci sont présentées dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Cytokines et chémokines d'intérêt			
	Mode d'action	Rôle	Expression
IL-1 α et IL-1 β (Hétérodimère)	Stimule l'expression d'IL-8, IL-6, MCP-1. Production inhibée par l'IL-10 et rétro-contrôlée par l'IL-6.	Pro-inflammatoire	Macrophages , monocytes, lymphocytes et neutrophiles
IL-6 (Homodimère)	Stimule la production de MCP-1/CCL2. Production stimulée par l'IL-1 α , TNF- α , IFN- γ et inhibée par l'IL-10. Pourrait rétro-contrôler la production d'IL-1, IL-8 et TNF- α .	Majoritairement pro-inflammatoire	Cellules endothéliales, fibroblastes, monocytes et macrophages .
IL-8 (Homodimère)	Chémokines de la famille des CXC. Active et recrute les neutrophiles et les NK. Production stimulée par l'IL-1 α , IL-1 β , TNF α et inhibée par l'IL-10 et potentiellement par l'IL-6.	Pro-inflammatoire	Monocytes, macrophages , neutrophiles, lymphocytes, DC, cellules épithéliales.
IL-10 (Homodimère)	Inhibe l'expression de l'IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ .	Anti-inflammatoire	Monocytes, lymphocytes, NK, macrophages et DCs.
IL-12p70 (Hétérodimère)	Stimule et est stimulé par la production d'IFN- γ . Stimule la production de TNF- α par les NK. Production inhibée par IL-10 et IL-4.	Pro-inflammatoire	Monocytes, macrophages , neutrophiles et DCs.
TNF- α	Activateur des neutrophiles. Médiateur primaire du choc septique. Stimule la production de MCP-1 et IL-8. Production inhibée par l'IL-10.	Pro-inflammatoire	Monocytes, macrophages , neutrophiles, lymphocytes, NK et cellules endothéliales.
MCP-1/CCL2	Monocyte Chemoattractant Protein 1 ou Chemokine Ligand 2 de la famille des chimiokine CC. Recrute les monocytes et les cellules T mémoire. Production stimulée par l'IL-1, IL-6 et TNF α et inhibée par l'IL-10	Pro-inflammatoire	Macrophages , monocytes, cellules endothéliales.

[Rollins 1997; Commins *et al.* 2010; Akdis *et al.* 2011]

4.1. Analyse de la production de cytokines par les cellules de notre modèle

Avant d'étudier l'influence de la phagocytose de cellules apoptotiques sur la réponse inflammatoire, nous avons cherché à connaître le niveau d'expression des différentes cytokines d'intérêt par les cellules de notre modèle de phagocytose.

Pour cela les cellules ont été incubées seules ou après un contact de 30 minutes avec C1q pendant 18h à 1×10^6 cellules/mL. Dans ces conditions, les cellules HeLa viables sécrètent constitutivement MCP-1/CCL2 (~1000 pg/mL), dont la présence avait déjà été décrite dans la littérature [Denney *et al.* 1999]. La présence de C1q induit également la sécrétion d'IL-6 et 8 (~100 pg/mL). Néanmoins, ces quantités, ne représentent que 0,1 à 1,5 % du signal obtenu après phagocytose par les THP-1-m des cellules HeLa ARNi viables et ces quantités restent inférieures à celles mesurées suite à la phagocytose de cellules apoptotiques (notamment en apoptose précoce). Cependant, nous n'avons pas mesuré la production de cytokines suite à l'induction de l'apoptose par irradiation aux UV de nos cellules. Dans la littérature, aucune évidence de la libération de cytokines suite à l'induction de l'apoptose n'est décrite, selon les données de l'équipe de Raghavan l'induction de l'apoptose avec différents modes d'induction n'entraîne pas de différence significative dans la sécrétion de cytokines par les cellules MEF [Peters *et al.* 2011]. Nous avons donc considéré dans la suite de notre analyse que la production de cytokines par les HeLa apoptotiques n'est pas augmentée par rapport à la production des cellules viables.

Toujours en absence de phagocytose, les THP-1-m produisent constitutivement et en faible quantité de l'IL-1 β (~10 pg/mL). L'IL-8 (~400 pg/mL) et MCP-1/CCL2 (~200 pg/mL) sont par contre produites en quantités plus importantes. L'ajout de C1q n'a aucun effet significatif sur la production de ces cytokines. Toutefois, ces quantités restent inférieures ou égales à la quantité dosée suite à la phagocytose des cellules HeLa ARNi viables ou apoptotiques. Une stimulation avec des lipopolysaccharides bactériens (LPS) a permis d'obtenir une augmentation significative de la production d'IL-1 β (~300 pg/mL), d'IL-6 (~300 pg/mL), de TNF (~200 pg/mL) et MCP-1/CCL2 (~1000 pg/mL) par les THP-1-m [Gessani *et al.* 1993] mais aucune modulation n'a été observée en présence de C1q.

4.2. Influence de la phagocytose des cellules HeLa ARNi sur l'expression de cytokines par les THP-1-m

Les expériences suivantes ont été menées sur le même lot de cellules HeLa ARNi afin d'avoir une déplétion en calréticuline homogène dans toutes nos expériences. La déplétion en calréticuline a été évaluée à 82 %.

L'apoptose des cellules HeLa ARNi a été induite uniquement par irradiation aux UV. Seule une production d'IL-6, l'IL-8 et MCP-1/CCL2 a été mesurée suite à leur phagocytose par les THP-1-m.

Afin de mieux comprendre la modulation de la réponse inflammatoire, nous avons donc regardé plus en détail l'impact de l'absence de calréticuline (Figure 69) puis de la présence de C1q (Figure 70) sur la production de ces cytokines.

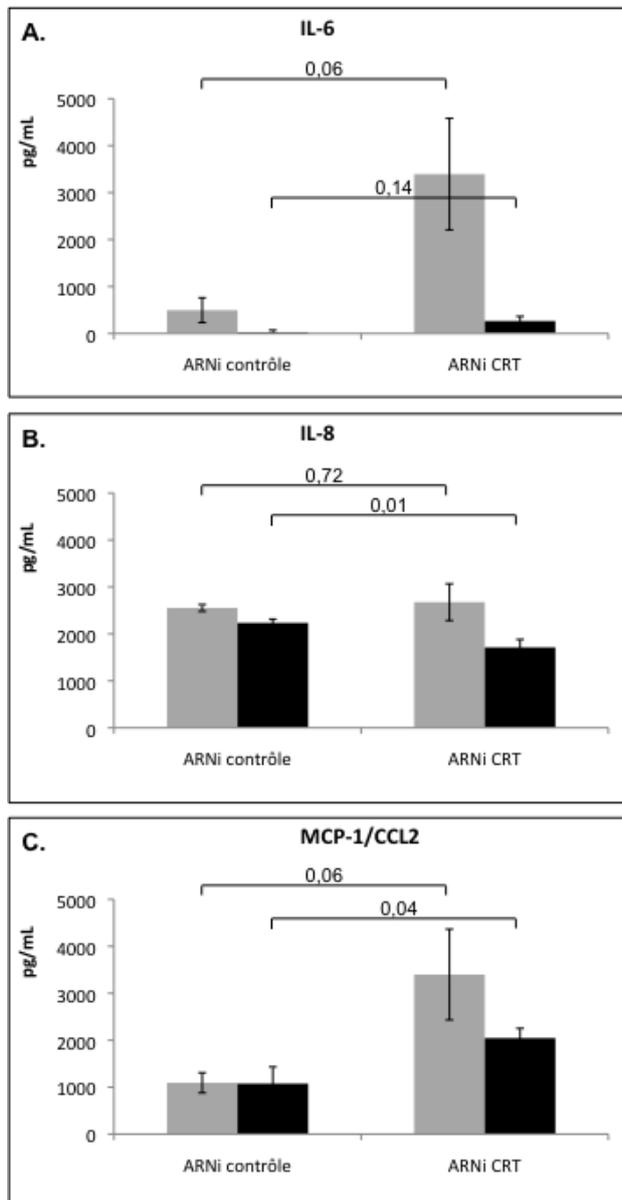


Figure 69 : Analyse de l'impact de l'absence de calréticuline sur la production d'IL-6, IL-8 et MCP-1/CCL2 par les THP-1-m suite à la phagocytose de cellules HeLa déplétées ou non en calréticuline

La quantification des cytokines produites par les THP-1-m après la phagocytose de cellules HeLa ARNi contrôle ou CRT apoptotiques précoces (gris) et tardives (noir) a été évaluée comme décrit dans le paragraphe 5.3 de la partie matériel et méthodes. Présentation de $n=3$ expériences \pm SD, les valeurs p indiquées sur la figure entre les deux conditions proviennent d'un test t apparié.

Sur la Figure 69 il apparaît clairement que la déplétion en calréticuline conduit à une augmentation importante de l'IL-6 et de MCP-1/CCL2 pour les cellules en apoptose précoce. Ces augmentations sont également observées pour les cellules en apoptose tardives assez clairement pour MCP-1/CCL2 et plus faiblement pour l'IL-6.

En ce qui concerne l'IL-8 aucune différence significative n'a été mesurée pour les cellules en apoptose précoce alors que l'expression est significativement diminuée lorsque les cellules sont en apoptose tardive.

L'augmentation de l'IL-6 et de MCP-1/CCL2 lorsque les cellules sont déficientes en calréticuline va dans le sens d'une acquisition d'un statut plutôt pro-inflammatoire dès les stades précoces d'apoptose.

Au regard de ces premières observations, nous avons voulu déterminer si C1q pouvait moduler la réponse pro-inflammatoire induite par la déficience en calréticuline (Figure 70).

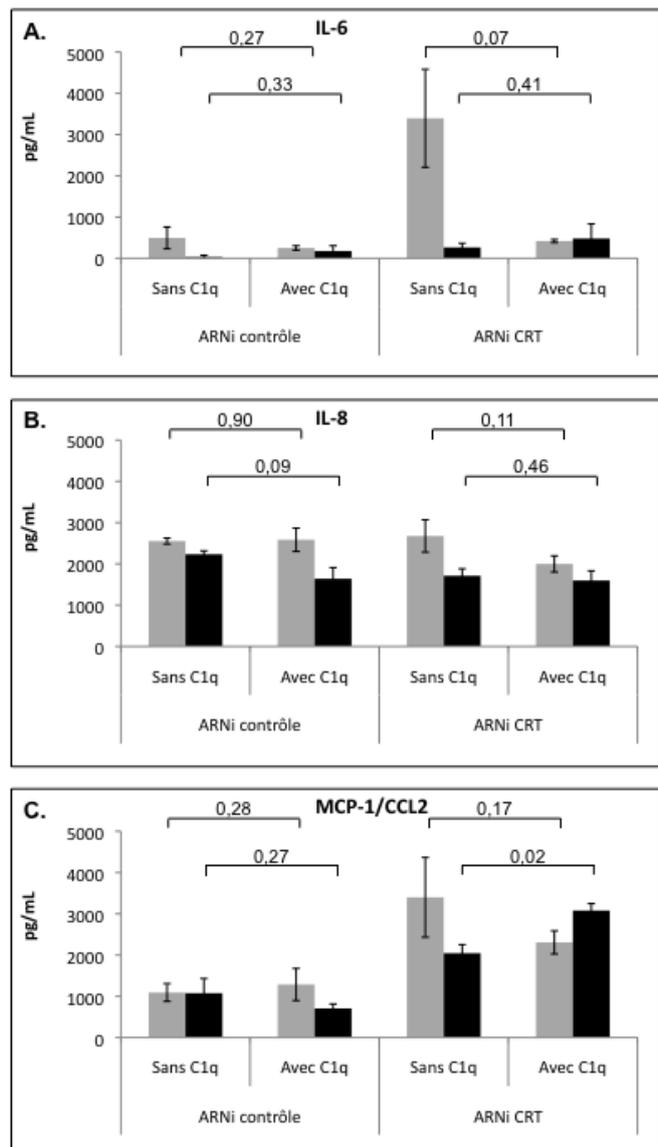


Figure 70 : Analyse l'impact de la présence de C1q sur la production d'IL-6, IL-8 et MCP-1/CCL2 par les THP-1-m suite à la phagocytose de cellules HeLa traitées HeLa déplétées ou non en calréticuline

La quantification des cytokines produites par les THP-1-m après la phagocytose de cellules HeLa ARNi contrôle ou CRT apoptotiques précoces (gris) et tardives (noir) en présence de C1q ou en absence de C1q a été évaluée comme décrit dans le paragraphe 5.3 de la partie matériel et méthodes. Présentation de $n=3$ expériences \pm SD, les valeurs p indiquées sur la figure entre les deux conditions proviennent d'un test t apparié.

C1q diminue nettement l'expression de l'IL-6 suite à la phagocytose de cellules déplétées en calréticuline en apoptose précoce (Figure 70 A à droite) et contrebalance l'augmentation induite par la déplétion en calréticuline observée sur la Figure 69. En apoptose tardive aucun effet significatif de C1q n'a été mis en évidence, cela est cohérent avec le faible effet de la déplétion en calréticuline sur la production d'IL-6 dans ces conditions.

Les mêmes tendances sur l'expression de MCP-1/CCL2, suite à la phagocytose de cellules en apoptose précoce et déplétées en calréticuline, sont observées. Cependant les analyses statistiques ne nous permettent pas de le confirmer. Par ailleurs, lorsque les cellules phagocytées déplétées en calréticuline sont en apoptose tardive, C1q a plutôt tendance à augmenter l'expression de MCP-1/CCL2 (Figure 70 C à droite).

La présence de C1q a également tendance à induire une baisse de l'expression d'IL-8. Toutefois la déplétion en calréticuline ne semble pas influencer cette tendance (Figure 70 B).

En résumé, la déplétion en calréticuline conduit à une augmentation des signaux pro-inflammatoires tels que l'IL-6 et MCP-1/CCL2. L'ajout de C1q exogène paraît contrebalancer cet effet lorsque les cellules phagocytées sont en apoptose précoce et essentiellement moduler l'expression de l'IL-6.

Afin de vérifier la capacité de C1q à moduler à la baisse l'expression de cytokines pro-inflammatoires, ces expériences ont été reconduites en présence de LPS, dans un contexte permettant de stimuler l'expression de ces cytokines.

Suite à l'ajout de LPS, de nouvelles cytokines ont pu être dosées telles que l'IL-1 β , IL-10 et TNF mais leurs niveaux d'expression sont restés extrêmement faibles et rien de significatif n'a pu être mis en évidence. L'IL-6, IL-8 et MCP-1/CCL2 déjà produites en grande quantité ont vu leur expression multipliée par 50 pour l'IL-6 et l'IL-8 ou par 3 pour MCP-1/CCL2 et les différences qui ont pu être précédemment observées suite à l'ajout de C1q exogène ou à la déplétion en calréticuline ont complètement été gommées.

L'ajout de LPS ne nous a malheureusement pas permis d'obtenir de nouvelles informations sur l'effet de C1q ou de la déplétion en calréticuline.

4.3. Analyse de la production de cytokines produites par les THP-1-m suite à la phagocytose de cellules MEF déficientes ou non en calréticuline.

Comme pour les expériences de phagocytose, les cellules MEF CRT-/- n'exprimant pas de calréticuline ont été utilisées dans nos expériences de dosage de cytokines.

En absence de LPS, après la phagocytose des cellules MEF (ne produisant pas de cytokines humaines) par les THP-1-m seules l'IL-1 β , l'IL-8 et MCP-1/CCL2 ont été détectés dans les surnageants.

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence l'impact de l'absence de la calréticuline sur la production d'IL-1 β , IL-8 et MCP-1/CCL2 suite à une induction de l'apoptose par irradiation aux UV ou traitement à la mitoxantrone (Figure 71).

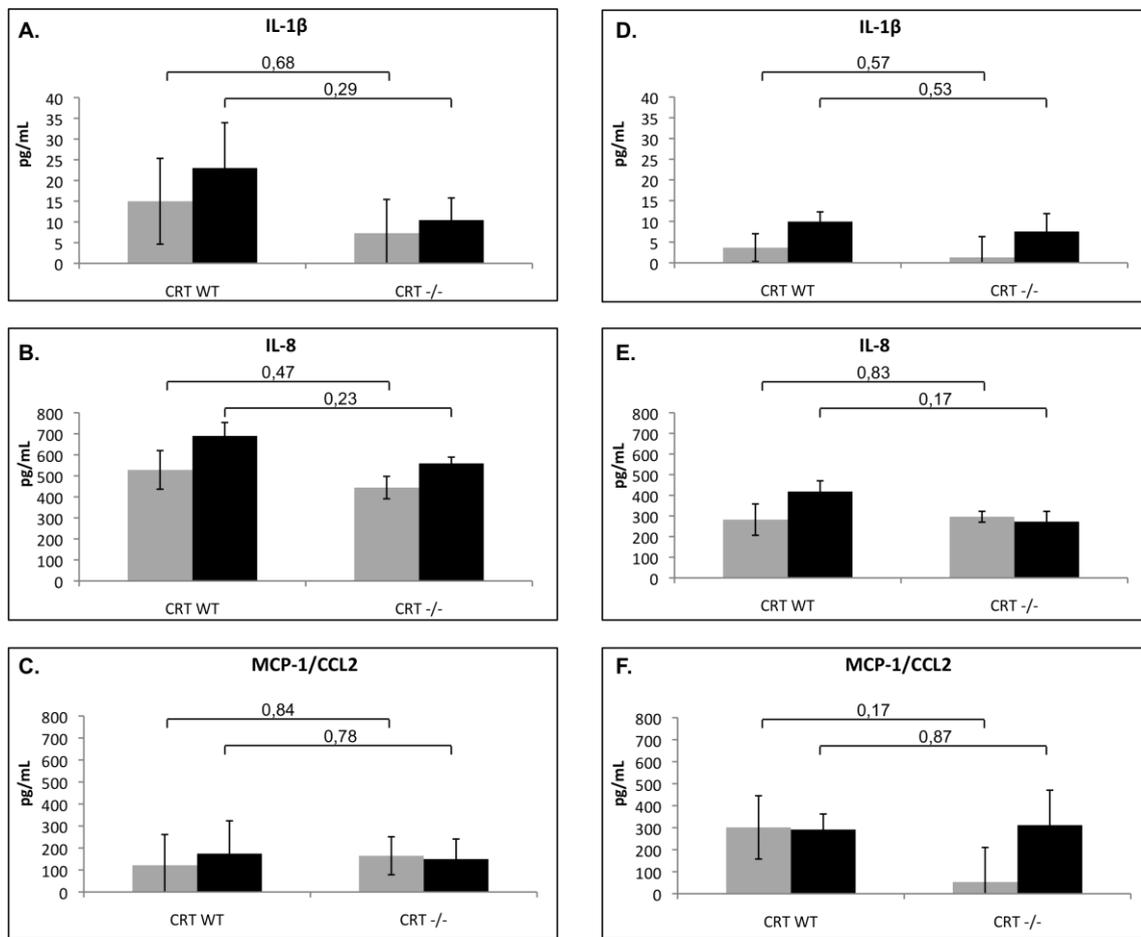


Figure 71 : Analyse de l'impact de l'absence de calréticuline sur la production d'IL-1 β , IL-8 et MCP-1/CCL2 par les THP-1-m suite à la phagocytose de cellules MEF dont l'apoptose a été induite par UV ou mitoxantrone

La quantification des cytokines produites par les THP-1-m après la phagocytose de cellules MEF contrôles (CRT WT) ou déficientes en CRT (CRT^{-/-}) apoptotiques précoces (gris) et tardives (noir) en absence de C1q a été évaluée comme décrit dans le paragraphe 5.3 de la partie matériel et méthodes. L'apoptose a été induite par les UV (A-C) ou par MTX (D-F). Présentation de $n=3$ expériences \pm SD, les valeurs p indiquées sur la figure entre les deux conditions proviennent d'un test t apparié.

De manière générale, sur la Figure 71, nous observons une augmentation de la production des cytokines avec l'avancement de l'apoptose des cellules, mais également une diminution de la production de ces cytokines en absence de calréticuline et ce pour une apoptose induite par irradiation aux UV ou traitement à la mitoxantrone. Ces variations restent toutefois faibles et statistiquement non significatives.

Nous avons néanmoins reproduit ces expériences en ajoutant du C1q exogène afin de rechercher l'impact de C1q sur la production d'IL-1 β , IL-8 et MCP-1/CCL2 (Figure 72).

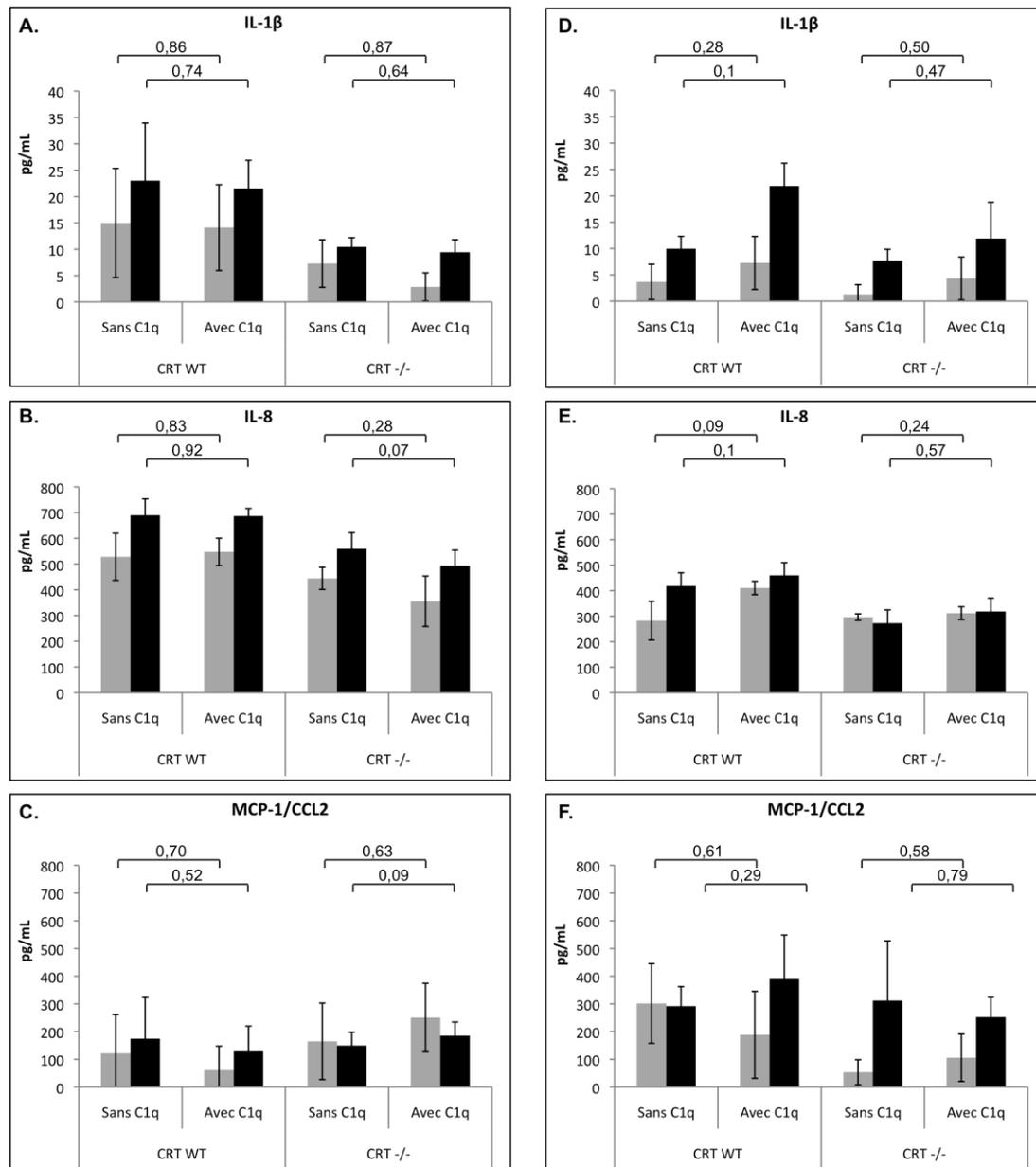


Figure 72 : Analyse de l'impact de la présence de C1q sur la production d'IL-1 β , IL-8 et MCP-1/CCL2 par les THP-1-m suite à la phagocytose de cellules MEF dont l'apoptose a été induite par UV ou mitoxantrone

La quantification des cytokines produites par les THP-1-m après la phagocytose de cellules MEF contrôles (CRT WT) ou déficientes en CRT (CRT^{-/-}) apoptotiques précoces (gris) et tardives (noir) en présence de C1q ou en absence de C1q a été évaluée comme décrit dans le paragraphe 5.3 de la partie matériel et méthodes. L'apoptose a été induite par les UV (A-C) ou par MTX (D-F). Présentation de $n=3$ expériences \pm SD, les valeurs p indiquées sur la figure entre les deux conditions proviennent d'un test t apparié.

Lorsque l'apoptose est induite par irradiation aux UV, C1q n'a aucun effet sur l'expression d'IL-1 β que les cellules soient déficientes ou non pour la calréticuline et qu'elles soient en apoptose précoce ou tardive (Figure 72 A). L'expression d'IL-8 est quant à elle modulée à la baisse après la phagocytose, en présence de C1q, de cellules MEF déficientes en calréticuline, cela étant statistiquement plus significatif lorsque les cellules sont en apoptose tardive. Cependant, une légère

tendance à l'augmentation se dessine pour MCP-1/CCL2 en présence de C1q lorsque les cellules sont déficientes en calréticuline.

Lorsque l'apoptose est induite par traitement à la mitoxantrone, l'ajout de C1q exogène à tendance à augmenter la production d'IL-1 β et ce quel que soit l'état d'apoptose ou le niveau d'expression de calréticuline. La production d'IL-8 est augmentée en présence de C1q suite à la phagocytose de cellules MEF CRT WT, néanmoins cela ne semble plus être le cas suite à la phagocytose des cellules MEF CRT $-/-$. Par ailleurs, nos données ne nous permettent pas de conclure sur un effet propre de la déficience en calréticuline ou de l'ajout de C1q sur l'expression de MCP-1/CCL2.

En résumé, dans une situation de phagocytose de fibroblastes embryonnaire de souris apoptotiques, les THP-1-m ont tendance à diminuer l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-8 lorsque celles-ci sont déficientes en calréticuline. L'ajout de C1q exogène a des effets variables selon les conditions étudiées, confirmant son rôle de modulateur mais cet effet peut aussi être observé indépendamment du niveau d'expression de la calréticuline.

4.4. Bilan de la modulation des cytokines

Comme observé dans les expériences de phagocytose, les effets observés suite à la diminution de l'expression de la calréticuline sont curieusement opposés selon le modèle utilisé. Il s'agit tout de même d'interpréter ces résultats avec prudence. D'une part les cytokines exprimées sont différentes en fonction des cellules phagocytées et d'autre part la réponse inflammatoire globale peut faire intervenir *in vivo* des cellules absentes dans notre système.

La déplétion en calréticuline de HeLa conduit néanmoins à une augmentation des signaux globalement pro-inflammatoires et notamment de l'IL-6 et de MCP-1/CCL2 alors que la déficience en calréticuline de cellules MEF semble plutôt induire une diminution de l'expression des cytokines pro inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-8. Dans certaines conditions C1q module l'expression des cytokines de façon dépendante ou non de la calréticuline. Avec les cellules HeLa, C1q contrebalance nettement l'effet induit par la déplétion en calréticuline aux stades précoces d'apoptose. Avec les cellules MEF, l'effet le plus net de C1q est observé sur l'expression d'IL-8, celui-ci accroît encore plus l'augmentation induite par la déplétion en calréticuline.

Enfin nos modèles basés sur l'utilisation de THP-1-m ne nous ont pas permis d'évaluer efficacement la production d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire décrite comme étant sous l'influence de C1q (notamment pour les macrophages issus de PBMC).

5. Mise en évidence d'un nouveau partenaire potentiel de C1q pouvant jouer un rôle dans la phagocytose

Lors de l'étude de l'expression des différentes calréticulines de fusion, nous avons constaté un faible taux d'exportation en surface des fusions GFP et un signal disjoint entre la calréticuline et le signal SNAP à la surface des cellules. Cela nous a amené à nous interroger sur la capacité des nos calréticulines de fusion à interagir avec les partenaires physiologiques de la calréticuline endogène, ce qui indiquerait leur capacité à utiliser les voies classiques d'exportation en particulier sous la dépendance d'ERp57. En effet, la co-exportation en surface d'ERp57 et de la calréticuline a été mise en évidence par l'équipe de Kroemer [Gardai *et al.* 2005] et l'interaction de la calréticuline avec ERp57 a été largement caractérisée [Frickel *et al.* 2002; Frasconi *et al.* 2012].

C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à ERp57, tout d'abord en essayant de mettre en évidence une interaction entre la calréticuline et ERp57 dans les cellules HeLa par co-immunoprécipitation. Ces expériences n'ont malheureusement pas permis de mettre en évidence l'interaction décrite. De plus, nous ne sommes pas parvenus à détecter ERp57 dans les extraits de shaving dans lesquels la calréticuline de surface était pourtant solubilisée (données non montrées).

D'autres parts, les expériences de FRET ont permis de mettre en évidence une interaction forte entre C1q et la calréticuline à la surface des cellules en apoptose précoce. Malgré l'existence d'une colocalisation entre C1q et la calréticuline à la surface des cellules viables ou en apoptose tardive, aucun signal significatif n'a été obtenu.

Ces observations suggèrent que C1q pourrait interagir avec d'autres partenaires en particulier à la surface des cellules viables ou en apoptose tardive. Nous avons donc voulu tester la possibilité qu'ERp57 soit un de ces partenaires.

5.1. Colocalisation d'ERp57 et de la calréticuline avec C1q à la surface des cellules HeLa

Nous avons tout d'abord confirmé la présence d'ERp57 à la surface de nos cellules HeLa viables et apoptotiques, puis afin d'étudier l'évolution de la localisation de C1q à la fois avec ERp57 et la calréticuline, des expériences de triples marquages ont été effectuées. Des images représentatives des triples marquages observés sont présentées sur la Figure 73.

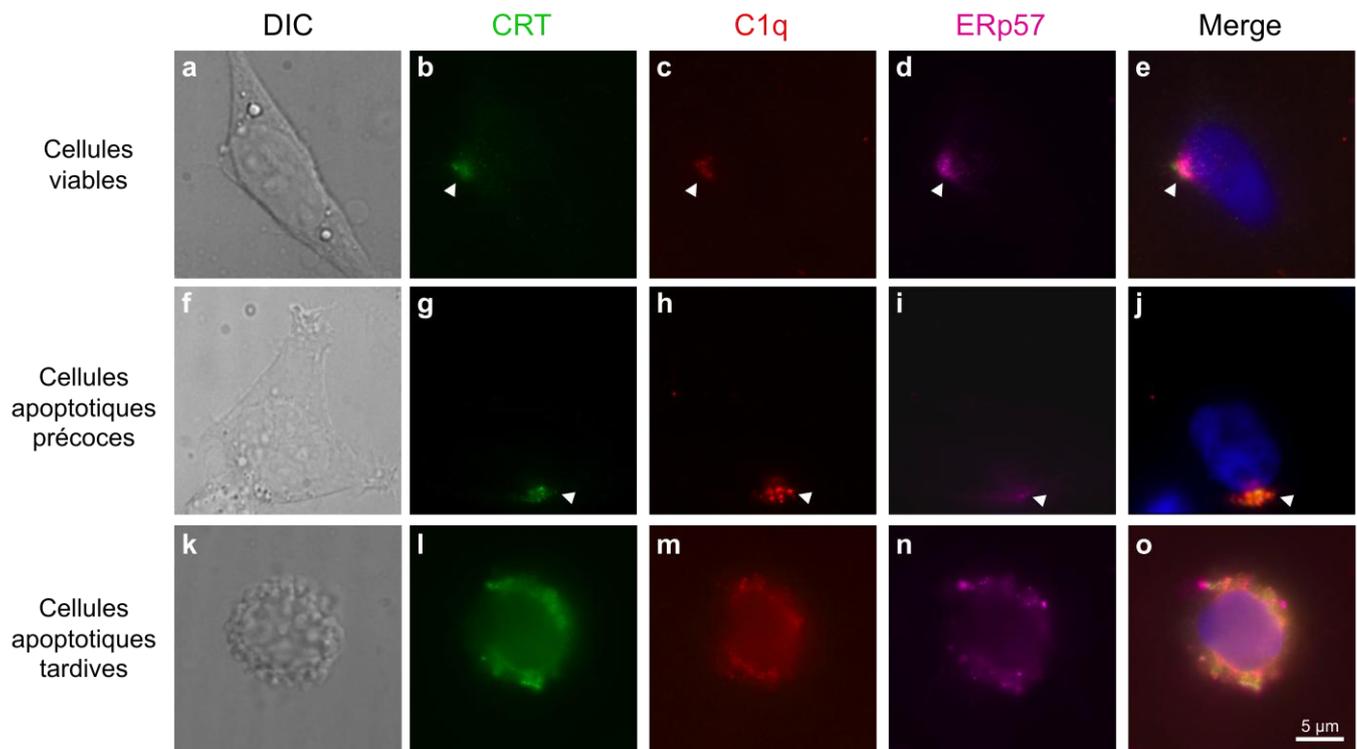


Figure 73 : Localisation de la calréticuline, d'ERp57 et de C1q à la surface des cellules HeLa

Les cellules HeLa viables (a-e), apoptotiques précoces (f-j) ou apoptotiques tardives (k-o), ont été fixées en PFA 4 %, incubées avec C1q puis immunomarquées pour la CRT (vert), C1q (rouge) et ERp57 (Magenta). Les flèches indiquent des zones de forte colocalisation entre les 3 signaux. Dans les expériences contrôles, aucun marquage n'est observé avec un anticorps primaire de même isotype et/ou avec l'anticorps secondaire seul avec ou sans C1q. L'analyse en microscopie à épifluorescence est effectuée avec un objectif PlanAPON60XO à immersion (huile). Le plan focal présenté est le plus représentatif parmi une série de 10 plans espacés de 1µm à travers la cellule.

Sur la Figure 73 nous pouvons observer le marquage de la calréticuline (vert), C1q (rouge) et ERp57 (magenta) au sein de structures en « patches ». Nous observons également sur la superposition (Figure 73 e, j, o) des zones de colocalisation des 3 signaux (flèches blanches).

L'évolution de la colocalisation des marquages en fonction de l'état d'apoptose des cellules a été analysée en mesurant les coefficients de colocalisation de Manders. Ces résultats sont présentés sur le graphique de la Figure 74.

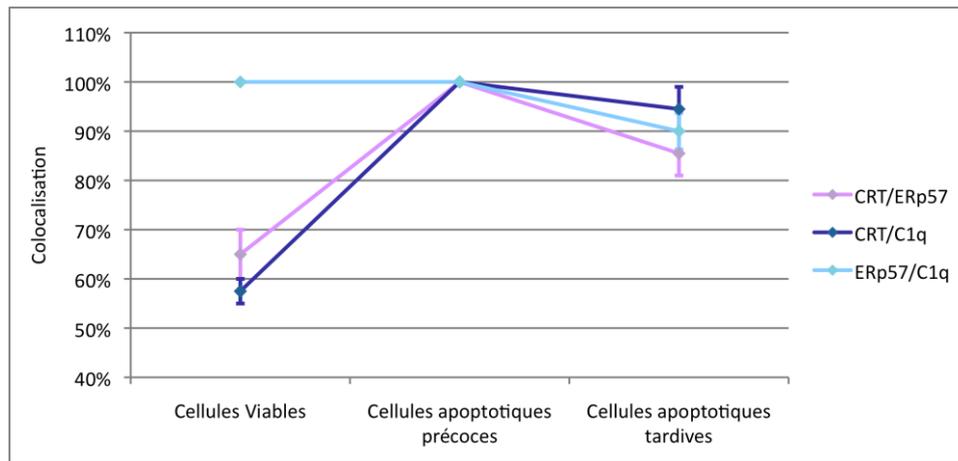


Figure 74 : Analyse de la colocalisation de la calréticuline, d'ERp57 et de C1q à la surface des cellules HeLa

La colocalisation entre la calréticuline et ERp57 (CRT/ERp57), entre la calréticuline et C1q (CRT/C1q) et enfin entre ERp57 et C1q (ERp57/C1q) est analysée lorsque les cellules HeLa sont viables, apoptotiques précoces ou apoptotiques tardives. Des mesures représentatives de 3 mesures sont présentées. Les coefficients de Manders ont été calculés deux à deux, la moyenne des deux est représentée et les barres d'erreurs correspondent à la variation observée entre les différentes mesures (ces mesures ont été effectuées sur 3 plans différents pour une cellule et reproduits sur au moins 5 cellules différentes).

Sur la Figure 74 nous pouvons voir contrairement à la localisation de C1q avec la calréticuline qu'ERp57 et C1q colocalisent parfaitement à la surface des cellules viables. Par contre lorsque les cellules sont en apoptose précoce les trois partenaires (ERp57, la calréticuline et C1q) colocalisent parfaitement. Enfin lorsque les cellules sont en apoptose tardive, la parfaite colocalisation des trois partenaires est diminuée mais reste tout de même importante (< 80 %).

Ces résultats suggèrent que C1q pourrait interagir avec ERp57 et c'est ce que nous avons voulu vérifier dans les expériences suivantes.

5.2. Mise en évidence d'une interaction *in vitro* entre C1q et ERp57

Nous savons qu'ERp57 et C1q colocalisent parfaitement dans certaines conditions à la surface des cellules HeLa. Nous avons donc cherché la présence d'une interaction *in vitro* entre ces deux protéines. Pour cela, nous avons dans un premier temps effectué des tests avec une protéine ERp57 recombinante commerciale.

La présence d'une interaction *in vitro* entre ERp57 et C1q a été évaluée par test ELISA.

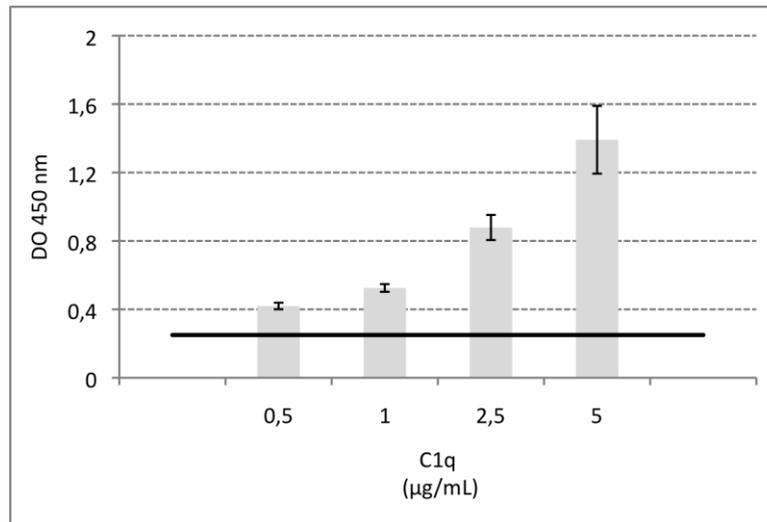


Figure 75 : Analyse par test ELISA de l'interaction entre ERp57 et C1q

ERp57 est immobilisé sur le support, il est ensuite mis en contact avec des concentrations croissantes de C1q. La fixation de C1q est détectée par fixation d'un anticorps primaire puis secondaire couplé à la HRP, la réaction colorimétrique est ensuite mesurée par l'étude de l'absorbance à 450 nm (voir paragraphe 7.3 du matériel et méthodes). La ligne noire représente le signal maximal obtenu dans les conditions contrôles (5 µg/mL de C1q sans ERp57). Présentation d'une expérience en triplicata \pm SD.

Sur la Figure 75, nous observons la présence d'une interaction *in vitro* entre ERp57 et C1q avec un effet dose lorsque des concentrations croissantes de C1q sont ajoutées. Cependant, dans les concentrations utilisées, aucune saturation du signal n'a été observée. Afin de confirmer la spécificité de cette interaction, des expériences de résonance plasmonique de surface (SPR) ont ensuite été menées.

Pour tester l'interaction d'ERp57 avec C1q par SPR, C1q et ses différents domaines ont été immobilisés sur le support (sensor chip) et afin de déterminer des constantes d'affinité, des concentrations croissantes d'ERp57 ont été injectées.

Un sensorgramme représentatif des résultats obtenus avec C1q est présenté en Figure 76.

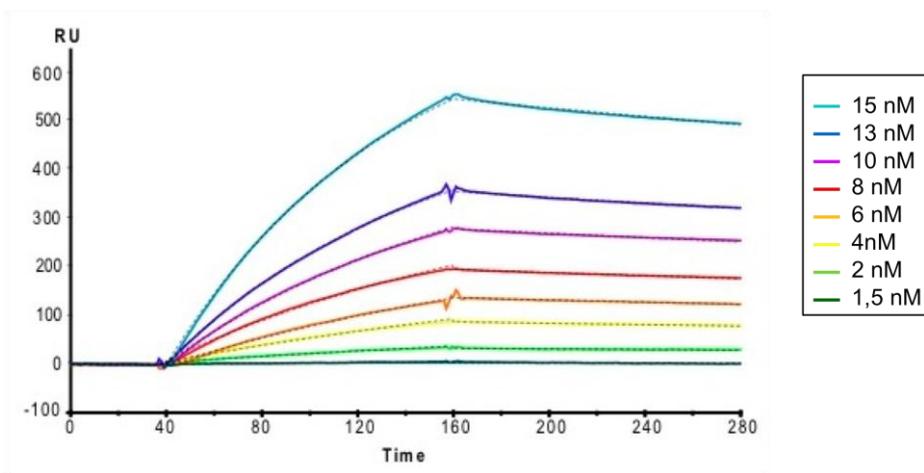


Figure 76 : Analyse par SPR de l'interaction entre ERp57 et C1q

ERp57 recombinant (Novus Biologicals) est injecté sur une surface sur laquelle C1q a été préalablement immobilisé. L'association et la dissociation sont analysées pendant 120 s.

Par SPR nous avons pu confirmer l'interaction entre ERp57 et C1q observée par ELISA. Nous remarquons également que l'affinité de ces deux protéines est assez stable car il n'y a quasiment aucune diminution du signal de résonance dans la phase de dissociation. Le même type de mesure a été effectué sur C1qGR et C1qCLF immobilisées et des résultats similaires ont été obtenus (sensorgrammes non montrés). L'analyse des sensorgrammes en présence de concentrations croissantes d'ERp57 par le logiciel BIAeval, selon un modèle d'interaction Langmuir 1 : 1, nous a permis de déterminer des constantes d'affinité ; celles-ci sont présentées dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Détermination des constantes d'affinité				
		C1q	C1qGR	C1qCLF
CRT ¹	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	$6,3 \pm 4 \times 10^3 / 1,7 \pm 0,6 \times 10^{-2}$	$2,4 \pm 0,5 \times 10^3$	$7,9 \pm 1,0 \times 10^3$
	k_d (s^{-1})	$2,4 \pm 0,5 \times 10^{-2} / 5,3 \pm 0,5 \times 10^{-4}$	$2,0 \pm 0,1 \times 10^{-3}$	$3,1 \pm 0,1 \times 10^{-3}$
	K_D (M)	$1,2 \pm 0,5 \times 10^{-7}$	$8,3 \pm 1,2 \times 10^{-7}$	$3,9 \pm 0,8 \times 10^{-7}$
ERp57	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	$1,3 \pm 0,35 \times 10^6$	$9 \pm 3 \times 10^5$	$2,1 \pm 0,5 \times 10^6$
	k_d (s^{-1})	$1,0 \pm 0,35 \times 10^{-5}$	$10,2 \pm 2 \times 10^{-4}$	$1,8 \pm 0,5 \times 10^{-3}$
	K_D (M)	$8 \pm 0,5 \times 10^{-10}$	$11 \pm 0,7 \times 10^{-10}$	$8,6 \pm 4 \times 10^{-10}$

¹[Paidassi *et al.* 2011]. Les constantes obtenues avec C1q ont été déterminées par un fit global selon un modèle de réaction à deux états de liaison (k_{a1}/k_{a2}) et (k_{d1}/k_{d2}). Les valeurs indiquées pour la constante d'association (k_a), de dissociation (k_d) et d'affinité (K_D) sont les moyennes de trois expériences distinctes.

Les expériences de SPR ont été menées de façon similaire à celles de la calréticuline où une interaction, à la fois avec les queues collagène et les têtes globulaire de C1q a été mise en évidence. La calréticuline étant à la fois présente à la surface des cellules apoptotiques, un modèle de fixation avec C1q a été proposé : les têtes globulaires interagiraient avec la calréticuline des cellules apoptotiques et les C1qCLF avec la calréticuline à la surface des phagocytes. Cependant ce modèle reste hypothétique.

Nous pouvons voir qu'ERp57, tout comme la calréticuline, interagit également à la fois avec les parties collagènes et les régions globulaires de C1q. Il semble cependant que l'interaction avec les C1qGR soit plus stable ($k_d\text{C1qCLF} > k_d\text{C1qGR}$). Comme pour la calréticuline, cette interaction pourrait avoir lieu des deux côtés.

5.3. Détermination du site d'interaction d'ERp57 avec C1q

Dans le but de déterminer le domaine d'ERp57 qui interagit avec C1qGR ou C1qCLF, nous avons produit de manière recombinante ses différents domaines.

5.3.1. Production et purification des différents domaines d'ERp57.

Sur la base de sa séquence polypeptidique, ERp57 a été divisée en 4 domaines selon [Grillo *et al.* 2002], les différentes constructions d'intérêt sont présentées sur la Figure 77.

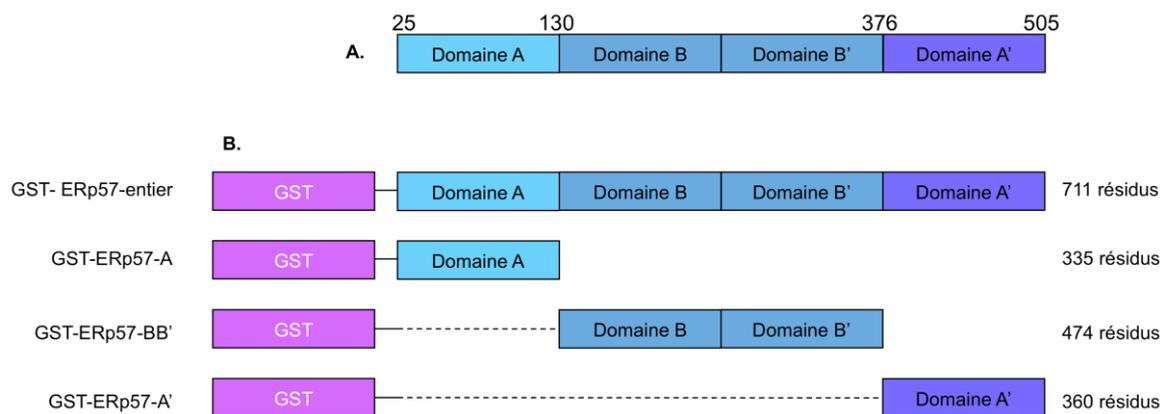


Figure 77 : Schéma représentatif des différents domaines d'ERp57 humaine ainsi que des constructions en fusion avec la GST

A. Représentation du découpage des domaines d'ERp57 selon Grillo et collaborateurs, les chiffres représentent la numérotation des acides aminés, en B. sont présentés les différentes constructions en fusion avec la GST qui ont été produites ainsi que le nombre de résidus de chaque construction.

Les vecteurs codants pour les différents domaines d'ERp57 ont été obtenus par amplification PCR de la séquence ADN d'intérêt à partir du plasmide pHIS-ERp57 (fourni par le Dr Lars Elgaard) et clonage dans le plasmide pGEX-6P-3. Les plasmides d'intérêt ont ensuite été utilisés pour transformer des bactéries BL21 (DE3). La culture, l'induction de pGEX-6P-3-ERp57 et l'extraction des protéines sont réalisées comme indiqué dans le paragraphe 6.3.2 du matériel et méthodes. L'analyse par SDS-PAGE montre la production et la purification de GST-ERp57-A' (Figure 78 A) et des autres constructions (Figure 78 B) après 3h en présence d'IPTG 1 mM.

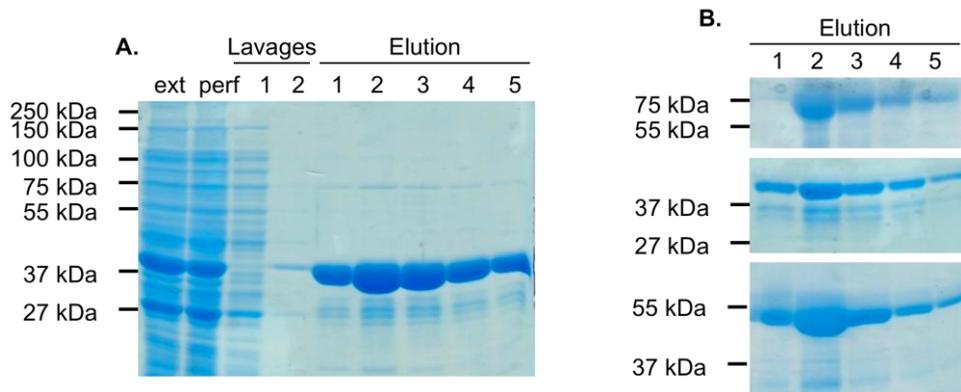


Figure 78 : Production et purification de GST-ERp57 et de ses domaines

(A) Analyse par SDS-PAGE de la purification de GST-ERp57-A' sur colonne d'affinité glutathion agarose. 10 μ L d'extrait protéique (ext), et de perfusât (perf), du lavage en tampon de lyse (Lavage 1), du lavage en tampon sans triton (Lavage 2) et des fractions d'élution 1 à 5 sont analysés sur gel 10 % acrylamide. (B) analyse sur gel 10 % acrylamide des fractions d'élution de GST-ERp57-entier a et BB'

GST-ERp57 et ses domaines sont purifiés sur colonne d'affinité glutathion agarose. L'étiquette GST, placée en position N-terminale des constructions permet la fixation spécifique de la protéine de fusion au glutathion de la résine. L'élution est effectuée à l'aide d'une solution contenant 20 mM de glutathion réduit, un compétiteur pour la fixation au glutathion. La purification est analysée par SDS-PAGE. Les fractions d'élutions de GST-ERp57 et de ses domaines (Figure 78 A et B) sont rassemblées, dialysée et 10% de glycérol est ajouté pour la conservation à -20 °C des échantillons.

Afin de mieux caractériser les protéines obtenues, une analyse par spectrométrie de masse a été effectuée. Toutes nos protéines purifiées correspondent bien à la masse attendue de chacune de nos constructions produites avec ou sans la méthionine N-terminale (cf. Tableau 15 du matériel et méthodes).

5.3.2. Expériences d'interaction in vitro

Sachant que la calréticuline interagit avec C1q nous nous sommes demandé si le site d'interaction de la calréticuline avec ERp57 était identique au site d'interaction d'un des domaines de C1q avec ERp57.

Nous savons que le Pdomaine de la calréticuline n'est pas capable d'interagir avec C1q [Frickel *et al.* 2002; Paidassi *et al.* 2011] mais que ce domaine est responsable de l'interaction de la calréticuline avec le domaine BB' d'ERp57 [Kozlov *et al.* 2006]. Nous avons donc utilisé le Pdomaine de la calréticuline pour des expériences de compétition (Figure 79).

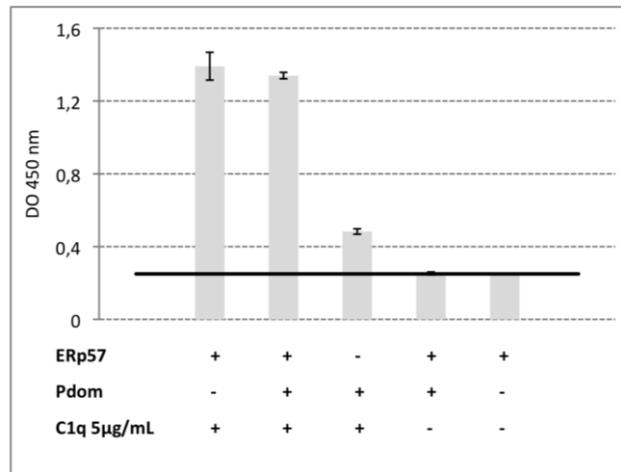


Figure 79 : Analyse par test ELISA de l'interaction entre ERp57 et C1q en compétition avec le Pdomaine de la calréticuline

ERp57 (commercial) est immobilisé sur le support, il est ensuite mis en contact ou non avec le Pdomaine de la calréticuline puis 5 µg/mL de C1q ont été ajoutés. La fixation de C1q est détectée par fixation d'un anticorps primaire puis secondaire couplé à la HRP, la réaction colorimétrique est ensuite mesurée par l'étude de l'absorbance à 450 nm (voir paragraphe 7.3 du matériel et méthodes). La ligne noire représente le signal maximal obtenu dans les conditions contrôles (5 µg/mL de C1q sans ERp57). Présentation d'une expérience en triplicata ±SD.

Dans cette expérience de compétition, nous n'avons pas pu vérifier la fixation effective du Pdomaine sur ERp57. Cependant nous pouvons dire que :

- le Pdomaine n'inhibe pas l'interaction de C1q avec ERp57. Une interaction à la fois entre C1q, ERp57 et la calréticuline pourrait être envisagée
- l'interaction d'ERp57 avec la calréticuline étant d'environ 2,6 µM [Frasconi *et al.* 2012] il est possible que la calréticuline soit déplacée pour permettre la fixation de C1q (beaucoup plus affine), impliquant alors une interaction avec le domaine BB' d'ERp57.

Afin de vérifier une partie de ces hypothèses, nous avons donc testé l'interaction de C1q avec chacun des domaines d'ERp57 *in vitro* par test ELISA (Figure 80).

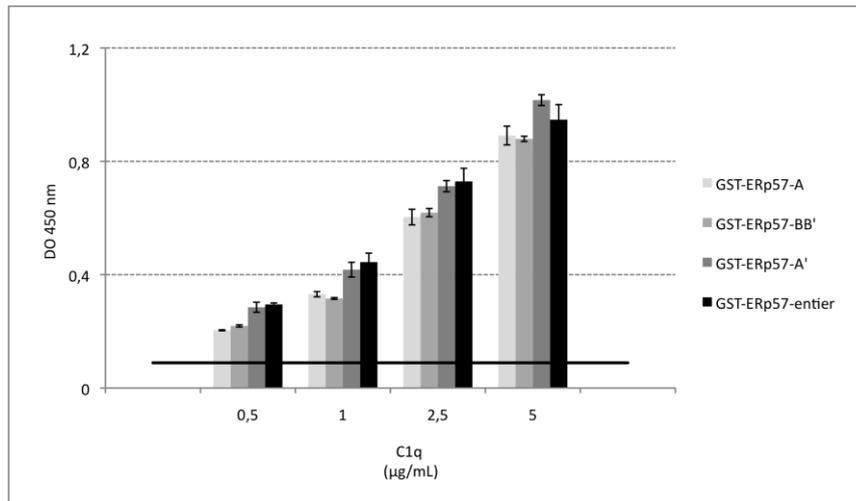


Figure 80 : Analyse par test ELISA de l'interaction des différents domaines d'ERp57 avec C1q

ERp57-entier et ses différents domaines sont immobilisés sur le support, ils sont ensuite mis en contact avec des concentrations croissantes C1q. La fixation de C1q est détectée par fixation d'un anticorps primaire puis secondaire couplé à la HRP, la réaction colorimétrique est ensuite mesurée par l'étude de l'absorbance à 450 nm (voir paragraphe voir paragraphe 7.3 du matériel et méthodes). La ligne noire représente le signal maximal obtenu dans les conditions contrôles (5 µg/mL de C1q sans ERp57). Présentation d'une expérience en triplicata \pm SD.

Sur la Figure 80, nous observons une interaction entre les différents domaines d'ERp57 et C1q. Un effet dose en présence de concentrations croissantes de C1q est observé avec tous les domaines d'ERp57. Cependant aucune différence d'interaction entre les différents domaines n'est mesurée.

Il est également possible que C1q interagisse avec la GST en fusion avec les domaines d'ERp57, le contrôle de l'interaction de C1q avec la GST seule n'ayant pas été effectué.

5.4. Bilan

In vitro ERp57 et C1q interagissent avec une forte affinité ($K_D = 10^{-10}$ M). Cependant pour déterminer le domaine d'ERp57 interagissant avec C1qGR ou C1qCLF, des expériences de SPR devront être menées.

La colocalisation entre ERp57 et C1q à la surface des cellules HeLa viables et apoptotiques semble être modulée en fonction de l'état d'apoptose des cellules. Au regard des données de FRET entre la calréticuline et C1q, il peut être envisageable qu'ERp57 interagisse à la place de la calréticuline avec C1q dans certaines conditions à la surface des cellules apoptotiques. La colocalisation du complexe calréticuline-ERp57-C1q semblant évoluer dans ce sens.

Ainsi, imaginer qu'ERp57 puisse être un partenaire de C1q à la surface des cellules apoptotiques et être impliqué dans la phagocytose de celles-ci semble tout à fait concevable. Une interaction de C1q à la fois avec la calréticuline et ERp57 au sein d'un même complexe pourrait également être envisageable.

CHAPITRE IV : Discussion et perspectives

Avant le début de mon travail, seule une colocalisation entre la calréticuline et les régions globulaires de C1q à la surface des cellules apoptotiques avait été montrée par immunofluorescence, l'interaction directe entre les deux protéines n'ayant été observée qu'*in vitro*. Ce sont ces données obtenues au laboratoire qui nous ont incités à rechercher, *in vivo*, l'interaction directe des têtes globulaires de C1q avec la CRT à la surface des cellules apoptotiques.

J'ai au cours de ces travaux, étudié l'interaction de C1q avec la calréticuline exposée à la surface des corps apoptotiques. En utilisant une technique de FRET, faisant appel à un marquage indirect, j'ai pu montrer que les têtes globulaires de C1q interagissaient avec la calréticuline à la surface des cellules apoptotiques. Cette interaction n'a été clairement démontrée que pour les cellules HeLa en apoptose précoce. Malgré la décoration des cellules HeLa en apoptose tardive par la calréticuline et les têtes globulaires de C1q, ainsi que leur colocalisation en surface, aucun signal de FRET n'a en effet pu être observé. Ce résultat suggère que les deux protéines ne sont pas en contact direct dans ces conditions.

L'influence de la calréticuline exposée à la surface des cellules apoptotiques a été analysée en utilisant une stratégie d'ARN interférence (ARNi) ou en utilisant des cellules déplétées en calréticuline (MEF CRT^{-/-}).

Dans ces tests de phagocytose, la réponse inflammatoire des phagocytes (THP-1-m) a été analysée en dosant les cytokines sécrétées au cours de la réaction.

1. La calréticuline et C1q, des protéines partenaires complexes

1.1. La calréticuline de surface, encore mystérieuse

Afin de pouvoir mesurer par FRET l'interaction de C1q avec la calréticuline à la surface des cellules, nous avons développé une stratégie utilisant des protéines de fusion CRT/GFP. Cependant la calréticuline en fusion exprimée transitoirement était trop faiblement exportée à la surface des cellules pour permettre la mesure de signaux par FRET. Suite à ces observations, nous nous sommes demandé si l'expression transitoire de la calréticuline en fusion pouvait être un frein à son exportation à la surface, en raison de taux d'expression transitoire trop élevés et/ou de défauts de repliement de la protéine en fusion exprimée. Nous n'avons malheureusement pas pu apporter de réponses à ces interrogations. Il serait donc intéressant de mener de nouvelles expériences de co-immunoprécipitation sur des cellules exprimant transitoirement une calréticuline radiomarquée afin d'être beaucoup plus sensible lors de la révélation. Cela pourrait nous informer sur le comportement de la calréticuline en fusion et sur son éventuelle interaction avec les partenaires physiologiques impliqués dans son exportation, notamment ERp57.

Pour les constructions de calréticuline en fusion, l'apparente ségrégation en surface entre le signal SNAP et la calréticuline suggère la possibilité d'un clivage en position C-terminale, séparant ainsi la protéine SNAP de la calréticuline. Cela supposerait un clivage de la séquence KDEL, permettant l'exportation en surface ; l'hypothèse d'un clivage avant exportation a également été évoquée par l'équipe d'Eggleton pour des cellules Jurkat [Tarr *et al.* 2010]. Néanmoins une autre étude a montré, à l'inverse, la présence de la séquence KDEL sur la calréticuline exposée à la surface de cellules MEF [Garg *et al.* 2012]. Ainsi, les mécanismes conduisant à l'exposition membranaire de la calréticuline apparaissent différents selon le type cellulaire et/ou les voies d'exportation de la calréticuline impliquées en fonction de l'inducteur d'apoptose utilisé (activation des récepteurs de mort ou stress oxydatif du réticulum). Plusieurs « pools » de calréticuline pourraient alors coexister, expliquant la publication de résultats apparemment contradictoires.

Nos expériences de « shaving » suggèrent par ailleurs que seule la fraction de calréticuline solubilisée à pH basique sur des cellules viables ne possède pas la séquence KDEL, ou du moins qu'elle est modifiée côté C-terminal car non reconnue par un anticorps spécifique de cette région. Il serait intéressant de tester la présence de la séquence KDEL sur la calréticuline exposée par les fractions soluble et non soluble à pH basique. Pour ce faire, nous pourrions réaliser une biotinylation de surface et reproduire les expériences d'immunotransfert sur des extraits de cellules viables et de cellules apoptotiques obtenues, éventuellement, dans différentes conditions expérimentales (induction UV ou Mitoxantrone et apoptose précoce ou tardive). Il serait ainsi possible de rechercher la présence de la séquence KDEL en fonction de l'état d'apoptose des cellules. Néanmoins le lien entre le clivage du KDEL et l'exportation en surface de la calréticuline n'est pas encore clairement établi ; des études plus approfondies semblent encore nécessaires.

Par ailleurs, ces expériences de « shaving » ont également permis d'élucider, en partie, la rétention de la calréticuline à la surface des cellules. Il semblerait qu'au moins une partie de celle-ci ne soit pas associée à la membrane par des interactions covalentes ou des interactions faibles dépendantes du calcium. Toutefois, la complexité des interactions permettant la rétention de la calréticuline en surface pourrait expliquer les problèmes rencontrés pour l'exportation de nos protéines de fusion. Plusieurs équipes ont mis en évidence une rétention de la calréticuline à la membrane de différents types cellulaires suite à une association avec un partenaire membranaire protéique [Arosa *et al.* 1999; Ghiran *et al.* 2003].

Garg et collaborateurs ont récemment montré l'importance de CD91/LRP dans la rétention de la calréticuline à la surface des cellules apoptotiques [Garg *et al.* 2012]. Nous avons pu également détecter cette molécule à la surface des cellules HeLa (non montré). Ainsi, cette dernière découverte complique le modèle d'interaction entre CD91/CRT impliqué dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques. En effet, le complexe CD91/CRT a tout d'abord été identifié à la surface des macrophages comme un récepteur des queues collagènes de C1q [Ogden *et al.* 2001]. Gardai et collaborateurs ont ensuite proposé une interaction entre CD91/LRP à la surface des macrophages et la calréticuline exposée à la surface des cellules apoptotiques [Gardai *et al.* 2005]. Plus tard une interaction directe de C1qGR et C1qCLF avec CD91/LRP a également été mise en évidence soulevant la possibilité d'une reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q à la fois par sa partie collagène et par ses têtes globulaires, de façon moins orientée que ce qui a été initialement imaginé [Duus *et al.* 2010].

Le rôle de CD91/LRP dans la phagocytose des cellules apoptotiques est quant à lui également controversé et pourrait ne pas être influencé par C1q [Lillis *et al.* 2008; Kozmar *et al.* 2010]. Par ailleurs, au laboratoire, suite aux données structurales obtenues de la région globulaire de la calréticuline, une interaction homophylique calréticuline-calréticuline a été proposée [Chouquet *et al.* 2011]. On pourrait ainsi envisager différentes possibilités de reconnaissance, impliquant la calréticuline et/ou CD91/LRP et/ou C1q. Celles-ci sont présentées sur la Figure 81.

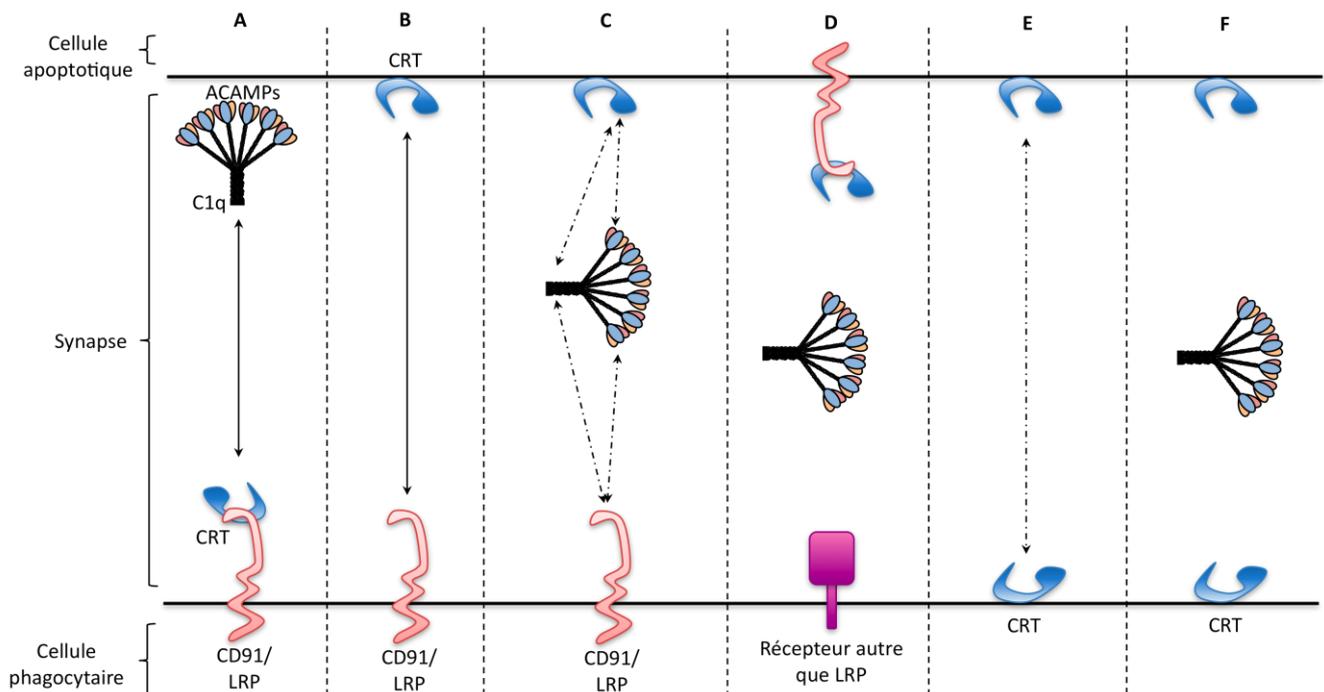


Figure 81 : Rôle de la calréticuline à la surface des cellules apoptotiques et des macrophages

(A) modèle de reconnaissance selon Ogden *et al.* [2001], (B) selon Gardai *et al.* [2005], (C) selon Duus *et al.* [2010], (D) selon Lillis *et al.* [2008] ; Garg *et al.* [2012], (E) selon Chouquet *et al.* [2011] et (F) selon Païdassi *et al.* [2011].

1.2. La calréticuline et les régions globulaires de C1q sont partenaires à la surface des cellules en apoptose précoce

Seul un marquage anticorps des têtes globulaires de C1q (C1qGR) et de la calréticuline endogène, a permis d'obtenir un signal de FRET à la surface uniquement des cellules en apoptose précoce. Ce signal peut être interprété comme une interaction à la surface des cellules.

Les cellules viables ou apoptotiques tardives, présentant pourtant des zones de fortes colocalisations entre la calréticuline et les C1qGR, n'ont pas permis l'obtention de signal de FRET significatif. La décoration de ces zones riches en calréticuline par les têtes globulaires démontre que C1q interagit avec des déterminants de surface (ACAMPs) autres que la calréticuline mais disposés à proximité. Quels sont alors les partenaires préférentiellement reconnus par C1q dans ces conditions ? Parmi les candidats, nous savons que C1q reconnaît d'autres motifs tels que l'ADN ou encore la phosphatidylsérine qui est elle-même une molécule pouvant reconnaître la calréticuline. Il est aussi possible qu'en apoptose tardive C1q s'associe avec d'autres motifs encore inconnus. Il serait intéressant de connaître les cinétiques d'interaction des différents ligands en fonction de l'évolution de l'apoptose des cellules afin de définir les rôles plus précis de ceux-ci lors de la reconnaissance et de l'élimination des cellules apoptotiques.

Parmi les protéines présentes en surface des corps apoptotiques, ERp57 a été identifiée. ERp57 est une protéine chaperonne associée à la calréticuline dans le réticulum endoplasmique qui est parfois exportée à la membrane en même temps que celle-ci comme l'a montré l'équipe de Kroemer [Panaretakis *et al.* 2008]. Par immunofluorescence, j'ai moi-même observé une colocalisation entre ERp57 et C1q à la surface des cellules apoptotiques, ce qui m'a amenée à rechercher une interaction entre ces deux protéines.

2. La calréticuline et C1q influencent la phagocytose et le statut inflammatoire

2.1. Questions posées par le modèle des cellules apoptotiques

Deux types de cellules apoptotiques ont été utilisés pour les tests de phagocytose et les dosages de cytokines : d'une part les cellules HeLa transfectées ou non avec des ARNi dirigés contre la CRT, afin d'atténuer transitoirement son expression, et d'autre part des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) délétés pour la calréticuline (CRT^{-/-}). La diminution en calréticuline influence la phagocytose mais de manière surprenante les effets observés sont opposés selon le modèle utilisé.

Les cellules MEF sont des cellules de souris, alors que les phagocytes utilisés dans nos essais sont des cellules humaines (THP-1-m), nous nous trouvons donc dans un système hétérologue. Il est possible qu'une reconnaissance du non-soi interspécifique ait lieu, induisant une modification de la reconnaissance, de la phagocytose et de la réponse inflammatoire. Par ailleurs, les cellules MEF CRT^{-/-} présentent une déficience totale en calréticuline, ce qui est un avantage car il n'y a pas de variation de la diminution de l'expression ; cependant la déficience en calréticuline est théoriquement létale au stade embryonnaire. De fait, les MEF CRT^{-/-}, bien vivantes, ont dû développer des mécanismes leur permettant de compenser l'absence de calréticuline provoquant certainement des modifications de certaines de leurs voies métaboliques et/ou de signalisation. Au vu de nos résultats, il serait intéressant de transfecter avec des ARNi dirigés contre la CRT des cellules MEF CRT WT afin de diminuer leur expression en calréticuline pour comparer une suppression transitoire et un KO de la CRT dans le but d'estimer la compensation mise en place par les cellules MEF CRT^{-/-}.

Les cellules HeLa, quant à elles, sont des cellules humaines, nous sommes donc cette fois-ci dans un modèle homologue pour l'espèce. Il faut cependant noter que les deux lignées cellulaires ne proviennent pas du même individu, elles peuvent donc également être reconnues comme du non-soi. Cependant les cellules HeLa déplétées par transfection transitoire d'ARNi présentent des niveaux variables de la diminution de l'expression de la calréticuline. Cette variabilité entraîne des difficultés dans l'analyse statistique des expériences. En effet, si le taux global de déplétion avoisine 60 %, tel que mesuré par l'intensité résiduelle en western-blot, il est difficile de savoir si cela correspond à 60 % des cellules qui n'expriment plus du tout de calréticuline ou à un pourcentage plus élevé qui n'exprimerait qu'une quantité réduite de calréticuline.

Il a également été constaté que les cellules HeLa transfectées avec des ARNi CRT présentaient une mortalité plus importante que les cellules non transfectées ou les cellules ARNi contrôle, cela ne modifiant que très peu le pourcentage de phagocytose mais afin de ne pas introduire de biais dans nos analyses et de ne considérer uniquement l'apoptose induite expérimentalement toutes nos phagocytoses ont été rapportées à la phagocytose des cellules viables correspondantes.

Pour nos expériences de phagocytose, deux types d'induction de mort cellulaire ont également été utilisés : un traitement à la mitoxantrone ou une irradiation aux UV. Nous avons pu constater que la prise en charge des cellules apoptotiques et la réponse inflammatoire qui en découlait étaient variables selon l'inducteur utilisé. En effet, une induction de l'apoptose par les UV induirait de nombreuses modifications moléculaires avec notamment des dommages de l'ADN, une activation du gène suppresseur de tumeur p53, une activation des récepteurs de mort cellulaire ainsi qu'une implication de la membrane et des dommages mitochondriaux conduisant au relargage du cytochrome-C [pour revue Kulms *et al.* 2000]. Ainsi de nombreuses voies seraient concernées ce qui rend plus complexe l'observation et la caractérisation des mécanismes impliqués.

A l'inverse, l'induction de l'apoptose par la mitoxantrone induirait beaucoup moins de modifications moléculaires avec principalement une fragmentation de l'ADN et un clivage protéolytique de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP, marqueur de l'activation des caspases) [Koceva-Chyla *et al.* 2005]. Il a également été mis en évidence une induction marquée de c-jun et une répression significative des oncogènes c-myc et BCL-2 [Bhalla *et al.* 1993]. Les effets observés sont donc plus restreints, il semblerait alors normal que suite à ces différences de modifications les motifs exprimés en surface puissent diverger et induire des réponses différentes. En effet, dans nos expériences les cellules dont l'apoptose a été induite par traitement à la mitoxantrone semblent mieux phagocytées par les THP-1-m et la réponse inflammatoire induite apparaît, elle aussi, différente.

Ces observations me laissent penser qu'il serait intéressant de reproduire les expériences de FRET après une induction à la mitoxantrone afin de comparer les interactions obtenues avec celles décrites lors de ce travail, après induction de l'apoptose aux UV. Nous pourrions également à terme étendre ces essais aux mesures de FRET avec les autres ACAMPs, et en particulier avec ERp57.

L'étude des modifications impliquées dans la reconnaissance et la modulation de la réponse inflammatoire suite à l'induction de la mort des cellules cancéreuses est actuellement très étudiée dans différents laboratoires. L'objectif est de combiner différentes stratégies anticancéreuses afin d'obtenir des traitements de plus en plus efficaces, notamment via l'induction d'une immunogénicité par l'exposition de la calréticuline.

2.2. Questions posées par les cellules phagocytaires

Les THP-1-m sont un modèle de macrophages issus de la différenciation au PMA d'une lignée monocyttaire. Cependant les THP-1-m, contrairement aux macrophages issus de la différenciation de PBMC, ne produisent pas d'IL-10, or C1q a été décrit comme un modulateur de l'expression de cette cytokine. Ce modèle ne nous a donc pas permis d'aborder ce point.

De plus, nous avons pu remarquer que nos THP-1-m produisaient très peu de C1q et qu'ils apparaissaient peu aptes à fixer du C1q exogène à leur surface. Malgré cela, nous avons réussi à détecter un effet de l'ajout de C1q exogène sur l'efficacité de la phagocytose des corps apoptotiques par ces cellules, et encore plus nettement pour leur réponse inflammatoire. Ainsi, il est possible que la réaction de phagocytose induise l'expression de nouveaux récepteurs permettant de fixer C1q. Notons que les monocytes humains sont connus pour leur sensibilité à C1q [Hosszu *et al.* 2012], cependant, nous n'avons pas vérifié leur capacité, dans notre modèle, à fixer du C1q exogène à leur surface.

En ce qui concerne le statut inflammatoire des THP-1-m, nous avons également observé, comme pour les mesures d'efficacité de phagocytose, des effets opposés lors de la réponse inflammatoire suite à la diminution de l'expression de la calréticuline selon l'utilisation de cellules HeLa ARNi ou MEF CRT WT ou CRT-/-.

3. Pour la suite

Malgré la variabilité induite par les ARNi, il serait intéressant de mener à nouveau ces analyses sur la phagocytose des cellules HeLa ARNi par les monocytes (plus sensibles à C1q) afin de mettre en évidence dans ce modèle l'influence de l'interaction entre C1q et la calréticuline.

Il faudrait également analyser la réponse inflammatoire induite suite à la phagocytose de cellules HeLa ARNi dont l'apoptose a été induite par la mitoxantrone afin de déterminer si les deux modes d'induction de l'apoptose provoquent une réponse inflammatoire différente comme nous avons pu l'observer avec les cellules MEF.

Par ailleurs, par FRET, l'interaction entre C1q et la calréticuline a été visualisée uniquement à la surface de cellules en apoptose précoce. Il faudrait confirmer cette observation lors de la phagocytose quand la cellule cible et la cellule phagocytaire sont en contact.

De plus, la présence à la surface des cellules d'ERp57 avec la calréticuline et C1q nous a amenés à étudier l'évolution de sa colocalisation avec ces deux partenaires. La colocalisation entre ERp57 et C1q à la surface des HeLa viables et apoptotiques semble être modulée en fonction de l'état d'apoptose des cellules. Au regard des données de FRET, obtenues pour l'interaction de la calréticuline avec C1q, il peut être envisagé qu'ERp57 interagisse à la place de la calréticuline avec C1q dans certaines conditions à la surface des cellules apoptotiques. *In vitro*, nous avons pu détecter une interaction de forte affinité ($K_D = 10^{-10}$ M) entre ERp57 et C1q. Des expériences complémentaires devront être menées pour déterminer le domaine d'ERp57 interagissant avec la partie collagène et/ou les têtes globulaires de C1q afin de mieux caractériser cette interaction. Ainsi, imaginer qu'ERp57 puisse être un partenaire de C1q à la surface des cellules apoptotiques et être impliqué dans la phagocytose de celles-ci semble tout à fait concevable.

De même, l'utilisation d'ARNi spécifique d'ERp57 pourrait permettre de compléter ces approches et de rechercher, dans des tests de phagocytose calqués sur ceux que nous avons développés pour la calréticuline, l'importance physiologique potentielle d'ERp57.

Enfin, il serait également intéressant d'effectuer des expériences de FRET entre ERp57 et C1q afin d'analyser l'évolution de leur interaction et de déterminer si celle-ci a lieu parallèlement à l'interaction de C1q avec la calréticuline ou si au contraire elle est décalée dans le temps. Il pourrait ainsi être envisagé que la calréticuline, ERp57 et C1q forment un complexe reconnu par les têtes globulaires de C1q mais également que les différentes C1qGR au sein d'une même molécule de C1q puissent reconnaître plusieurs motifs (Figure 82).

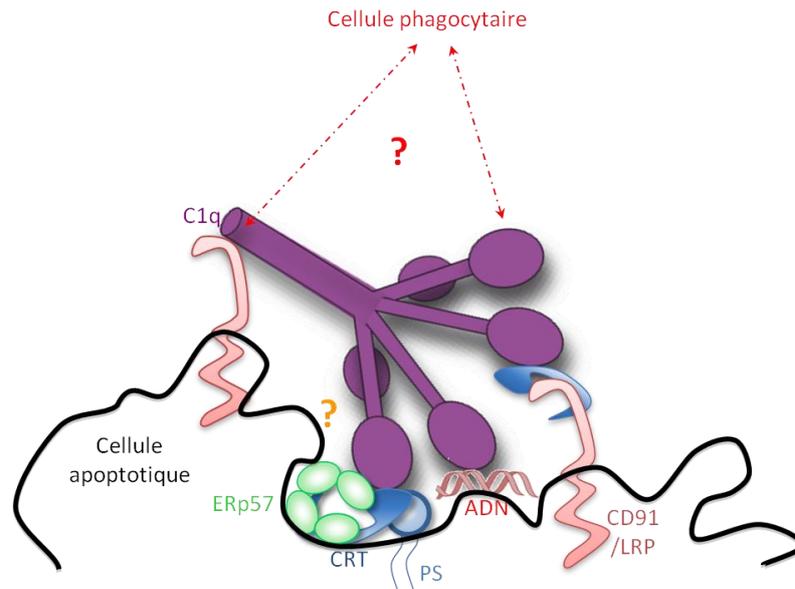


Figure 82 : Proposition d'un modèle de reconnaissance des ACAMPs à la surface des cellules apoptotiques par C1q

Il est possible que les C1qGR reconnaissent un complexe multimoléculaire, mais il est également possible que les différentes C1qGR au sein d'une même molécule de C1q reconnaissent plusieurs motifs.

Le rôle de cette interaction avec ERp57, seul ou en complexe, reste à confirmer dans le contexte cellulaire. Les conséquences physiologiques restent pour l'heure inconnues et nous ouvrent des perspectives intéressantes. Le rôle d'une telle interaction dans l'élimination des corps apoptotiques restera encore à être déterminé.

4. Le mot de la fin

Les résultats obtenus au cours de ces travaux contribuent à la compréhension de l'interaction de C1q avec la calréticuline à la surface des cellules apoptotiques. Cependant C1q est une molécule qui a encore beaucoup de secrets à révéler car elle semble être dotée d'une capacité « illimitée » à reconnaître et fixer de nouveaux ligands.

Du fait de la présence de certains ligands de C1q, potentiels ou caractérisés, à la surface des cellules phagocytaires et des cellules apoptotiques, le modèle initial impliquant la reconnaissance des cellules apoptotiques uniquement par ces têtes globulaires et la reconnaissance de ces queues collagènes par les cellules phagocytaires est probablement à reconsidérer.

Enfin, une meilleure compréhension de la reconnaissance des molécules impliquées à la surface des cellules apoptotiques et de la modulation de la réponse inflammatoire reste un point essentiel pour le développement de nouvelles stratégies anticancéreuses efficaces.

Annexes

1. Vecteurs et séquences clés des constructions de la calréticuline

1.1. Vecteur pHFX-CRT :

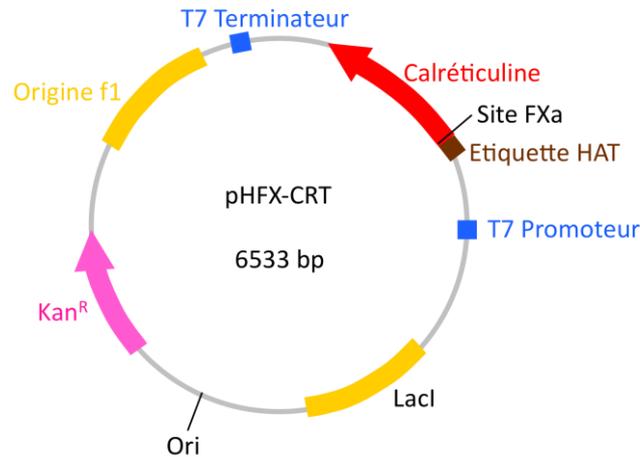


Figure 83 : Représentation schématique du plasmide pHFX-CRT

Figure réalisée selon les informations fournies par le Dr Gunnar Houen du Department of Autoimmunology, Statens Serum Institut, Copenhague, Danemark. Ce plasmide permet d'exprimer la HAT-CRT en bactérie BL21 (DE3) pLysS. [Houen *et al.* 1994]. Ori : origine de réplication ; Origine f1 : origine de réplication du phage f1 ; Lacl : gène codant pour le répresseur de l'opéron lac.

1.2. Vecteur pEGFP-C1 :

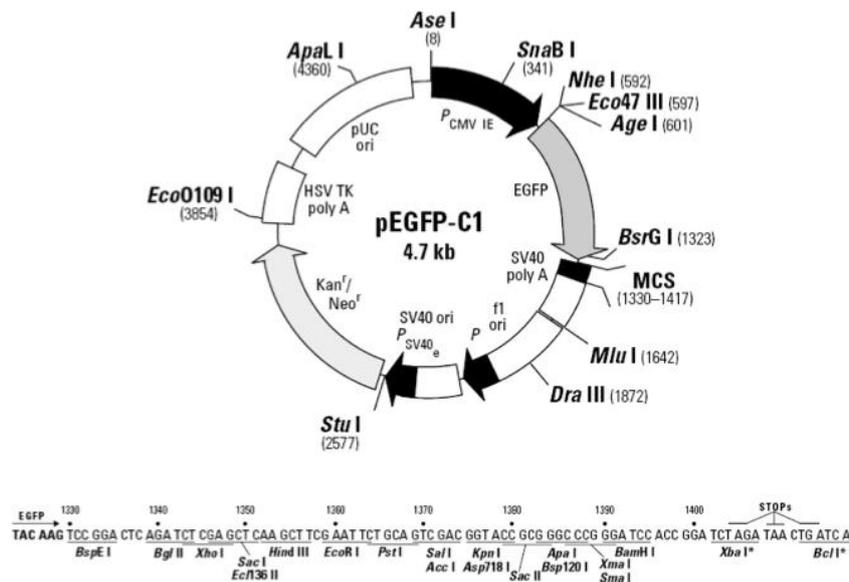


Figure 84 : Carte de restriction et du site multiple de clonage (MCS) de pEGFP-C1

Tous les sites de restriction montrés sont uniques. Le MCS est du côté Cter de la GFP. Figure de la fiche d'information du vecteur de BD Biosciences Clontech. Ce plasmide peut être amplifié en système bactérien (résistance à la Kanamycine) et permet l'expression en cellules mammifères (résistance à la Néomycine).

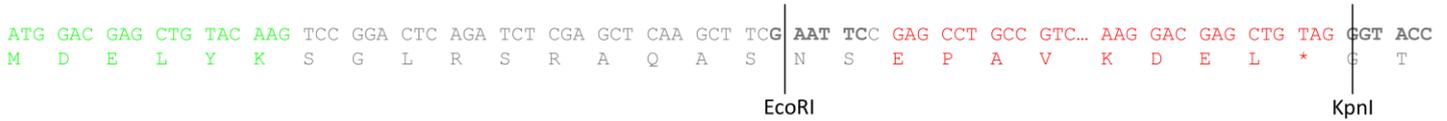


Figure 85 : Séquence du plasmide pEGFP-CRT-C1 au niveau des sites de restriction EcoRI et KpnI

La séquence de la GFP est présentée en vert, la séquence de la calréticuline en rouge et la séquence correspondant au plasmide pEGFP-C1 en gris. Les séquences reconnues par les enzymes de restriction sont présentées en gras.



Figure 86 : Séquence du plasmide psig-EGFP-CRT-C1 au niveau du peptide signal après son insertion par mutagenèse dirigée

La séquence de la GFP est présentée en vert, la séquence du peptide signal en orange et la séquence correspondant au plasmide pEGFP-C1 en gris. Les séquences reconnues par les enzymes de restriction sont présentées en gras.

1.3. Vecteur pEGFP-N1 :

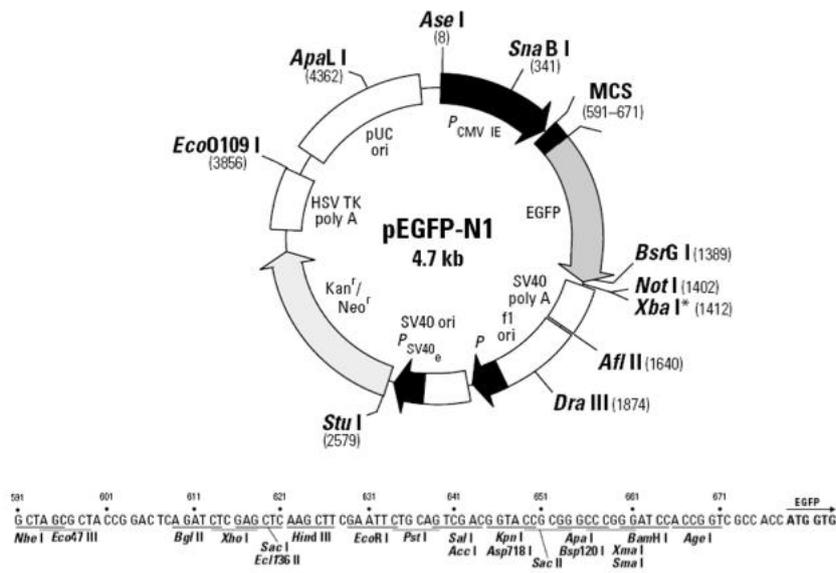


Figure 87 : Carte de restriction et du site multiple de clonage (MCS) de pEGFP-N1

Tous les sites de restriction montrés sont uniques. Le MCS est du côté Nter de la GFP. Figure de la fiche d'information du vecteur de BD Biosciences Clontech. Ce plasmide peut être amplifié en système bactérien (résistance à la Kanamycine) et permet l'expression en cellules mammifères (résistance à la Néomycine).



Figure 88 : Séquence du plasmide pEGFP-CRT-N1 au niveau des sites de restriction Eco RI et Acc I

La séquence de la GFP est présentée en vert, la séquence de la calréticuline en rouge et la séquence correspondant au plasmide pEGFP-N1 en gris. Les séquences reconnues par les enzymes de restriction sont présentées en gras.

```

gat ccg | cta gcg cra ccg gtc gcc acc ATG CTG ... GAG CCG GCC GTC TAC TTC ... AAG GAC GAG CTA gat cca ccg gtc gcc acc ATG GTG
D P | L A L P V A T M L E P A V Y F K D E L D P P V A T M V
NheI Accl
    
```

Figure 89 : Séquence du plasmide psig-CRT-EGFP-N1 au niveau des sites de restriction NheI et Accl

La séquence de la GFP est présentée en vert, la séquence du peptide signal en orange, la séquence de la calréticuline en rouge et la séquence correspondant au plasmide pEGFP-N1 en gris. Les séquences reconnues par les enzymes de restriction sont présentées en gras.

1.4. Vecteur pSNAP-N1 :

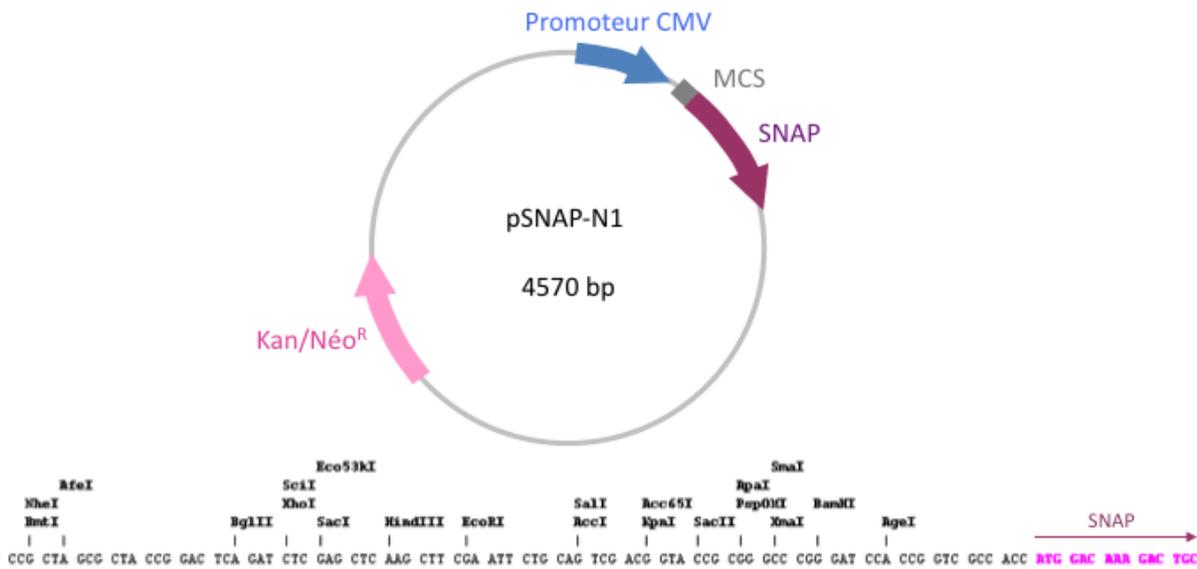


Figure 90 : Schéma de la carte du plasmide pSNAP-N1

Tous les sites de restriction montrés sont uniques. Le MCS est du côté Nter de SNAP. Ce plasmide, fourni par Jean-Philippe Kleman, est identique à pEGFP-C1, seule la séquence codant pour la GFP a été modifiée et remplacée par la séquence codant pour SNAP, le cadre de lecture et les sites de restriction restent identiques. La séquence SNAP a été obtenue à partir du plasmide pSNAP de New England Biolabs. Ce plasmide peut être amplifié en système bactérien (résistance à la Kanamycine) et permet l'expression en cellules mammifères (résistance à la Néomycine).

```

gat ccg | cta gcg cta ccg gtc gcc acc ATG CTG ... GAG CCG GCC GTC TAC TTC ... AAG GAC GAG CTA gat cca ccg gtc gcc acc ATG GAC
D P | L A L P V A T M L E P A V Y F K D E L D P P V A T M D
NheI Accl
    
```

Figure 91 : Séquence du plasmide psig-CRT-SNAP-N1 au niveau des sites de restriction NheI et Accl

La séquence de SNAP est présentée en parme, la séquence de la calréticuline en rouge, la séquence du peptide signal en orange et la séquence correspondant au plasmide pSNAP-N1 en gris. Les séquences reconnues par les enzymes de restriction sont présentées en gras.

2. Vecteurs et séquences clés des constructions d'ERp57

2.1. Vecteur pHisERp57 :

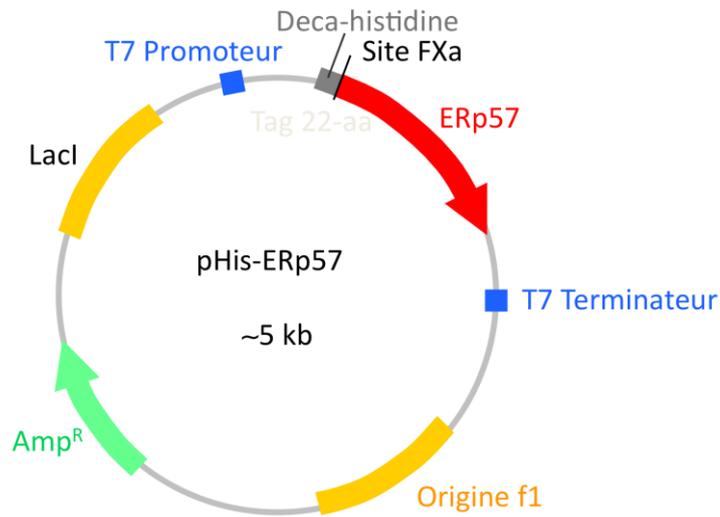


Figure 92 : Schéma de la carte du plasmide pHis-ERp57

Figure réalisée selon les informations fournies par le fourni par le Dr Lars Elgaard de la Section for Biomolecular Sciences du Department of Biology, Copenhagen Biocenter, Copenhagen, Denmark. Ce plasmide permet d'exprimer His-ERp57 en bactérie BL21 (DE3) [Frickel *et al.* 2002].

2.2. Vecteur pGEX-6P-2 :

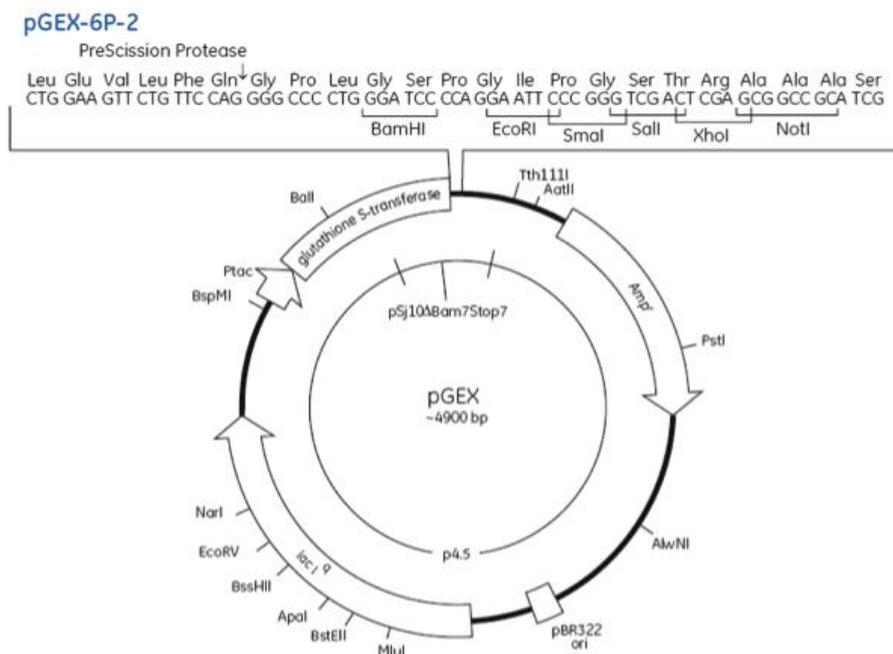


Figure 93 : Carte de restriction et du site multiple de clonage (MCS) de pGEX-6P-2

Tous les sites de restriction montrés sont uniques. Figure de la fiche d'information du vecteur de GE Healthcare.

Article



Investigations on the C1q–Calreticulin–Phosphatidylserine Interactions Yield New Insights into Apoptotic Cell Recognition

Helena Païdassi¹†, Pascale Tacnet-Delorme¹†, Mélanie Verneret¹, Christine Gaboriaud¹, Gunnar Houen², Karen Duus², Wai Li Ling¹, Gérard J. Arlaud¹ and Philippe Frchet¹*

¹Université Joseph Fourier Grenoble 1, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 38027 Grenoble, France; CNRS, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 38027 Grenoble, France; CEA, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 38027 Grenoble, France

²Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Statens Serum Institut, DK-2300 Copenhagen, Denmark

Received 3 November 2010;
received in revised form

2 February 2011;
accepted 11 February 2011

Available online
23 February 2011

Edited by M. Yaniv

Keywords:

apoptotic cell recognition;
C1q;
calreticulin;
phosphatidylserine;
innate immunity

Both C1q and calreticulin (CRT) are involved in the recognition of apoptotic cells. CRT was initially characterized as a receptor for the C1q collagen-like fragment (CLF), whereas C1q was shown to bind apoptotic cells through its globular region (GR). Using purified CRT and recombinant CRT domains, we now provide unambiguous experimental evidence that, in addition to its CLF, the C1q GR also binds CRT and that both types of interactions are mediated by the CRT globular domain. Surface plasmon resonance analyses revealed that the C1q CLF and GR domains each bind individually to immobilized CRT and its globular domain with K_D values of $(2.6–8.3) \times 10^{-7}$ M. Further evidence that CRT binds to the C1q GR was obtained by electron microscopy. The role of CRT in the recognition of apoptotic HeLa cells by C1q was analyzed. The C1q GR partially colocalized with CRT on the surface of early apoptotic cells, and siRNA (small interfering RNA)-induced CRT deficiency resulted in increased apoptotic cell binding to C1q. The interaction between CRT and phosphatidylserine (PS), a known C1q ligand on apoptotic cells, was also investigated. The polar head of PS was shown to bind to CRT with a 10-fold higher affinity ($K_D = 1.5 \times 10^{-5}$ M) than that determined for C1q, and, accordingly, the C1q GR–PS interaction was impaired in the presence of CRT. Together, these observations indicate that CRT, C1q, and PS are all closely involved in the uptake of apoptotic cells and strongly suggest a combinatorial role of these three molecules in the recognition step.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Corresponding author. Equipe “Phagocytose du Soi Altéré,” Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France. E-mail address: philippe.frchet@ibs.fr.

† H.P. and P.T.D. contributed equally to this work.

Present address: H. Païdassi, Program of Development Immunology, Department of Pediatrics, Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School, Boston 02114, MA, USA.

Abbreviations used: CRT, calreticulin; CLF, collagen-like fragment; GR, globular region; PS, phosphatidylserine; siRNA, small interfering RNA; pCRT, placental CRT; rCRT, recombinant CRT; SPR, surface plasmon resonance; ectoCRT, CRT exposed at the cell surface.

Introduction

The uptake of apoptotic cells by phagocytes is a physiological function that is essential for development and tissue homeostasis. In the healthy human, this results in most cases in an anti-inflammatory response and the induction of self-tolerance. This process is divided into several steps ranging from the recognition of altered cells to the acquisition of a new immunological status by the phagocyte (for reviews, see Refs. 1–4). Perturbation of this mechanism can lead to autoimmune diseases and to pathological inflammation. A number of molecules that either mark the apoptotic cell, serve as a receptor on macrophages, or bridge these two types of cells have been characterized, but the role of each of these partners, alone or in combination, remains to be fully elucidated.

Complement protein C1q and calreticulin (CRT) have been shown to be involved in apoptotic cell uptake. Over the past few years, a novel multifaceted role for the “old” protein C1q has emerged. Besides its role in the activation of the classical complement pathway in response to pathogen infection, C1q plays a crucial role in the detection and scavenging of a wide variety of noxious altered-self substances, such as β -amyloid fibrils, the pathological form of the prion protein, apoptotic and necrotic cells, or modified forms of the low-density lipoprotein.^{5–11} Interestingly, unlike the other complement proteins, C1q is produced by macrophages and immature dendritic cells. Numerous studies have shown that C1q influences the phagocyte “status” through regulation of cytokine expression^{12,13} and that it may be involved in the nonimmunogenic presentation of self-antigens through its ability to modulate maturation of dendritic cells.^{14–18} C1q acts as a bridging molecule that binds apoptotic cells through interactions between its globular regions (GRs) and various molecules, probably not yet all characterized, that become surface-exposed under apoptotic stress conditions and contribute “eat-me” signals. Among these molecules are the emblematic apoptosis marker phosphatidylserine (PS)¹⁹ and DNA exposed at the surface of apoptotic cells.^{20–22} The multifunctional CRT protein,^{23–25} a calcium-binding chaperone protein mainly located in the endoplasmic reticulum, is now considered an early eat-me signal that enhances phagocytosis of apoptotic cells and, when exposed on cancer cells, elicits an immunogenic response.^{26,27} The observation that CRT could be involved in processes with opposite (immunogenic *versus* nonimmunogenic) consequences reflects the complexity of the pathways that regulate the global response to the recognition of altered-self cells, suggesting a possible combinatorial interplay of soluble molecules and receptors contributed by the phagocyte and its target.

CRT is also known to act as a “receptor for the C1q collagenous domain” (cC1qR) at the surface of phagocytes in conjunction with its co-receptor CD91/LRP (lipoprotein receptor-related protein).^{28–30} Binding of CRT to the C1q GR has also been suggested by several studies even though this interaction has not been fully established.^{31–34} Again, these observations evoke a double play for this protein as both a phagocyte receptor and an eat-me signal on the apoptotic cell surface.

In light of these observations and considering the crucial role of CRT and of C1q-mediated phagocytosis in the control of the immune response, we have further investigated the CRT–C1q interactions and their implications in the uptake of apoptotic cells. Using placenta-derived and recombinant forms of CRT, we provide unambiguous evidence of the ability of C1q GR to bind to the CRT globular domain. A small interfering RNA (siRNA)-based strategy leading to a decrease in surface-exposed CRT also reveals that CRT modulates C1q binding to apoptotic cells, very likely by competing with this protein for interaction with PS. These findings shed new light on the role of C1q and CRT and their possible coordination in the elimination of apoptotic cells.

Results

Production and purification of recombinant CRT and its globular and P domains

Expression vectors for the P and globular domains of CRT were constructed from the pHFX-CRT plasmid (Fig. 1a). For the P domain, regions coding for the CRT N- and C-terminal domains (residues 1–188 and 289–400, respectively) were deleted. The globular domain was obtained by fusing the CRT N-terminal (residues 1–187) and C-terminal (residues 285–400) domains by means of a three-amino-acid linker (GSG) as a substitute for the P domain. This latter construct retains a larger part of the original protein than the N/C domain comprising a 15-residue linker produced previously by Tan *et al.*³⁵ (Fig. 1a). The expression vectors used allowed production of the recombinant proteins fused to a histidine affinity tag. SDS-PAGE analysis of the purified recombinant proteins indicated that full-length CRT, its globular domain, and its P domain were essentially pure and exhibited apparent molecular masses of 55, 40 and 23 kDa, respectively, under reducing conditions (Fig. 1b). The corresponding molecular masses determined by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) analysis were $49,431 \pm 50$, $38,111 \pm 40$, and $14,756 \pm 15$ Da, respectively, consistent with the values predicted from the amino acid sequences after removal of the N-terminal methionine (49,399, 38,114, and 14,752 Da, respectively). That the recombinant proteins were

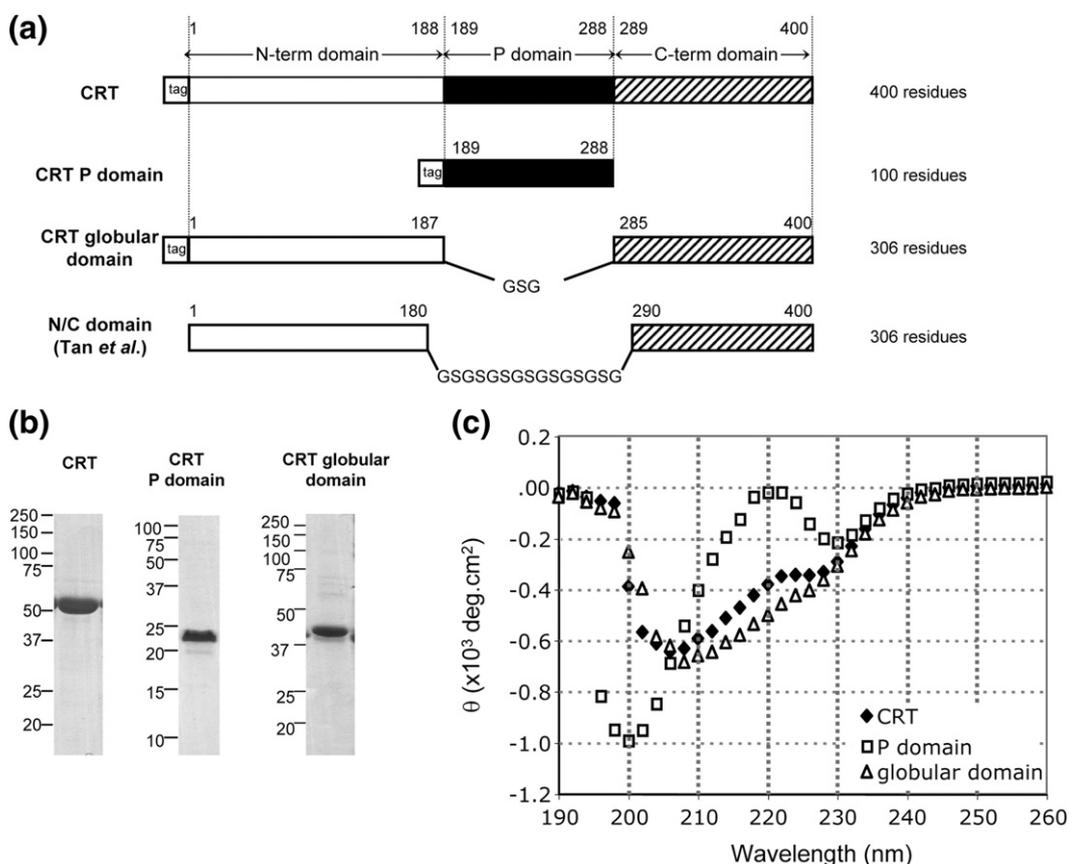


Fig. 1. Design and characterization of recombinant human CRT domains. (a) Schematic representation of the CRT constructs used in this study. The N/C domain produced by Tan *et al.* is shown for comparison. (b) SDS-PAGE analysis of full-length CRT, the CRT P domain, and the CRT globular domain fused to HAT, expressed in *E. coli* BL21. All samples were analyzed under reducing conditions and stained with Coomassie blue. The positions of molecular mass markers (expressed in kilodaltons) are shown. (c) Far-UV CD spectra (260–190 nm) of the CRT constructs at 25 °C.

folded was assessed by circular dichroism (CD) spectroscopy. The far-UV spectrum of recombinant CRT (rCRT) was characterized by a minimum at 208 nm, indicative of the presence of α -helix, and a prominent shoulder at 229 nm (Fig. 1c), in keeping with a previous report by Li *et al.*³⁶ The globular domain exhibited a marked minimum at 209 nm as observed previously for a similar N/C construct.³⁵ In contrast, the P domain yielded a strikingly different spectrum, with two strong minima at 200 and 230 nm.^{31–34} These analyses strongly suggested that the three recombinant proteins were properly folded. In addition, all recombinant forms of CRT were found to be monomeric and nonaggregated as judged by size-exclusion chromatography (data not shown), in concordance with published data by Young and collaborators.³⁷

C1q, its CLF, and its GR bind CRT

Whether interaction of C1q with CRT involves its GR, CLF, or both domains is still a controversial issue.^{31–34,38,39} To further investigate this question,

the C1q–CRT interaction was analyzed by surface plasmon resonance (SPR) using human placental (pCRT) or rCRT immobilized on a sensor chip and intact C1q, its GR, or its CLF as soluble ligands. As illustrated in Fig. 2, intact C1q and its GR and CLF all bound to immobilized pCRT. The kinetic parameters of CRT recognition were determined by recording sensorgrams at varying C1q, GR, and CLF concentrations (Fig. 2a–c). For the C1q GR and CLF, the kinetic (k_a , k_d) and dissociation (K_D) constants were calculated with a simple 1:1 Langmuir binding model (Table 1). The C1q GR and CLF bound pCRT with similar K_D values of 3.8×10^{-7} and 2.6×10^{-7} M, respectively. However, the CLF had significantly higher k_a and k_d values than the GR, as illustrated in the sensorgrams in Fig. 2d. Similar experiments were performed with rCRT as the immobilized ligand, again demonstrating efficient recognition by both the C1q CLF and the GR (Table 1). Both C1q domains bound rCRT with K_D values slightly higher than but nevertheless in the same order as those determined for pCRT. As observed for pCRT, the C1q CLF also had higher k_a

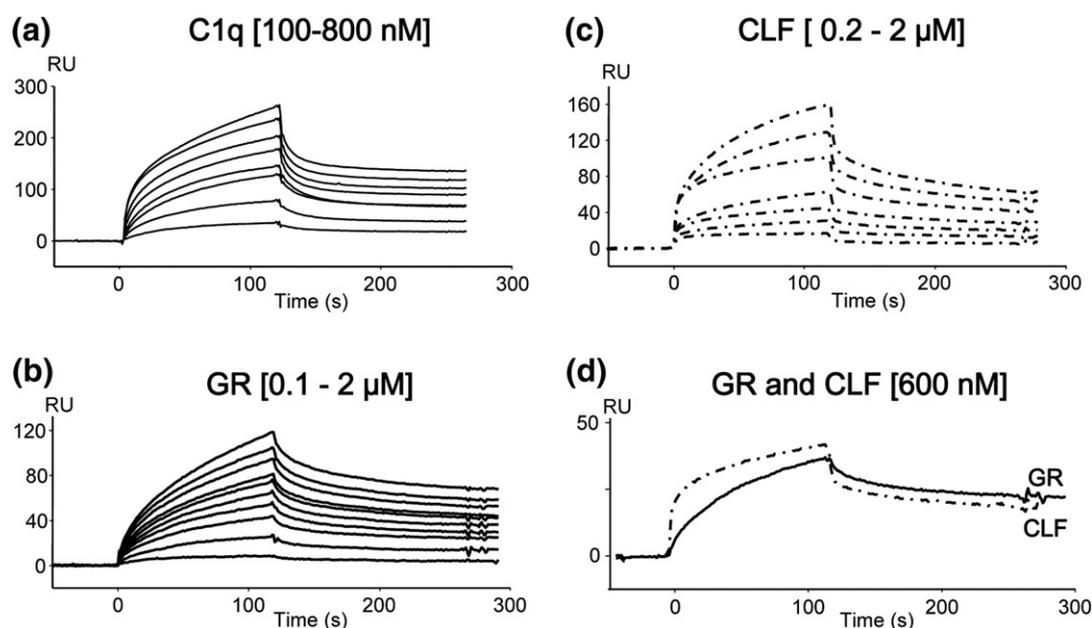


Fig. 2. SPR analysis of the interaction of C1q and its fragments with pICRT. Binding of intact C1q (a), C1q GR (b), and C1q CLF (c) to immobilized pICRT. (d) Comparison of the C1q GR and CLF sensorgrams at the same concentration (600 nM). All interactions were measured at a flow rate of 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Association and dissociation curves were recorded for 120 s. The concentrations of soluble ligands were as follows: C1q: 100, 200, 300, 400, 500, 600, and 800 nM; GR: 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, and 2.0 μM ; CLF: 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 1.6, and 2.0 μM . All other conditions are described under [Materials and Methods](#).

and k_d values than the GR. Intact C1q itself was found to bind to both pICRT and rCRT with higher affinities ($K_D=1.6\times 10^{-7}$ and 1.2×10^{-7} M, respectively) than its GR or CLF ([Table 2](#)). Proper kinetic analysis of these interactions required the use of a two-state reaction binding model. This model takes into account complex conformational changes, leading to an increasingly more stable complex formed in two steps and fitting the equation $A + B \rightleftharpoons AB \rightleftharpoons AB^*$. The two groups of kinetic constants and the resulting apparent affinity constant (K_D), calculated by the BIAeval software, are listed in [Table 2](#). The fact that the experimental binding data can be properly fitted using this model strongly suggests that CRT recognition by intact C1q implies (a) conformational changes that do not take place in

the isolated GR or CLF domains. According to the kinetic analysis using this two-state model, rCRT and pICRT have similar interaction properties with C1q ([Table 2](#)), indicating that rCRT is produced in a fully functional state. Of note, the K_D values of the interaction with full-length CRT or the CRT globular domain were significantly lower for intact C1q compared to its GR ([Tables 1 and 2](#)), accounting for an increased binding avidity of C1q arising from its hexameric structure and/or from conformational changes during the binding process.

Electron microscopy was next used with a view to observing the interaction between C1q and rCRT. Because CRT and the C1q GRs have similar molecular masses, rCRT was specifically labeled with nickel(II)–nitrilotriacetic acid–Nanogold®

Table 1. Kinetic constants for the interaction between C1q GR or C1q CLF and CRT or its globular domain

Immobilized ligand	Soluble analyte					
	C1q GR			C1q CLF		
	K_a ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)	K_a ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)
pICRT	$6.2 \pm 1.3 \times 10^3$	$2.4 \pm 0.2 \times 10^{-3}$	$3.8 \pm 1.0 \times 10^{-7}$	$1.3 \pm 0.9 \times 10^4$	$3.4 \pm 0.6 \times 10^{-3}$	$2.6 \pm 1.4 \times 10^{-7}$
Recombinant CRT	$2.4 \pm 0.5 \times 10^3$	$2.0 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$8.3 \pm 1.2 \times 10^{-7}$	$7.9 \pm 1.0 \times 10^3$	$3.1 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$3.9 \pm 0.8 \times 10^{-7}$
CRT globular domain	$2.4 \pm 0.7 \times 10^3$	$1.7 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$7.0 \pm 2.3 \times 10^{-7}$	$3.5 \pm 1.4 \times 10^3$	$1.7 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$4.8 \pm 2.0 \times 10^{-7}$

Binding of C1q GR (0.1–2 μM) and CLF (0.2–2 μM) was measured as described under [Materials and Methods](#). The association (k_a) and dissociation (k_d) rate constants were determined with a 1:1 Langmuir binding model. Values are the means of at least three separate experiments.

Table 2. Kinetic constants for the binding of full-length C1q to CRT and its globular domain

Immobilized ligand	Soluble analyte				
	C1q				
	K_{a1} ($M^{-1} s^{-1}$)	K_{d1} (s^{-1})	K_{a2} (s^{-1})	K_{d2} (s^{-1})	K_D (M)
pICRT	$11 \pm 4 \times 10^3$	$3.8 \pm 1.1 \times 10^{-2}$	$2.0 \pm 0.7 \times 10^{-2}$	$8.1 \pm 6.3 \times 10^{-4}$	$1.6 \pm 1.5 \times 10^{-7}$
rCRT	$6.3 \pm 0.6 \times 10^3$	$2.4 \pm 0.5 \times 10^{-2}$	$1.7 \pm 0.6 \times 10^{-2}$	$5.3 \pm 0.5 \times 10^{-4}$	$1.2 \pm 0.5 \times 10^{-7}$
CRT globular domain	$6.2 \pm 2 \times 10^3$	$1.9 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	$2.2 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	$3.7 \pm 2.9 \times 10^{-4}$	$0.52 \pm 0.6 \times 10^{-7}$

Binding of C1q (0.05–0.8 μ M) was measured as described under [Materials and Methods](#). The association (k_{a1} , k_{a2}) and dissociation (k_{d1} , k_{d2}) rate constants were determined by global fitting of the data using a two-state reaction binding model. The dissociation constants K_D were determined from the $(k_{d1}/k_{a1})(k_{d2}/k_{a2})$ ratios. The values shown for pICRT and rCRT are the means of three separate experiments.

beads, a reagent that has a high affinity for the multiple histidine residues contained in the histidine affinity tag (HAT) fusion of rCRT. As illustrated in [Fig. 3](#), gold-labeled rCRT specifically bound to the GR of C1q. In some cases ([Fig. 3c](#), i and ii), attachment through the C1q CLF region was also observed. In full agreement with the SPR binding experiments, these analyses thus provided further evidence of the ability of CRT to interact with both the C1q CLF and the GR domains.

CRT interacts with C1q through its globular domain

To gain insight into the area of the CRT molecule involved in C1q recognition, the rCRT globular

domain and P domain were immobilized covalently on a sensor chip and allowed to interact with soluble C1q, its GR, or its CLF ([Fig. 4](#)). Using the P domain, we detected no significant interaction with any of the C1q domains. In contrast, the CRT globular domain was found to bind C1q, its GR, and its CLF in a manner similar to that of full-length rCRT. For interaction between the immobilized CRT globular domain and C1q, again the two-state reaction binding model provided the best global fit ([Table 2](#)). The resulting apparent affinity constant [$(0.52 \pm 0.6) \times 10^{-7}$ M] was in the same range as that measured for rCRT [$(1.2 \pm 0.5) \times 10^{-7}$ M]. As expected, binding of C1q GR and CLF to the CRT globular domain obeyed a simple 1:1 Langmuir binding model ([Table 1](#)). Again, the kinetic parameters

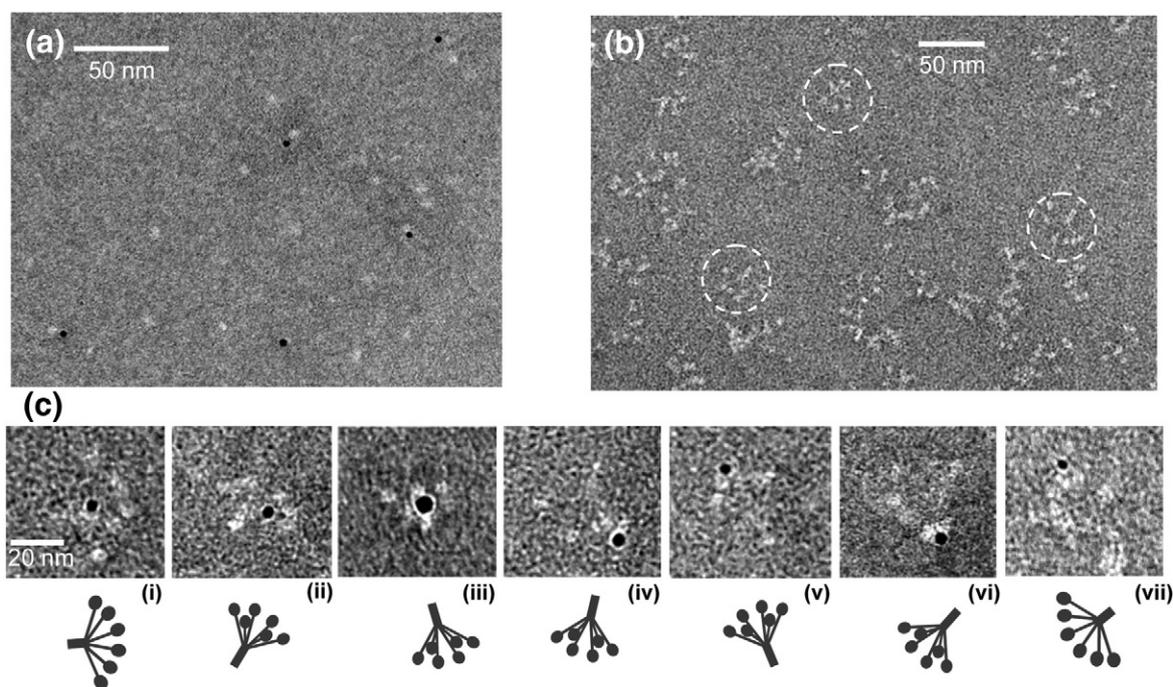


Fig. 3. Electron microscopy images of the interaction between gold-labeled CRT and C1q. (a) Representative micrograph of gold-labeling beads incubated with CRT molecules alone. All gold beads were attached to CRT molecules. (b) Representative area of gold-labeling beads incubated with C1q molecules alone. No gold beads were observed. Some representative C1q molecules are circled. (c) Gold-labeled CRT molecules bound to individual C1q molecules. Attachment through both the GR (iii–vii) and the CLF (i, ii) domains were observed.

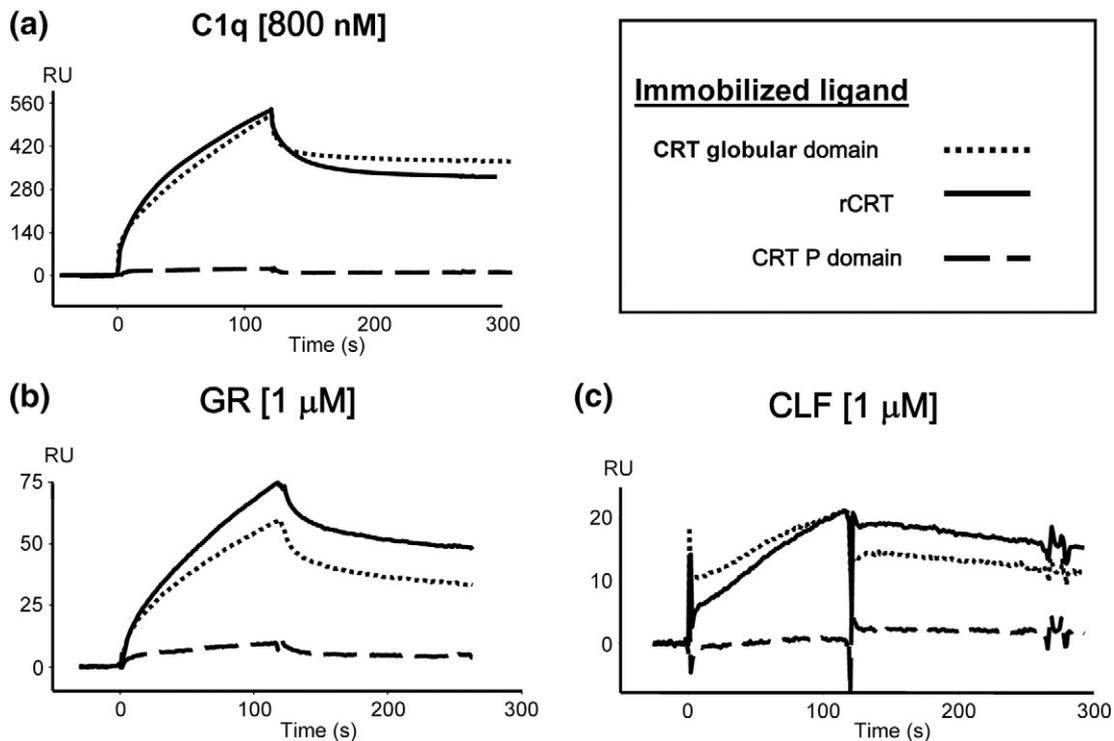


Fig. 4. Interaction of C1q and its GR and CLF with rCRT and its domains. Binding of C1q (a), C1q GR (b), and C1q CLF (c) to immobilized rCRT, the CRT globular domain, and the CRT P domain. In each case, the same amount of proteins was immobilized on the sensor chip. The kinetic parameters of the interactions determined by recording sensorgrams at varying C1q, C1q GR, and C1q CLF concentrations are listed in Tables 1 (C1q GR and CLF) and 2 (C1q).

were similar to those measured for full-length CRT (Table 1). Together, these results provided clear evidence that the CRT globular domain mediates the interaction with C1q through its ability to bind to both the C1q GR and the CLF domains.

C1q GR partially colocalizes with CRT on the surface of apoptotic HeLa cells

Our finding of the C1q ability to bind CRT through its GR prompted us to investigate whether CRT could be involved as a ligand in the recognition of apoptotic cells by C1q. To this end, CRT exposed at the cell surface (ectoCRT) was analyzed on viable and early apoptotic HeLa cells. Apoptosis was induced by UV-B irradiation and monitored as described previously.¹⁹ Viable and apoptotic cells were then analyzed by flow cytometry using anti-CRT antibodies. As shown in Fig. 5a, CRT was detected at the surface of viable HeLa cells, and the staining increased for early apoptotic cells (analyzed 2 and 4 h after UV-B irradiation) but remained unchanged up to 6 h after induction of apoptosis (data not shown). As shown previously,¹⁹ cells had not undergone significant necrosis at this stage. Thus, as reported previously for Jurkat cells and neutrophils,²⁶ CRT exposure at the surface of HeLa cells increases significantly during apoptosis. Con-

focal laser microscopy was next used to analyze the distribution of ectoCRT and bound C1q GR on the surface of early apoptotic cells. As illustrated in Fig. 5b, double immunofluorescence labeling showed that C1q GR colocalized to a large extent with ectoCRT in certain areas of the surface of early apoptotic cells (overlay, lower panel). In contrast, C1q GR and ectoCRT were clearly not superimposed on the surface of nonapoptotic cells (overlay, upper panel). These observations, together with our previous finding that C1q recognizes CRT through its GR, suggested that a direct C1q GR–CRT interaction occurred in newly organized membrane patches on the apoptotic cell surface.

Inhibition of CRT expression increases binding of apoptotic cells to C1q

To further investigate the implication of CRT in the recognition of apoptotic cells by C1q, we used an RNA interference strategy to inhibit CRT expression. As illustrated in the representative experiment shown in Fig. 6a, CRT knockdown using a specific siRNA efficiently reduced exposure of CRT at the surface of HeLa cells, resulting in decreases of 49–79%, 48 h after siRNA transfection. Apoptotic or viable CRT-deficient cells were then tested for their ability to bind to immobilized C1q using a SPR-

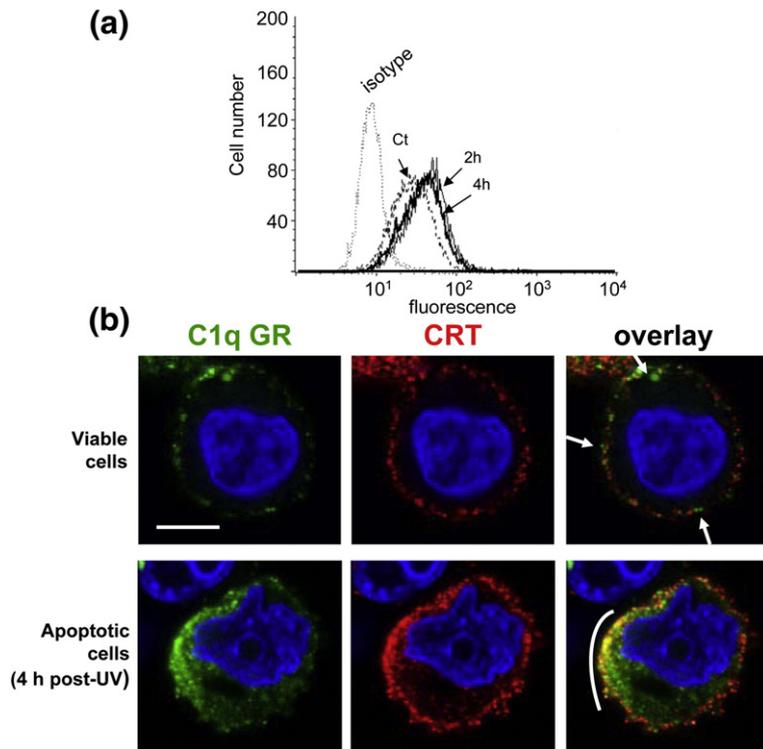


Fig. 5. C1q GR partially colocalizes with surface-exposed CRT on early apoptotic cells. (a) CRT cell-surface expression was assessed with a monoclonal anti-CRT antibody by FACS (fluorescence-activated cell sorting) analysis on viable (Ct) and early apoptotic HeLa cells (2 and 4 h after UV-B irradiation). (b) Cells were submitted to a double-immunofluorescence labeling for C1q GR (green) and CRT (red) followed by confocal laser microscopy detection as described under [Materials and Methods](#). Nuclei were labeled with Hoechst (blue). White arrows show labeling disjunctions in viable HeLa cells (upper panels). The white bow indicates areas where C1q GR colocalizes with CRT in early apoptotic cells (lower panels). The scale bar represents 10 μm .

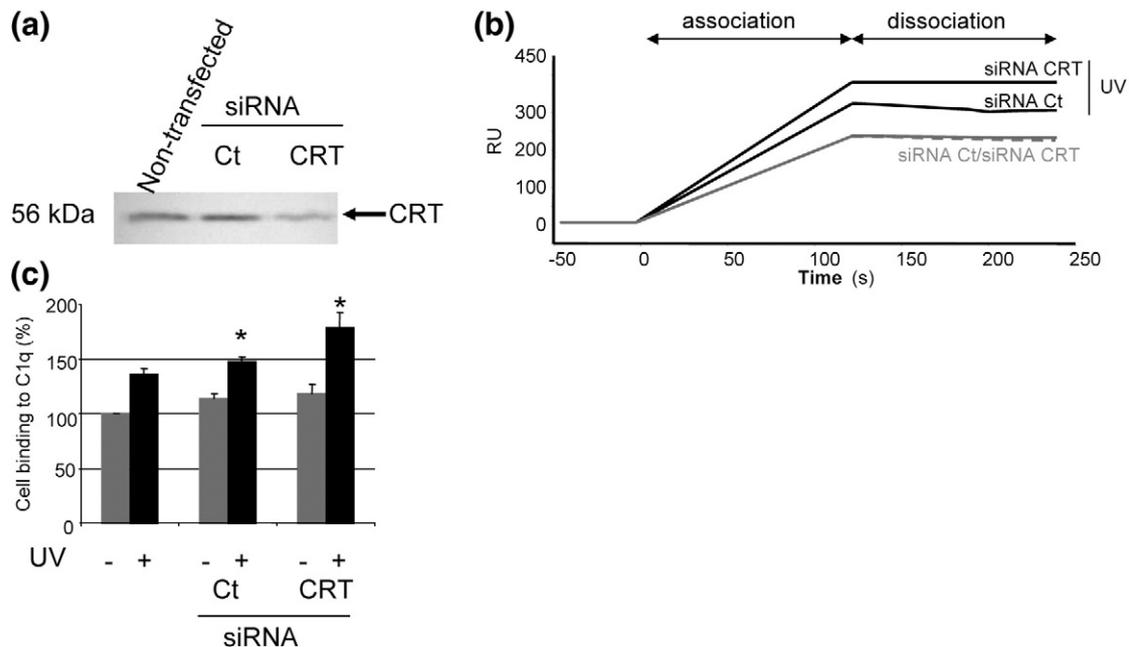


Fig. 6. Effect of CRT knockdown on cell binding to C1q. (a) CRT exposed on the surface of untreated or siRNA-treated HeLa cells was analyzed by SDS-PAGE analysis and immunoblotting as described under [Materials and Methods](#). (b) Viable or UV-B-irradiated HeLa cells (2 h after UV-B irradiation) treated with CRT-specific or control siRNA were harvested, suspended at 2.5×10^5 cells/ml in 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2.5 mM CaCl_2 , and 25 mM HEPES (pH 7.4) containing 0.005% surfactant P20 and then passed over a C1q-coated sensor chip at a flow rate of 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Association and dissociation were both monitored for 120 s. (c) The results of the experiments shown in (b) are expressed relative to the capture of viable and apoptotic cells by C1q in the absence of siRNA treatment. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.005$; significance was determined by Student's *t* test.

based assay developed in previous studies.^{19,20} siRNA-treated or untreated HeLa cells were rendered apoptotic by UV-B irradiation, and then both control cells and early apoptotic cells (2 h after irradiation) were allowed to bind immobilized C1q. As already reported in our previous study,¹⁹ apoptosis induced a marked increase in cell capture by C1q (Fig. 6b). Treatment with a control siRNA had no significant effect on the capture of viable or apoptotic cells (Fig. 6b and c). In contrast, whereas transfection with CRT specific siRNA had no effect on the capture of viable cells, this treatment increased binding of apoptotic cells to C1q by >31%. At first sight, this result was difficult to reconcile with our previous observations, since a decrease in cell capture by C1q, rather than an increase, would have been expected. This suggested that despite the ability of C1q to bind CRT, recognition of apoptotic cells involves more complex mechanisms.

CRT associates with PS and thereby inhibits the C1q GR–PS interaction

Considering that PS, a known ligand of the C1q GR domain,¹⁹ had been shown to colocalize with CRT in patches on apoptotic cell membranes,²⁶ this raised the possibility of an interaction between CRT

and PS. To test this hypothesis, we first analyzed the binding of a water-soluble derivative (06:0 PS) composed of the polar moiety of PS connected to two six-carbon saturated hydrocarbon chains. As illustrated in Fig. 7a, SPR analysis at varying concentrations of this ligand revealed a dose-dependent interaction with immobilized rCRT. The kinetic rate constants of the interaction were estimated at $22.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (k_a) and $3.38 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (k_d), with a resulting K_D of about $1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, a value approximately 10-fold lower than that determined in our previous study for the interaction between 06:0 PS and immobilized C1q ($K_D=1.7 \times 10^{-4} \text{ M}$).¹⁹ Further analyses were performed to test the CRT-binding ability of the water-soluble derivatives of phosphatidylcholine (06:0 PC) and phosphatidylethanolamine (06:0 PE). As illustrated in Fig. 7b, neither of these derivatives interacted significantly with immobilized CRT at concentrations up to 6 mM, providing evidence for the specificity of CRT for the polar head of PS.

We next used a co-sedimentation assay to investigate the effect of CRT on the binding of C1q GR to PS vesicles; the extent of interaction was assessed from the relative amount of C1q GR associated with the vesicles in the pellet after centrifugation.¹⁹ As shown in Fig. 7c, the C1q GR readily bound to the PS vesicles in the absence of CRT, the whole C1q GR

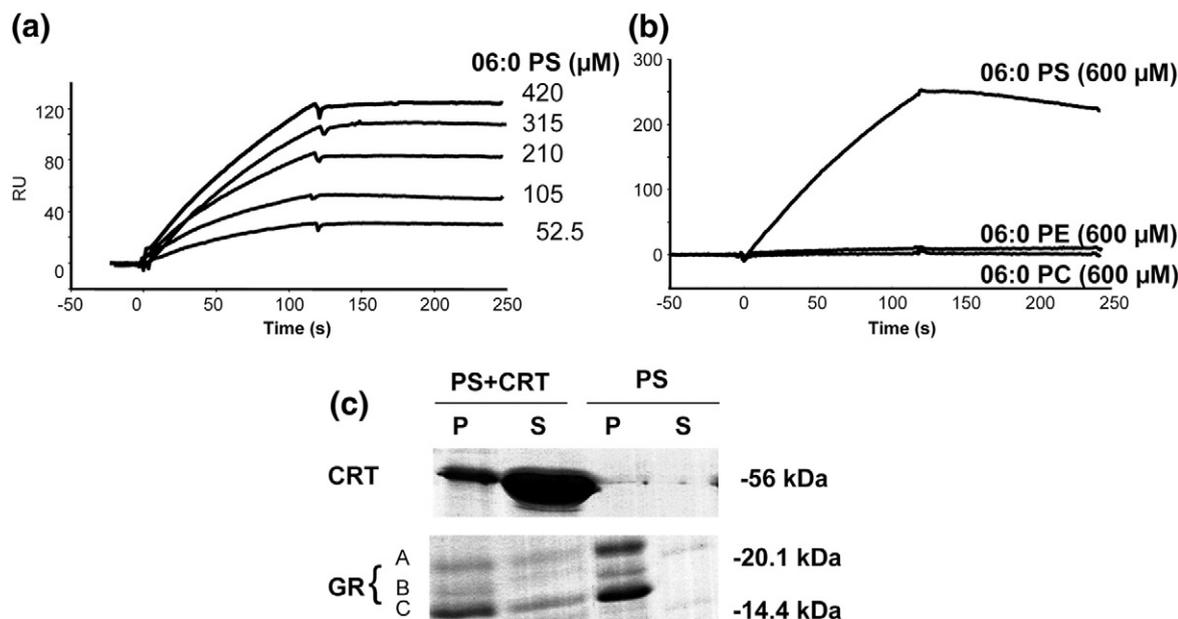


Fig. 7. CRT binds to PS, thereby inhibiting the C1q–PS interaction. (a) SPR analysis of the interaction between immobilized rCRT and soluble 06:0 PS. All interactions were measured in the running buffer (PBS, 1 mM CaCl_2 , pH 7.4) at a flow rate of 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Association and dissociation curves were each recorded for 120 s. The concentrations of the soluble 06:0 PS ligand are shown. (b) Comparative SPR analyses of the interaction of 06:0 PS, 06:0 PC, and 06:0 PE to immobilized CRT. (c) Analysis by co-sedimentation of the interaction between the C1q GR and the PS vesicles: effect of CRT. PS vesicles were incubated in the presence or absence of rCRT and allowed to interact with C1q GR. After ultracentrifugation, the pellet (P) and supernatant (S) fractions were separated, and their relative GR content was assessed by SDS-PAGE analysis as described under [Materials and Methods](#). Molecular weight markers are indicated on the right. Data are representative of three independent experiments.

material being found in the pellet. In contrast, preincubation of the vesicles with CRT significantly decreased the amount of C1q GR associated with the vesicles. In addition, part of the CRT was found to co-sediment with the PS vesicles, providing further evidence for a CRT–PS interaction. Based on these observations, it became clear that CRT had the ability to bind PS and thereby to competitively inhibit the C1q GR–PS interaction.

Discussion

A number of studies indicate that both C1q and ectoCRT are involved in the recognition of apoptotic cells. CRT was initially characterized as a C1q receptor through its ability to interact with its collagen region (CLF), whereas it was observed more recently that the C1q GRs are responsible for the binding of C1q to apoptotic cells. The objective of this study was to further investigate the C1q–CRT interactions at the molecular and cellular levels to better understand how these interactions contribute to the phagocytosis of altered-self cells.

First, this study provides unambiguous experimental evidence that, in addition to its CLF, the GR of C1q also binds to CRT, both types of interactions being mediated by the CRT globular domain. These conclusions are based on the following observations: (i) As shown by SPR analyses, the C1q GR and CLF domains recognize CRT with similar affinities (K_D values = $(2.6–8.3) \times 10^{-7}$ M). That CRT binds to the GR of C1q is further supported by electron microscopy images providing direct evidence of such an interaction. (ii) A rCRT globular domain corresponding to the N-terminal domain fused to the C-terminal domain, and excluding the P domain, is as efficient as the full-length molecule for binding to C1q and its GR and CLF domains. The rCRT globular domain (residues 1–187 fused by a three-residue linker to residues 285–400) and CRT P domain (residues 189–288) produced in this study were designed to preserve the CRT structural domain limits as deduced from homology with the chaperone calnexin and from NMR analysis of individual CRT domains.^{40,41} We found that the P domain did not significantly interact with C1q, in contrast with previously published data.^{33,38} This discrepancy possibly arises from the fact that the P domain used in these latter studies partly overlaps the CRT globular domain, or from the use of short peptides from the P domain. However, we cannot exclude that in the context of full-length CRT, C1q could make secondary interactions with residues in the P domain.

Interestingly, SPR kinetic analyses of the binding of full-length C1q to CRT were shown to fit a two-state reaction binding model, strongly suggesting that this interaction implies a conformational change

in C1q. This observation is in line with the data published by Steino and collaborators,³⁴ who studied CRT binding to C1q immobilized on a polystyrene surface. Their results suggested that immobilization induces a C1q conformational change and that this change allows CRT to bind C1q, initially to its CLF and then subsequently to its GR. That C1q needs conformational changes to bind CRT is also supported by the observation that CRT binding was not observed on SPR experiments when C1q was covalently immobilized.

We also analyzed exposure of CRT at the surface of HeLa cells and the role of this ectoCRT in the recognition of early apoptotic cells by C1q. CRT was found to be present on the viable cell surface, but its exposure increased rapidly after induction of apoptosis, as also reported for other cell types.^{26,27,42} As observed by immunofluorescence labeling, the C1q GR was found to colocalize partially with ectoCRT on early apoptotic cells, indicating that the two proteins are in close vicinity and suggesting that they possibly interact with each other. In light of these findings, the observation that CRT deficiency resulting from siRNA treatment induced an increase in apoptotic cell binding to C1q was quite intriguing. This prompted us to examine possible interactions between CRT and molecules that could be involved in C1q binding to apoptotic cells. Considering that PS has been shown to colocalize in membrane patches with CRT^{26,42} and is also one of the apoptotic cell ligands recognized by C1q,¹⁹ we tested the hypothesis that PS and CRT could interact with each other and thereby could modulate C1q binding to the apoptotic cell. PS was indeed found to bind to CRT, as demonstrated by SPR analysis using the polar moiety of PS and by co-sedimentation with PS vesicles. During the writing of this article, such an interaction between PS and CRT was actually elegantly demonstrated by Tarr and collaborators, who showed that the association with PS is involved in CRT externalization under apoptotic stress conditions.⁴³ The finding that the polar head of PS binds directly to CRT, with an affinity 10-fold higher than that determined for C1q, led us to hypothesize that CRT may actually efficiently compete with C1q for interaction with PS. This hypothesis was tested using a lipid–protein co-sedimentation assay, which indeed demonstrated that the C1q GR–PS interaction is impaired in the presence of CRT. Such a competition between CRT and C1q provides therefore a possible explanation for the increased cell binding to C1q resulting from siRNA-mediated CRT deficiency.

Together, these observations indicate that each of these three molecules (ectoCRT, C1q, and PS) is closely involved in the uptake of apoptotic cells through their location in the same restricted membrane areas and their potential mutual interactions. This strongly suggests a combinatorial role of

these molecules in the recognition step. How these molecules contribute to the cell–cell interaction and/or to the signaling pathways involved in the uptake process and the establishment of the new phagocyte “immunological status” remains, however, to be investigated in detail.

Whether the phagocyte CRT, a soluble extracellular form of CRT, or both are involved, directly or with the assistance of phagocyte receptors, in the formation of the phagocytic synapse is another important point that needs clarification. Indeed, several recently published studies raise additional questions. On one hand, the phagocyte CRT co-receptor CD91/LRP has been reported not to be always required for C1q-triggered enhancement of phagocytosis.^{44–46} On the other hand, we have recently demonstrated a direct interaction between CD91 and C1q, which involves both the CLF and the GR domains of C1q.⁴⁷ In addition, the apoptotic cell ectoCRT could possibly interact with the phagocyte membrane through its binding to CD91 or other receptors, directly or through bridging molecules such as C1q, thereby leading to a specific signaling cascade.^{26,42}

In conclusion, our results provide new insights into the role of C1q and CRT in the removal of apoptotic cells by phagocytes. They strongly suggest that complex multimolecular interactions involving at least PS, C1q, and CRT and taking place in restricted membrane areas are responsible for connecting the two types of cells and for triggering further signaling events. The unique ability of C1q to sense multiple molecular motifs^{48–50} leads us to postulate that other as yet unidentified C1q partners could be involved in this process.

Materials and Methods

Proteins, antibodies, and lipids

C1q was purified from human serum, and its GR and CLF were prepared and quantified as described previously.^{10,51} PS was from Sigma (L'Isle d'Abeau, France). 06:0 PS, 06:0 PC, and 06:0 PE were obtained from Avanti Polar Lipids, Inc. (Coger, Paris). Human pCRT was purified as described.⁵² PA1-902A, a chicken polyclonal antibody directed against the N terminus of CRT, was obtained from Affinity Bioreagents, Inc. NB120-2908, a chicken polyclonal antibody directed against the C terminus of CRT, was from Novus Biologicals, Inc. The mouse monoclonal anti-CRT SPA-601 was obtained from Stressgen.

Cells

HeLa cells (American Type Culture collection, # CCL-2) were cultivated in Glutamax DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, penicillin

(2.5 U/ml), and streptomycin (2.5 µg/ml) (Invitrogen). Apoptosis was induced and quantified as described previously.^{19,20} Briefly, cells were grown in sterile dishes overnight to 60–80% confluence and exposed to UV-B irradiation (1000 mJ/cm²) at 312 nm in fresh DMEM. Cells were then incubated for the indicated times at 37 °C under 5% CO₂.

Expression of the P and globular domains of CRT

All expression plasmids were derived from pHFX-CRT, a plasmid containing the cDNA encoding full-length human CRT (AU6-F11 IMAGE clone, Mammalian Gene Collection, MRC Gene Service, Cambridge, UK) fused to a HAT tag at its N terminus (N. Larsen, Structural and physicochemical properties of the chaperone protein calreticulin, thesis, University of Copenhagen, 2005). The expression plasmids for the P and globular domains were constructed by site-directed mutagenesis according to the manufacturer's instructions (QuikChange XL site-directed mutagenesis kit, Stratagene). For expression of the P domain, the N-terminal (residues 1–188) and C-terminal (residues 289–400) regions of CRT were successively deleted with the following respective primers: 5'-CAACAAGGGTTCATCGAGGGTAG-AAAGAAGATAAAGGATCCTGATG-3' and reverse; 5'-GTATTCTCCCGATCCCAGTATCTAAGCTT-GCGCCGCACTCGAGC-3' and reverse (P domain shown in bold). The expression plasmid for the globular domain was obtained by replacing residues 215–311 by a three-residue linker (GSG) with the following primers: 5'-GGAAGACGATTGGGACTTCTGCCAGGCTCTGGC-GATCCCAGTATCTATGCCTATG-3' and reverse (linker shown in bold). BL21(DE3)pLysS cells transformed with the different pHFX plasmids were optimally grown at 37 °C, and protein production was induced by 1 mM IPTG for 3 h 30 min at 37 °C. Cells were then lysed by sonication in the affinity chromatography buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0) containing 1 mM DFP (diisopropyl fluorophosphate). Cell lysates were then centrifuged, filtered, and applied to a cobalt-Sepharose affinity column (TALON metal affinity resins, Clontech). After elution with 150 mM imidazole, fractions containing full-length CRT, the P domain, or the globular domain were pooled. Further purification was achieved by ion-exchange chromatography. Pooled fractions from the affinity chromatography step were dialyzed against 20 mM Tris-HCl (pH 7.5; for the P and globular domains) containing 350 mM NaCl (for full-length CRT), filtered, and applied to a monoQ5/50 GL column (Amersham Biosciences). Proteins were eluted by a 0–1 M NaCl gradient in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5).

Electron microscopy

The binding of CRT to C1q was visualized by negative staining and transmission electron microscopy (TEM). Histidine-tagged CRT was conjugated to nickel (II)-nitrilotriacetic acid–Nanogold® (Nanoprobes). C1q molecules alone, CRT molecules alone, and mixtures of C1q and CRT molecules were incubated with gold beads at 22 °C for 40 min. About 2–4 µl of the resulting solutions was applied to carbon-coated mica sheets. The carbon films on the mica sheets were subsequently

floated in 100–200 μ l of 2% sodium silicotungstate at pH 7.4 and picked up by TEM grids. The grids were observed under a Philips CM12 electron microscope at 120 kV. Images were taken with low-dose imaging and recorded with a Gatan Orius™ CCD (charge-coupled device) camera.

SPR spectroscopy

Analyses were carried out on a BIAcore 3000 or BIAcore X instrument (GE Healthcare). (i) Analyses on C1q, CRT, or CRT-fragment-coated surfaces: C1q immobilization was performed as described previously.¹⁹ The running buffer for immobilization of CRT and its globular and P domains was 145 mM NaCl, 5 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), and 10 mM Hepes (pH 7.4). CRT, its P domain, and its globular domain were diluted in 10 mM formate (pH 3.0) to 50, 15, and 15 μ g/ml, respectively, and immobilized onto a CM5 sensor chip using the amine coupling kit (BIAcore). Binding of C1q, its GR, and its CLF to CRT and its domains was measured at a flow rate of 20 μ l/min in 50 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, and 2 mM CaCl₂ containing 0.005% surfactant P20 (pH 7.4). Surfaces were regenerated by injection of 10 μ l of 10 mM NaOH. The specific binding signal shown was obtained by subtracting the background signal, routinely obtained by injection of the sample over an activated–deactivated surface. All data were analyzed by global fitting either to a two-state reaction binding model or to a 1:1 Langmuir binding model of both the association and the dissociation phases for several concentrations simultaneously, using the BIAevaluation 3.2 software (BIAcore). In each case, the data presented were obtained with a statistic χ^2 value <2. For the two-state reaction binding model, the dissociation constants were calculated from the $(k_{d1}/k_{a1})(k_{d2}/k_{a2})$ ratios. For the Langmuir binding model, the apparent equilibrium dissociation constants (K_D) were calculated from the ratio of the dissociation and association rate constants (k_d/k_a). (ii) Binding of 06:0 PS, 06:0 PC, and 06:0 PE to immobilized CRT was performed as described previously for binding of 06:0 PS to immobilized C1q.¹⁹ (iii) Analyses using viable or apoptotic cells were performed as described previously.^{19,20} When necessary, untreated cells as well as cells treated with CRT siRNA were induced to undergo apoptosis prior to injection over immobilized C1q.

RNA interference

We used the 21-nucleotide sense (5'-CAUGAGCAGAA-CAUCGACUdTdT-3') and antisense (5'-AGUCGAUGUUCUGCUCAUGdTdT-3') strands of CRT mRNA (GenBank™ accession number M84739) as described by Harada *et al.*⁵³ As negative controls, the complementary inverse sequences, 5'-UCAGCUACAAGACGAGUACdTdT-3' and 5'-GUACUCGUCUUGUAGCUGAdTdT-3', were used. Heteroduplexes were prepared according to the manufacturer's protocol (Eurogentec) with a thermocycler. HeLa cells were transfected by siRNA at a final concentration of 10 nM with lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen), following the instructions of the manufacturer. Forty-eight hours after transfection, HeLa cells were harvested and either assessed

for their total CRT content by Western blotting or biotinylated and assessed for surface-exposed CRT.

Biotinylation of cell-surface proteins

Forty-eight hours after transfection, trypsinized HeLa cells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and cell-surface proteins were biotinylated with EZ-link sulfo-NHS biotin (0.5 mg/ml; Pierce) in ice-cold PBS (pH 8.0). After incubation at 4 °C for 1 h with gentle shaking, cells were washed once with ice-cold PBS containing 100 mM glycine for 10 min at 4 °C to quench unreacted biotin. Cells were then rinsed twice with ice-cold PBS, pelleted by centrifugation, and then assessed for surface-exposed CRT as described below.

Measurement of surface-exposed CRT

Cells were lysed in 1% Triton X-100 in PBS containing 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and protease inhibitors for 1 h at 4 °C. Insoluble material was removed by centrifugation at 14,000 rpm for 30 min at 4 °C. The supernatant was then collected and its protein concentration was measured with the bicinchoninic acid protein assay (Pierce) and adjusted to 1 μ g/ μ l with the lysis buffer. Three hundred microliters of the supernatant was incubated with 150 μ l of streptavidin-conjugated magnetic beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1; Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) under rotation overnight at 4 °C. The beads were collected with a magnet and washed twice with PBS–0.1% Tween 20 and four times with the lysis buffer. To elute biotinylated proteins, the beads were incubated with 35 μ l of Laemmli sample buffer⁵⁴ for 5 min at 100 °C. The amount of surface-exposed CRT was determined by Western blotting as described below.

SDS–PAGE and Western blotting

Equivalent amounts of soluble proteins were separated on 10% SDS–PAGE gels under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes.⁵⁴ The membranes were blocked by incubation with PBS containing 0.1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk. The membranes were then probed overnight at 4 °C with either NB120-2908 or SPA-601 as a primary antibody and washed in PBS containing 0.1% Tween 20. They were subsequently incubated for 1 h at room temperature with horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies, washed thoroughly, stained with enhanced chemiluminescence reagent (Supersignal West Pico Chemiluminescent substrate, Pierce), and exposed to an X-ray film.

Co-sedimentation analyses

PS vesicles (100 μ g in 100 μ l PBS, 1 mM CaCl₂, pH 7.4) were obtained by treatment for 20 min in a bath sonicator⁵⁵ and incubated for 2 h with either rCRT (21 μ g) or buffer alone. The C1q GR (10 μ g in PBS, 1 mM CaCl₂, pH 7.4) was incubated with each vesicle sample for 30 min at 22 °C. Samples were centrifuged at 300,000g for 30 min at 4 °C, allowing separation of the supernatant

from the lipid-containing pellet. The protein contents of the supernatant and pellet fractions were determined by means of a 14% SDS-PAGE analysis followed by Coomassie blue staining.

Flow cytometry

HeLa cells were harvested with trypsin–EDTA (Invitrogen) at varying times after irradiation. To analyze the whole apoptotic cell population, nonadherent cells present in the culture medium were added to harvested cells. Cells (0.5×10^6 /ml) were suspended in PBS containing 1% bovine serum albumin (pH 7.4), incubated for 45 min on ice with the anti-CRT antibody PA1-902A (Affinity Bioreagents, Inc.) diluted 1:100 or a control isotype, washed twice, resuspended in PBS, and incubated on ice for 30 min with donkey anti-chicken DyLight 488 (Jackson ImmunoResearch, Interchim) diluted 1:200. Cells were then washed twice, resuspended in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min on ice, and analyzed with a FACScan flow cytometer using the CellQuest software (Becton-Dickinson).

Confocal laser scanning microscopy

HeLa cells were incubated with C1q GR (100 μ g/ml) in 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2.5 mM $CaCl_2$, bovine serum albumin (1 mg/ml), and 25 mM Hepes (pH 7.4) for 1 h at 4 °C. Cells were then washed in the Hepes buffer and fixed for 5 min with 4% paraformaldehyde. CRT and bound C1q GR were then detected by indirect immunofluorescence with the anti-CRT antibody PA1-902A (10 μ g/ml) and a rabbit polyclonal anti-C1q antibody diluted 1:2000, respectively. Bound antibodies were visualized with cyanine-3-conjugated donkey anti-chicken IgY diluted 1:200 and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1:200 (both from Jackson ImmunoResearch, Interchim). DNA was then stained with Hoechst dye (1 μ g/ml; Sigma), and cells were mounted on glass slides with DABCO [1,4-diazabicyclo (2,2,2)octane, 25 mg/ml; Sigma] in a PBS/glycerol 1:9 (v/v) solution. Cells were photographed with a laser confocal fluorescence microscope (Leica). To assess spatial localizations within the cell and at the surface, serial optical sections were taken at 0.7- μ m intervals throughout the thickness of all cells examined.

Other methods

CD measurements were carried out with a CD6 Jobin-Yvon spectropolarimeter. A 1-mm path-length cuvette was used to record the spectra. MALDI-TOF mass spectrometry analyses were performed with an Autoflex Bruker Daltonics mass spectrometer.

Acknowledgements

We thank Isabelle Bally, Guy Schoehn, Luca Signor, and Izabel Bérard from the IBS platform of

the Partnership for Structural Biology and the Institut de Biologie Structurale in Grenoble (PSB/IBS) for assistance and access to the BIAcore, electron microscopy, and mass spectrometry facilities, respectively.

We thank Pierre Gans for expertise with CD, Didier Grunwald for confocal microscopy, Thomas Lunardi for purification of C1q GR, and Mickael Jacquet for technical help. We are grateful to Dr. Nicole Thielens for critical reading of the manuscript and helpful assistance with SPR analysis.

References

1. Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C. & Haslett, C. (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 965–975.
2. Ravichandran, K. S. & Lorenz, U. (2007). Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 964–974.
3. Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Arlaud, G. J. & Frachet, P. (2009). How phagocytes track down and respond to apoptotic cells. *Crit. Rev. Immunol.* **29**, 111–130.
4. Erwig, L. P. & Henson, P. M. (2008). Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* **15**, 243–250.
5. Biro, A., Thielens, N. M., Cervenak, L., Prohaszka, Z., Fust, G. & Arlaud, G. J. (2007). Modified low density lipoproteins differentially bind and activate the C1 complex of complement. *Mol. Immunol.* **44**, 1169–1177.
6. Blanquet-Grossard, F., Thielens, N. M., Vendrely, C., Jamin, M. & Arlaud, G. J. (2005). Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry*, **44**, 4349–4356.
7. Klein, M. A., Kaeser, P. S., Schwarz, P., Weyd, H., Xenarios, I., Zinkernagel, R. M. *et al.* (2001). Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat. Med.* **7**, 488–492.
8. Korb, L. C. & Ahearn, J. M. (1997). C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J. Immunol.* **158**, 4525–4528.
9. Navratil, J. S., Watkins, S. C., Wisnieski, J. J. & Ahearn, J. M. (2001). The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. *J. Immunol.* **166**, 3231–3239.
10. Tacnet-Delorme, P., Chevallier, S. & Arlaud, G. J. (2001). β -Amyloid fibrils activate the C1 complex of complement under physiological conditions: evidence for a binding site for $A\beta$ on the C1q globular regions. *J. Immunol.* **167**, 6374–6381.
11. Biro, A., Ling, W. L. & Arlaud, G. J. (2010). Complement protein C1q recognizes enzymatically modified low-density lipoprotein through unesterified fatty acids generated by cholesterol esterase. *Biochemistry*, **49**, 2167–2176.
12. Fraser, D. A., Laust, A. K., Nelson, E. L. & Tenner, A. J. (2009). C1q differentially modulates phagocytosis and

- cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *J. Immunol.* **183**, 6175–6185.
13. Fraser, D. A., Pisalyaput, K. & Tenner, A. J. (2010). C1q enhances microglial clearance of apoptotic neurons and neuronal blebs, and modulates subsequent inflammatory cytokine production. *J. Neurochem.* **112**, 733–743.
 14. Hosszu, K. K., Santiago-Schwarz, F., Peerschke, E. I. & Ghebrehiwet, B. (2010). Evidence that a C1q/C1qR system regulates monocyte-derived dendritic cell differentiation at the interface of innate and acquired immunity. *Innate Immun.* **16**, 115–127.
 15. Lood, C., Gullstrand, B., Truedsson, L., Olin, A. I., Alm, G. V., Ronnblom, L. *et al.* (2009). C1q inhibits immune complex-induced interferon- α production in plasmacytoid dendritic cells: a novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Arthritis Rheum.* **60**, 3081–3090.
 16. Csomor, E., Bajtay, Z., Sandor, N., Kristof, K., Arlaud, G. J., Thiel, S. & Erdei, A. (2007). Complement protein C1q induces maturation of human dendritic cells. *Mol. Immunol.* **44**, 3389–3397.
 17. Castellano, G., Trouw, L. A., Fiore, N., Daha, M. R., Schena, F. P. & van Kooten, C. (2010). Infiltrating dendritic cells contribute to local synthesis of C1q in murine and human lupus nephritis. *Mol. Immunol.* **47**, 2129–2137.
 18. Castellano, G., Woltman, A. M., Schlagwein, N., Xu, W., Schena, F. P., Daha, M. R. & van Kooten, C. (2007). Immune modulation of human dendritic cells by complement. *Eur. J. Immunol.* **37**, 2803–2811.
 19. Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Garlatti, V., Darnault, C., Ghebrehiwet, B., Gaboriaud, C. *et al.* (2008). C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multi-ligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *J. Immunol.* **180**, 2329–2338.
 20. Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Lunardi, T., Arlaud, G. J., Thielens, N. M. & Frchet, P. (2008). The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition. *FEBS Lett.* **582**, 3111–3116.
 21. Radic, M., Marion, T. & Monestier, M. (2004). Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis. *J. Immunol.* **172**, 6692–6700.
 22. Elward, K., Griffiths, M., Mizuno, M., Harris, C. L., Neal, J. W., Morgan, B. P. & Gasque, P. (2005). CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 36342–36354.
 23. Johnson, S., Michalak, M., Opas, M. & Eggleton, P. (2001). The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell. Biol.* **11**, 122–129.
 24. Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L. I. & Opas, M. (2009). Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **417**, 651–666.
 25. Michalak, M. & Opas, M. (2009). Endoplasmic and sarcoplasmic reticulum in the heart. *Trends Cell. Biol.* **19**, 253–259.
 26. Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E. *et al.* (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, **123**, 321–334.
 27. Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L. *et al.* (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13**, 54–61.
 28. Fraser, D. A. & Tenner, A. J. (2008). Directing an appropriate immune response: the role of defense collagens and other soluble pattern recognition molecules. *Curr. Drug Targets*, **9**, 113–122.
 29. Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A. & Henson, P. M. (2001). C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **194**, 781–795.
 30. Vandivier, R. W., Ogden, C. A., Fadok, V. A., Hoffmann, P. R., Brown, K. K., Botto, M. *et al.* (2002). Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J. Immunol.* **169**, 3978–3986.
 31. Kishore, U., Sontheimer, R. D., Sastry, K. N., Zander, K. S., Zappi, E. G., Hughes, G. R. *et al.* (1997). Release of calreticulin from neutrophils may alter C1q-mediated immune functions. *Biochem. J.* **322**(Pt 2), 543–550.
 32. Kovacs, H., Campbell, I. D., Strong, P., Johnson, S., Ward, F. J., Reid, K. B. & Eggleton, P. (1998). Evidence that C1q binds specifically to CH2-like immunoglobulin gamma motifs present in the autoantigen calreticulin and interferes with complement activation. *Biochemistry*, **37**, 17865–17874.
 33. Stuart, G. R., Lynch, N. J., Lu, J., Geick, A., Moffatt, B. E., Sim, R. B. & Schwaeble, W. J. (1996). Localisation of the C1q binding site within C1q receptor/calreticulin. *FEBS Lett.* **397**, 245–249.
 34. Steino, A., Jorgensen, C. S., Laursen, I. & Houen, G. (2004). Interaction of C1q with the receptor calreticulin requires a conformational change in C1q. *Scand. J. Immunol.* **59**, 485–495.
 35. Tan, Y., Chen, M., Li, Z., Mabuchi, K. & Bouvier, M. (2006). The calcium- and zinc-responsive regions of calreticulin reside strictly in the N-/C-domain. *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 745–753.
 36. Li, Z., Stafford, W. F. & Bouvier, M. (2001). The metal ion binding properties of calreticulin modulate its conformational flexibility and thermal stability. *Biochemistry*, **40**, 11193–11201.
 37. Young, P. J., Szeszakowska, D., Morse, R., Winyard, P. G., Whatmore, J., Reid, K. B. *et al.* (2006). Purification, isolation and characterization of native and recombinant calreticulin. *Calcium Binding Proteins*, **1**, 160–169.
 38. Stuart, G. R., Lynch, N. J., Day, A. J., Schwaeble, W. J. & Sim, R. B. (1997). The C1q and collectin binding site within C1q receptor (cell surface calreticulin). *Immunopharmacology*, **38**, 73–80.
 39. Kishore, U., Sontheimer, R. D., Sastry, K. N., Zappi, E. G., Hughes, G. R., Khamashta, M. A. *et al.* (1997). The systemic lupus erythematosus (SLE) disease autoantigen-calreticulin can inhibit C1q association with immune complexes. *Clin. Exp. Immunol.* **108**, 181–190.
 40. Ellgaard, L., Riek, R., Braun, D., Herrmann, T., Helenius, A. & Wuthrich, K. (2001). Three-dimensional

- structure topology of the calreticulin P-domain based on NMR assignment. *FEBS Lett.* **488**, 69–73.
41. Ellgaard, L., Riek, R., Herrmann, T., Guntert, P., Braun, D., Helenius, A. & Wuthrich, K. (2001). NMR structure of the calreticulin P-domain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 3133–3138.
 42. Gardai, S. J., Bratton, D. L., Ogden, C. A. & Henson, P. M. (2006). Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 896–903.
 43. Tarr, J. M., Young, P. J., Morse, R., Shaw, D. J., Haigh, R., Petrov, P. G. *et al.* (2010). A mechanism of release of calreticulin from cells during apoptosis. *J. Mol. Biol.* **401**, 799–812.
 44. Kozmar, A., Greenlee-Wacker, M. C. & Bohlson, S. S. (2010). Macrophage response to apoptotic cells varies with the apoptotic trigger and is not altered by a deficiency in LRP expression. *J. Innate. Immun.* **2**, 248–259.
 45. Lillis, A. P., Greenlee, M. C., Mikhailenko, I., Pizzo, S. V., Tenner, A. J., Strickland, D. K. & Bohlson, S. S. (2008). Murine low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP) is required for phagocytosis of targets bearing LRP ligands but is not required for C1q-triggered enhancement of phagocytosis. *J. Immunol.* **181**, 364–373.
 46. Donnelly, S., Roake, W., Brown, S., Young, P., Naik, H., Wordsworth, P. *et al.* (2006). Impaired recognition of apoptotic neutrophils by the C1q/calreticulin and CD91 pathway in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **54**, 1543–1556.
 47. Duus, K., Hansen, E. W., Tacnet, P., Frachet, P., Arlaud, G. J., Thielens, N. M. & Houen, G. (2010). Direct interaction between CD91 and C1q. *FEBS J.* **277**, 3526–3537.
 48. Gaboriaud, C., Juanhuix, J., Gruez, A., Lacroix, M., Darnault, C., Pignol, D. *et al.* (2003). The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *J. Biol. Chem.* **278**, 46974–46982.
 49. Garlatti, V., Chouquet, A., Lunardi, T., Vives, R., Paidassi, H., Lortat-Jacob, H. *et al.* (2010). Cutting edge: C1q binds deoxyribose and heparan sulfate through neighboring sites of its recognition domain. *J. Immunol.* **185**, 808–812.
 50. Kishore, U., Gaboriaud, C., Waters, P., Shrive, A. K., Greenhough, T. J., Reid, K. B. *et al.* (2004). C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends Immunol.* **25**, 551–561.
 51. Arlaud, G. J., Sim, R. B., Duplaa, A. M. & Colomb, M. G. (1979). Differential elution of Clq, Clr and Cls from human CI bound to immune aggregates. Use in the rapid purification of CI subcomponents. *Mol. Immunol.* **16**, 445–450.
 52. Houen, G. & Koch, C. (1994). Human placental calreticulin: purification, characterization and association with other proteins. *Acta Chem. Scand.* **48**, 905–911.
 53. Harada, K., Okiyoneda, T., Hashimoto, Y., Ueno, K., Nakamura, K., Yamahira, K. *et al.* (2006). Calreticulin negatively regulates the cell surface expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **281**, 12841–12848.
 54. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
 55. Ishii, M., Fujita, S., Yamada, M., Hosaka, Y. & Kurachi, Y. (2005). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Ca²⁺/calmodulin competitively bind to the regulators of G-protein-signalling (RGS) domain of RGS4 and reciprocally regulate its action. *Biochem. J.* **385**, 65–73.

Références

A

A-Gonzalez, N., S. J. Bensinger, et al. (2009). "Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR." *Immunity* **31**(2): 245-258.

Afshar, N., B. E. Black, et al. (2005). "Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol." *Mol Cell Biol* **25**(20): 8844-8853.

Akakura, S., S. Singh, et al. (2004). "The opsonin MFG-E8 is a ligand for the alphavbeta5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells." *Exp Cell Res* **292**(2): 403-416.

Akdis, M., S. Burgler, et al. (2011). "Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases." *J Allergy Clin Immunol* **127**(3): 701-721 e701-770.

Albert, M. L. (2004). "Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation?" *Nat Rev Immunol* **4**(3): 223-231.

Albert, M. L., J. I. Kim, et al. (2000). "alphavbeta5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells." *Nat Cell Biol* **2**(12): 899-905.

Albert, M. L., S. F. Pearce, et al. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **188**(7): 1359-1368.

Anderson, H. A., C. A. Maylock, et al. (2003). "Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells." *Nat Immunol* **4**(1): 87-91.

Arlaud, G. J., A. Biro, et al. (2011). "Enzymatically modified low-density lipoprotein is recognized by c1q and activates the classical complement pathway." *J Lipids* **2011**: 376092.

Arlaud, G. J., R. B. Sim, et al. (1979). "Differential elution of Clq, Clr and CIs from human Cl bound to immune aggregates. Use in the rapid purification of Cl subcomponents." *Mol Immunol* **16**(7): 445-450.

Arosa, F. A., O. de Jesus, et al. (1999). "Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class I molecules." *J Biol Chem* **274**(24): 16917-16922.

Arur, S., U. E. Uche, et al. (2003). "Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment." *Dev Cell* **4**(4): 587-598.

Asano, K., M. Miwa, et al. (2004). "Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces autoantibody production in mice." *J Exp Med* **200**(4): 459-467.

Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* **281**(5381): 1305-1308.

Azuma, Y., Y. Inami, et al. (2002). "Alterations in cell surface phosphatidylserine and sugar chains during apoptosis and their time-dependent role in phagocytosis by macrophages." Biol Pharm Bull **25**(10): 1277-1281.

Azuma, Y., H. Nakagawa, et al. (2011). "Decreases in CD31 and CD47 levels on the cell surface during etoposide-induced Jurkat cell apoptosis." Biol Pharm Bull **34**(12): 1828-1834.

Azuma, Y., A. Taniguchi, et al. (2000). "Decrease in cell surface sialic acid in etoposide-treated Jurkat cells and the role of cell surface sialidase." Glycoconj J **17**(5): 301-306.

B

Baksh, S. and M. Michalak (1991). "Expression of calreticulin in Escherichia coli and identification of its Ca²⁺ binding domains." J Biol Chem **266**(32): 21458-21465.

Baksh, S., C. Spamer, et al. (1995). "Identification of the Zn²⁺ binding region in calreticulin." FEBS Lett **376**(1-2): 53-57.

Balasubramanian, K. and A. J. Schroit (1998). "Characterization of phosphatidylserine-dependent beta2-glycoprotein I macrophage interactions. Implications for apoptotic cell clearance by phagocytes." J Biol Chem **273**(44): 29272-29277.

Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.

Barker, R. N., L. P. Erwig, et al. (2002). "Antigen presentation by macrophages is enhanced by the uptake of necrotic, but not apoptotic, cells." Clin Exp Immunol **127**(2): 220-225.

Barlow, A. L., A. Macleod, et al. (2010). "Colocalization analysis in fluorescence micrographs: verification of a more accurate calculation of pearson's correlation coefficient." Microsc Microanal **16**(6): 710-724.

Bhalla, K., A. M. Ibrado, et al. (1993). "High-dose mitoxantrone induces programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells." Blood **82**(10): 3133-3140.

Bharadwaj, D., C. Mold, et al. (2001). "Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis." J Immunol **166**(11): 6735-6741.

Bharadwaj, D., M. P. Stein, et al. (1999). "The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II." J Exp Med **190**(4): 585-590.

Bickerstaff, M. C., M. Botto, et al. (1999). "Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity." Nat Med **5**(6): 694-697.

Bilyy, R. O., T. Shkandina, et al. (2012). "Macrophages discriminate glycosylation patterns of apoptotic cell-derived microparticles." J Biol Chem **287**(1): 496-503.

Biro, A., W. L. Ling, et al. (2010). "Complement protein C1q recognizes enzymatically modified low-density lipoprotein through unesterified fatty acids generated by cholesterol esterase." Biochemistry **49**(10): 2167-2176.

Bogdan, C., Y. Vodovotz, et al. (1991). "Macrophage deactivation by interleukin 10." J Exp Med **174**(6): 1549-1555.

Borisenko, G. G., T. Matura, et al. (2003). "Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells--existence of a threshold." Arch Biochem Biophys **413**(1): 41-52.

Bose, J., A. D. Gruber, et al. (2004). "The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal." J Biol **3**(4): 15.

Botto, M. (1998). "C1q knock-out mice for the study of complement deficiency in autoimmune disease." Exp Clin Immunogenet **15**(4): 231-234.

Botto, M., C. Dell'Agnola, et al. (1998). "Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies." Nat Genet **19**(1): 56-59.

Bouma, B., P. G. de Groot, et al. (1999). "Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure." EMBO J **18**(19): 5166-5174.

Bournazou, I., J. D. Pound, et al. (2009). "Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin." J Clin Invest **119**(1): 20-32.

Bratton, D. L., V. A. Fadok, et al. (1997). "Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase." J Biol Chem **272**(42): 26159-26165.

Brown, S., I. Heinisch, et al. (2002). "Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment." Nature **418**(6894): 200-203.

Brugnera, E., L. Haney, et al. (2002). "Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex." Nat Cell Biol **4**(8): 574-582.

Burns, K., B. Duggan, et al. (1994). "Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor." Nature **367**(6462): 476-480.

C

Chang, M. K., C. Bergmark, et al. (1999). "Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6353-6358.

Chang, M. K., C. J. Binder, et al. (2002). "C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13043-13048.

Chen, Z., S. B. Koralov, et al. (2000). "Complement C4 inhibits systemic autoimmunity through a mechanism independent of complement receptors CR1 and CR2." J Exp Med **192**(9): 1339-1352.

Chouquet, A., H. Paidassi, et al. (2011). "X-ray structure of the human calreticulin globular domain reveals a peptide-binding area and suggests a multi-molecular mechanism." PLoS One **6**(3): e17886.

Chung, E. Y., S. J. Kim, et al. (2006). "Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells." Cell Res **16**(2): 154-161.

Commins, S. P., L. Borish, et al. (2010). "Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S53-72.

Costes, S. V., D. Daelemans, et al. (2004). "Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells." Biophys J **86**(6): 3993-4003.

Crocker, P. R. and A. Varki (2001). "Siglecs, sialic acids and innate immunity." Trends Immunol **22**(6): 337-342.

Cutolo, M., B. Villaggio, et al. (2001). "Presence of estrogen receptors in human myeloid monocytic cells (THP-1 cell line)." Eur Cytokine Netw **12**(2): 368-372.

Cvetanovic, M. and D. S. Ucker (2004). "Innate immune discrimination of apoptotic cells: repression of proinflammatory macrophage transcription is coupled directly to specific recognition." J Immunol **172**(2): 880-889.

D

Daigneault, M., J. A. Preston, et al. (2010). "The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages." PLoS One **5**(1): e8668.

de Waal Malefyt, R., J. Abrams, et al. (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." J Exp Med **174**(5): 1209-1220.

Debnath, J., E. H. Baehrecke, et al. (2005). "Does autophagy contribute to cell death?" Autophagy **1**(2): 66-74.

Degterev, A. and J. Yuan (2008). "Expansion and evolution of cell death programmes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 378-390.

DeKruyff, R. H., X. Bu, et al. (2010). "T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells." J Immunol **184**(4): 1918-1930.

Del Cid, N., E. Jeffery, et al. (2010). "Modes of calreticulin recruitment to the major histocompatibility complex class I assembly pathway." J Biol Chem **285**(7): 4520-4535.

Denney, C. F., L. Eckmann, et al. (1999). "Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection." Infect Immun **67**(4): 1547-1552.

Devitt, A. and L. J. Marshall (2011). "The innate immune system and the clearance of apoptotic cells." J Leukoc Biol **90**(3): 447-457.

Devitt, A., O. D. Moffatt, et al. (1998). "Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells." Nature **392**(6675): 505-509.

Diedrich, G., N. Bangia, et al. (2001). "A role for calnexin in the assembly of the MHC class I loading complex in the endoplasmic reticulum." J Immunol **166**(3): 1703-1709.

Donnelly, S., W. Roake, et al. (2006). "Impaired recognition of apoptotic neutrophils by the C1q/calreticulin and CD91 pathway in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **54**(5): 1543-1556.

Duus, K., E. W. Hansen, et al. (2010). "Direct interaction between CD91 and C1q." FEBS J **277**(17): 3526-3537.

Duvall, E., A. H. Wyllie, et al. (1985). "Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis)." Immunology **56**(2): 351-358.

E

Eggleton, P., K. B. Reid, et al. (1997). "Clinical relevance of calreticulin in systemic lupus erythematosus." Lupus **6**(7): 564-571.

Elliott, M. R., F. B. Chekeni, et al. (2009). "Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance." Nature **461**(7261): 282-286.

Elliott, M. R. and K. S. Ravichandran (2010). "Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease." J Cell Biol **189**(7): 1059-1070.

Ellis, H. M. and H. R. Horvitz (1986). "Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*." Cell **44**(6): 817-829.

Ellis, R. E., D. M. Jacobson, et al. (1991). "Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **129**(1): 79-94.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.

Elward, K., M. Griffiths, et al. (2005). "CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells." J Biol Chem **280**(43): 36342-36354.

Endemann, G., L. W. Stanton, et al. (1993). "CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein." J Biol Chem **268**(16): 11811-11816.

Erlich, P., C. Dumestre-Perard, et al. (2010). "Complement protein C1q forms a complex with cytotoxic prion protein oligomers." J Biol Chem **285**(25): 19267-19276.

F

Fadeel, B., P. Quinn, et al. (2007). "Fat(al) attraction: oxidized lipids act as "eat-me" signals." HFSP J **1**(4): 225-229.

- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998a). "The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes." Cell Death Differ **5**(7): 551-562.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998b). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." J Clin Invest **101**(4): 890-898.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (2000). "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." Nature **405**(6782): 85-90.
- Fadok, V. A., A. de Cathelineau, et al. (2001). "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts." J Biol Chem **276**(2): 1071-1077.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." J Immunol **148**(7): 2207-2216.
- Flannagan, R. S., V. Jaumouille, et al. (2012). "The cell biology of phagocytosis." Annu Rev Pathol **7**: 61-98.
- Florey, O. and D. O. Haskard (2009). "Sphingosine 1-phosphate enhances Fc gamma receptor-mediated neutrophil activation and recruitment under flow conditions." J Immunol **183**(4): 2330-2336.
- Formigli, L., L. Papucci, et al. (2000). "Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis." J Cell Physiol **182**(1): 41-49.
- Franc, N. C., K. White, et al. (1999). "Phagocytosis and development: back to the future." Curr Opin Immunol **11**(1): 47-52.
- Franz, S., K. Herrmann, et al. (2007). "After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes." Cell Death Differ **14**(4): 733-742.
- Frasconi, M., S. Chichiarelli, et al. (2012). "Interaction of ERp57 with calreticulin: Analysis of complex formation and effects of vancomycin." Biophys Chem **160**(1): 46-53.
- Fraser, D. A., S. S. Bohlson, et al. (2006). "C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression." J Leukoc Biol **80**(1): 107-116.
- Fraser, D. A., A. K. Laust, et al. (2009). "C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells." J Immunol **183**(10): 6175-6185.
- Freeman, G. J., J. M. Casasnovas, et al. (2010). "TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity." Immunol Rev **235**(1): 172-189.
- Frickel, E. M., R. Riek, et al. (2002). "TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 1954-1959.

- Fulda, S. and K. M. Debatin (2006). "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy." Oncogene **25**(34): 4798-4811.
- Furnrohr, B. G., G. J. Groer, et al. (2007). "Interaction of histones with phospholipids--implications for the exposure of histones on apoptotic cells." Autoimmunity **40**(4): 322-326.
- Fuss, I. J., M. Boirivant, et al. (2002). "The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis." J Immunol **168**(2): 900-908.

G

- Gaboriaud, C., P. Frchet, et al. (2011). "The human c1q globular domain: structure and recognition of non-immune self ligands." Front Immunol **2**: 92.
- Gaboriaud, C., J. Juanhuix, et al. (2003). "The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties." J Biol Chem **278**(47): 46974-46982.
- Gaboriaud, C., N. M. Thielens, et al. (2004). "Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle." Trends Immunol **25**(7): 368-373.
- Galluzzi, L. and G. Kroemer (2008). "Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis." Cell **135**(7): 1161-1163.
- Galluzzi, L., M. C. Maiuri, et al. (2007). "Cell death modalities: classification and pathophysiological implications." Cell Death Differ **14**(7): 1237-1243.
- Galvan, M. D., D. B. Foreman, et al. (2012). "Complement component C1q regulates macrophage expression of Mer tyrosine kinase to promote clearance of apoptotic cells." J Immunol **188**(8): 3716-3723.
- Gardai, S. J., D. L. Bratton, et al. (2006). "Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective." J Leukoc Biol **79**(5): 896-903.
- Gardai, S. J., K. A. McPhillips, et al. (2005). "Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte." Cell **123**(2): 321-334.
- Gardai, S. J., Y. Q. Xiao, et al. (2003). "By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation." Cell **115**(1): 13-23.
- Garg, A. D., D. V. Krysko, et al. (2012). "A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death." EMBO J **31**(5): 1062-1079.
- Garlatti, V., A. Chouquet, et al. (2010). "Cutting edge: C1q binds deoxyribose and heparan sulfate through neighboring sites of its recognition domain." J Immunol **185**(2): 808-812.
- Gayen Betal, S. and B. N. Setty (2008). "Phosphatidylserine-positive erythrocytes bind to immobilized and soluble thrombospondin-1 via its heparin-binding domain." Transl Res **152**(4): 165-177.

- Gershov, D., S. Kim, et al. (2000). "C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity." J Exp Med **192**(9): 1353-1364.
- Gessani, S., U. Testa, et al. (1993). "Enhanced production of LPS-induced cytokines during differentiation of human monocytes to macrophages. Role of LPS receptors." J Immunol **151**(7): 3758-3766.
- Ghiran, I., S. F. Barbashov, et al. (2000). "Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin." J Exp Med **192**(12): 1797-1808.
- Ghiran, I., L. B. Klickstein, et al. (2003). "Calreticulin is at the surface of circulating neutrophils and uses CD59 as an adaptor molecule." J Biol Chem **278**(23): 21024-21031.
- Gil, M., F. X. McCormack, et al. (2009). "Surfactant protein A modulates cell surface expression of CR3 on alveolar macrophages and enhances CR3-mediated phagocytosis." J Biol Chem **284**(12): 7495-7504.
- Gillmore, J. D., W. L. Hutchinson, et al. (2004). "Autoimmunity and glomerulonephritis in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene: SAP deficiency or strain combination?" Immunology **112**(2): 255-264.
- Gold, L. I., P. Eggleton, et al. (2010). "Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease." Faseb J **24**(3): 665-683.
- Golstein, P. and G. Kroemer (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." Trends Biochem Sci **32**(1): 37-43.
- Gorman, A. M., S. J. Healy, et al. (2012). "Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis." Pharmacol Ther **134**(3): 306-316.
- Greenberg, M. E., M. Sun, et al. (2006). "Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells." J Exp Med **203**(12): 2613-2625.
- Gregory, C. D. and S. B. Brown (2005). "Apoptosis: eating sensibly." Nat Cell Biol **7**(12): 1161-1163.
- Griffiths, M. R., P. Gasque, et al. (2010). "The regulation of the CNS innate immune response is vital for the restoration of tissue homeostasis (repair) after acute brain injury: a brief review." Int J Inflam **2010**: 151097.
- Grillo, C., S. Coppari, et al. (2002). "The DNA-binding activity of protein disulfide isomerase ERp57 is associated with the a(1) domain." Biochem Biophys Res Commun **295**(1): 67-73.
- Grimsley, C. and K. S. Ravichandran (2003). "Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals." Trends Cell Biol **13**(12): 648-656.
- Grimsley, C. M., J. M. Kinchen, et al. (2004). "Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration." J Biol Chem **279**(7): 6087-6097.

Gude, D. R., S. E. Alvarez, et al. (2008). "Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal." FASEB J **22**(8): 2629-2638.

Gumienny, T. L., E. Brugnera, et al. (2001). "CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration." Cell **107**(1): 27-41.

H

Hamon, Y., C. Broccardo, et al. (2000). "ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine." Nat Cell Biol **2**(7): 399-406.

Hanayama, R., K. Miyasaka, et al. (2006). "MFG-E8-dependent clearance of apoptotic cells, and autoimmunity caused by its failure." Curr Dir Autoimmun **9**: 162-172.

Hanayama, R., M. Tanaka, et al. (2002). "Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes." Nature **417**(6885): 182-187.

Harada, K., T. Okiyonedo, et al. (2006). "Calreticulin negatively regulates the cell surface expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." J Biol Chem **281**(18): 12841-12848.

Hart, S. P., J. A. Ross, et al. (2000). "Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes." Cell Death Differ **7**(5): 493-503.

Henson, P. M., D. L. Bratton, et al. (2001). "The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch?" Nat Rev Mol Cell Biol **2**(8): 627-633.

Hirt, U. A., F. Gantner, et al. (2000). "Phagocytosis of nonapoptotic cells dying by caspase-independent mechanisms." J Immunol **164**(12): 6520-6529.

Hitomi, J., D. E. Christofferson, et al. (2008). "Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway." Cell **135**(7): 1311-1323.

Hojrup, P., P. Roepstorff, et al. (2001). "Human placental calreticulin characterization of domain structure and post-translational modifications." Eur J Biochem **268**(9): 2558-2565.

Honore, C., T. Hummelshoj, et al. (2007). "The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells." Arthritis Rheum **56**(5): 1598-1607.

Hosszu, K. K., A. Valentino, et al. (2012). "Cell surface expression and function of the macromolecular c1 complex on the surface of human monocytes." Front Immunol **3**: 38.

Hotchkiss, R. S., A. Strasser, et al. (2009). "Cell death." N Engl J Med **361**(16): 1570-1583.

Houen, G. and C. Koch (1994). "Human placental calreticulin: purification, characterization and association with other proteins." Acta Chem Scand **48**(11): 905-911.

Hutchins, J. B. and S. W. Barger (1998). "Why neurons die: cell death in the nervous system." Anat Rec **253**(3): 79-90.

Huynh, M. L., V. A. Fadok, et al. (2002). "Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation." J Clin Invest **109**(1): 41-50.

Ichimura, T., E. J. Asseldonk, et al. (2008). "Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells." J Clin Invest **118**(5): 1657-1668.

I

Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." Nat Rev Cancer **2**(4): 277-288.

Ishimoto, Y., K. Ohashi, et al. (2000). "Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6." J Biochem **127**(3): 411-417.

J

Jacobson, M. D., M. Weil, et al. (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-354.

Jensen, M. L., C. Honore, et al. (2007). "Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells." Mol Immunol **44**(5): 856-865.

Johnson, S., M. Michalak, et al. (2001). "The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space." Trends Cell Biol **11**(3): 122-129.

Jones, P., L. Gardner, et al. (2008). "Intervertebral disc cells as competent phagocytes in vitro: implications for cell death in disc degeneration." Arthritis Res Ther **10**(4): R86.

Jutras, I. and M. Desjardins (2005). "Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 511-527.

K

Kagan, V. E., B. Gleiss, et al. (2002). "A role for oxidative stress in apoptosis: oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis." J Immunol **169**(1): 487-499.

Kepp, O., L. Galluzzi, et al. (2009). "Disruption of the PP1/GADD34 complex induces calreticulin exposure." Cell Cycle **8**(23): 3971-3977.

- Kepp, O., L. Galluzzi, et al. (2011). "Cell death assays for drug discovery." Nat Rev Drug Discov **10**(3): 221-237.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Kim, S., E. Y. Chung, et al. (2005). "Immunological consequences of macrophage-mediated clearance of apoptotic cells." Cell Cycle **4**(2): 231-234.
- Kim, S., K. B. Elkon, et al. (2004). "Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells." Immunity **21**(5): 643-653.
- Kinchen, J. M., J. Cabello, et al. (2005). "Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*." Nature **434**(7029): 93-99.
- Kirschfink, M., F. Petry, et al. (1993). "Complete functional C1q deficiency associated with systemic lupus erythematosus (SLE)." Clin Exp Immunol **94**(2): 267-272.
- Kishore, U. and K. B. Reid (2000). "C1q: structure, function, and receptors." Immunopharmacology **49**(1-2): 159-170.
- Kishore, U., R. D. Sontheimer, et al. (1997). "The systemic lupus erythematosus (SLE) disease autoantigen-calreticulin can inhibit C1q association with immune complexes." Clin Exp Immunol **108**(2): 181-190.
- Klein, M. A., P. S. Kaeser, et al. (2001). "Complement facilitates early prion pathogenesis." Nat Med **7**(4): 488-492.
- Klickstein, L. B., S. F. Barbashov, et al. (1997). "Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q." Immunity **7**(3): 345-355.
- Klionsky, D. J., H. Abeliovich, et al. (2008). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes." Autophagy **4**(2): 151-175.
- Klionsky, D. J., E. H. Baehrecke, et al. (2011). "A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition)." Autophagy **7**(11): 1273-1294.
- Kobayashi, N., P. Karisola, et al. (2007). "TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells." Immunity **27**(6): 927-940.
- Koceva-Chyla, A., M. Jedrzejczak, et al. (2005). "Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation." Apoptosis **10**(6): 1497-1514.
- Kohro, T., T. Tanaka, et al. (2004). "A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage." J Atheroscler Thromb **11**(2): 88-97.
- Korb, L. C. and J. M. Ahearn (1997). "C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited." J Immunol **158**(10): 4525-4528.

Kozlov, G., P. Maattanen, et al. (2006). "Crystal structure of the bb' domains of the protein disulfide isomerase ERp57." Structure **14**(8): 1331-1339.

Kozlov, G., C. L. Pocanschi, et al. (2010). "Structural basis of carbohydrate recognition by calreticulin." J Biol Chem **285**(49): 38612-38620.

Kozmar, A., M. C. Greenlee-Wacker, et al. (2010). "Macrophage response to apoptotic cells varies with the apoptotic trigger and is not altered by a deficiency in LRP expression." J Innate Immun **2**(3): 248-259.

Kremlev, S. G. and D. S. Phelps (1997). "Effect of SP-A and surfactant lipids on expression of cell surface markers in the THP-1 monocytic cell line." Am J Physiol **272**(6 Pt 1): L1070-1077.

Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.

Kroemer, G. and M. Jaattela (2005). "Lysosomes and autophagy in cell death control." Nat Rev Cancer **5**(11): 886-897.

Kuhn, R., J. Lohler, et al. (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell **75**(2): 263-274.

Kulms, D. and T. Schwarz (2000). "Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis." Photodermatol Photoimmunol Photomed **16**(5): 195-201.

Kuraya, M., Z. Ming, et al. (2005). "Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation." Immunobiology **209**(9): 689-697.

L

Lauber, K., S. G. Blumenthal, et al. (2004). "Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses." Mol Cell **14**(3): 277-287.

Lauber, K., E. Bohn, et al. (2003). "Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal." Cell **113**(6): 717-730.

Leach, M. R., M. F. Cohen-Doyle, et al. (2002). "Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin." J Biol Chem **277**(33): 29686-29697.

Lecut, C., K. Frederix, et al. (2009). "P2X1 ion channels promote neutrophil chemotaxis through Rho kinase activation." J Immunol **183**(4): 2801-2809.

Lee, J. K., Y. R. Lee, et al. (2009). "Production of TGF-beta1 as a Mechanism for Defective Antigen-presenting Cell Function of Macrophages Generated in vitro with M-CSF." Immune Netw **9**(1): 27-33.

Leffler, J., A. P. Herbert, et al. (2010). "Annexin-II, DNA, and histones serve as factor H ligands on the surface of apoptotic cells." J Biol Chem **285**(6): 3766-3776.

Lemasters, J. J. (2005). "Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis." Gastroenterology **129**(1): 351-360.

Lemke, G. and C. V. Rothlin (2008). "Immunobiology of the TAM receptors." Nat Rev Immunol **8**(5): 327-336.

Lettre, G. and M. O. Hengartner (2006). "Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(2): 97-108.

Li, X. M., R. G. Salomon, et al. (2007). "Conformation of an endogenous ligand in a membrane bilayer for the macrophage scavenger receptor CD36." Biochemistry **46**(17): 5009-5017.

Li, Z., W. F. Stafford, et al. (2001). "The metal ion binding properties of calreticulin modulate its conformational flexibility and thermal stability." Biochemistry **40**(37): 11193-11201.

Lillis, A. P., M. C. Greenlee, et al. (2008). "Murine low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP) is required for phagocytosis of targets bearing LRP ligands but is not required for C1q-triggered enhancement of phagocytosis." J Immunol **181**(1): 364-373.

Liu, Q. A. and M. O. Hengartner (1998). "Candidate adaptor protein CED-6 promotes the engulfment of apoptotic cells in *C. elegans*." Cell **93**(6): 961-972.

Llewellyn Roderick, H., D. H. Llewellyn, et al. (1998). "Role of calreticulin in regulating intracellular Ca²⁺ storage and capacitative Ca²⁺ entry in HeLa cells." Cell Calcium **24**(4): 253-262.

Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2001). "Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(7): 545-550.

Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2004). "Apoptosis, autophagy, and more." Int J Biochem Cell Biol **36**(12): 2405-2419.

Lu, J., L. L. Marnell, et al. (2008a). "Structural recognition and functional activation of Fcγ₃R by innate pentraxins." Nature **456**(7224): 989-992.

Lu, J. H., B. K. Teh, et al. (2008b). "The classical and regulatory functions of C1q in immunity and autoimmunity." Cell Mol Immunol **5**(1): 9-21.

Luciani, M. F. and G. Chimini (1996). "The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death." EMBO J **15**(2): 226-235.

Lutz, M. B. and G. Schuler (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" Trends Immunol **23**(9): 445-449.

M

Maderna, P. and C. Godson (2003). "Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation." Biochim Biophys Acta **1639**(3): 141-151.

Majno, G. and I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." Am J Pathol **146**(1): 3-15.

- Marnell, L., C. Mold, et al. (2005). "C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation." Clin Immunol **117**(2): 104-111.
- Martins, I., O. Kepp, et al. (2010). "Surface-exposed calreticulin in the interaction between dying cells and phagocytes." Ann N Y Acad Sci **1209**: 77-82.
- Meesmann, H. M., E. M. Fehr, et al. (2010). "Decrease of sialic acid residues as an eat-me signal on the surface of apoptotic lymphocytes." J Cell Sci **123**(Pt 19): 3347-3356.
- Meier, P., A. Finch, et al. (2000). "Apoptosis in development." Nature **407**(6805): 796-801.
- Mesaeli, N., K. Nakamura, et al. (1999). "Calreticulin is essential for cardiac development." J Cell Biol **144**(5): 857-868.
- Mevorach, D., J. O. Mascarenhas, et al. (1998a). "Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages." J Exp Med **188**(12): 2313-2320.
- Mevorach, D., J. L. Zhou, et al. (1998b). "Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production." J Exp Med **188**(2): 387-392.
- Michalak, M., E. F. Corbett, et al. (1999). "Calreticulin: one protein, one gene, many functions." Biochem J **344 Pt 2**: 281-292.
- Michalak, M., J. Groenendyk, et al. (2009). "Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum." Biochem J **417**(3): 651-666.
- Miyanishi, M., K. Tada, et al. (2007). "Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor." Nature **450**(7168): 435-439.
- Moffatt, O. D., A. Devitt, et al. (1999). "Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes." J Immunol **162**(11): 6800-6810.

N

- Nagata, K., K. Ohashi, et al. (1996). "Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases." J Biol Chem **271**(47): 30022-30027.
- Nagata, S., R. Hanayama, et al. (2010). "Autoimmunity and the clearance of dead cells." Cell **140**(5): 619-630.
- Nakamura, K., E. Bossy-Wetzel, et al. (2000). "Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis." J Cell Biol **150**(4): 731-740.
- Nakamura, K., A. Zuppini, et al. (2001). "Functional specialization of calreticulin domains." J Cell Biol **154**(5): 961-972.
- Nakano, T., Y. Ishimoto, et al. (1997). "Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6." J Biol Chem **272**(47): 29411-29414.
- Navratil, J. S., S. C. Watkins, et al. (2001). "The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells." J Immunol **166**(5): 3231-3239.

O

Obeid, M. (2008). "ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin." J Immunol **181**(4): 2533-2543.

Obeid, M., A. Tesniere, et al. (2007). "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death." Nat Med **13**(1): 54-61.

Ogden, C. A., A. deCathelineau, et al. (2001). "C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells." J Exp Med **194**(6): 781-795.

Oka, K., T. Sawamura, et al. (1998). "Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9535-9540.

Okazaki, Y., H. Ohno, et al. (2000). "Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **275**(46): 35751-35758.

Oldenborg, P. A., A. Zheleznyak, et al. (2000). "Role of CD47 as a marker of self on red blood cells." Science **288**(5473): 2051-2054.

Oliveira, J. B. and S. Gupta (2008). "Disorders of apoptosis: mechanisms for autoimmunity in primary immunodeficiency diseases." J Clin Immunol **28 Suppl 1**: S20-28.

P

Paidassi, H., P. Tacnet-Delorme, et al. (2009). "How phagocytes track down and respond to apoptotic cells." Crit Rev Immunol **29**(2): 111-130.

Paidassi, H., P. Tacnet-Delorme, et al. (2008a). "C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition." J Immunol **180**(4): 2329-2338.

Paidassi, H., P. Tacnet-Delorme, et al. (2008b). "The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition." FEBS Lett **582**(20): 3111-3116.

Paidassi, H., P. Tacnet-Delorme, et al. (2011). "Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition." J Mol Biol **408**(2): 277-290.

Palaniyar, N., H. Clark, et al. (2005). "Innate immune collectin surfactant protein D enhances the clearance of DNA by macrophages and minimizes anti-DNA antibody generation." J Immunol **174**(11): 7352-7358.

Palaniyar, N., J. Nadesalingam, et al. (2004). "Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin." J Biol Chem **279**(31): 32728-32736.

- Panaretakis, T., N. Joza, et al. (2008). "The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death." Cell Death Differ **15**(9): 1499-1509.
- Panaretakis, T., O. Kepp, et al. (2009). "Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death." EMBO J **28**(5): 578-590.
- Park, D., A. C. Tosello-Tramont, et al. (2007a). "BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module." Nature **450**(7168): 430-434.
- Park, E. K., H. S. Jung, et al. (2007b). "Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli." Inflamm Res **56**(1): 45-50.
- Park, S. Y., M. Y. Jung, et al. (2008). "Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor." Cell Death Differ **15**(1): 192-201.
- Parnaik, R., M. C. Raff, et al. (2000). "Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes." Curr Biol **10**(14): 857-860.
- Peter, C., M. Waibel, et al. (2008). "Migration to apoptotic "find-me" signals is mediated via the phagocyte receptor G2A." J Biol Chem **283**(9): 5296-5305.
- Peters, L. R. and M. Raghavan (2011). "Endoplasmic reticulum calcium depletion impacts chaperone secretion, innate immunity, and phagocytic uptake of cells." J Immunol **187**(2): 919-931.
- Platt, N., H. Suzuki, et al. (1996). "Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12456-12460.
- Pocanschi, C. L., G. Kozlov, et al. (2011). "Structural and functional relationships between the lectin and arm domains of calreticulin." J Biol Chem **286**(31): 27266-27277.
- Prieto, J., A. Eklund, et al. (1994). "Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages." Cell Immunol **156**(1): 191-211.

Q, R

- Radic, M., T. Marion, et al. (2004). "Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis." J Immunol **172**(11): 6692-6700.
- Ramprasad, M. P., W. Fischer, et al. (1995). "The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9580-9584.
- Rastogi, R. P., R. Sinha, et al. (2009). "Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity." EXCLI Journal **8**: 155-181.
- Rathmell, J. C. and C. B. Thompson (2002). "Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease." Cell **109** Suppl: S97-107.

- Ravichandran, K. S. (2010). "Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums." J Exp Med **207**(9): 1807-1817.
- Ravichandran, K. S. (2011). "Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways." Immunity **35**(4): 445-455.
- Ravichandran, K. S. and U. Lorenz (2007). "Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal." Nat Rev Immunol **7**(12): 964-974.
- Reddien, P. W. and H. R. Horvitz (2000). "CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*." Nat Cell Biol **2**(3): 131-136.
- Rehfeldt, W., K. Resch, et al. (1993). "Cytosolic phospholipase A2 from human monocytic cells: characterization of substrate specificity and Ca²⁺-dependent membrane association." Biochem J **293** (Pt 1): 255-261.
- Reid, K. B. and J. Edmondson (1984). "Location of the binding site in subcomponent C1q for plasma fibronectin." Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Suppl **284**: 11-17.
- Ricklin, D., G. Hajishengallis, et al. (2010). "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis." Nat Immunol **11**(9): 785-797.
- Robey, F. A., K. D. Jones, et al. (1984). "Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles. A possible physiological role of C-reactive protein." J Biol Chem **259**(11): 7311-7316.
- Rodriguez-Manzanet, R., M. A. Sanjuan, et al. (2010). "T and B cell hyperactivity and autoimmunity associated with niche-specific defects in apoptotic body clearance in TIM-4-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(19): 8706-8711.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-928.
- Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 519-529.
- Roumenina, L. T., D. Sene, et al. (2011). "Functional complement C1q abnormality leads to impaired immune complexes and apoptotic cell clearance." J Immunol **187**(8): 4369-4373.
- Rovere, P., G. Peri, et al. (2000). "The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells." Blood **96**(13): 4300-4306.
- Rutault, K., C. A. Hazzalin, et al. (2001). "Combinations of ERK and p38 MAPK inhibitors ablate tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) mRNA induction. Evidence for selective destabilization of TNF-alpha transcripts." J Biol Chem **276**(9): 6666-6674.
- Rutkevich, L. A. and D. B. Williams (2011). "Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum." Curr Opin Cell Biol **23**(2): 157-166.

S

Santiago, C., A. Ballesteros, et al. (2007). "Structures of T cell immunoglobulin mucin protein 4 show a metal-Ion-dependent ligand binding site where phosphatidylserine binds." Immunity **27**(6): 941-951.

Sasaki, T. and K. Yonemasu (1983). "Chemical studies on the isolated collagen-like and globular fragment of complement component C1q. Comparative studies on bovine and human C1q." Biochim Biophys Acta **742**(1): 122-128.

Savill, J., I. Dransfield, et al. (2002). "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses." Nat Rev Immunol **2**(12): 965-975.

Savill, J., N. Hogg, et al. (1991). "Macrophage vitronectin receptor, CD36, and thrombospondin cooperate in recognition of neutrophils undergoing programmed cell death." Chest **99**(3 Suppl): 6S-7S.

Savill, J., N. Hogg, et al. (1992). "Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis." J Clin Invest **90**(4): 1513-1522.

Schagat, T. L., J. A. Wofford, et al. (2001). "Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils." J Immunol **166**(4): 2727-2733.

Schweichel, J. U. and H. J. Merker (1973). "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues." Teratology **7**(3): 253-266.

Schwende, H., E. Fitzke, et al. (1996). "Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3." J Leukoc Biol **59**(4): 555-561.

Sellar, G. C., D. J. Blake, et al. (1991). "Characterization and organization of the genes encoding the A-, B- and C-chains of human complement subcomponent C1q. The complete derived amino acid sequence of human C1q." Biochem J **274** (Pt 2): 481-490.

Shimohama, S. (2000). "Apoptosis in Alzheimer's disease--an update." Apoptosis **5**(1): 9-16.

Sim, R. B., S. K. Moestrup, et al. (1998). "Interaction of C1q and the collectins with the potential receptors calreticulin (cC1qR/collectin receptor) and megalin." Immunobiology **199**(2): 208-224.

Sperandio, S., I. de Belle, et al. (2000). "An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14376-14381.

Steinman, R. M., S. Turley, et al. (2000). "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells." J Exp Med **191**(3): 411-416.

Stuart, L. M., K. Takahashi, et al. (2005). "Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype." J Immunol **174**(6): 3220-3226.

Su, H. P., K. Nakada-Tsukui, et al. (2002). "Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)." J Biol Chem **277**(14): 11772-11779.

Szegezdi, E., S. E. Logue, et al. (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." EMBO Rep **7**(9): 880-885.

T

Tabas, I. and D. Ron (2011). "Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress." Nat Cell Biol **13**(3): 184-190.

Tacnet-Delorme, P., S. Chevallier, et al. (2001). "Beta-amyloid fibrils activate the C1 complex of complement under physiological conditions: evidence for a binding site for A beta on the C1q globular regions." J Immunol **167**(11): 6374-6381.

Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 621-632.

Tamai, R., S. Sugawara, et al. (2003). "Synergistic effects of lipopolysaccharide and interferon-gamma in inducing interleukin-8 production in human monocytic THP-1 cells is accompanied by up-regulation of CD14, Toll-like receptor 4, MD-2 and MyD88 expression." J Endotoxin Res **9**(3): 145-153.

Tan, Y., M. Chen, et al. (2006). "The calcium- and zinc-responsive regions of calreticulin reside strictly in the N-/C-domain." Biochim Biophys Acta **1760**(5): 745-753.

Tarr, J. M., P. J. Young, et al. (2010). "A mechanism of release of calreticulin from cells during apoptosis." J Mol Biol **401**(5): 799-812.

Taylor, P. R., A. Carugati, et al. (2000). "A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo." J Exp Med **192**(3): 359-366.

Taylor, P. R., L. Martinez-Pomares, et al. (2005). "Macrophage receptors and immune recognition." Annu Rev Immunol **23**: 901-944.

Thielens, N. M., I. M. Bally, et al. (1993). "Further characterization of the interaction between the C1q subcomponent of human C1 and the transmembrane envelope glycoprotein gp41 of HIV-1." J Immunol **151**(11): 6583-6592.

Toda, S., R. Hanayama, et al. (2012). "Two-step engulfment of apoptotic cells." Mol Cell Biol **32**(1): 118-125.

Torr, E. E., D. H. Gardner, et al. (2012). "Apoptotic cell-derived ICAM-3 promotes both macrophage chemoattraction to and tethering of apoptotic cells." Cell Death Differ **19**(4): 671-679.

Tosello-Trampont, A. C., J. M. Kinchen, et al. (2007). "Identification of two signaling submodules within the CrkII/ELMO/Dock180 pathway regulating engulfment of apoptotic cells." Cell Death Differ **14**(5): 963-972.

Trinchieri, G. (1995). "Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity." Annu Rev Immunol **13**: 251-276.

Truman, L. A., C. A. Ford, et al. (2008). "CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis." Blood **112**(13): 5026-5036.

Tsai, R. K. and D. E. Discher (2008). "Inhibition of "self" engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells." J Cell Biol **180**(5): 989-1003.

Tsuchiya, S., Y. Kobayashi, et al. (1982). "Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester." Cancer Res **42**(4): 1530-1536.

Turner, M. W. (2003). "The role of mannose-binding lectin in health and disease." Mol Immunol **40**(7): 423-429.

U, V

Van der Meer, F. J., D. J. Faber, et al. (2010). "Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography." Lasers Med Sci **25**(2): 259-267.

Vandenabeele, P., L. Galluzzi, et al. (2010). "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(10): 700-714.

Vandivier, R. W., C. A. Ogden, et al. (2002). "Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex." J Immunol **169**(7): 3978-3986.

Varki, A. (1993). "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct." Glycobiology **3**(2): 97-130.

Vaux, D. L. and S. J. Korsmeyer (1999). "Cell death in development." Cell **96**(2): 245-254.

Villamil Giraldo, A. M., M. Lopez Medus, et al. (2010). "The structure of calreticulin C-terminal domain is modulated by physiological variations of calcium concentration." J Biol Chem **285**(7): 4544-4553.

Voll, R. E., M. Herrmann, et al. (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." Nature **390**(6658): 350-351.

Von Muhlen, C. A. and E. M. Tan (1995). "Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases." Semin Arthritis Rheum **24**(5): 323-358.

W

Walker, D. G. (1998). "Expression and regulation of complement C1q by human THP-1-derived macrophages." Mol Chem Neuropathol **34**(2-3): 197-218.

Walport, M. J. (2001). "Complement. First of two parts." N Engl J Med **344**(14): 1058-1066.

Wang, J. and M. J. Lenardo (2000). "Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies." J Cell Sci **113 (Pt 5)**: 753-757.

Wang, W. A., J. Groenendyk, et al. (2012). "Calreticulin signaling in health and disease." Int J Biochem Cell Biol **44**(6): 842-846.

Warren, J., P. Mastroeni, et al. (2002). "Increased susceptibility of C1q-deficient mice to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection." Infect Immun **70**(2): 551-557.

Wearsch, P. A. and P. Cresswell (2008). "The quality control of MHC class I peptide loading." Curr Opin Cell Biol **20**(6): 624-631.

Williams, D. B. (2006). "Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum." J Cell Sci **119**(Pt 4): 615-623.

Williamson, P. and R. A. Schlegel (2002). "Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells." Biochim Biophys Acta **1585**(2-3): 53-63.

Williamson, P. and R. A. Schlegel (2004). "Hide and seek: the secret identity of the phosphatidylserine receptor." J Biol **3**(4): 14.

Wong, K., P. A. Valdez, et al. (2010). "Phosphatidylserine receptor Tim-4 is essential for the maintenance of the homeostatic state of resident peritoneal macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(19): 8712-8717.

Wu, Y. C. and H. R. Horvitz (1998a). "The C. elegans cell corpse engulfment gene ced-7 encodes a protein similar to ABC transporters." Cell **93**(6): 951-960.

Wu, Y. C. and H. R. Horvitz (1998b). "C. elegans phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180." Nature **392**(6675): 501-504.

Wu, Y. C., M. C. Tsai, et al. (2001). "C. elegans CED-12 acts in the conserved crkII/DOCK180/Rac pathway to control cell migration and cell corpse engulfment." Dev Cell **1**(4): 491-502.

X

Xu, G. and Y. Shi (2007). "Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis." Cell Res **17**(9): 759-771.

Xu, W., S. P. Berger, et al. (2008). "Properdin binds to late apoptotic and necrotic cells independently of C3b and regulates alternative pathway complement activation." J Immunol **180**(11): 7613-7621.

Y

Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 47-59.

Z

Zhang, W. J. and S. S. Zheng (2005). "In vitro study of immunosuppressive effect of apoptotic cells." J Zhejiang Univ Sci B **6**(9): 919-925.

Zhou, Z., E. Caron, et al. (2001a). "The C. elegans PH domain protein CED-12 regulates cytoskeletal reorganization via a Rho/Rac GTPase signaling pathway." Dev Cell **1**(4): 477-489.

Zhou, Z., E. Hartwig, et al. (2001b). "CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in C. elegans." Cell **104**(1): 43-56.

Zitvogel, L., O. Kepp, et al. (2010). "Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway." Clin Cancer Res **16**(12): 3100-3104.

Zuzarte-Luis, V. and J. M. Hurlle (2002). "Programmed cell death in the developing limb." Int J Dev Biol **46**(7): 871-876.

Zwart, B., C. Ciurana, et al. (2004). "Complement activation by apoptotic cells occurs predominantly via IgM and is limited to late apoptotic (secondary necrotic) cells." Autoimmunity **37**(2): 95-102.

Résumé

La mort cellulaire par apoptose est un processus biologique fondamental, nécessitant des interactions fines avec le système immunitaire pour une reconnaissance et une élimination efficace des cellules mortes. C'est ainsi que C1q, une molécule du complément, essentielle dans le système immunitaire inné, a été mise en évidence comme fortement impliquée dans le mécanisme de reconnaissance et d'élimination des cellules apoptotiques, notamment via sa région globulaire (C1qGR). Récemment, la translocation de la calréticuline (CRT) au niveau externe de la membrane plasmique des cellules cancéreuses a été identifiée comme un signal « eat-me » pouvant être immunogène. Initialement, l'interaction entre la CRT et C1q a été caractérisée à la surface des phagocytes et la CRT a été considérée comme un récepteur pour les queues collagènes de C1q (C1qCLF). L'ensemble de ces observations est en faveur d'un double rôle de la CRT, à la surface des phagocytes et des cellules apoptotiques. Dans un premier temps, l'élaboration d'une stratégie de FRET a permis de détecter une interaction directe entre la CRT et C1qGR à la surface de la cellule HeLa en apoptose précoce. Dans un second temps, la mise en place de tests de phagocytose a permis de montrer que la calréticuline exposée à la surface des cellules apoptotiques peut moduler la phagocytose : des effets opposés ont été observés selon le modèle cellulaire utilisé (HeLa traitées par des ARNi ou MEF CRT-/-) et dans certaines conditions, une modulation combinée de la calréticuline et de C1q a été observée sur la réponse inflammatoire (production de cytokines).

Mots clés : calréticuline, C1q, complément, phagocytose, réponse inflammatoire, cytokines, FRET, signaux « eat-me »

Abstract

Cell death by apoptosis is a fundamental biological process, requiring fine interactions with the immune system for the effective recognition and removal of the apoptotic cells. C1q, a complement molecule, essential in the innate immune system, has been shown to be strongly involved in the mechanism of recognition and elimination of apoptotic cells, mainly through its globular region (C1qGR). Recently, the translocation of calreticulin (CRT) at the surface of cancer cells has been identified as an eat-me signal, which can be immunogenic. Initially, the interaction between CRT and C1q was characterized on phagocytes surface and CRT was described as a receptor for the collagenous tails of C1q (C1qCLF). All these observations support a dual role of CRT at the surface of phagocytes and their targets. At first, using a FRET strategy we achieve to detect a direct interaction between CRT and C1qGR at the surface of early apoptotic HeLa cells. Second, the establishment of phagocytosis assays showed that calreticulin exposed at the surface of apoptotic cells could modulate phagocytosis: opposite effects were observed depending on the cellular model used (RNAi-treated HeLa or MEF CRT-/-) and under certain conditions, a combined modulation of calreticulin and C1q was observed on the inflammatory response (cytokine production).

Keywords: calreticulin, C1q, complement, phagocytosis, inflammatory response, cytokines, FRET, eat-me signal