

THESE

Présentée par
Virginie GARLATTI

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1954 et du 30 mars 1992)

(Spécialité Biologie Structurale et Nanobiologie)

**SYSTEMES EFFECTEURS DE L'IMMUNITE INNEE :
RECONNAISSANCE ET VOIES DE SIGNALISATION**

ÉTUDE STRUCTURALE DES PROPRIETES DE RECONNAISSANCE DES FICOLINES ET DU
C1Q

ÉTUDE CELLULAIRE DU ROLE DE LA PROTEINE ELMO1 DANS L'ELIMINATION DES
CELLULES APOPTOTIQUES

À soutenir le 25 juin 2008 devant un jury composé de :

Christelle Breton	Présidente du jury
Herman van Tilbeurgh	Rapporteur
Daniel Aeschlimann	Rapporteur
Christine Gaboriaud	Co-Directrice de thèse
Jean-Phillipe Kleman	Co-Directeur de thèse
Yann Leverrier	
Nicole Thielens	
Philippe Frachet	

Thèse préparée au sein de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble

Le travail présenté dans le cadre de cette thèse a été réalisé à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble et au sein du Partnership for Structural Biology dans plusieurs laboratoires : le Laboratoire de Cristallographie et de Cristallogenèse des Protéines, le Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire et le Laboratoire des Protéines du Cytosquelette. Il a été financé par un contrat de formation par la recherche attribué par le Commissariat à l'Energie Atomique.

Je tiens à remercier M. Fontecilla-Camps, M. Arlaud ainsi que M. Skoufias de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires au cours de ces années.

Je remercie Christelle Breton pour avoir bien voulu accepter la présidence de ce jury de thèse et Herman van Tilbeurgh et Daniel Aeschlimann pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens également à remercier mes directeurs de thèse, Christine Gaboriaud et Jean-Philippe Kleman pour leur disponibilité et leur soutien. Je leur suis extrêmement reconnaissante de la confiance qu'ils m'ont donnée pour réaliser ces travaux mais aussi de la liberté dont j'ai profité pour mes activités d'enseignements et mes formations.

Je remercie chaudement Helena Paidissi pour sa contribution à l'écriture de l'introduction bibliographique du troisième chapitre de ce manuscrit.

Je remercie Nicole Thielens, Philippe Frachet et Jean-Baptiste Reiser pour l'aide qu'ils m'ont apportés au cours de ces années tant scientifique que technique ainsi que Lydie Martin, Anne Chouquet et Claudine Darnault pour leur expertise technique et leur persévérance dans la recherche des conditions de cristallisation.

Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont permis de réaliser ces travaux : Le Dr. Y.Leverrier pour son apport scientifique et technique sur la phagocytose, J. Perard pour son apport technique au cours de ma première année de thèse ainsi que Rose-Laure Indorato, Françoise Lacroix et Suzanne Behlke pour leur expertise en biologie cellulaire.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
ABREVIATIONS UTILISÉES POUR LES ACIDES AMINÉS	3
ABREVIATIONS UTILISÉES POUR LES SUCRES	4

CHAPITRE I INTRODUCTION GENERALE AUX QUESTIONS D'IMMUNITE CHEZ LES MAMMIFERES **5**

1 L'IMMUNITE CHEZ LES MAMMIFERES	7
2 RECONNAISSANCE PAR LE SYSTEME IMMUNITAIRE INNE.....	11
2.1 <i>Les molécules reconnues</i>	11
2.1.1 Généralités.....	11
2.1.2 Les signaux du non-soi.....	11
2.1.3 Les signaux du soi altéré	13
2.2 <i>Les récepteurs solubles : notion d'opsonine</i>	13
2.3 <i>Les récepteurs membranaires</i>	14
3 ÉLIMINATION DE LA CIBLE PAR LE SYSTEME IMMUNITAIRE INNE.....	14
3.1 <i>La phagocytose</i>	14
3.1.1 Définition et acteurs.....	15
3.1.2 Le mécanisme.....	15
3.2 <i>Le complément</i>	16
4 L'INFLAMMATION	16
4.1 <i>Réponse inflammatoire ou anti-inflammatoire ?</i>	16
4.1.1 Le cas des cellules apoptotiques	16
4.1.2 Le cas d'un pathogène	17
4.2 <i>Les pathologies auto-immunes associées à l'immunité innée</i>	17
5 LES PROJETS DE THESE.....	18
5.1 <i>La reconnaissance par le C1q et les ficolines</i>	18
5.2 <i>L'élimination des cellules apoptotiques : voies de signalisation mises en jeu</i>	18

CHAPITRE II ETUDE STRUCTURALE DES PROPRIETES DE RECONNAISSANCE DES FICOLINES ET DU C1Q..... **19**

1 INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	21
1.1 <i>Le complément</i>	21
1.1.1 Voies d'activation et régulateurs.....	22
1.1.2 Fonctions biologiques des protéines du complément	25
1.1.3 Pathologies associées au complément	27
1.2 <i>Les protéines de reconnaissance du complément</i>	32
1.2.1 Généralités.....	33
1.2.2 Organisation structurale.....	37
1.2.3 Activation des complexes initiateurs	41
1.2.4 Les spécificités de reconnaissance.....	42
1.3 <i>Objectif : comprendre au niveau atomique les propriétés de reconnaissances des ficolines et du C1q</i> 53	
2 MATERIEL ET METHODE EN CRISTALLOGENESE ET CRISTALLOGRAPHIE AUX RAYONS X	55
2.1 <i>Principe de l'obtention de structures atomiques par diffraction aux rayons X</i>	55
2.2 <i>Obtention des molécules à cristalliser</i>	59
2.3 <i>Cristallogénèse</i>	61
2.3.1 Principe.....	61
2.3.2 Technique de la goutte suspendue	63
2.3.3 Cristalliser des complexes protéine-ligand.....	63
2.3.4 La cristallogénèse de nos complexes	65
2.4 <i>Diffraction aux rayons X</i>	69
2.4.1 Enregistrement des données de diffraction	69
2.4.2 Traitement des données	71
3 RESULTATS.....	77
3.1 <i>Structure globale des domaines de reconnaissance des ficolines</i>	77
3.1.1 Obtention des structures natives des domaines de reconnaissance.....	77
3.1.2 Des protéines homotrimériques	79
3.1.3 Topologie des protomères	79
3.1.4 Les interfaces.....	81
3.2 <i>Modalités de reconnaissance des ficolines humaines</i>	83

3.2.1	Obtention de complexes protéine-ligand.....	83
3.2.2	Les ficolines H et M : un seul site conservé.....	85
3.2.3	La surface de reconnaissance de la ficoline L.....	89
3.2.4	Ces sites S2 et S3 existent-ils potentiellement sur les ficolines M et H ?.....	95
3.3	<i>Contrôle par le pH de l'activité de reconnaissance de la ficoline M</i>	97
3.4	<i>Clq reconnaît un marqueur des cellules apoptotiques</i>	101
4	DISCUSSION.....	103
4.1	<i>Qu'apportent les études structurales sur l'analyse des déterminants de la reconnaissance ?</i>	103
4.1.1	Le rôle du calcium dans les propriétés reconnaissance des ficolines et de Clq.....	103
4.1.2	Les sites de fixation identifiés précisent la nature des micromotifs reconnus par les trois ficolines.....	103
4.1.3	Les études structurales permettent de comprendre la variété de ligands identifiés pour la ficoline L et le Clq.....	106
4.1.4	Les spectres de reconnaissance des micromotifs sont complémentaires.....	107
4.1.5	Quelles informations apportent les structures sur le macromotif reconnu ?.....	108
4.1.6	Une reconnaissance régulable ?.....	109
4.2	<i>Structure, reconnaissance et fonctions biologiques</i>	109
4.2.1	Peut-on prédire les spécificités de reconnaissance des ficolines ?.....	109
4.2.2	Implications quant à la reconnaissance des surfaces.....	110
4.2.3	Les conséquences biologiques de la reconnaissance.....	111

CHAPITRE III ETUDE CELLULAIRE DU ROLE DE LA PROTEINE ELMO1 DANS LA PHAGOCYTOSE ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

1	INTRODUCTION.....	117
1.1	<i>Apoptose : Une mort cellulaire « sans danger »</i>	117
1.1.1	Définition.....	117
1.1.2	Fonctions physiologiques.....	117
1.1.3	Caractéristiques des cellules apoptotiques.....	119
1.2	<i>Reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes</i>	121
1.2.1	Signaux « find-me ».....	121
1.2.2	Les signaux « eat-me ».....	123
1.2.3	Les récepteurs connus.....	124
1.3	<i>Internalisation et élimination « silencieuses »</i>	125
1.3.1	Remodelage de l'actine pour l'internalisation.....	125
1.3.2	Voies anti-inflammatoires.....	130
1.3.3	L'activation de DOCK/ELMO, une voie anti-inflammatoire ?.....	131
1.4	<i>Le complexe ELMO/DOCK</i>	135
1.4.1	Les protéines de la famille Dock180.....	135
1.4.2	Les protéines de la famille ELMO.....	137
1.4.3	Interaction entre DOCK180 et ELMO.....	139
1.4.4	Projet : étudier le rôle de ce complexe dans la phagocytose.....	139
2	MATERIEL ET METHODES.....	141
2.1	<i>Obtention de vecteurs d'expression eucaryotes</i>	141
2.1.1	Méthodes de biologie moléculaire.....	141
2.1.2	Amplification des séquences d'Elmo1MS (PCR).....	143
2.1.3	Obtentions de vecteurs de fusion GFP.....	143
2.1.4	Obtention d'un vecteur de TAP-tag modifié et insertion d'Elmo1MS.....	145
2.2	<i>Analyse de l'expression d'ELMO1 in silico</i>	148
2.2.1	Matériel.....	148
2.2.2	Transfection des vecteurs d'expression.....	149
2.2.3	Visualisation des protéines et de l'ADN par microscopie à fluorescence.....	149
2.3	<i>Analyse biochimique des protéines cellulaires</i>	152
2.3.1	Lysats cellulaires.....	152
2.3.2	Gel SDS-PAGE.....	152
2.3.3	Electrotransfert sur membrane.....	153
2.3.4	Immunorévélation.....	153
2.4	<i>Tests fonctionnels en biologie cellulaire</i>	154
2.4.1	Matériel.....	154
2.4.2	Déclenchement et analyse de l'apoptose.....	155
2.4.3	Quantification de la phagocytose par FAC's.....	156
3	RESULTATS.....	159
3.1	<i>Mise au point de tests quantitatifs de phagocytose</i>	159
3.1.1	Phagocytose de billes de latex.....	159
3.1.2	Phagocytose des corps apoptotiques.....	163
3.2	<i>Expression cellulaire d'Elmo1MS</i>	167
3.2.1	Expression d'ELMO1 dans les cellules de mammifères.....	167

3.2.2	Expression de ELMO1MS fusionné à la GFP	171
3.2.3	A la recherche de partenaires d'ELMO1 par TAP-Tag.....	172
3.3	<i>Expression de domaines isolés d'ELMO1MS</i>	173
3.3.1	Choix des domaines à exprimer	175
3.3.2	Les constructions obtenues et leur expression	175
4	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	177
4.1	<i>Un modèle de phagocytose</i>	177
4.2	<i>Surexpression d'ELMO1MS dans les cellules</i>	178
4.3	<i>Perspectives : étude du comportement d'ELMO1 lors de la phagocytose</i>	178
4.3.1	Disséquer les signaux permettant de recruter ELMO1	178
4.3.2	Détecter l'expression de la protéine ELMO1MS.....	179
4.3.3	L'avenir immédiat du projet.....	180
CHAPITRE IV CONCLUSION ET PERSPECTIVES GENERALES		181
1	UN PROJET DEJA BIEN AVANCE : L'ETUDE STRUCTURALE DES PROPRIETES DE RECONNAISSANCE DES FICOLINES ET DE C1Q.....	183
2	UN PROJET A CONSTRUIRE : ETUDE DE LA PROTEINE ELMO1 AU COURS DE LA PHAGOCYTOSE DES CELLULES APOPTOTIQUES.....	184
BIBLIOGRAPHIE.....		185

ABBREVIATIONS

ADN : Acide DesoxyriboNuléique
ADNc : ADN complémentaire
BSA : Bovine Serum Albumin
CBP : Calmoduline Binding Protein
CCP : Complement Control Protein
Ced : C. elegans cell Death
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV : CycloMegalovirus
CR : Complement Receptor
CRP : C-Reactive Protein
CRT : Calréticuline
CUB : C1r/s, uEGF, BMP-1
Da : Dalton
DAMP : Danger/Damage Associated Molecular Pattern
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
DEAE : Diethylaminoethyl
DHR : Dock Homology Region
DMEM : Dubelco's Medium Eagles' Modified
DMSO : Dimethyl sulfoxide
EBP : Elastin Binding Protein
EBV : Epstein Barr Virus
ECL : électrochimiluminescence
EDTA : ethylene-diamine-tetraacetic acid
EGF : Epidermal Growth Factor
ELMO : Engulfment and Motility
FBG : FiBrinoGène
FITC : Fluorescein Iso Thio Cyanate
FSC : Forward Scatter
GBS : Group B Streptococcus
GEF : Guanine ? Exchange Factor
GC-BP : GC BInding Protein
GFP : Green Fluorescent Protein
HEK : Human Embryonic Kidney
HeLa : Henrietta Lakes
HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIV : Human Immunodeficiency Virus
HL : Human Leucocyte
HMGB1 : High Mobility Group Box 1
HRP : Horse Raddish Peroxidase
HSV : Herpes Simplex Virus
HTLV : Human T-cell Lymphotropic Virus
IAV : Influenza A Virus
IF : Immunofluorescence
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
INF : Interferon

Kd : constante de dissociation
LB : Luria Broth Base
LPC : LisophosphatidylCholine
LPS : LipoPolySaccharide
LRP : Low-density lipoprotein Receptor-related Protein
LTA : LipoTeichoic Acid
CAM : Complexe d'attaque membranaire
MASP : MBL associated Serine Protease
MBL : Mannose Binding Lectin
MCS : Multiple Clonage Site
MS : Mouse
MuLV : Murine Leukemia Virus
NCS : Non Crystallographic Symetry
PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
pb : paire de base
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEG : Poly Ethylen GLycol
PFA : ParaFormAldehyde
PH : Pleckstrin Homology
PI : Propidium Iodide
PP : PolyProline
PS : Phosphosérine
PTX : Pentraxine
p/v : poids/volume
RIM : Remplacement Moléculaire Isomorphe
RPMI : Roosevelt Park Memorial Institute
SDS : Sodium DodécylSulfate
SDS-PAGE : SDS- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SH : Src Homology
SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SLE : Systemic Lupus Erythematosus
SP : Serine Protease
SSC : side scatter
SVF : Sérum de Veau Foetal
TAP : Tandem Affinity Purification
TEMED : Tetramethylethylenediamine
TGF : Tumor Growth Factor
TL5a : Tachylectine 5a
TLR : Toll-Like Receptor
TLS : Translation, Libration and Screw rotation
Tm : température de fusion
TNF : Tumor Necrosis Factor
Tris : trishydroxyméthylaminométhane
TRITC : Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate
UV : Ultra-Violet
v/v : volume/volume
WB : Western Blot

**ABREVIATIONS UTILISÉES POUR LES ACIDES AMINÉS : CODE À
UNE OU TROIS LETTRES**

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide Glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

ABREVIATIONS UTILISEES POUR LES SUCRES :

Nom du sucre	Abréviation utilisée	Code dans les fichiers de structure
D-Glucose	Glc	GLC
D-Galactose	Gal	GLA
N-acétylglucosamine	NAcGlc	NAG
N-acétylgalactosamine	NAcGal	NGA
N-acétylmannosamine	NAcMan	NcM
Acide 5 N-acétylneuraminique	Neu5Ac	SLB
1,3-D- β -glucan	β -glucan	4 GLC
D-fucose	D-fuc	FCA
Mannose	Man	MAN

**CHAPITRE I INTRODUCTION GENERALE AUX
QUESTIONS D'IMMUNITE CHEZ LES MAMMIFERES**

Dans ce chapitre, nous allons décrire brièvement l'immunité chez les mammifères et tout particulièrement l'immunité innée de façon très générale. Certains points discutables dans la présentation très classique que je vais faire de l'immunologie seront l'objet de ma thèse et donc rediscutés ultérieurement.

1 L'immunité chez les mammifères

L'immunologie est une science relativement récente dont l'origine est attribuée à Edward Jenner en 1796 avec sa découverte de la vaccination contre la variole humaine. Historiquement, a été appelé système immunitaire, l'ensemble des défenses de l'organisme contre les maladies dues à des agents externes dits pathogènes (le non-soi). Des découvertes récentes montrent que le système immunitaire est aussi impliqué dans l'élimination des agressions internes à l'organisme (le soi altéré) : cellules mortes ou cellules tumorales par exemple. Le système immunitaire peut reconnaître puis éliminer une cible potentiellement dangereuse. Cette réaction inflammatoire est caractérisée physiologiquement par des rougeurs et des gonflements locaux (au niveau des muqueuses, de la peau ou des ganglions) mais aussi parfois de la fièvre. Le déclenchement de cette réponse immunitaire est finement contrôlé. La réponse immunitaire des mammifères peut être séparée en deux étapes : une première médiée par l'immunité innée encore appelée immunité non spécifique et une seconde menée par l'immunité acquise encore appelée immunité adaptative ou immunité spécifique (pour revue Janeway *et al.*, 2001) (figure 1, page 8).

L'immunité innée est constituée des barrières naturelles de l'organisme (épithélium, épiderme), de protéines sériques et d'un ensemble de cellules résidant dans les tissus ou dans le sang comme les macrophages, les cellules dendritiques ou les polynucléaires. Ces acteurs interviennent dans les premières heures de l'infection. Classiquement, on considère que les acteurs de l'immunité innée reconnaissent leurs cibles de façon peu spécifique. Cette reconnaissance va permettre la mise en place de deux systèmes effecteurs que nous décrirons par la suite : le système du complément et la phagocytose qui permettent de détruire la cible. Si l'infection ne peut être enrayée localement par l'immunité innée, des signaux inflammatoires vont activer l'immunité acquise. Ces signaux sont des cytokines qui peuvent activer les effecteurs immunitaires, des chemokines qui attirent les cellules sur le lieu de l'inflammation mais également la différenciation et la migration de cellules de l'immunité innée.

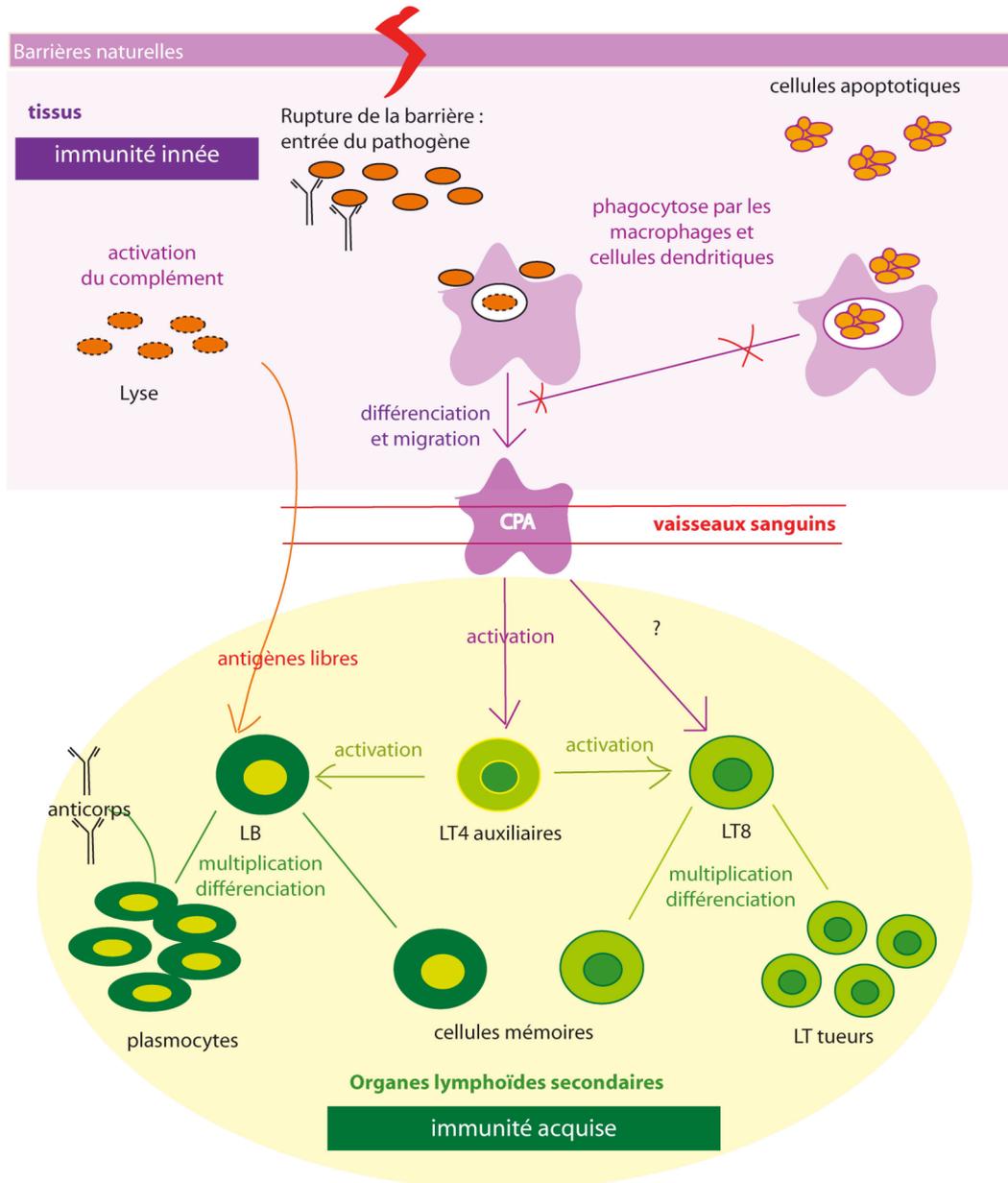


Figure 1 : Vue générale de l'immunité.

Un pathogène entrant dans les tissus est reconnu par les acteurs de l'immunité innée (mauve) qui mettent en place deux systèmes effecteurs principaux : la phagocytose et le système du complément. Ceci entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires et la différenciation de certains phagocytes en cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui migrent des tissus aux organes lymphoïdes, centre de l'immunité adaptative (en vert) via la circulation sanguine. Ces cellules activent des lymphocytes T dits auxiliaires ou LT4 nécessaires à l'activation des cellules effectrices les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes LT8. Les lymphocytes B qui reconnaissent des antigènes libres du pathogène se différencient en plasmocytes sécrétant d'anticorps. Ces anticorps circulent dans le sang et facilitent l'action du complément et de la phagocytose en opsonisant le pathogène. Les lymphocytes LT8 deviennent des lymphocytes tueurs (LT tueurs) et migrent dans les tissus de façon à détruire les cellules infectées. Dans le cas de l'élimination de cellules apoptotiques dans les tissus, il n'y a pas d'activation des acteurs de l'immunité adaptative.

L'immunité adaptative a été la première immunité étudiée à travers les vaccins. En effet, une de ses caractéristiques est de posséder une mémoire immunitaire essentielle pour la vaccination. En absence d'infection, les cellules immunitaires adaptatives, les lymphocytes B et T, résident dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions..) et circulent entre ceux-ci. Les lymphocytes B sont capables en cas d'activation de produire des anticorps qui facilitent l'action du complément et de la phagocytose. Les lymphocytes T activés peuvent devenir des lymphocytes auxiliaires (lymphocytes T4) qui activent les autres lymphocytes ou des lymphocytes tueurs (lymphocytes T8) qui migrent sur le site de l'infection pour détruire les cellules infectées. La reconnaissance d'une cible par ces cellules est dite spécifique car elle différencie une souche de bactérie d'une autre ou un sérotype viral d'un autre : les cellules immunitaires acquises reconnaissent des antigènes.

Historiquement, l'antigène est la molécule reconnue par un anticorps, mais, par extension, c'est devenu une molécule potentiellement reconnue par le système immunitaire adaptatif. Un antigène ne peut théoriquement pas être une molécule de l'organisme : on parle de tolérance immunitaire envers le soi. En cas d'inflammation, seuls les lymphocytes qui reconnaissent spécifiquement un antigène du pathogène s'activent, se multiplient et fabriquent des cellules mémoires. On parle de sélection clonale. Cette réponse met quatre à sept jours à se mettre en place si le pathogène est inconnu. Par contre, lors d'une seconde rencontre avec ce même pathogène, la mémoire immunitaire permet de diminuer ce temps de latence.

De nombreuses maladies complexes sont associées au système immunitaire. Les immunodéficiences sont, comme leur nom l'indique, des pathologies dans lesquelles le système immunitaire est trop faible pour protéger l'organisme. Ces immunodéficiences peuvent être dues à une maladie génétique comme dans le cas des « bébés bulles » qui n'ont aucun lymphocyte T, à un lymphome (prolifération non contrôlée de lymphocytes) ou à un pathogène comme dans le cas du virus de l'immunodéficiência acquise humain (VIH). Les maladies auto-immunes sont des pathologies dans lesquelles le système immunitaire s'active à mauvais escient et notamment se retourne contre l'organisme : c'est le cas du diabète de type II insulino-dépendant, du lupus ou de l'arthrite. Contrairement aux autres maladies inflammatoires chroniques, on peut détecter chez les patients atteints d'auto-immunité des anticorps dirigés contre le soi. Pendant longtemps on a associé ces maladies à une rupture de tolérance de l'immunité acquise, mais les chercheurs se rendent compte que l'immunité innée a un rôle central dans le maintien ou la rupture de ces tolérances. Dans la

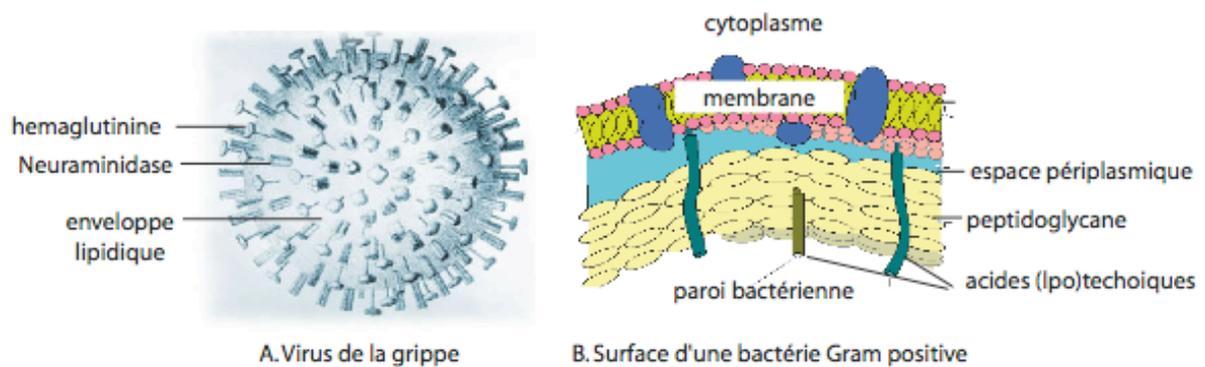


Figure 2 : Exemples des molécules surface de pathogènes

Le virus de la grippe (à gauche) possède une enveloppe lipidique contenant deux types de glycoprotéines membranaires : la neuraminidase et l'hémagglutinine. Les bactéries gram positives exposent à leur surface des antigènes communs de la paroi : le peptidoglycane (en beige) et les acides (lipo)techoïques (en vert).

suite de ce chapitre, je me concentrerai sur le système immunitaire inné qui est au centre des études menées au laboratoire.

2 Reconnaissance par le système immunitaire inné

Nous avons vu dans la première partie que le système immunitaire inné est souvent qualifié de système immunitaire non-spécifique de par ses modalités de reconnaissance. En réalité, si le niveau de spécificité est différent de celui du système immunitaire adaptatif, il n'en reste pas moins présent et discriminant.

2.1 Les molécules reconnues

2.1.1 Généralités

Les acteurs du système immunitaire inné sondent en permanence l'organisme à la recherche des cibles à éliminer. La seule information disponible dont ils disposent est l'ensemble des molécules exposées à la surface d'une cellule ou d'un virus. Ces molécules peuvent être des sucres, des lipides, des protéines ou encore des acides nucléiques. La figure 2 montre les molécules pouvant être présentes à la surface d'une bactérie gram positive ou du virus de la grippe. Nous pouvons voir que le virus de la grippe présente deux protéines qui lui sont spécifiques : la neuraminidase et l'hémagglutinine. La bactérie gram positive présente des molécules qui lui sont propres également comme le peptidoglycane ou les acides téchoïques qui n'existent pas chez les eucaryotes ou les virus. Les cellules de mammifères présentent notamment en permanence des acides sialiques.

2.1.2 Les signaux du non-soi

Les signaux du non-soi sont appelés PAMPs ce qui signifie : « Pathogen Associated Molecular Pattern ». Ce sont les motifs moléculaires répétées à la surface d'un pathogène, spécifiques de celui-ci et qui peuvent être lues par le système immunitaire inné. Parmi les PAMPs les plus étudiés, nous avons le lipopolysaccharide, le peptidoglycane, les acides téchoïques, les acides nucléiques modifiés mais aussi les protéines de surface virale. Cacher ces signaux est une technique d'échappement au système immunitaire pour les pathogènes. Ceci est le rôle des capsules bactériennes mais aussi de certaines enveloppes virales qui exposent les sucres de leur cellule hôte.

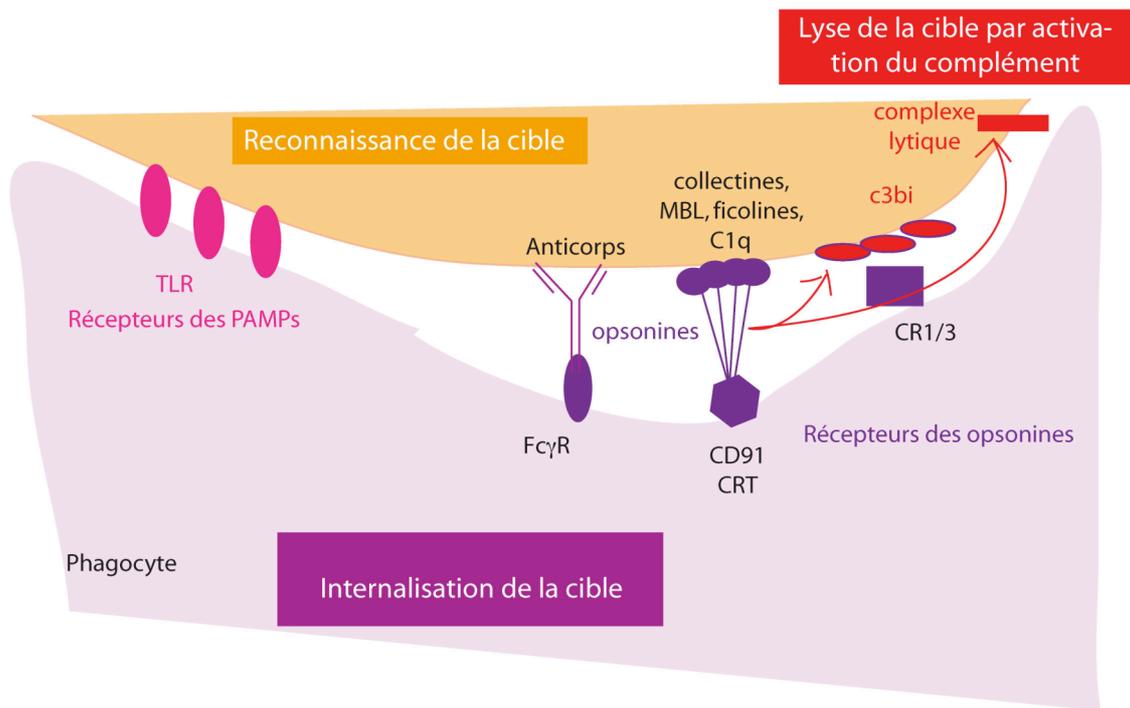


Figure 3 : Protéines de Reconnaissance et systèmes effecteurs innés

La cible (orangée) du système immunitaire inné peut être reconnue directement par des récepteurs des PAMPs (fushia) présents à la surface du phagocyte (mauve) comme ici les TLR (Toll-like Receptor) ou alors par des molécules solubles : anticorps, collectines, ficolines ou C1q (violet). Certaines peuvent déclencher l'activation du complément (rouge) et la lyse de la cible. Elles sont également reconnues par des récepteurs de surface du phagocyte (en violet), et avec les récepteurs des PAMPs, déclencher l'internalisation et la destruction de la cible.

2.1.3 Les signaux du soi altéré

En ce qui concerne le soi altéré, nous allons nous appuyer sur l'exemple qui nous a intéressé ici : les cellules apoptotiques. Les cellules apoptotiques sont des cellules qui subissent une mort cellulaire programmée. C'est une mort physiologique qui permet d'éliminer les cellules endommagées ou devenues obsolètes de l'organisme. Elle a un rôle fondamental dans le développement, le renouvellement des tissus ou encore la mise en place de la tolérance du système immunitaire adaptatif. Nous reviendrons sur ce processus cellulaire dans le troisième chapitre.

Une des conséquences de l'apoptose est de modifier les propriétés de la membrane plasmique, notamment la répartition des phospholipides entre le feuillet interne et le feuillet externe. Cela conduit à l'exposition de la phosphatidylsérine à l'extérieur de la cellule (Fadok *et al.*, 2001). On assiste également à une modification des sucres exposés à la surface avec la perte des acides sialiques exposant ainsi des chaînes glycosidiques se terminant par une N-acétylglucosamine (NAcGlc), une N-acétylgalactosamine (NAcGal) ou encore des galactoses ou des fucoses (Bilyy *et al.*, 2004; Orlando and Pittman, 2006). Certaines protéines vont également être exposées en masse à la surface comme la calréticuline (Gardai *et al.*, 2005, figure 3). Ces motifs nouvellement exposés sont appelés ACAMPs pour « Apoptotic Cells Associated Molecular Patterns » ou signaux « eat-me » car ils déclenchent la reconnaissance par le système immunitaire inné et l'élimination de ces cellules par phagocytose.

2.2 Les récepteurs solubles : notion d'opsonine

Les opsonines sont des molécules solubles capables de recouvrir la surface des cibles du système immunitaire. Elles sont elles-mêmes reconnues par des récepteurs membranaires des cellules immunitaires.

La première opsonine décrite appartient au système immunitaire adaptatif : c'est l'anticorps. Depuis, de nombreuses opsonines ont été découvertes dans le système immunitaire inné (figure 3) (pour revue Janeway *et al.*, 2001). Ces molécules peuvent être sériques ou tissulaires. Elles sont notamment abondantes au niveau de certaines muqueuses comme le tissu pulmonaire. Parmi ces opsonines, la large famille des collectines joue un rôle prépondérant. Ce sont des protéines dont l'unité trimérique est constituée d'un domaine de reconnaissance lectine de type C, d'une queue collagène et d'une région riche en cystéine. Ces unités s'assemblent pour former des structures multimériques. Huit collectines sont identifiées à ce jour dont la MBL (« Mannose Binding Lectin »), constituant du complément,

essentiellement sérique, et les protéines du surfactant pulmonaire SP-A et SP-D (« Surfactant Protein » A et D) (pour revue, van de Wetering *et al.*, 2004). De nombreuses opsonines sont bâties sur le même modèle avec souvent la nature du domaine de reconnaissance qui change. Nous avons par exemple les pentraxines mais aussi les autres protéines de reconnaissance du complément, ficolines et C1q dont nous ferons une étude approfondie dans le chapitre II. Des opsonines d'un troisième type peuvent être décrites : les molécules C3 et C4 de la cascade du complément, qui n'ont pas de propriétés de reconnaissance en soi mais qui recouvrent la surface des cibles (pour revue Walport, 2001b).

2.3 Les récepteurs membranaires

Les cellules immunitaires innées possèdent à leur surface des récepteurs appelés PRRs pour Pattern Recognition Receptors qui reconnaissent directement les PAMPs (figure 3) (Janeway *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter que ces PRR reconnaissent les PAMPs associés à la surface de la cible mais aussi sous leur forme soluble suite à la mort du pathogène par exemple. Les récepteurs de type Toll (TLRs) forment une famille de récepteurs membranaires reconnaissant directement des signaux de type non-soi. Ces récepteurs sont numérotés de 1 à 9 et chacun reconnaît un signal particulier. Par exemple, TLR-4 reconnaît le lipopolysaccharide bactérien associé à CD14 et induit un signal de type inflammatoire dans le phagocyte. TLR-2 s'active en présence de peptidoglycane de bactéries gram-positives. Les autres TLR peuvent reconnaître des signaux tels que les acides nucléiques par exemple (pour revue O'Neill, 2000).

Outre ces récepteurs spécifiques des PAMPs, les phagocytes possèdent aussi des récepteurs aux opsonines (figure 3). Les opsonines sont des molécules qui font le pont entre la cible et le phagocyte. Parmi ces récepteurs, nous pouvons citer les récepteurs aux immunoglobulines, le couple calréticuline/CD91 qui reconnaît les queues collagènes des collectines et du C1q, ou encore CR1 qui fixe C3, C4. Nous reviendrons sur certains de ces récepteurs dans le chapitre II.

3 Élimination de la cible par le système immunitaire inné

3.1 La phagocytose

3.1.1 Définition et acteurs

L'immunité innée a été découverte, dans un premier temps, à travers un processus appelé phagocytose. Un immunologiste Russe, Elie Metchnikoff, avait découvert que de nombreux

organismes pouvaient être internalisés et digérés par des cellules phagocytaires qu'il appelait macrophages (Metchnikoff, 1905). Toutes les cellules de l'organisme semblent être capables de phagocytose, mais certaines, particulièrement efficaces, sont appelées phagocytes professionnels. Nous savons actuellement que certains phagocytes professionnels peuvent se différencier en cellules présentatrices d'antigène (figure 1, page 8) pour le système immunitaire adaptatif. Nous reviendrons plus tard sur cette notion. Les phagocytes professionnels connus actuellement sont de trois types :

- Les polynucléaires neutrophiles, phagocytes professionnels
- Les cellules dendritiques dont le rôle essentiel est la différenciation en CPA.
- Les macrophages d'une capacité de phagocytose élevée mais pouvant aussi devenir une CPA.

3.1.2 Le mécanisme

La phagocytose est définie par trois étapes : la reconnaissance de la cible, son internalisation et sa destruction (pour revue Janeway *et al.*, 2001). L'étape de reconnaissance a été abordée précédemment et nous ne reviendrons pas dessus.

La reconnaissance de la cible déclenche des voies de signalisation cellulaire aboutissant, notamment, à la modification du cytosquelette. Il se forme alors des extensions cellulaires appelées pseudopodes qui viennent recouvrir la cible selon un mécanisme de fermeture éclair. Au fur et à mesure de l'extension des pseudopodes, les récepteurs membranaires reconnaissent les molécules à la surface de la cible entraînant ainsi une nouvelle modification du cytosquelette. Les pseudopodes s'étendent alors de plus en plus jusqu'à recouvrir totalement la cible. La dernière étape est la fusion membranaire qui aboutit à la formation d'une large vésicule intracellulaire : le phagosome.

Ce phagosome fusionne alors avec une autre vésicule intracellulaire : le lysosome pour donner un phagolysosome. Le lysosome contient des enzymes lytiques et a un pH très bas. Il possède également, dans les phagocytes professionnels et particulièrement dans les polynucléaires neutrophiles, une protéine membranaire appelée NADPH oxydase. Celle-ci est capable de produire de l' H_2O_2 mais aussi des dérivés toxiques de l'oxygène. L'ensemble de ces phénomènes va permettre la destruction de la cible dans un compartiment cellulaire limitant ainsi le relargage de substances hautement toxiques ou immunogènes dans le milieu. Nous verrons plus tard que cette caractéristique est fondamentale dans l'élimination des corps apoptotiques.

3.2 Le complément

Le complément a été décrit la première fois dans les années 1890 comme une protéine sérique sensible à la chaleur qui « complémentait » l'action des anticorps stables pour la destruction des bactéries. Actuellement, le système du complément regroupe plus de 30 protéines solubles ou membranaires dont la concentration totale est de l'ordre de 3g par litre de plasma, soit 15% des globulines totales (pour revue Arlaud *et al.*, 1998; Sim and Tsiftoglou, 2004). Il est connu comme un système sophistiqué de destruction des microorganismes à l'interface entre immunité innée et adaptative. Il a également un rôle essentiel dans l'élimination des complexes immuns et des déchets inflammatoires (pour revue Walport, 2001b).

L'activation du complément nécessite le plus souvent l'intervention de protéines de reconnaissance que nous avons évoquées plus haut : la MBL et les ficolines ou C1q. Il existe également une voie d'activation dite alterne qui ne fait pas intervenir de protéines de reconnaissance et servirait de boucle d'amplification. La reconnaissance de la cible lance une réaction en chaîne qui active diverses protéases à sérine afin d'aboutir à l'opsonisation de la cible par C3/C4 (facilitation de la phagocytose) et à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (CAM, C5-C9). Ce complexe est une perforine qui va réaliser des trous dans la membrane de la cible et conduire à sa lyse (figure 3). De plus, certains fragments libérés ont une fonction pro-inflammatoire. Compte-tenu des conséquences dramatiques d'une activation du complément, il existe de nombreux inhibiteurs. Nous reviendrons plus en détail dans le deuxième chapitre sur ce système effecteur.

4 L'inflammation

4.1 Réponse inflammatoire ou anti-inflammatoire ?

L'activation des deux systèmes effecteurs, phagocytose et complément, a pour conséquence non seulement la destruction de la cible mais aussi l'envoi de signaux au reste du système immunitaire. Ces signaux peuvent être pro- ou anti-inflammatoires.

4.1.1 Le cas des cellules apoptotiques

Dans le cas de la reconnaissance de cellules apoptotiques, le rôle du système immunitaire inné est de servir d'éboueur et non d'activer les défenses. L'élimination d'une cellule apoptotique se doit d'être silencieuse et aucun cas de relarguer des signaux ou substances immunogènes.

Une activation du complexe d'attaque membranaire du complément sur une cellule apoptotique aurait pour conséquence de relarguer dans le milieu le contenu intracellulaire

fortement immunogène. Il a été observé qu'en cas d'activation du complément sur des cellules apoptotiques la cascade s'arrête à l'opsonisation par C3/C4 (Platt *et al.*, 1998b). De même, le phagocyte confronté à une cellule apoptotique va l'éliminer, mais, en parallèle délivre un message anti-inflammatoire via l'interleukine 10 et le TGF- β (« Tumor Growth Factor »), (Fadok *et al.*, 1998b).

4.1.2 Le cas d'un pathogène

Dans le cas de la reconnaissance d'un pathogène, les conséquences sont à l'opposé : il y a une amplification du signal inflammatoire qui mène à l'activation de toutes les défenses immunitaires.

La cascade du complément peut aboutir à la formation du complexe d'attaque membranaire. De plus, de nombreux fragments libérés, ont la propriété d'attirer les cellules phagocytaires : ce sont des anaphylatoxines C3a et C5a.

Les phagocytes délivrent un signal pro-inflammatoire via les interleukines 12 et 1 et l'Interféron γ (INF γ) mais aussi sécrètent des chemokines qui attirent les autres cellules immunitaires (pour revue Garcia-Garcia and Rosales, 2002). Les macrophages et les cellules dendritiques se différencient en cellules présentatrices d'antigène qui ont alors un taux de phagocytose plus faible mais expriment plus fortement à leur surface des molécules dites du CMH. Le CMH, Complexe Majeur d'Histocompatibilité, est impliqué dans la reconnaissance des lymphocytes T. Les molécules de CMH-II s'expriment à la surface des cellules présentatrices d'antigène et portent un peptide issu de la phagocytose du pathogène. Ce couple CMH-II/peptide est un signal d'activation des lymphocytes T auxiliaires. Ils sont nécessaires à l'activation des lymphocytes B et des lymphocytes T tueurs et donc à la mise en place de la réponse adaptative (figure 1). La différenciation en cellule présentatrice d'antigène se fait simultanément avec la migration vers les organes lymphoïdes secondaires (pour revue Janeway *et al.*, 2001).

4.2 Les pathologies auto-immunes associées à l'immunité innée

Des travaux récents montrent un rôle fondamental des cellules dendritiques dans la mise en place de la tolérance du système immunitaire adaptatif *via* leur rôle de cellules présentatrices d'antigène. De plus, il semblerait qu'une élimination défailante des cellules apoptotiques soit à l'origine de pathologies comme le Lupus Erythémateux systémique ou l'arthrite rhumatoïde (Gaipl *et al.*, 2007).

Ces observations ont entraîné l'augmentation massive des recherches sur le fonctionnement de l'immunité innée. Dans l'Institut, de nombreux projets sont axés sur la compréhension de cette immunité complexe : activation et régulation du système du complément et reconnaissance et élimination des cellules apoptotiques.

5 Les projets de thèse

5.1 La reconnaissance par le C1q et les ficolines

Le laboratoire d'enzymologie moléculaire a initié avec le Laboratoire de cristallographie des protéines, il y a une quinzaine d'années, une étude structurale des composants du complément avec pour objectifs de comprendre les premières étapes d'activation de cette voie. Au cours de ma thèse, je me suis penchée sur la compréhension des déterminants structuraux de la reconnaissance par le C1q et les ficolines. Cette étude fera l'objet du chapitre II.

5.2 L'élimination des cellules apoptotiques : voies de signalisation mises en jeu.

Nous avons construit, il y a trois ans, un projet visant à comprendre les voies de signalisation impliquées dans les phagocytes professionnels suite à la reconnaissance de cellules apoptotiques. Notre attention s'est portée sur un complexe protéique ELMO/DOCK qui semble être spécifique de la phagocytose des cellules apoptotiques. Au cours, de ma thèse j'ai mis en place des outils cellulaires nécessaires à l'étude du comportement de ces protéines au cours de la phagocytose. Ce travail sera l'objet du chapitre III.

**CHAPITRE II ÉTUDE STRUCTURALE DES PROPRIÉTÉS
DE RECONNAISSANCE DES FICOLINES ET DU C1q**

1 Introduction bibliographique

1.1 Le complément

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, le complément est un système effecteur à l'interface entre immunité innée et adaptative qui possède trois fonctions essentielles : opsonisation, inflammation et lyse. Dans cette partie, nous allons montrer que le système du complément est au coeur du système immunitaire.

1.1.1 Voies d'activation et régulateurs

1.1.1.1 *Les trois voies d'activation du complément*

- Terminologie

Avant d'entreprendre la description des voies d'activation et de régulation du complément, il est essentiel d'en expliquer la nomenclature complexe. Celle-ci suit l'ordre historique de découverte des protéines. La voie classique d'activation du complément a été la première voie mise en évidence. Les protéines de la cascade sont notées C1 à C9. Les protéines de la seconde voie mise en évidence, la voie alterne, sont appelés « facteurs » suivi d'une lettre. En ce qui concerne la voie lectine, les protéines spécifiques ont des noms liés à leur fonction biologique comme, par exemple : MBL pour « Mannose Binding Lectin » (Ikeda *et al.*, 1987) ou MASP pour « MBL Associated Serine Protease » (Matsushita and Fujita, 1992). Compte-tenu du fait que de nombreuses protéines du complément sont clivées au cours de l'activation, les fragments obtenus sont désignés par « a » pour le plus petit fragment, « b » pour le plus grand fragment et « i » pour la forme inactivée. Nous allons décrire les trois voies d'activation du complément (pour revue Janeway *et al.*, 2001; Walport, 2001).

- La voie classique

La voie classique du complément est initiée par l'activation du complexe C1 composé d'une protéine de reconnaissance C1q et de deux protéases à sérine C1r et C1s. La voie classique peut être initiée suite à la liaison directe de C1q sur un pathogène (Kang *et al.*, 2006) ou à des signaux de danger (Szalai *et al.*, 1999). Cette voie est aussi mise en jeu lors de la réponse adaptative par la liaison de C1q aux complexes antigène-anticorps. La reconnaissance d'une cible par C1q entraîne l'auto-activation de C1r par coupure enzymatique. La forme active de

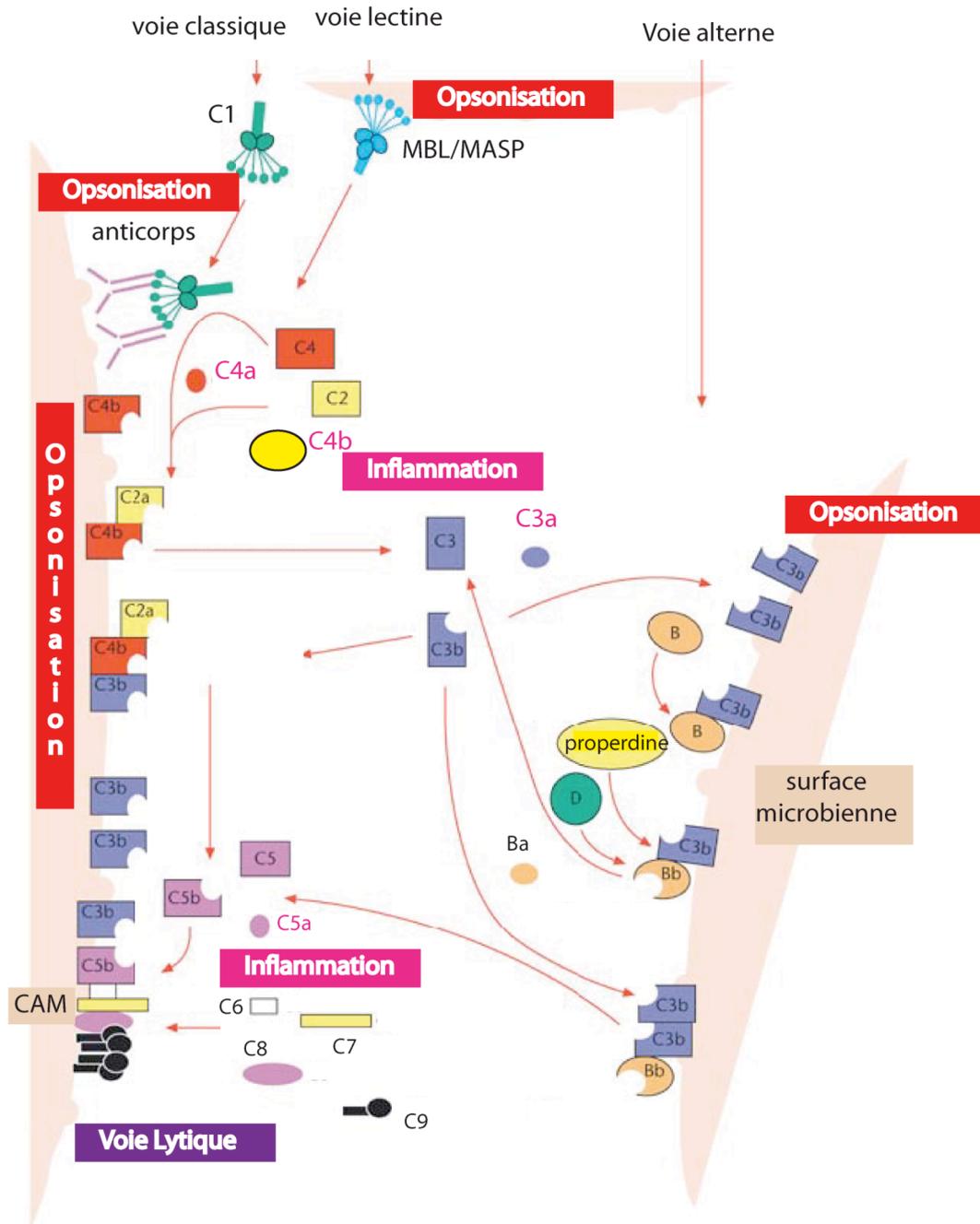


Figure 4 : Représentation schématique des cascades du complément.

Les voies classique et lectine commencent par la reconnaissance de la cible via les complexes initiateurs ce qui entraîne la coupure des substrats C4 et C2. Cette activation permet la formation de la C3 convertase classique (C4bC2a) et la libération d'anaphylatoxines (en rose). C3 est à son tour coupé et opsonise la cible facilitant ainsi la phagocytose. La voie alterne ne possède pas de complexe initiateur mais aboutit aussi à la coupure de C3 par une C3 convertase alterne (C3bBb). Deux C5 convertases peuvent être formées, la C5 convertase classique C2aC4bC3b et la C5 convertase alterne C3b₂Bb. Elles coupent C5 et permettent ainsi d'activer la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM) et donc la lyse. D'après Walport, 2001.

C1r coupe C1s de façon à générer une protéase à sérine active. Une fois C1s activée, elle clive tout d'abord C4 en C4b et C4a. Le fragment large C4b s'attache à la membrane de la cible et fixe C2 qui devient alors susceptible à la coupure par C1s. Le fragment C2a est une protéase à sérine activée. Le complexe C4b/C2a fixé à la membrane cible forme la C3 convertase de la voie classique. Son rôle essentiel est de cliver un nombre élevé de molécules C3 afin d'opsoniser la surface de la cible avec des molécules de C3b. Ce clivage de C3 conduit également à la formation d'une « C5-convertase » C4b2a3b (pour revue Volanakis and Arlaud, 1998). Ce complexe coupe la protéine C5 et initie les étapes ultimes de l'activation du complément par formation du Complexe d'Attaque Membranaire (CAM ; figure 4).

- La voie lectine

La voie lectine, découverte plus récemment (Matsushita and Fujita, 1992), est très similaire à la voie classique du complément. Le complexe d'activation est composé, tout comme C1, d'une protéine multimérique de reconnaissance (MBL ou ficoline) associée à une protéase à sérine appelée MASP (1, 2 ou 3) dont la structure modulaire est proche de C1r et C1s. L'activation de la voie lectine est déclenchée par la reconnaissance directe d'oligosaccharides à la surface de pathogènes ou de signaux de danger à la surface des cellules apoptotiques. Cela entraîne l'auto-activation d'une MASP qui va elle-même cliver C2 et C4. Le reste de la voie est identique (figure 4).

- La voie alterne

La voie alterne du complément peut s'activer sur la surface de nombreux pathogènes en absence d'une protéine de reconnaissance identifiée (bactéries, champignons, virus, cellules tumorales). Elle mène à l'activation d'une C3 convertase C3bBb différente de celle de la voie classique (pour revue Harboe and Mollnes, 2008). Cette voie commence par l'hydrolyse spontanée de la liaison thioester de C3 pour former C3(H₂O) qui permet la fixation du facteur B (Tack *et al.*, 1980; Bexborn *et al.*, 2008). Ceci permet au facteur D, une protéase plasmatique, de cliver le facteur B en Ba et Bb qui reste attaché à C3(H₂O). Ce complexe est une C3 convertase soluble formée en très faible quantité. Le fragment C3b formé est le plus souvent inactivé par hydrolyse mais, de temps en temps, il s'attache de façon covalente à la membrane de pathogènes ou de cellules de l'hôte via son groupe thioester (Spitzer *et al.*, 2007). Ce C3b fixé à la membrane peut à son tour fixer le facteur B autorisant sa coupure par le facteur D (Volanakis and Narayana, 1996). Le complexe C3bBb membranaire est la C3

Properdine	Soluble	Stabilise la C3-convertase alterne
C1 inhibiteur	Soluble	Inhibe l'activité de C1r, C1s, MASP-1 et MASP-2
Facteur I	Soluble	Clive C3b et C4b, les rendant inactifs.
Facteur H	Soluble	Dissocie la C3-convertase alterne Co-facteur du facteur I dans le clivage de C3b
C4bp	Soluble	Dissocie la C3-convertase classique Co-facteur du facteur I dans le clivage de C4b
Clusterine/ProtéineS	Soluble	Empêche l'insertion du CAM dans la membrane
MCP / CD46	Membranaire	Co-facteur du Facteur I dans le clivage de C3b et C4b
DAF / CD55	Membranaire	Dissocie les C3 convertases
CD59	Membranaire	Empêche la formation du CAM
CR1 / CD35	Membranaire	Dissocie les C3-convertase Co-facteur du facteur I dans le clivage de C3b et C4b

Tableau I : Caractéristiques des différents régulateurs du complément. (CAM : Complexe d'Attaque Membranaire) D'après Teillet, 2006.

Récepteur	Cellules	Cibles	Référence
CR-1	Presque toutes les cellules immunitaires ainsi que les érythrocytes.	C3b, C4b, C1q	Pour revue Krych <i>et al.</i> , 1999
CR-2	Lymphocytes B Follicular Dendritic Cells	C3d, C3dg (i)C3b	Pour revue Toapanta and Ross, 2006
CR-3	Toutes les cellules immunitaires innées.	C3b C3dg (i)C3b ICAM-1/2	Pour revue Ehlers, 2000
CR-4	Surtout sur les cellules dendritiques, un peu sur monocytes/macrophages.	C3b C3dg (i)C3b	Pour revue Toapanta and Ross, 2006
CD91/calréticuline	ubiquitaire	MBL, C1q, ficolines ?	(Ogden et al., 2001)
Autres récepteurs SR-A Intégrine $\alpha 2\beta 1$ gC1qR		C1q	(Vandivier et al., 2002) (Zutter and Edelson, 2007)

Tableau II : Les récepteurs du complément.

convertase de la voie alterne. Il peut également se former un complexe C3b₂Bb appelé « C5 convertase alterne », dont le rôle est identique à celui de la C5-convertase des voies lectine et classique. Cette voie alterne est vue de plus en plus comme une boucle d'amplification du complément (figure 4).

1.1.1.2 Régulation

Dans la régulation du complément, il existe une molécule qui stabilise la C3-convertase alterne, la properdine (Spitzer *et al.*, 2007) et tous les autres régulateurs inhibent la mise en place de la cascade (pour revue Walport, 2001). Cette fonction inhibitrice est essentielle. La spécificité pour une cible est perdue une fois les premières protéases activées. Il est donc essentiel de limiter l'action potentiellement destructive sur cellules environnantes. Pour cela, un certain nombre d'inhibiteurs sont présents à la surface des cellules de l'hôte de façon à empêcher notamment la formation du complexe lytique final. Ces régulateurs sont répertoriés dans le tableau I.

1.1.2 Fonctions biologiques des protéines du complément

- Formation du complexe d'attaque membranaire

L'ensemble des voies d'activation du complément peut conduire à la formation d'un complexe d'attaque membranaire, composé de C5b, C6, C7, C8 et de 10 à 16 molécules de C9. Il peut s'insérer dans les membranes cellulaires et former un pore transmembranaire qui induit la lyse du pathogène par déstabilisation et perméabilisation de la membrane.

- Opsonisation et facilitation de la phagocytose

L'opsonisation des surfaces par les protéines de reconnaissance du complément (C1q, MBL, ficolines) mais surtout par le facteur C3b/C3b(i) et dans une moindre mesure C4b entraîne une facilitation de la phagocytose. Les phagocytes portent à leur surface des récepteurs à ces molécules. Ces derniers se comportent alors comme des « ponts » entre la cible à éliminer et le phagocyte. Nous verrons dans la suite que selon les cellules considérées, l'interaction avec les récepteurs peut avoir des conséquences autres que la phagocytose. Les récepteurs connus pour ces molécules sont décrits dans le tableau II.

L'identité de ces récepteurs liant les tiges collagéniques des collectines, C1q et ficolines reste à établir précisément. Le récepteur qui semble le meilleur candidat actuellement est cC1qR/calréticuline. C'est un récepteur de C1q isolé par chromatographie d'affinité ayant la capacité d'interagir avec le domaine de type collagène de C1q (Ghebrehiwet, 1984). Ce

récepteur interagit également avec la MBL, les ficolines H et L (Kuraya *et al.*, 2005) ainsi que les collectines SP-A et SP-D (Vandivier *et al.*, 2002). Son mode d'attachement à la membrane n'est pas connu mais il semblerait qu'il puisse en association avec son co-récepteur LRP/CD91 (« LDL-receptor related protein »), transmettre un signal à travers la membrane et ainsi induire la phagocytose des cellules apoptotiques opsonisées par C1q et la MBL (Ogden *et al.*, 2001). D'autres récepteurs ont été proposés essentiellement pour C1q :

- C1qRp/CD93 impliqué dans la phagocytose déclenchée par C1q ou la MBL (Steinberger *et al.*, 2002) mais des travaux récents ont montré qu'il n'y avait aucune interaction directe entre C1q et CD93 (McGreal *et al.*, 2002).

- gC1qR/p33 est un récepteur des têtes globulaires de C1q. Par contre, il ne possède pas de domaine transmembranaire, ni d'ancre d'association à la membrane.

- CR1/CD35 est le récepteur du complément de type 1 qui peut fixer à la fois C1q, C3b et C4b. Il reconnaît notamment les complexes immuns opsonisés via les fragments de type collagène de C1q et permet leur élimination (Klickstein *et al.*, 1997; Tas *et al.*, 1999).

- L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ a été découverte récemment comme un nouveau récepteur de C1q (Zutter and Edelson, 2007).

- Inflammation et chimiotactisme

Au cours de l'activation du complément de nombreux fragments protéiques sont libérés. Les anaphylatoxines (C3a, C5a et C4a) attirent par chimiotactisme les cellules phagocytaires sur le site de l'infection. Il est suggéré également dans la littérature que la ficoline M aurait un rôle dans l'adhésion des monocytes à la surface endothéliale mais ce ne sont que des observations préliminaires (Teh *et al.*, 2000). C1q possède aussi un rôle dans le chimiotactisme (Stokol *et al.*, 2004) et peut induire *in vitro* une large gamme de réponses cellulaires. Par exemple, l'interaction de C1q avec les cellules endothéliales et les plaquettes conduit à leur activation et à l'induction directe ou indirecte de l'inflammation (Peerschke and Ghebrehiwet, 2001).

Les conséquences inflammatoires de l'activation du complément peuvent varier selon le contexte. Par exemple, il semblerait que le C1q et la MBL répriment l'expression des gènes de l'IL-1 ou du TNF β induite par le LPS. Ceci est cohérent avec le rôle central du complément dans l'élimination des cellules mortes (Flierman and Daha, 2007). Comme nous le verrons dans la suite de cette étude, les protéines de reconnaissance du complément

reconnaissent les cellules apoptotiques et participent à leur élimination en facilitant leur phagocytose. Il est intéressant de noter que dans ce cas, la cascade s'arrête à l'opsonisation par (i)C3b et qu'il n'y a pas de message inflammatoire (Platt *et al.*, 1998). Cette inhibition de l'activation des phases terminales du complément serait due à la fixation d'inhibiteurs du complément sur les cellules apoptotiques (Trouw *et al.*, 2007).

- *Le complément : un rôle non-immunitaire*

Le complément semblerait avoir un rôle physiologique en dehors de ses fonctions d'élimination des déchets ou des pathogènes. Nous pouvons prendre comme exemple le rôle du complément dans le développement du système nerveux (pour revue, (Fourgeaud and Boulanger, 2007). Des données récentes montrent que les souris déficientes en C1q et à moindre échelle en C3, conservent des connexions nerveuses redondantes au niveau de la rétine. Les auteurs proposent que C1q, voir C3, ciblent les connexions nerveuses à éliminer et induisent leur destruction probablement par phagocytose (Stevens *et al.*, 2007). De plus, la présence du récepteur CR-3 sur les cellules microgliales (Gasque *et al.*, 1998) suggère une reconnaissance possible de l'opsonisation par C1q et C3 par ces cellules qui ont de fortes capacités de phagocytose. De même, C1q est sécrété par l'endomètre au cours de la grossesse et semble servir à l'adhésion entre cet endothélium et le trophoblaste (Bulla *et al.*, 2008).

1.1.3 Pathologies associées au complément

Dans cette partie, nous n'allons pas décrire de façon exhaustive l'ensemble des pathologies associées au complément. Par contre, nous développerons plus précisément les pathologies associées aux protéines de reconnaissance qui nous intéressent plus particulièrement.

1.1.3.1 Les déficiences génétiques

Les déficiences génétiques au niveau des protéines du complément peuvent avoir comme conséquences des infections chroniques par certains types de pathogènes, le développement de pathologies auto-immunes ou des sur-activations du complément. Les symptômes peuvent passer totalement inaperçus ou presque comme dans le cas de faibles taux de MBL ou alors dramatiques comme dans le cas d'une déficience en Facteur H ou C1s. Les maladies héréditaires liées actuellement au complément sont résumées dans le tableau III (d'après Walport, 2001).

Déficiences en protéine du complément	Conséquences sur l'activation du complément	Effets cliniques
C3	Perte de l'opsonine majeure et pas d'activation de CAM	Infections par les bactéries pyogéniques, Glomérulonéphrite Membranoproliférative
C3, properdine, CAM	Pas de CAM	Infection par <i>Neisseria</i>
C1 inhibiteur	Perte d'inhibition de C1 et activation de la Kallikréine	Angio-oedème
CD59	Pas d'inhibition de la formation de CAM sur les cellules de l'hôte	Hémolyse, thrombose
C1q, C1r/s, C4, C2	Pas d'activation de la voie classique	Lupus systémique Erythémateux Sensibilité aux Infections
Facteur H et Facteur I	Pas de régulation de l'activation de C3, déficience secondaire sévère en C3.	Syndrome hémolytique Urémique, Glomérulonéphrite Membranoproliférative
MBL	Faible reconnaissance de certains pathogènes	Sensibilité accrue aux infections Polyarthrite rhumatoïde
Ficoline M		Polyarthrite rhumatoïde

Tableau III : Effets cliniques de déficience dans les protéines du complément. (CAM : Complexe d'Attaque Membranaire ; d'après Walport, 2001)

- Les sur-infections

Trois types de déficiences du complément peuvent entraîner des susceptibilités aux infections pyogènes : une déficience dans les capacités d'opsonisation (déficit en C3), une déficience dans la mise en place de l'activité lytique qui, la plupart du temps, augmente les infections aux *Neisseria* (C3, properdine, CAM) et un déficit en MBL.

Les déficiences en MBL sont des pathologies complexes qui peuvent être très ou pas du tout invalidantes. Elles sont associées à des mutations, soit sur le promoteur modifiant les concentrations sériques en MBL vers une augmentation ou une diminution, soit à des mutations dans la séquence du gène lui-même entraînant une diminution du taux sérique de MBL. Une diminution du taux sérique de MBL est caractérisée par une sensibilité accrue à certaines infections, plus particulièrement chez l'enfant en bas âge et chez les patients immunodéprimés (Turner and Hamvas, 2000). Ce bas taux en MBL peut être associé aussi à une augmentation de la sévérité de l'atteinte pulmonaire de la mucoviscidose (Garred *et al.*, 1999). L'effet sur les infections virales reste très controversé.

Les travaux relatant des déficits en ficoline sont très récents. Les pathologies observées sont souvent proches de celles associées à la MBL même si la quantité de travaux réalisés reste bien inférieure. Des mutations entraînant des variations sériques de la quantité de ficoline fonctionnelle commencent à être mises en évidence (Cedzynski *et al.*, 2007; Munthe-Fog *et al.*, 2007; Swierzko *et al.*, 2007) ainsi que des mutations dans la ficoline L pouvant être responsables d'une baisse d'affinité pour le NAcGlc (Hummelshoj *et al.*, 2005). Il semblerait aussi qu'une déficience en ficoline L aggrave les symptômes respiratoires d'enfants présentant déjà une déficience en MBL (Atkinson *et al.*, 2004).

- Les maladies auto-immunes

Plusieurs maladies auto-immunes sont associées à des déficiences dans les protéines du complément comme le Lupus Erythémateux Systémique ou l'Arthrite Rhumatoïde. Cette dernière implique des déficiences en MBL (Hummelshoj *et al.*, 2005) voire en ficoline M (Vander Cruyssen *et al.*, 2007), mais la pathologie auto-immune la plus récurrente est le SLE. 95% des individus déficients en C1q développent une maladie auto-immune de type Lupus Erythémateux Systémique (SLE). Les souris déficientes en C1q développent également des symptômes proches de ceux du SLE chez l'homme. Tout comme les patients déficients en C4, les souris C4^{-/-} développent une pathologie de type SLE mais moins sévère que lors de déficiences en C1q. Une des caractéristiques immunologiques du SLE est la synthèse

Microorganisme	Ligand sur le pathogène	Recepteur de l'hôte	Localisation du récepteur	Cible de l'infection
Virus Epstein-Barr	Glycoprotéine 350/220	CR-2	Cellules B	Cellules B cellules épithéliales
Virus de la varicelle	Hémagglutinine	CD46	Nombreuses cellules	Lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques, neurones
Picornavirus	Capside	CD55	Nombreuses cellules	Cellules du tube digestif et des tissus lymphoïdes
Mycobacterium tuberculosis	C3b déposé	CR-3	Macrophages	Macrophages
HIV	C3b déposé	CR-1 CR-2 CR-3	Macrophages, quelques cellules T CD4, cellules dendritiques, cellules dendritiques folliculaires	Cellules T CD4, cellules dendritiques, cellules dendritiques folliculaires
Flavivirus	C3b déposé	CR-3	macrophages	Macrophages, neurones

Tableau IV: Protéines du complément utilisées par les microorganismes comme porte d'entrée.

(d'après Walport, 2001)

d'auto-anticorps dirigés contre les constituants nucléaires (Nisengard *et al.*, 1975). Les patients présentent également une glomérulonéphrite, due à l'accumulation de complexes immuns dans le rein (Napirei *et al.*, 2000) et un défaut d'élimination des cellules apoptotiques (Gaipl *et al.*, 2007). Dernièrement un lien a été fait entre des polymorphismes dans le gène de la ficoline M et le développement d'arthrite rhumatoïde. Par contre, aucun lien n'a été trouvé entre des mutations dans les gènes des ficolines H et L et l'arthrite rhumatoïde (Vander Cruyssen *et al.*, 2007).

- *Autres inflammations chroniques*

Les inflammations chroniques sont le plus souvent des glomérulonéphrites, le syndrome hémolytique urémique, des thromboses ou des angiomes. Toutes ces activations non-contrôlées du complément sont dues à des déficiences dans les facteurs de régulation de l'activation (pour revue, Richards *et al.*, 2007).

1.1.3.2 L'échappement au système immunitaire

Pour pouvoir se développer et survivre, de nombreux micro-organismes ont développé différents systèmes d'échappement au système immunitaire et en particulier au complément. Certains se protègent de façon à ne pas être reconnus comme certaines bactéries derrière les capsules (*N.meningitis* ou *E. coli K1*), d'autres sécrètent des protéases qui inhibent ou détruisent les composants du complément. Certains pathogènes vont jusqu'à utiliser les protéines du complément comme porte d'entrée cellulaire ou comme protection. Par exemple, l'activation de la voie classique pourrait être impliquée dans les stades précoces de l'infection par le VIH, (pour revue Banki *et al.*, 2007), les pathogenèses des maladies à prion (Klein *et al.*, 2001) et contribuer au processus dégénératif de la maladie d'Alzheimer (Tacnet-Delorme *et al.*, 2001). Le tableau IV résume les autres portes d'entrée du complément utilisées par les pathogènes (d'après Walport, 2001).

1.1.3.3 Les sur-activations du complément

Le système immunitaire inné a un rôle fondamental dans la protection des cellules du système nerveux contre les infections, les hémorragies et le vieillissement. Pourtant, dans un certain nombre de maladies neurodégénératives, ces mécanismes de protection deviennent neurotoxiques. L'activation inappropriée du complément peut mener à la lyse des cellules et a été impliqué dans les maladies démyélinisantes comme la sclérose en plaque (Compston *et al.*, 1989) ou les encéphalomyélites (Linnington *et al.*, 1989). De plus, il semblerait que le rôle

à l'origine protecteur du complément dans certaines maladies neurodégénératives, comme la maladie Alzheimer, soit responsables de certaines lésions secondaires (pour revue Griffiths *et al.*, 2007).

Les forts taux de MBL sont associés en cas de greffe ou d'ischémie suivie de reperfusion à des pathologies inflammatoires exacerbées. Les ficolines sont également mises en cause dans les pré-éclampsies pendant la grossesse : un faible taux de ficolines sériques chez la mère mais un fort taux dans le placenta. La réaction de pré-éclampsie serait due à une sur-inflammation lors de l'élimination des cellules apoptotiques du trophoblaste (Munthe-Fog *et al.*, 2007).

Finalement, le complément a été découvert via son activité lytique sur les pathogènes mais nous avons vu dans cette partie que son rôle va bien au-delà. Les protéines du complément sont également impliquées dans l'opsonisation et la phagocytose, la régulation de l'inflammation (positive ou négative), ainsi que dans des processus développementaux à la marge du système immunitaire (développement nerveux, nidation). Les maladies auto-immunes dues à des déficiences au complément montrent le rôle du complément dans la mise en place de la tolérance immunitaire. Les fonctions nouvelles du complément impliquent presque toujours les opsonines. Parmi ces opsonines, les ficolines, la MBL et le C1q possèdent les propriétés de reconnaissance des cibles du complément. Dans la partie suivante, nous allons décrire ces protéines ainsi que leurs propriétés de reconnaissance.

1.2 Les protéines de reconnaissance du complément

Nous avons évoqué dans le chapitre I les particularités de reconnaissance du système immunitaire inné. Nous avons vu que des récepteurs membranaires ou solubles reconnaissent des motifs répétés à la surface des pathogènes, on parle de PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) ou à la surface des cellules apoptotiques, on parle d'ACAMPs (Apoptotic Cells Associated Molecular Patterns). Parmi ces récepteurs, certains reconnaissent des signaux de danger, issus des cellules endommagées, ce sont les DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns). Finalement, tous ces termes expliquent que le système immunitaire inné reconnaît des motifs conservés, absents des cellules viables. En réalité, les déterminants et les spécificités de reconnaissance du système immunitaire inné ne sont définis que pour très peu de récepteurs. Nous allons aborder cette notion de spécificité à travers l'étude des ficolines, du C1q et de la MBL.

1.2.1 Généralités

1.2.1.1 **C1q**

L'histoire de C1q commence en 1961 quand Müller-Eberhard *et al.* associent l'activité de liaison de C1 aux γ -globulines à un sous-composant appelé C1q (Muller-Eberhard and Kunkel, 1961). De nombreux travaux suivent afin de séparer les composants de C1 et purifier C1q (Lepow *et al.*, 1963; Linscott, 1968; Reid *et al.*, 1972). La suite de l'histoire a été en grande partie écrite par le Pr. Reid avec pas moins de 96 publications à son actif sur cette molécule qui, malgré tout, garde certains aspects mystérieux. Encore purifiée à partir du plasma (Arlaud *et al.*, 1979), nous restons incapables de la produire de façon recombinante et nous ne comprenons pas encore très bien toutes ses fonctions. C'est une protéine sérique ($70\mu\text{g.mL}^{-1}$) produite par les macrophages tissulaires hépatiques et non par les hépatocytes (Muller *et al.*, 1978; Loos *et al.*, 1989). Si l'origine hématopoïétique de la production de C1q semble claire, des études récentes montrent que le C1q, ainsi que d'autres éléments du complément, est produit par le tissu neuronal et particulièrement par la microglie (Schafer *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2000). Les déficiences en C1q sont associées à des pathologies auto-immunes invalidantes comme le Lupus Erythémateux Systémique (Botto *et al.*, 1998; Cutler *et al.*, 1998; Walport *et al.*, 1998).

1.2.1.2 **La MBL**

La MBL, aussi appelée MBP ou RaRF(p28), a été isolée il y a une trentaine d'années à partir de cellules hépatiques humaines par chromatographie d'affinité sur une résine portant des résidus mannose (Robinson *et al.*, 1975). C'est une collectine principalement produite par le foie et est sécrétée dans le sang à une concentration inférieure à $5\mu\text{g.mL}^{-1}$. Chez les rongeurs et le singe rhésus, il existe deux formes de la MBL (MBL-A et MBL-C) contre une seule forme chez l'homme. Chez la souris, de faibles taux de production de MBL ont aussi été détectés dans les reins et l'intestin grêle dans lequel elle pourrait avoir un rôle de facteur immunitaire humoral (pour revue, van de Wetering *et al.*, 2004). Les déficits en MBL sont relativement fréquents et peuvent être associés à des infections répétées et sévères.

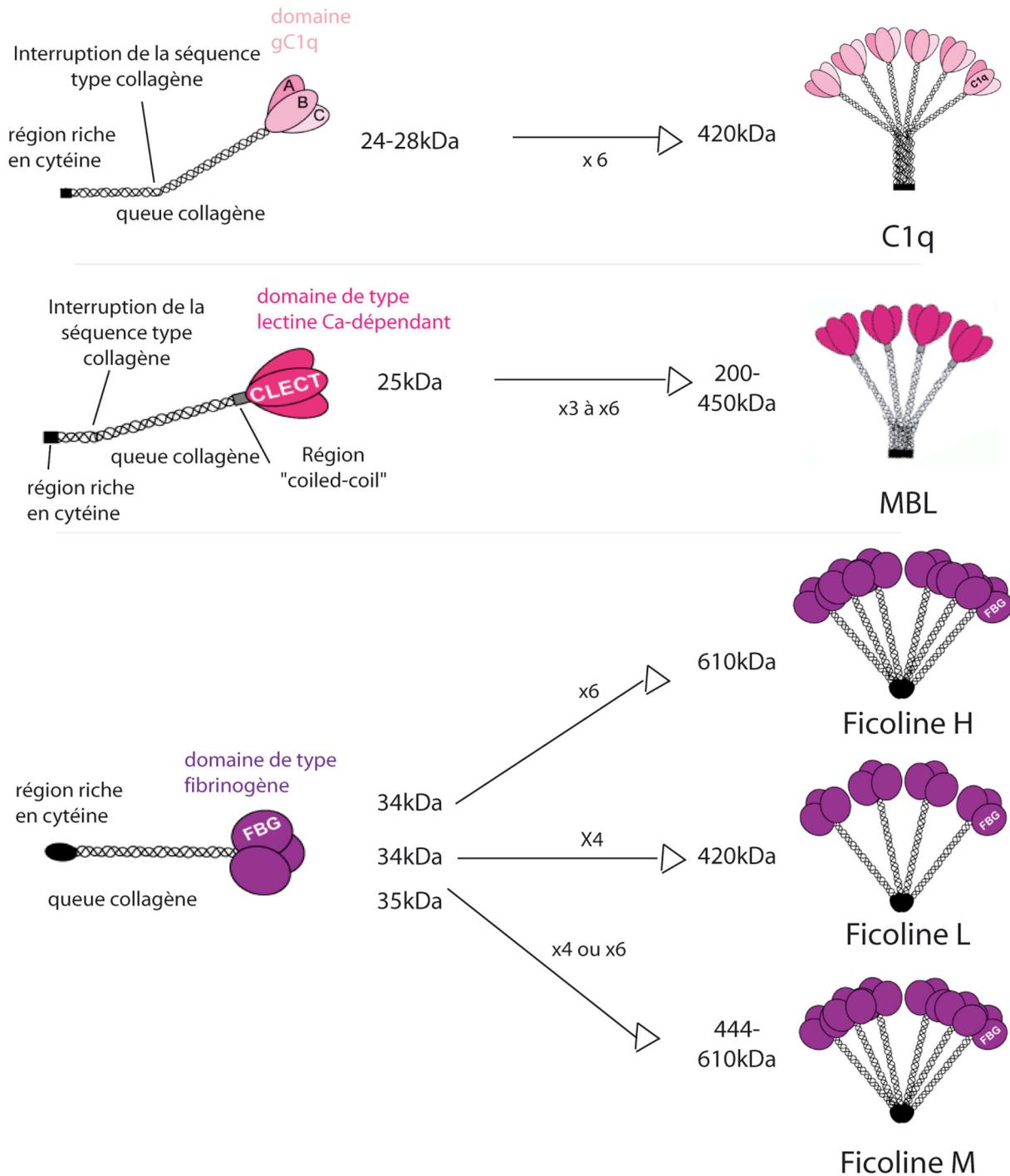


Figure 5 : Organisation structurale du C1q, de la MBL et des ficolines.

Les trois protéines de reconnaissance du complément sont présentées depuis leur organisation trimérique en trois régions : la région riche en cystéine, la queue collagène et les domaines de reconnaissance jusqu'à leur forme oligomérisée. Les masses moléculaires sont indiquées en kDa pour les monomères et les oligomères.

1.2.1.3 Les ficolines

Les ficolines ont été isolées pour la première fois à partir de cellules utérines de porcs via leur propriété à fixer le TGF- β 1 (Ichijo *et al.*, 1993). Il faudra attendre 1996 pour identifier les premières ficolines humaines (Endo *et al.*, 1996 ; Harumiya *et al.*, 1996; Akaiwa *et al.*, 1999). Chez l'homme, trois ficolines ont été identifiées : la ficoline M (« Monocytes »), la ficoline L (« liver ») et la ficoline H (Hakata Antigen).

La ficoline L ou ficoline 2, encore appelée hucoline (« human ficolin ») (Edgar, 1995) ou « Elastin Binding Protein » (EBP)-37 (Harumiya *et al.*, 1995), est une glycoprotéine multimérique formée de sous unités de 35kDa (p35). C'est une protéine plasmatique exprimée principalement dans le foie (Matsushita *et al.*, 1996). Sa concentration dans le sérum est estimée à 3-4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Kilpatrick *et al.*, 1999).

- La ficoline H ou ficoline 3 a été identifiée pour la première fois en tant qu'antigène reconnu par des auto-anticorps chez les patients atteints de SLE (Robinson *et al.*, 1975). La signification de cette observation reste inconnue. Depuis il a été montré que l'antigène Hakata est un constituant normal du sérum (7 à 23 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). C'est une glycoprotéine produite par le foie (hépatocytes et cellules du conduit biliaires) mais aussi dans les poumons (cellules épithéliales et alvéolaires de type II) (Akaiwa *et al.*, 1999) et le cerveau (cellules gliales T98G) (Kuraya *et al.*, 2003). A la différence de la ficoline L, principalement sérique, la ficoline H est présente dans le sérum mais aussi dans les bronches et les alvéoles pulmonaires ainsi que dans le cerveau.

- La ficoline M ou ficoline 1 (Harumiya *et al.*, 1996), première ficoline humaine identifiée (Lu *et al.*, 1996), a été appelée « p35-related protein » (Endo *et al.*, 1996) en raison des 80% d'homologie avec la ficoline L. A la différence de cette dernière, elle est exprimée dans les cellules phagocytaires non différenciées, les poumons et la rate. Malgré une absence de motifs de liaison à la membrane, elle est trouvée principalement à la surface des monocytes sanguins (Endo *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1996) et n'est pas détectable dans le sérum. Néanmoins des études récentes (Liu *et al.*, 2005) montrent qu'elle est présente dans les vésicules intracellulaires de certaines cellules (monocytes, neutrophiles et cellules pulmonaires) et qu'elle peut être sécrétée. Ces travaux suggèrent qu'elle pourrait être stockée et libérée de façon localisée.

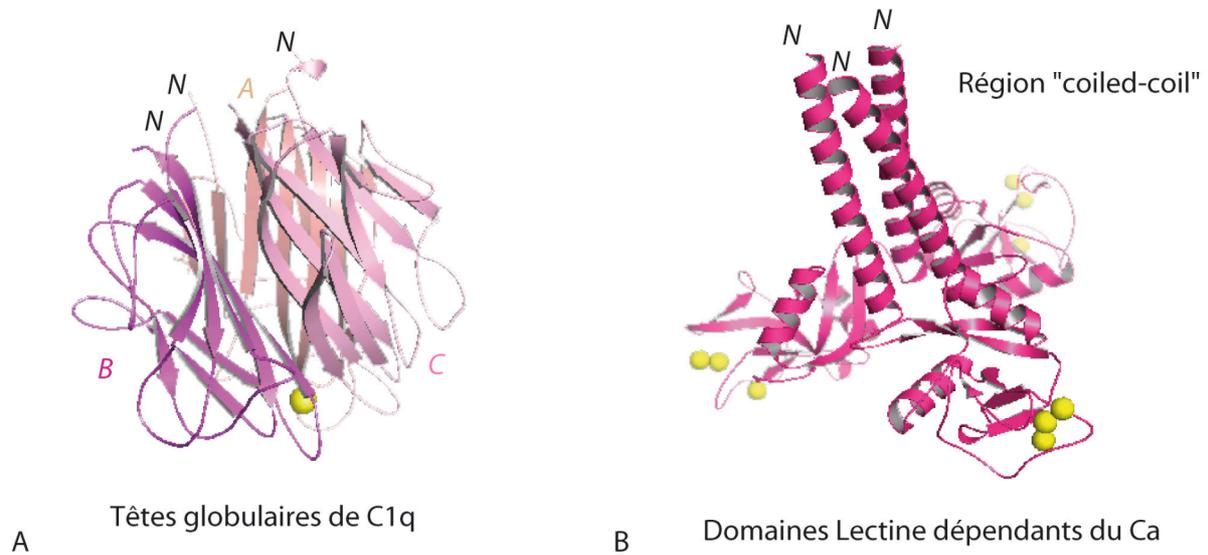


Figure 6 : Structure des têtes globulaires de C1q (A) et de la MBL (B).

A. Structure trimérique des têtes globulaires de C1q, les sous-unités sont notées A, B et C (Gaboriaud *et al.*, 2003). B. Association trimérique des domaines de reconnaissance de la MBL grâce aux domaines « coiled-coil » (Weis *et al.*, 1991). Les ions calcium sont représentés en jaune et les extrémités N-terminales notées N.

Dans les autres espèces étudiées, le porc et la souris, seules deux ficolines ont été identifiées. Chez la souris, il semblerait que la ficoline A soit l'homologue de la ficoline L alors que la ficoline B serait l'homologue de la ficoline M.

1.2.2 Organisation structurale

1.2.2.1 *Organisation globale*

Les protéines de reconnaissance du complément, C1q, MBL et ficolines, sont des protéines de haut poids moléculaire (>200 kDa). Ce sont des protéines multimériques, en forme de bouquet, constituées de l'assemblage de 3 à 6 trimères (figure 5). Chaque trimère se compose

- d'une région N-terminale courte riche en cystéine impliquée dans l'assemblage des multimères et la stabilisation des trimères
- d'une queue collagène (triple hélice)
- d'un domaine de reconnaissance globulaire trimérique

Le C1q est composé de trois chaînes différentes (A, B et C) afin de former un hétérotrimère alors que la MBL et les ficolines possèdent une seule chaîne polypeptidique afin de former des homotrimères. D'après les études de microscopie électronique, il est admis que la ficoline L est un tétramère (quatre trimères) et que la ficoline H et le C1q sont des hexamères (six trimères) (Ohashi and Erickson, 1997), par contre, la MBL est présente dans le sérum selon des degrés d'oligomérisation variables allant du dimère à l'hexamère. Une autre particularité de la MBL est de posséder une région charnière (« neck ») en structure « coiled-coil » entre la région collagène et le domaine de reconnaissance.

Si l'organisation globale de ces protéines est assez proche, les domaines de reconnaissance sont eux très différents. Ce sont eux qui définissent la famille de protéine à laquelle appartient chacune de ces protéines.

1.2.2.2 *Les têtes globulaires de reconnaissance*

C1q est l'archétype d'une large famille de protéines (32 chez l'homme) définie via la présence d'un domaine globulaire proche de ceux des têtes globulaires de C1q (gC1q). La structure de ce domaine a été résolue au laboratoire (Gaboriaud *et al.*, 2003). Les trois têtes globulaires de C1q (ghA, ghB et ghC) s'assemblent selon un pseudo-axe de symétrie d'ordre 3. Chaque domaine globulaire a une topologie de type « jelly-roll » consistant en un

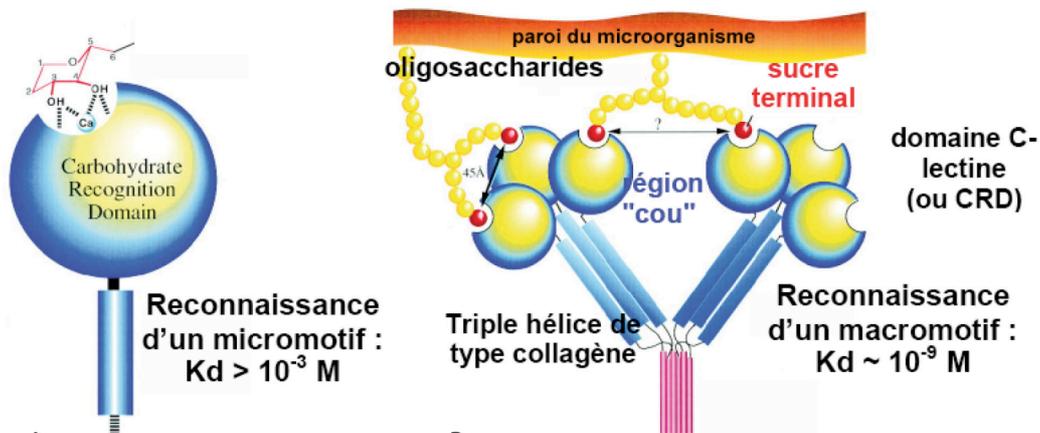


Figure 7 : Illustration de l'avidité de fixation de la MBL sur une surface.

Les domaines de type C-lectine sont représentés en bleu et jaune, les régions coiled-coil en bleu et la queue de type collagène en rose. A. Reconnaissance et affinité d'un micromotif par un monomère. B. Reconnaissance par avidité collective pour des motifs répétés. (D'après Gaboriaud , 2007).

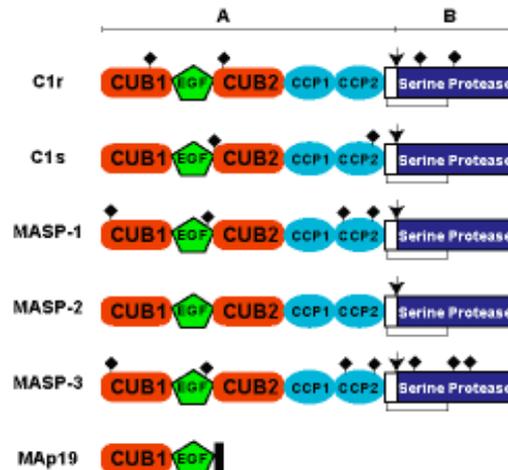


Figure 8 : Organisation modulaire des protéases à sérine des complexes initiateurs.

Les protéines de la famille MASPs contiennent des domaines CUB (en rouge) un domaine EGF (en vert), des domaines CCP (en bleu clair) et un domaine protéase à sérine (bleu foncé). Les losanges indiquent les sites de glycosylations et la flèche le site de coupure menant à l'activation de la protéase, générant ainsi les chaînes A et B. (D'après Gaboriaud , 2007)

sandwich β constitué de deux feuillets β de 5 brins β anti-parallèles (figure 6A). Le trimère possède un ion calcique et est stabilisé principalement par des interactions non-polaires ainsi que quelques interactions polaires le long du pseudo-axe de symétrie d'ordre 3. Cette structure montre que le C1q ne nécessite pas la région collagène pour s'assembler en trimère, il est juste stabilisé par des ponts inter-chaînes (A-B et C-C).

La MBL appartient à la famille des collectines et en tant que telle possède un domaine globulaire de type lectine Ca^{2+} -dépendant (C-lectine). La structure du domaine de reconnaissance de la MBL de rat a été résolue en 1991 (Weis *et al.*, 1991). Chaque domaine contient deux hélices α et cinq brins β . La région du domaine située à l'opposé des queues de type collagène contient essentiellement des boucles auxquelles s'associent 2 à 3 ions calcium (figure 6B). Les modules de type gC1q s'associent spontanément alors que les domaines C-lectine de la MBL nécessitent la région « coiled-coil » en amont.

Les ficolines possèdent un domaine de reconnaissance de type fibrinogène (FBG) partagé avec les protéines de la famille du fibrinogène, les tenascines et des protéines associées aux microfibrilles. Le domaine FBG contient 220-250 résidus et est caractérisé par l'existence de 24 résidus invariants et 40 résidus conservés. La structure de la tachylectine (TL5a), une protéine du crabe en fer à cheval (*Tachypleus tridentatus*), très homologue aux ficolines, a été résolue par Kairies *et al.* (Kairies *et al.*, 2001).

1.2.2.3 Principe de reconnaissance des motifs par avidité collective

Les molécules de type collectine dont celles qui nous intéressent ici, la MBL, les ficolines et le C1q ont une structure en bouquet de tulipes exposant ainsi sur une même molécule plusieurs fois le même site de reconnaissance. La reconnaissance d'un motif par un domaine globulaire isolé de la MBL a une affinité beaucoup plus faible (K_d supérieur à 10^{-3} M) que celle de la MBL entière (K_d de l'ordre de 10^{-9} M) sur une surface présentant ce motif répété selon une géométrie qui permet la reconnaissance simultanée par plusieurs domaines (figure 7). Cette fixation conduit à un phénomène d'avidité pour la surface reconnue, permettant d'obtenir une reconnaissance sélective très efficace à partir de sites de fixation de faible affinité. La fixation de ces molécules implique donc deux niveaux de reconnaissance :

- celui de chaque micromotif
- celui de la répartition spatiale définissant le macromotif.

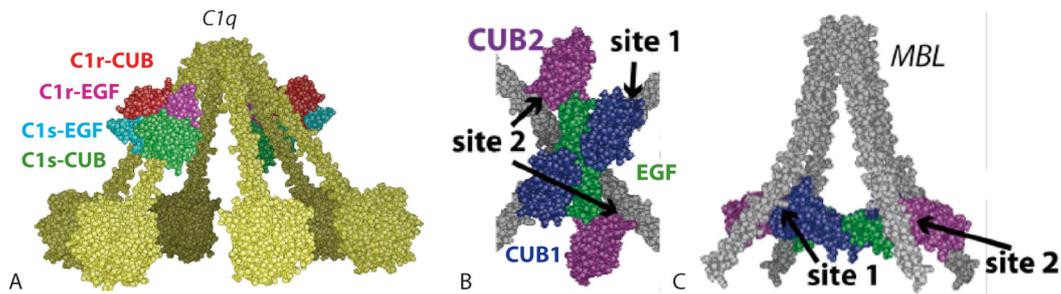


Figure 9 : Modèles d'assemblage des domaines CUB-EGF de C1r/s avec C1q et CUB-EGF-CUB MASP-2 avec la MBL.

A. Assemblage des domaines CUB1-EGF des protéases à sérine C1r/C1s avec les queues de type collagène de C1q (jaune). B. Vue du Dessous et C. Vue latérale de l'assemblage des domaines CUB1-EGF-CUB2 avec les queues de type collagène de la MBL.) (Gaboriaud *et al.*, 2004; Gaboriaud *et al.*, 2007)

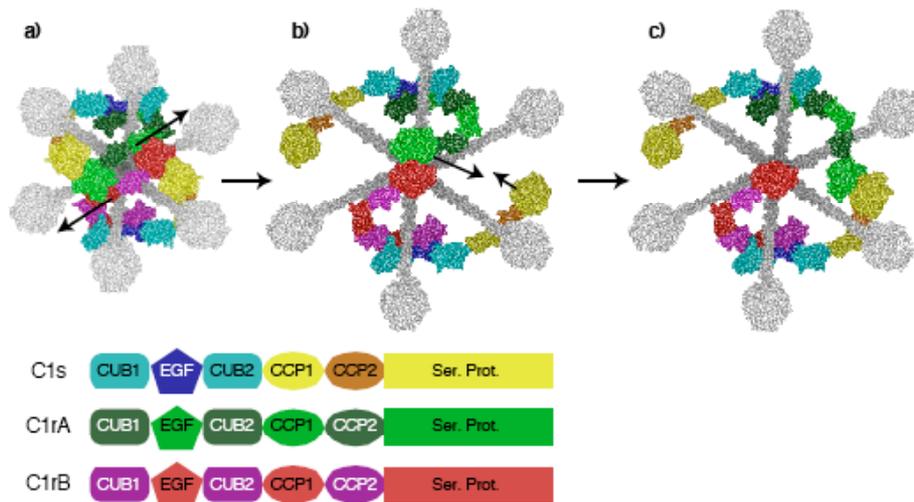


Figure 10 : Schéma hypothétique de conversion d'un signal de reconnaissance multiple en une cascade d'activation protéolytique.

En a), le complexe C1 est au repos, vu de dessous. La reconnaissance de signaux par plusieurs têtes globulaires de C1q va entraîner une déformation avec étirement du cône de C1q sur la surface activatrice. En b), l'étirement a provoqué la dissociation du dimère de C1r central, permettant le contact entre les domaines protéases à sérine des deux molécules de C1r et leur activation. En c), il y a rapprochement entre les domaines catalytiques de C1rA et de C1s, conduisant à l'activation d'une molécule de C1s (le même phénomène pourra se produire du côté C1rB). La molécule de C1s activée pourra ensuite basculer vers l'extérieur pour couper le substrat C4 ; la position externe des modules CCP1 et CCP2 de C1s est compatible avec leur implication dans la reconnaissance de C4. L'ensemble du processus est caractérisé par une évolution des contacts établis entre les domaines protéases à sérine de C1r et C1s. D'après (Gaboriaud *et al.*, 2004; Gaboriaud *et al.*, 2007)

Cette caractéristique complique l'étude *in vitro* de la reconnaissance de ces protéines. Si on étudie les domaines de reconnaissance isolés, l'affinité sera faible et difficile à analyser. Si on se place au niveau de la protéine entière sur une surface, on aura alors un meilleur signal. Par contre, il est pour l'instant difficile d'estimer la répartition des motifs sur une surface et donc de trouver le micromotif répété de façon à permettre la fixation correcte de plusieurs sites de reconnaissance. De plus, il faut garder en tête que, *in vivo*, de nombreux motifs répétés sont présentés à ces protéines et la compétition est alors beaucoup plus forte que ce qu'on peut réaliser *in vitro*.

1.2.3 Activation des complexes initiateurs

1.2.3.1 **Organisation des complexes initiateurs du complément**

Le complexe C1 se compose de la protéine de reconnaissance multimérique C1q à laquelle s'associe un tétramère dépendant du calcium formé de deux protéases C1r et de deux protéases C1s. Alors que C1r est responsable des clivages à l'intérieur du complexe C1, C1s est responsable du clivage des substrats de C1. Les complexes de la voie lectine sont composés également d'une protéine de reconnaissance, MBL ou ficoline, et d'un dimère de MASP. Seule MASP-2 semble être capable de déclencher la coupure de C4 et le rôle de MASP-1 et de son produit d'épissage alternatif MASP-3 restent incompris. D'après la littérature, le complexe initiateur de la voie lectine serait le premier à être apparu au cours de l'évolution et il est retrouvé chez quelques invertébrés évolués comme les ascidies (Endo *et al.*, 2006).

La structure modulaire des protéases à sérine des complexes initiateurs est commune. L'activité catalytique est portée par le domaine protéase à sérine précédé de deux modules CCP (« Complement Control Protein »). La partie N-terminale, constituée de deux modules CUB (« C1r/C1s, Uegf, BMP ») encadrant un module de type EGF (« Epidermal Growth Factor »), permet l'association aux régions collagènes des protéines de reconnaissance, ainsi que l'association des protéases entre elles : hétérodimères de C1r/C1s et homodimères de MASPs (figure 8) (Gaboriaud *et al.*, 2007).

L'assemblage des protéases à sérines avec les protéines de reconnaissance se fait au niveau des modules CUB-EGF-CUB et implique des ions calcium. Il a été proposé que l'interaction de C1r/C1s avec les queues collagènes de C1q met en jeu deux sites d'interaction chacun sur les interfaces hétérodimériques des modules CUB1-EGF de C1r et de C1s. Au contraire, il semblerait que l'assemblage des dimères de MASP-2 et MASP-3 avec les queues collagènes

des ficolines ou de la MBL impliquerait quatre sites de liaison situés sur les domaines CUB1 et CUB2 (figure 9) (Gaboriaud *et al.*, 2007).

1.2.3.2 *Le modèle d'activation du complexe C1*

Les études structurales menées au laboratoire ont permis de proposer un modèle d'activation du complexe C1 (figure 10). Ce modèle permet de mieux percevoir le rôle crucial de l'étape de reconnaissance des têtes globulaires de C1q et le déclenchement de la cascade du complément. La nécessité d'un stress mécanique semble pouvoir limiter la probabilité d'une activation non contrôlée. En effet, ce modèle implique la reconnaissance simultanée de motifs par plusieurs têtes globulaires, en accord avec la propriété de reconnaissance par avidité collective. De plus, une tension mécanique ne peut être obtenue que si les motifs reconnus sont solidaires d'une même surface et suffisamment éloignés. Il y a donc des contraintes importantes quant à la disposition en surface des motifs reconnus, ce qui constitue un niveau supplémentaire de différenciation des structures étrangères, du soi altéré et du non soi (Gaboriaud *et al.*, 2004; Gaboriaud *et al.*, 2007).

1.2.4 Les spécificités de reconnaissance

Nous atteignons dans cette partie le cœur de la question qui nous intéresse ici : que reconnaissent ces protéines et comment ? Les études menées sur la MBL et C1q sont nombreuses alors que les études sur les ficolines ne sont qu'au commencement. Nous allons essayer de dégager des spectres de reconnaissance pour chacune de ces protéines mais avant cela, il est important de garder en mémoire que les informations que nous apportent les études *in vitro* peuvent ne pas être pertinentes physiologiquement.

1.2.4.1 *La MBL*

Les études sur la MBL sont nombreuses et je ne vais pas être exhaustive sur tous les résultats accumulés. Je vais essayer de décrire les spécificités de reconnaissance bien établies.

- Reconnaissance des antigènes communs des parois bactériennes

La MBL semble reconnaître ce qu'on appelle les antigènes communs de la paroi bactérienne : acides (lipo)téichoïques, peptidoglycane ou encore le lipopolysaccharide. L'antigène reconnu dépend bien sûr de la souche considérée.

Chez *Salmonella enterica* sv *typhimurium* et *Neisseria gonorrhoeae*, la MBL fixerait le LPS, par contre la région du LPS impliquée dans la reconnaissance par la MBL reste encore

indéterminée. Il semblerait que la nature du sucre terminal ainsi que le repliement du LPS soient des critères importants. Il a été trouvé qu'un glucose terminal facilitait la fixation de la MBL et que des mutants présentant un heptose terminal avait une très forte affinité pour la MBL (Devyatyarova-Johnson *et al.*, 2000). Aucune expérience de compétition avec des heptoses n'a été réalisée pour compléter cette observation et on ne peut toujours pas affirmer si les heptoses sont des cibles de la MBL ou si le phénotype des mutants et la présence d'heptose ne sont que des coïncidences.

Sur les bactéries *E. coli* et *S. aureus* mais pas sur *S. pneumoniae*, les acides lipotéchoïques (LTA) semblent les ligands de la MBL (Polotsky *et al.*, 1996). Il est intéressant de noter que la MBL se lie très fortement sur le sérotype sans capsule de *S. aureus* (souche Wood) et moins bien, voire pas du tout, sur les sérotypes encapsulés. Cela confirme une reconnaissance des antigènes communs de la paroi bactérienne (Krarup *et al.*, 2005). Il a été proposé que la cible de la MBL ne soit pas les LTA de *S. aureus* mais le peptidoglycane (Ma *et al.*, 2004).

- Reconnaissance des sucres hautement mannosidés des Champignons et des Virus

La MBL tient son nom de sa propriété de fixation du mannose. Du fait de sa préférence pour les structures hautement mannosidés, les champignons sont une cible de choix : *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* (Neth *et al.*, 2000), *Cryptococcus neoformans* (Schelenz *et al.*, 1995).

De même, elle pourrait se fixer aux sucres fortement mannosidés à la surface du virus de la grippe A (IAV) (Hartshorn *et al.*, 1993) ainsi que de HIV-1 et HIV-2 (Hart *et al.*, 2002; Hart *et al.*, 2003). Les virus sont des parasites absolus qui exposent à leur surface des protéines ou glycoprotéines produites par l'hôte. Les sucres à la surface des virus sont donc souvent des sucres de l'hôte. Il semblerait que la MBL joue tout de même un rôle important dans l'immunité antivirale.

- Reconnaissance des cellules endommagées

La MBL est aussi capable de fixer les cellules apoptotiques (Kuraya *et al.*, 2005). Elle reconnaît également des cytokératines exposées à la surface des tissus abîmés après ischémie reperfusion (Collard *et al.*, 2001).

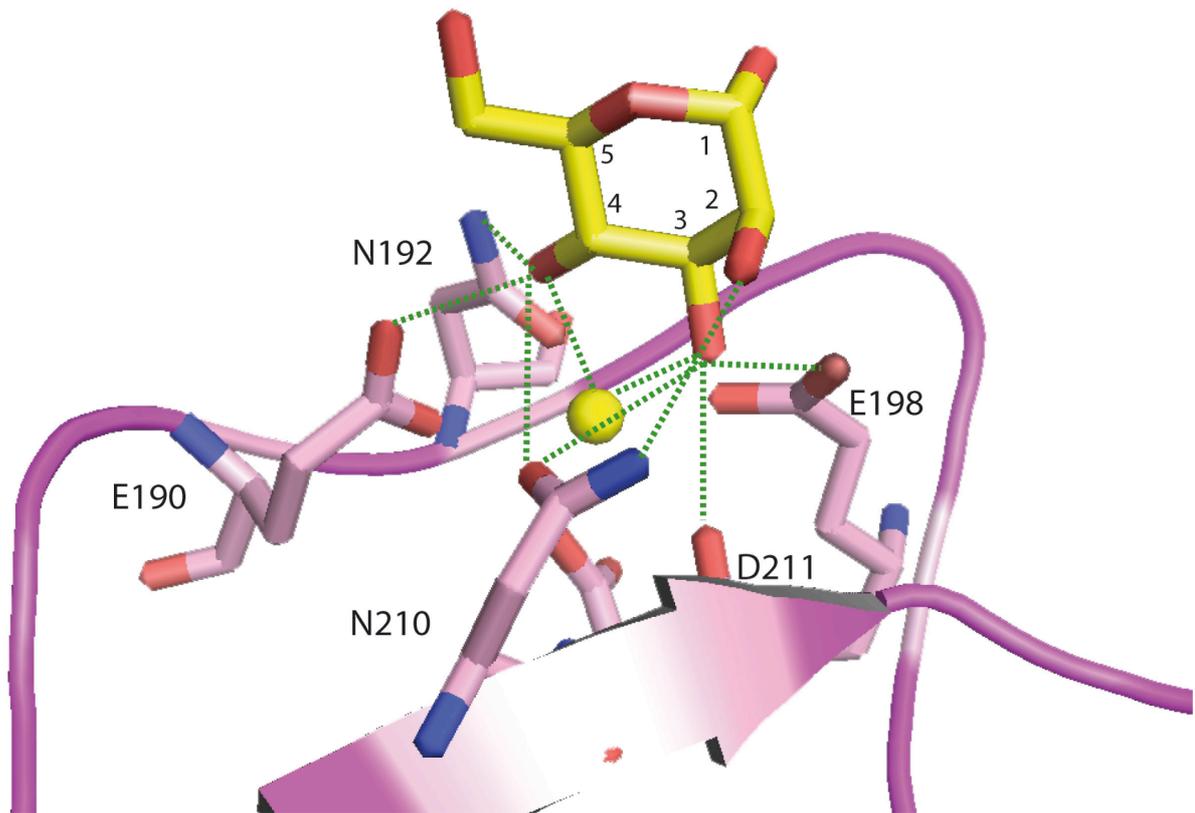


Figure 11 : Fixation du D-Mannose dans le site de reconnaissance de la MBL C de rat.

Le D-mannose est représenté en jaune (les chiffres indiquent la numérotation des carbones du cycle pyranose) et rouge et l'ion calcium par une sphère jaune. Les interactions polaires sont notées par des traits pointillés verts et les résidus du site de fixation sont représentés en rose. Les hydroxyles 4 et 3 du mannose sont hautement stabilisés par interaction avec les résidus du site mais aussi avec le calcium. (Ng *et al.*, 1996)

- Déterminants de la spécificité de la MBL pour certains sucres

Les déterminants des spécificités de reconnaissance des micromotifs des collectines commencent à être compris. Ils ont été établis par les comparaisons de séquences entre les domaines de reconnaissance des collectines mais aussi grâce aux études cristallographiques. La MBL a été isolée par sa capacité à fixer le mannose. D'après la littérature, il semblerait que la MBL fixe les sucres dans l'ordre de préférence suivant : NAcGlc > D-mannose-L-fucose>NAcMan>>maltose>glucose (Weis *et al.*, 1992). La spécificité des collectines pour le mannose ou le galactose est déterminée par trois résidus (Glu-Pro-Asn) aux positions Glu185 et Asn187 sur la MBL. La séquence Glu-Pro-Arg maintient une spécificité pour le mannose (SP-A) par contre la mutation en Gln-Pro-Asp change la spécificité du mannose vers le galactose (McCormack *et al.*, 1994). Les structures de la MBL couplée à des oligosaccharides mannosidés ainsi que des études par mutagenèse dirigée ont permis de mieux comprendre la sélectivité de la MBL pour certains sucres. La caractéristique clef du site de reconnaissance de la MBL est l'interaction de deux hydroxyles de l'hexose avec l'ion calcium 2 (figure 11). Cette interaction est complétée par des liaisons hydrogène entre ces mêmes hydroxyles et les résidus Glu et Asn du triplet Glu-Pro-Asn (185-187) ainsi qu'avec les résidus Glu193 et Asn205. La reconnaissance d'un mannose par la MBL est permise par la présentation de groupements hydroxyles équatoriaux sur les carbones 3 et 4. De façon intéressante, le fucose est reconnu via les hydroxyles 2 et 3 en position équatoriale et ceux-ci se superposent parfaitement avec ceux du mannose. Il a été montré que le galactose pourrait être fixé de la même façon via ses hydroxyles 1 et 2 mais cela supprime toute possibilité de fixation d'un galactose au sein d'une chaîne polysaccharidique (Weis *et al.*, 1992; Ng *et al.*, 1996).

1.2.4.2 Les ficolines

Chacune des ficolines humaines a des spécificités de reconnaissance particulières. Nous allons décrire les spécificités de chacune afin de mieux comprendre leurs capacités de reconnaissance. Pour chacune de ces ficolines, un tableau récapitulatif des ligands ou pathogènes reconnus ainsi que la technique qui a permis d'établir ces spécificités est proposé (tableaux V à VII).

Ligand	Organisme	Technique	Effets biologiques	Références
Mannan	levure	Colonne d'affinité		(Matsushita et al., 1996)
NAcGlc		Surface recouverte Colonne BSA- NAcGlc	Activation voie lectine, dépôt de C4b	(Krarup et al., 2004) (Ma et al., 2004).
Asialofetuin		colonne		(Matsushita <i>et al.</i> , 1996)
NAcCys		Compétition Colonne d'affinité		(Krarup et al., 2004)
NAcGAl, NAcMan NAcGlycine, Ac-choline		Compétition		(Krarup et al., 2004)
1,3-b-D- glucan		Colonne d'affinité Surface recouverte	Activation voie lectine, dépôt C4b	(Ma et al., 2004)
galactose		Résonance Plasmonique de Surface		(Hummelshoj <i>et al.</i> , 2007)
CPS (Neu5Ac ?)	GBS III GBS Ib, V, VI, VIII	Test fonctionnel Test d'affinité Inhibition	- Destruction par Opsonophagocytose (GBS III) inversement proportionnelle au taux de Neu5Ac - Fixation fonction de Neu5Ac - Dépôt C4b	(Aoyagi <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Ra S.</i> <i>thyphimurium</i>	cytométrie	Opsonophagocytose Activation de la voie lectine (dépôt de C4b)	(Matsushita <i>et al.</i> , 1996)
CPS ?	<i>S. aureus</i> <i>S.pneumoniae</i>	Test d'affinité	Activation de la voie lectine, dépôt C4b	(Krarup et al., 2005)
LTA	<i>S.aureus</i>	Test d'affinité	Activation de la voie lectine, dépôt de C4b	(Lynch et al., 2004)
ADN ?	Cellules apoptotiques tardives Cellules nécrotiques	cytométrie Compétition ADN /NAcGlc	Activation voie lectine, dépôt C3b et C4b Opsonophagocytose des cellules nécrotiques	(Jensen et al., 2007) (Kuraya et al., 2005)

Tableau V : Spectre de reconnaissance de la ficoline L et les conséquences biologiques connues (CPS : polysaccharide de capsule. LTA : acide lipotéichoïque)

- La ficoline L

Une protéine spécifique des composés acétylés ?

Si la ficoline L a été identifiée via son affinité pour l'élastine (Harumiya *et al.*, 1995), les corticoïdes (Edgar, 1995) mais aussi pour un mannane de levure immobilisé sur colonne (Matsushita *et al.*, 1996), de nombreuses études de compétition montrent que la ficoline L est spécifique des composés acétylés. Les premières études ont montré que la ficoline L semblait fixer les résidus de NAcGlc lorsque ceux-ci sont réunis en forte concentration sur une surface (et non présents en quelques exemplaires sur une protéine glycosylée) mais pas le mannose, le galactose, le glucose ou la cellobiose. Il a été montré également que cette ficoline pouvait fixer la souche TV119 de *S. typhimurim* et faciliter ainsi sa phagocytose. Cette souche a la particularité de posséder un polysaccharide avec un NAcGlc terminal (Matsushita *et al.*, 1996). Suite à cette première analyse de nombreuses études ont été menées quant aux spécificités de reconnaissance des groupements acétylés par la ficoline L. Des expériences de compétition entre les ligands connus (billes avec du NAcGlc ou de la BSA acétylée et *S. typhimurium*) et différents composés montrent une inhibition préférentielle de la fixation de la ficoline L par les composés acétylés : NAcGlc et NAcMan surtout mais aussi NAcGal, N-acétylglycine, N-acétylcystéine et Acétylcholine. Aucune inhibition n'a été observée pour les composés neutres testés (glucose, glucosamine, mannose, mannosamine, galactose, galactosamine, glycine) (Krarup *et al.*, 2004). Il semblerait donc que la ficoline L soit spécifique des composés acétylés.

Mais aussi de quelques sucres neutres

Une publication montre que cette ficoline L serait capable de fixer le 1,3- β -D-glucan de levure fixé sur une colonne et cette fixation est supprimée par l'ajout de NAcGlc. De plus, la fixation de la ficoline L sur des puits recouverts de 1,3- β -D-glucan est suffisante pour déclencher la voie lectine (Ma *et al.*, 2004). De même, une étude récente par Résonance Plasmonique de Surface montre que la ficoline L reconnaît le galactose (Hummelshoj *et al.*, 2007).

Contrairement à la MBL, la ficoline L reconnaît les polysaccharides de capsule (CPS)

La ficoline L semble se fixer préférentiellement sur les souches bactériennes encapsulées. En effet, elle fixe certains sérotypes encapsulés de *S. pneumoniae* (11A, 11D, 11F) et de *S. aureus* (T-1, T-7, T-8, T-9, T-11, T-12) mais aucun sérotype sans capsule (Krarup *et al.*, 2005). Il semblerait donc, que contrairement à la MBL, la ficoline L reconnaisse un composant de la

Ligand	Organisme	Technique	Effets biologiques	Références
	Globules rouges de moutons	agglutination		(Sugimoto et al., 1998)
LPS	S.thyphimurium S.minesota (-)	Test d'agglutination GR humains		
NAcGlc, NAcGal D-fucose		Compétition avec LPS		
Polysaccharide de surface	<i>A. viridans</i>	Surfaces recouvertes	Inhibition croissance Activation voie lectine (Dépôt de C4b)	(Matsushita <i>et al.</i> , 2002; Tsujimura <i>et al.</i> , 2002)
	Corps apoptotiques Jurkat	cytométrie	Elimination	(Honore et al., 2007) (Kuraya et al., 2005)

Tableau VI : Spectre de reconnaissance de la ficoline H et effets biologiques connus (LPS, lipopolysaccharide)

capsule de certains sérotypes bactériens. Pourtant, il avait été montré précédemment que la ficoline L reconnaissait les LTA de *S.aureus* (Lynch *et al.*, 2004). La présence ou non de sucres N-acétylés dans les oligosaccharides de la capsule ne correspond pas à la fixation ou non de la ficoline L : certains sérotypes sans sucres N-acétylés dans leur capsules sont reconnus alors que certains sérotypes avec ne le sont pas. Le motif reconnu doit encore être établi (Krarup *et al.*, 2005). Deux études sur les Streptocoques de Groupe B confirment la reconnaissance des polysaccharides des capsules par la ficoline L (Wang *et al.*, 2005) ; (Aoyagi *et al.*, 2008). La ficoline L fixe de façon significative toutes les souches GBS des sérotypes Ib, V, VI et VIII mais pas celles des sérotypes Ia et II. Les auteurs montrent que la fixation de la ficoline L est proportionnelle à la concentration d'acides sialiques à la surface de ces souches. Par contre, l'activation de la voie du complément est inversement proportionnelle à cette concentration (Aoyagi *et al.*, 2008), ce qui est cohérent avec la fixation des régulateurs du complément sur les acides sialiques. Ces résultats sont d'autant plus surprenants que jusque là il avait été montré que la ficoline L ne fixait pas les acides sialiques (Matsushita *et al.*, 1996).

Reconnaissance des cellules apoptotiques

Actuellement, les études se tournent vers les capacités de reconnaissance des corps apoptotiques par ces protéines. Deux articles suggèrent la reconnaissance des cellules en apoptose, voire des cellules nécrotiques par la ficoline L (Kuraya *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2007). Cette interaction semblerait être inhibée par de l'ADN génomique et non par du NAcGlc, suggérant un site de reconnaissance alternatif pour l'ADN des cellules apoptotiques comparé avec le site impliqué dans la reconnaissance des composés acétylés (Jensen *et al.*, 2007). Néanmoins, ces résultats nécessitent d'être approfondis car les écart-types obtenus et les témoins ne sont pas toujours concluants.

- La ficoline H

Les études décelant des spécificités de la ficoline H sont peu nombreuses.

Il semblerait qu'elle partage avec la MBL la capacité de fixation de lipopolysaccharide. En effet, la ficoline H est capable d'agglutiner les globules rouges de mouton de façon Ca^{2+} -dépendante mais pas les globules rouges humains. Par contre, si les érythrocytes humains sont pré-traités avec du LPS purifié à partir de *S.thyphimurium*, et à un moindre degré *S.minesota*, alors la ficoline H agglutine ces cellules. Aucune réaction n'est observée avec le LPS d'*E.coli* (Sugimoto *et al.*, 1998).

Ligand	Organisme	Technique	Effets biologiques	Références
NAcGlc		Colonne d'affinité Compétition avec BSA-Ac Surfaces recouvertes	Activation voie lectine, Dépôt C4b	(Teh et al., 2000)
	<i>E.coli</i>	Test fonctionnel	Opsonophagocytose	(Teh et al., 2000)
NAcMan NAcGal		Compétition avec BSA-Ac		(Frederiksen et al., 2005)
NeuAc (fetuin, SialLac)		BSA-fetuin BSA-SialLac		(Liu et al., 2005)
	<i>S.thyphimurium</i> <i>LT2</i> <i>S.aureus</i>	Test d'affinité par fluorescence		(Liu et al., 2005)

Tableau VII : Spectre de reconnaissance de la ficoline M et conséquences biologiques connues

Sa spécificité envers les sucres a été étudiée à l'aide de colonnes d'affinité mais aussi d'expériences de compétition. L'agglutination dépendante du lipopolysaccharide peut être inhibée par l'ajout de NAcGal, NAcGlc ou D-fucose et des colonnes de NAcGlc ou NAcGal fixent la ficoline H alors que les colonnes de mannose ou lactose non. De même, il semblerait que la ficoline H ne fixe ni l'élastine, ni la fibronectine, ni le zymosan (Sugimoto *et al.*, 1998).

Un seul pathogène a été identifié en tant que cible de la ficoline H : *Aerococcus viridans*. La ficoline H peut inhiber sa croissance en se fixant un de ses polysaccharides (glucose-mannose-NAcGlc-xylose) (Matsushita *et al.*, 2002; Tsujimura *et al.*, 2002). Contrairement à la MBL et à la ficoline L, aucune fixation de la ficoline H n'a été observée que ce soit sur des souches capsulées ou non-capsulées de *S. aureus* et *S. pneumoniae* (Krarup *et al.*, 2005).

Il semblerait que la ficoline H, comme la ficoline L et la MBL, soit capable de reconnaître les corps apoptotiques (Kuraya *et al.*, 2005) et d'en médier l'élimination (Honore *et al.*, 2007). Malgré un nombre d'études aussi élevé que la ficoline L, très peu de ligands potentiels ont été identifiés pour la ficoline H : NAcGlc, NAcGal, D-fucose ainsi que quelques LPS et seule une souche de pathogène *Aerococcus viridans* semble être affectée par cette protéine.

- La ficoline M

Elle a été la première ficoline découverte mais aussi certainement la moins étudiée. Ceci peut s'expliquer par une difficulté d'étude supplémentaire du fait qu'elle est exprimée à la surface des monocytes et donc absente du sérum. Elle est identifiée notamment en tant que protéine capable de fixer l'élastine (Harumiya *et al.*, 1996) tout comme la ficoline L. La ficoline M peut être purifiée sur une colonne d'affinité avec NAcGlc, un composant très abondant chez les bactéries Gram négatives. Elle serait également capable de faciliter la phagocytose d'une souche non pathogène d'*E.coli* (Teh *et al.*, 2000). La fixation de la ficoline M sur de la BSA-Ac peut être éluée par l'ajout de différents composés acétylés : NAcGal, NAcGlc, Acétylcholine, NAcMan mais pas les composés neutres équivalents (Frederiksen *et al.*, 2005). Ce résultat est proche de celui déjà obtenu pour la ficoline L (Krarup *et al.*, 2004). De plus, la ficoline M reconnaît la fétuine et le Sial-Lactose mais pas l'asialofétuine ni le Lactose, ce qui suggère que la ficoline M reconnaîtrait les acides sialiques. Les souches *S.thyphimurium* LT2 et *S. aureus* fixent également la ficoline M (Liu *et al.*, 2005).

1.2.4.3 C1q

Le premier ligand du C1q mis en évidence n'est en rien un motif de pathogène : ce sont les immunoglobulines G et M. La reconnaissance des immunoglobulines par le C1q entraîne l'activation de la voie classique du complément et l'élimination de la cible (Cooper, 1985). Le C1q reconnaît le domaine CH2 des régions Fc de ces immunoglobulines lors d'une présentation de plusieurs régions Fc très peu espacées comme c'est le cas pour les complexes immuns (Burton *et al.*, 1980; Duncan and Winter, 1988; Idusogie *et al.*, 2000).

Depuis cette découverte de nombreux ligands du C1q ont été mis en évidence mais le rôle de cette reconnaissance n'est pas toujours très clair. Il semblerait que C1q puisse reconnaître directement certains pathogènes (Bredt *et al.*, 1977; Santoro *et al.*, 1980; Thielens *et al.*, 2002) (Cooper, 1985). C1q reconnaît de nombreux virus : MuLV, HIV, HSV, HTLV, EBV, CMV et IAV. Les conséquences de cette reconnaissance sont souvent l'activation de la voie classique du complément mais celle-ci conduit rarement à une lyse du virus. Parfois, il y a neutralisation (HSV-1) mais le plus souvent il semble que le virus échappe au complément ou que son entrée soit facilitée par cette opsonisation (HIV). Cette reconnaissance par C1q semble impliquer les glycoprotéines d'enveloppe et la région globulaire de C1q (Thielens *et al.*, 2002).

C1q reconnaîtrait aussi des parasites mais la conséquence serait aussi l'échappement au système immunitaire (Santoro *et al.*, 1980). Par contre, la fixation de C1q sur *M. pneumoniae* ou *M. hominis* activerait la voie classique du complément et mènerait à la lyse des bactéries (Santoro *et al.*, 1980). D'autres motifs bactériens semblent être reconnus directement par C1q : les porines de certaines bactéries comme *Klebsiella pneumoniae*, *Mesophilic aeromonas minnesota*, *Legionella pneumophila* ou encore de *Salmonella minnesota*. Les lipopolysaccharides sont aussi reconnus dans le cas de *Mesophilic aeromonas minnesota*. En ce qui concerne les Streptocoques du groupe B, C1q lie directement les protéines M5 et FcRA76 mais les conséquences ne sont pas bien établies.

C1q reconnaîtrait les pathogènes indirectement via des agents de la phase aiguë. C'est le cas de la CRP « C- Reactive Protein » qui se complexe aux résidus phosphocholine à la surface des bactéries (Szalai *et al.*, 1999) ou de l'amyloïde (Sim *et al.*, 2007) et la PTX3 (Pentraxine 3) (Baruah *et al.*, 2006). De même, il y aurait activation de la voie classique après reconnaissance par C1q de SIGN-R1 qui fixe la capsule des bactéries (Kang *et al.*, 2006).

C1q ne reconnaît pas seulement les agents étrangers mais aussi les structures aberrantes du soi : débris cellulaires et membranes sub-cellulaires (Storrs *et al.*, 1981) mais surtout les cellules apoptotiques (Navratil *et al.*, 2001). Des études récentes montrent qu'il reconnaît également des protéines anormales telles que le prion (Klein *et al.*, 2001). De nombreuses interactions ont été observées entre C1q et des structures normales telles que des protéines glycosylées de la matrice extracellulaire, des protéines de la myéline, de l'héparine ou de protéines d'absorption. De nouveaux ligands potentiels du C1q surgissent actuellement et multiplient les données sur la reconnaissance du C1q. Il reconnaît l'ADN à la surface des cellules apoptotiques (Elward *et al.*, 2005), mais aussi la phosphatidylsérine (Paidassi *et al.*, 2008) et le NAcGlc ainsi que la calréticuline.

1.3 Objectif : comprendre au niveau atomique les propriétés de reconnaissances des ficolines et du C1q

Les spécificités des reconnaissances des protéines du complément sont l'objet de nombreuses études. Les déterminants structuraux permettant la reconnaissance de certains micromotifs par la MBL sont bien établis et, comme nous l'avons dit, sont très instructifs quant à la géométrie du ligand dans le site de reconnaissance. Par contre, pour C1q ou les ficolines, peu de choses ont été définies.

C1q possède un nombre d'interactants décrits dans la littérature très élevé qui ne semblent partager aucun motif commun. Les modèles établis d'interaction entre le C1q et la CRP ou les IgG supposent deux sites de fixation complètement différents pour ces ligands. On peut donc se demander si ce large spectre de ligand n'est pas du à des surfaces d'interactions multiples offertes par cette molécule qui, contrairement aux autres, est hétérotrimérique.

Malgré la forte identité entre les ficolines humaines, les spectres de reconnaissance semblent différents, très large pour la ficoline L et par contre très vague pour la ficoline H. Qu'est-ce qui détermine ces différences dans les spécificités de reconnaissance ?

Le tableau VIII fait le bilan des structures reconnues par chacune de ces protéines. Nous pouvons observer que les spectres de reconnaissance se chevauchent. Notamment, le NAcGlc semble être reconnu par toutes ces protéines. Il y a donc une certaine redondance dans les capacités de fixation. Mais ces composés sont-ils réellement reconnus de la même façon ?

Afin d'essayer de trouver des réponses à toutes ces questions, nous avons entrepris d'étudier les propriétés de reconnaissance des micromotifs par les ficolines et C1q au niveau atomique.

Pour cela, nous avons cristallisé les domaines de reconnaissance de ces protéines en présence ou en absence de ligands connus puis analysé les données de diffraction aux rayons X.

Cible	MBL	Ficoline L	Ficoline H	Ficoline M	C1q
Composés acétylés	NAcGlc	Tous	NAcGlc NAcGal BSA- acétylée	Tous	NAcGlc
Acides sialiques	non	Peut-être	non	Neu5Ac	
Sucres neutres	mannose	Mannose ? Galactose β -glucan	D-fucose		
Polyssacharides de capsule	non	<i>S.aureus</i> , <i>S.pneumoniae</i> Streptocoques groupe B	non	?	
Acides Lipotéichoïques	oui	?			
Cellules apoptotiques	oui	Oui (ADN ?)	oui		Oui (ADN, phosphatidylsérine ?)
Peptides	cytokératines				CRP, IgG, porines

Tableau VIII : Spectres de reconnaissance des protéines de reconnaissance du complément.

2 Matériel et méthode en cristallogénèse et cristallographie aux rayons X

2.1 Principe de l'obtention de structures atomiques par diffraction aux rayons X

Pour étudier la structure d'un objet, il faut disposer d'un rayonnement d'une longueur d'onde compatible avec la résolution à atteindre (figure 12). Pour une résolution atomique, il faut une longueur d'onde proche des distances interatomiques (de l'ordre de $1,5\text{\AA}$) ce qui est le cas des photons X, des neutrons ou des électrons. En ce qui concerne les rayons X, un problème majeur se pose : le signal issu de la diffusion d'une molécule unique est trop faible pour être analysé. Il faut donc additionner les signaux de plusieurs molécules identiques qui, pour avoir une diffusion cohérente, doivent être ordonnées dans l'espace. Cet état n'est atteint que dans le cristal, on parle alors de diffraction des rayons X.

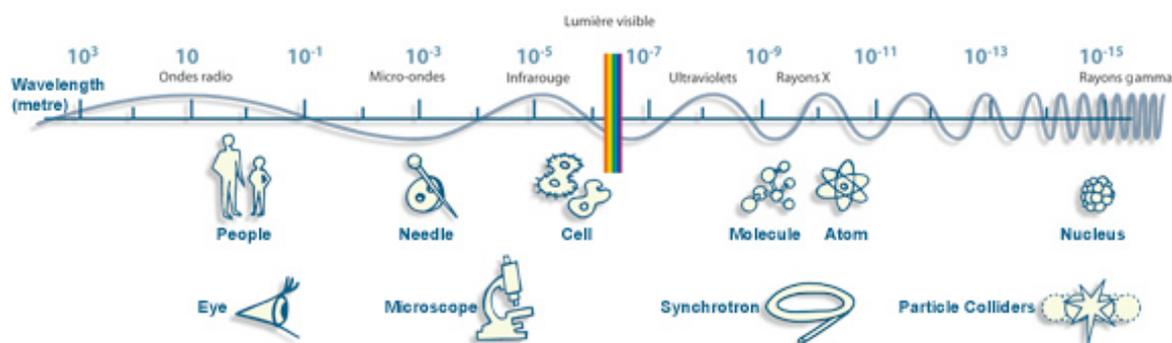


Figure 12 : Taille des objets pouvant être observés en fonction de la longueur d'onde.

Ce diagramme présente la gamme d'ondes électromagnétiques pouvant être produites en fonction de leur longueur d'onde. Sous chaque longueur d'onde est présentée la taille des objets pouvant être observés ainsi que l'outil requis.

L'état cristallin est défini par l'arrangement périodique et ordonné d'unités identiques. Ces unités identiques peuvent être composées d'un seul atome (diamant) ou de macromolécules (protéines). L'unité de base est appelée unité asymétrique (figure 13). Elle est contenue dans une maille élémentaire de forme parallélépipédique décrite par ses trois angles (α , β , γ) et trois distances (a , b , c). Le passage d'une maille à l'autre se fait par une opération de translation. Il existe également des opérations de symétrie internes à la maille. Selon les opérateurs de symétrie, on a pu définir 230 groupes d'espace dont seuls 65 sont applicables

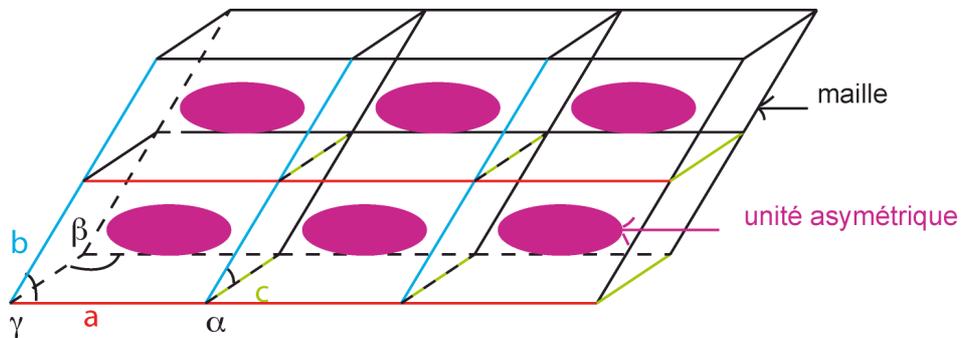


Figure 13 : Représentation schématique d'un arrangement cristallin avec les paramètres de maille

L'unité asymétrique est présentée en rouge et la maille est schématisée par un parallélépipède de côtés a, b, c et d'angles α, β, γ . Ce sont les paramètres de la maille.

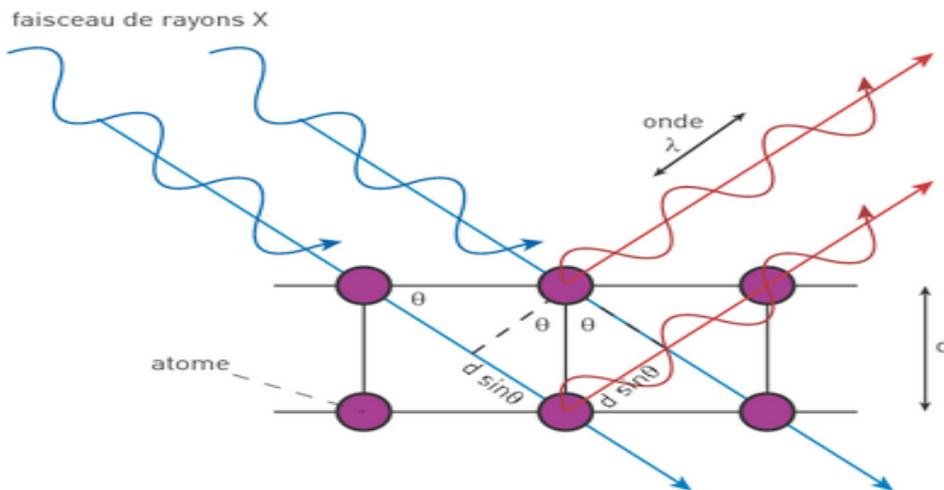


Figure 14: Incidence des rayons X sur un atome situé au sein d'un réseau cristallin.

Le faisceau de rayons X incident (bleu) frappe l'objet avec un angle θ . Les ondes diffractées sont notées en rouge.

aux protéines. En effet, un certain nombre d'opérations de symétrie sont impossibles à cause de la chiralité des protéines (D-aa). Cette organisation cohérente des macromolécules dans un cristal permet l'addition des signaux de diffraction.

Compte tenu de l'interaction de la lumière avec la matière, le faisceau de rayons X peut être dévié de différentes manières. Chaque atome du cristal diffuse une onde qui se propage dans toutes les directions (figure 14). Les ondes issues des différents atomes du cristal interfèrent :

- Si elles ont la même phase, les ondes s'additionnent et on obtient un signal sur le détecteur.

On parle d'interférences constructives

- Si elles ont des phases différentes, alors elles s'annulent et on n'a aucun signal. On parle d'interférences destructives.

Les interférences constructives ne sont possibles que s'il existe un agencement régulier des atomes. Dans un solide amorphe, toutes les ondes vont s'annuler.

Selon l'orientation de l'échantillon par rapport au faisceau (angle θ), les rayons diffractés ont des positions différentes. La position relative des points sur un diagramme de diffraction permet de déterminer l'orientation des plans et la distance entre les plans et donc les paramètres de maille et le groupe d'espace. Pour deux macromolécules différentes qui seraient agencées dans le cristal de la même façon, l'agencement des points sur le diagramme de diffraction serait le même. Par contre, l'intensité de chaque point serait différente. En effet, l'intensité de chaque point est la résultante de la diffraction de l'ensemble des atomes de l'unité asymétrique. L'intensité relative des points donne une information sur le contenu atomique de l'unité asymétrique. En modifiant l'orientation du cristal, on accumule les informations sur la nature de l'unité asymétrique. L'ensemble des informations obtenues grâce aux intensités relatives des points de diffraction sont consignées sont la forme de facteurs de structures h , k et l . Si on est capable de mesurer l'intensité des ondes de diffraction en chaque point, on est par contre incapable de dire quelle était la phase de ces ondes.

La connaissance de cette phase est essentielle pour reconstituer le trajet des ondes après avoir rencontré le cristal et plus concrètement pour reconstituer le nuage électronique en trois dimensions de l'unité asymétrique. Cette phase peut être déterminée par deux méthodes :

- Le Remplacement Moléculaire : on part de la connaissance de la structure d'une macromolécule homologue. On va placer, dans un premier temps, cette molécule dans la maille de notre cristal en essayant de lui donner exactement le même orientation que dans la maille réelle, pour ensuite calculer des phases théoriques. Cette technique

peut poser des problèmes de surinterprétation. On risque d'imposer des phases biaisées et donc d'obtenir une structure biaisée.

- Les deux autres méthodes consistent à introduire des dérivés lourds dans un cristal par trempage ou lors de la production de la protéine (sélénométhionine). Les caractéristiques de diffraction particulières de ces dérivés permettent de reconstituer les phases soit par Remplacement Isomorphe Multiple, soit par Diffusion Anomale.

Pour déterminer les phases, nous nous sommes servis uniquement de la technique de remplacement moléculaire. Je ne détaillerai donc pas par la suite comment peuvent être traitées les données de diffusion anormale ou de diffusion isomorphe.

2.2 Obtention des molécules à cristalliser

Pour pouvoir analyser une protéine par cristallographie aux rayons X, il faut une protéine soluble très pure (plus de 90%) et à très forte concentration (supérieure à 2-5mg.mL⁻¹). Pour notre étude, les domaines de reconnaissance des ficolines ont été produits par E. Gout et M. Lacroix et les têtes globulaires de C1q par T. Lunardi et P. Tacnet-Delorme du Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire (LEM) dirigé par G. Arlaud.

Le système Bac-to-Bac (Invitrogen) a été utilisé afin d'exprimer les domaines de reconnaissance des ficolines dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus. Les ADNc sont transférés dans un bacmide, un virus recombinant qui est capable de se répliquer dans *E. coli* comme un plasmide en gardant sa capacité à infecter des cellules d'insectes. Suite à une double sélection des clones dans *E. coli*, le bacmide recombinant d'intérêt est utilisé pour infecter des cellules d'insectes. Celles-ci produisent des particules virales qui sont utilisées pour infecter des cellules High Five. Ces cellules permettent la production des protéines. Ce système permet notamment de produire des protéines glycosylées, contrairement à une production en cellules bactériennes. Les ficolines L et M ont été purifiées à partir des surnageants de culture par chromatographie échangeuse de cations (Q-sépharose). La ficoline H a été purifiée en deux étapes : tout d'abord sur une colonne de DEAE-cellulose puis par chromatographie échangeuse d'ion en S-sépharose. Deux espèces ont été obtenues pour la ficoline L : une espèce non glycosylée de 24,9 kDa et une espèce glycosylée majoritaire identifiée par spectrométrie de masse *via* quatre pics allant de 25,8 kDa à 26,3 kDa. Au contraire, une seule espèce de ficoline H est produite d'une masse allant de 25,9 à 26,2 kDa de par la nature hétérogène du sucre N-lié. Une seule espèce est également produite

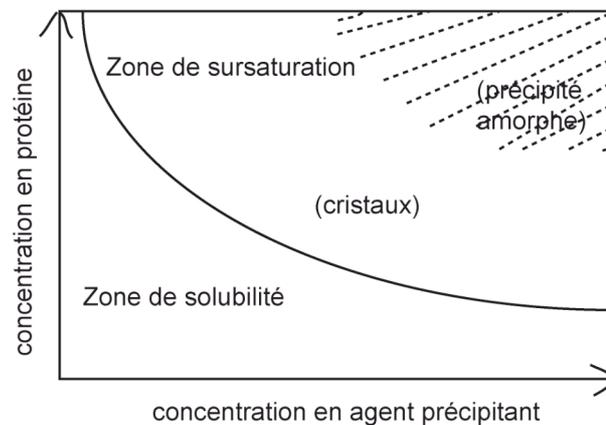


Figure 15 : Diagramme de phase d'une protéine.

Ce diagramme de phase théorique présente les différents états par lesquels peut passer une protéine en fonction de la concentration en agent précipitant et de la concentration en protéine. À de faibles concentrations, la protéine est soluble jusqu'à des concentrations critiques où l'on passe dans des conditions de sursaturation. C'est dans cette zone qu'il est possible d'obtenir une forme cristalline de la protéine. Par contre, dans des conditions extrêmes de concentration de la protéine et du solvant, on peut passer la zone de cristallisation et la protéine précipite.

pour la ficoline M de 24,5 kDa sans modification post-traductionnelle (Garlatti *et al.*, 2007a; Garlatti *et al.*, 2007b). Les têtes globulaires de C1q sont purifiées à partir de sérum humain comme décrit précédemment (Arlaud *et al.*, 1979; Tacnet-Delorme *et al.*, 2001).

2.3 Cristallogenèse

De nombreuses expériences de cristallisation ont été menées avec l'aide de trois techniciennes du Laboratoire de Cristallographie et de Cristallogenèse des Protéines : Lydie Martin, Claudine Darnault et Anne Chouquet.

2.3.1 Principe

La cristallogenèse est un processus au cours duquel les molécules interagissent entre elles et s'ordonnent dans un réseau périodique : elles passent donc de l'état soluble à un état solide ordonné : le cristal.

Les solutions de protéines et macromolécules biologiques peuvent cristalliser. Les cristaux formés correspondent à un des états d'équilibre du système protéine-solvant. La solubilité de la molécule dépend de sa concentration et de la concentration du solvant en sels et autres constituants additionnels.

La cristallisation d'une protéine consiste à conduire lentement la solution de protéine vers la limite de solubilité et au-delà, c'est-à-dire d'atteindre un degré de sur-saturation tel que les protéines s'agrègent soit en un précipité amorphe, soit de manière ordonnée pour former des cristaux. Ces différents états sont illustrés dans la figure 15, qui représente un extrait de diagramme de phase protéine-solvant, en fonction de la concentration en solvant.

De nombreux paramètres permettent de faire varier la solubilité d'une protéine, dont les principaux sont :

- La concentration en protéine
- La nature et la concentration des agents précipitants dont la fonction est de réduire la solubilité de la protéine. Ce sont des sels (sulfate d'ammonium, de sodium ou de lithium, NaCl), des polymères (Polyéthylène glycol-PEG- 400-20000) ou des solvants organiques (alcools tels que le methylpentanediol). Leur rôle est de rompre la couche d'hydratation des molécules protéiques soit par liaison des molécules d'eau, soit par saturation du solvant, ce qui favorise les interactions protéine-protéine.

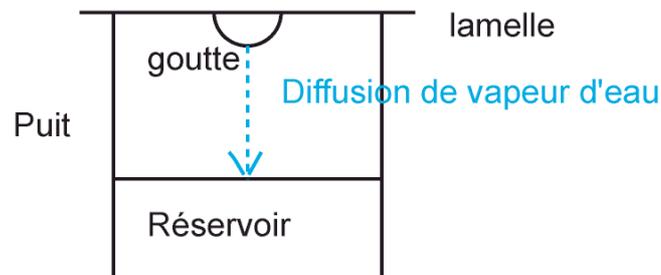


Figure 16 : Dispositif de la goutte suspendue.

Ce dispositif permet d'augmenter lentement la concentration en agent précipitant dans la solution protéique. Une goutte de protéine diluée dans de la solution d'agent précipitant est suspendue au dessus d'un réservoir dont la concentration en agent précipitant est double. La diffusion de la vapeur d'eau de la goutte vers le réservoir va permettre de concentrer lentement la goutte en agent précipitant jusqu'à tendre vers les conditions du réservoir.

- Le pH, qui permet de jouer sur la charge nette de la protéine.
- La température qui a un rôle cinétique sur la réaction et sur la solubilité de la protéine.
- Des additifs mineurs peuvent jouer un rôle dans la formation de cristaux, en particulier dans la qualité du cristal.

Il n'existe pas de protocole universel pour cristalliser les protéines mais un ensemble de paramètres décrits permettent de faire varier la solubilité en veillant à respecter les conditions de stabilité de la protéine étudiée.

2.3.2 Technique de la goutte suspendue

La technique de la diffusion en phase vapeur est la méthode courante utilisée pour la cristallisation (Wlodawer and Hodgson, 1975). Elle permet actuellement l'utilisation d'une quantité relativement faible de matériel protéique. Cette méthode permet de faire tendre lentement le système protéine-solvant vers la limite de solubilité de la protéine (figure 16).

Une goutte de solution protéique (quelques μl) est suspendue au dessus d'un réservoir contenant la solution précipitante (1ml) dont le contenu peut varier selon les paramètres décrits précédemment. La goutte contient la solution protéique et les réactifs de la solution précipitante dilués de moitié. Il va y avoir une mise en équilibre par diffusion de vapeur entre les deux solutions. La concentration en précipitant dans la goutte va tendre petit à petit vers la concentration en précipitant du réservoir. Au fur et à mesure que la solution protéique se concentre, elle peut passer par la zone du diagramme de phase qui permet la formation des cristaux. Pour cela, il faut que la protéine dans la goutte soit dans des conditions sous-critiques, c'est-à-dire se trouve toujours dans la zone de solubilité de la protéine mais proche de la saturation et que par contre la solution du réservoir soit une condition de sursaturation.

Afin de conserver les cristaux, ils sont congelés dans l'azote liquide. Cette étape risque d'entraîner la formation de glace ce qui peut modifier l'empilement cristallin et interférer avec les résultats de diffraction. Pour éviter cela, les cristaux sont immergés dans une solution contenant un agent cryo-protectant qui peut être de l'huile de paratone, du glycérol ou encore du PEG.

2.3.3 Cristalliser des complexes protéine-ligand

La cristallisation de complexes peut se révéler délicate. En effet, pour obtenir un cristal avec de bonnes caractéristiques de diffraction, il faut qu'il soit formé d'une seule espèce : le complexe. Pour obtenir un cristal de complexe, il faut que celui-ci soit majoritaire en solution.

	Solution protéique	Réservoir	Trempage	Forme cristalline	
2j3g	L-ficoline 5,7 mg/mL 145mmol/L NaCl 50mM Tris-HCL, pH 7,4	15% PEG8000, 20 mM acétate de calcium et 0,1M Hepes pH 7	non	Forme A P3 ₂ a=b=99Å c=142Å α=β=γ=90°	
2j2p			150mM CysNac		
2j0y			150mM β-glucan		
2j3u			150mM Galactose		
2j0g			10mM NAcMan		
2j3f			50mM NAcGal		
2j0h		ajout 1mM AcCholine	NON		
2j1g	Ajout 0,25mM NAcCys				
	18% PEG4000, 1M acétate de sodium, 1M acétate de calcium pH 5,6	Forme E P3 ₂ a=b= 100Å c=140Å α=β=90° γ=120°			
2j3o	Ajout 10mM NAcGlc et 1mM CaCl ₂	0,9 à 0,95 M succinate de Na à pH 7			Forme B C2 a= 200,9Å b= 84,3Å c=144Å α=γ=90° β=124,5°
2j61		pH 6,5 et 1mM phosphoglycérate			Forme C P6 ₃ a=b= 79,5Å c= 172Å α=β=90° γ=120°

Tableau IX : Conditions de cristallisation des domaines fibrinogène de la ficoline L

Dans le cas de nos domaines de reconnaissance, l'affinité du ligand pour le protomère en solution est très faible (de l'ordre du mmol.L^{-1}).

Lorsque la co-cristallisation semble inefficace, il est possible d'utiliser la méthode de trempage. Les cristaux de la protéine seule sont immergés dans une solution contenant le ligand à très forte concentration. Cette technique présente néanmoins des inconvénients majeurs :

- La solution de ligand circule dans les canaux de solvant du cristal. Cette contrainte peut déstabiliser la structure cristalline et entraîner la désagrégation du cristal. Ce n'est heureusement pas toujours le cas.
- Le ligand ne peut accéder qu'aux régions de la protéine non impliquées dans les contacts cristallins ce qui peut introduire des artefacts : ne pas pouvoir observer le site réel de fixation du ligand.

2.3.4 La cristallogénèse de nos complexes

Tous nos cristaux ont été obtenus grâce à la technique de diffusion en phase vapeur à 20°C après concentration des solutions protéiques fournies par le LEM. Les premiers tests de cristallisation des domaines de reconnaissance ont été menés à bien grâce à l'utilisation des robots de l'EMBL (Josan Marquez) et de l'IBS (Delphine Blot). Les conditions ayant permis d'obtenir des cristaux sont reproduites et affinées au laboratoire. La cristallogénèse de complexes a nécessité l'utilisation des deux techniques à notre disposition : la co-cristallisation et le trempage. Dans un premier temps, les co-cristallisations ont été effectuées en ajoutant le ligand à la solution protéique, puis face au nombre élevé de ligands à tester, nous avons choisi d'ajouter le ligand à la solution réservoir.

2.3.4.1 *La ficoline L*

La ficoline L recombinante a été concentrée jusque $5,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans 145mM de NaCl et 50mM de triéthanolamine-HCL, pH 7,4. Les cristaux natifs (forme A) utilisables pour les expériences de diffraction aux rayons X ont été obtenus en mélangeant des volumes identiques de solution protéique et d'une solution réservoir de 15% PEG8000, 20mM d'acétate de calcium et $0,1\text{M}$ Hepes pH 7. La congélation a été réalisée en ajoutant $1\mu\text{L}$ de PEG400 à la goutte avant de congeler le cristal dans de l'azote liquide. Des cristaux natifs à pH 5,6 ont été

	Solution protéique	Réservoir	Forme cristalline
2j64	H-ficoline 3mg/mL 100mM sulfobétaïne 195.	21-26% de PEG6000, 0,1M tris- HCL pH 8 ou 8,5	P4₁2₁2 a=b=62Å c=347Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
2j60		+ 20mM D fucose	
2j5z		+ 20mM galactose	

Tableau X : Conditions de cristallisation des domaines fibrinogènes de la ficoline H

obtenus à partir de solutions réservoir à 18% PEG4000, 1M acétate de sodium, 1M acétate de calcium pH 5,6 (forme cristalline E).

La majorité des complexes protéine-ligand ont été obtenus par co-cristallisation (1mM acétylcholine, 0,25 mM NAcCys) ou trempage (10mM NAcMan, 50mM NAcGal) à partir de la forme cristalline A. La meilleure résolution de diffraction a été obtenue pour la co-cristallisation avec le NAcCys. Ces cristaux ont ensuite été cassés et utilisés pour ensemercer les gouttes afin d'obtenir des structures natives de meilleure qualité. Ces cristaux ont ensuite été trempés dans de nouvelles solutions de ligands à 150mM pour obtenir les complexes avec le galactose, le β -glucan et le NAcCys. Les cristaux des complexes ficoline L/NAcGlc ont été obtenus par co-cristallisation dans d'autres formes cristallines (forme B et C). Elles ont été obtenues en mélangeant à la solution protéique 10mM NAcGlc et 1mM CaCl₂. La solution réservoir contenait 0,9 à 0,95 M de succinate de sodium à pH 6,5 (forme C) ou à pH 7 (forme B) ainsi que 1mM de phosphoglycérate pour la forme C. Les solutions de cryoprotection contenaient 1,05 M succinate de sodium pH 7, 10mM NAcGlc, 10mM acétate de Calcium et 24% glycérol (forme B) et 1M succinate de sodium, pH 6,5, 1mM phosphoglycérate et glycérol 22% (forme C). De nombreux cristaux de ficoline L ont été obtenus dans une quatrième forme cristalline D du groupe d'espace P222₁ avec quatre trimères par unité asymétrique. Les conditions de cristallisations sont résumées dans le tableau IX.

2.3.4.2 La ficoline H

La ficoline H a été concentrée jusqu'à 3mg.mL⁻¹ dans une solution à 100mM de sulfobétaïne 195 non-détergente comme agent de solubilisation. La méthode de diffusion en phase vapeur a été utilisée avec un réservoir contenant 21-26% de PEG6000, 0,1M Tris-HCl pH 8 ou 8,5 et 20mM CaCl₂ ou 18-20% PEG8000, 0,1M acétate de sodium pH 5,5 et 20mM CaCl₂. Les cristaux de complexes ont été obtenus par co-cristallisation. Elles ont été facilitées par ajout de ligands aux solutions réservoir à pH basique avec des concentrations croissantes jusqu'à 25mM pour le galactose et 50mM pour le fucose. La cryo-protection a été obtenue en utilisant de l'huile de paratone ou 20% glycérol. Les conditions de cristallisation sont résumées dans le tableau X.

2.3.4.3 La ficoline M

La ficoline M recombinante a été concentrée jusqu'à 6 mg.mL⁻¹ dans une solution à 145 mM NaCl, 50mM triéthanolamine-HCL pH 7,6. De nombreuses conditions de cristallisation ont

	Solution protéique	Réservoir	Trempage	Forme cristalline
2jhm	M-ficoline 6mg/mL 145 mM NaCl, 50mM Tris-HCL pH 7,6	11% PEG4000, 5% isopropanol, 0,1M Hepes pH 7,0		R3 a=b=73,7Å c=125Å $\alpha=\beta=90^\circ$ $\gamma=120^\circ$
2jhl			500mM Neu5Ac	
2jhk			500mM NAcGlc	
2jhi			500mM NAcGal	
2jhh		18-20% PEG8000, 0,1M acétate de sodium, 0,1M Mes pH 5,5 et 20mM CaCl2	non	P3 a=b=69,40Å c=77,63Å $\alpha=\beta=90^\circ$ $\gamma=120^\circ$

Tablea XI : Conditions de cristallisation des domaines fibrinogènes de la ficoline M

	Solution protéique	Réservoir	Trempage	Forme cristalline
2jg9	C1q 250mM NaCl, 2% glycérol, 50mM Tris-HCL, pH 7,6 contenant 100mM de sulfobétaïne 195	30-41 % PEG4000, 20mM CaCl2, 10nM β -mercaptoethanol, 100mM Tris-HCl pH 7,2 ou pH 7,4	non	P1 a=48,09 Å b=48,07Å c=84,7Å $\alpha=91,34^\circ$ $\beta=93,34^\circ$ $\gamma=113,68^\circ$
2jg8			Phosphosérine 12,5mM	

Tableau XII : Conditions de cristallisation des cristaux des têtes globulaires de C1q

été obtenues en utilisant le robot disponible à l'EMBL. Les cristaux choisis pour leur qualité de diffraction ont été obtenus avec une solution réservoir composée de 11% PEG4000, 5% isopropanol, 0,1M HEPES pH 7,0 ou 23% PEG 4000, 0,32 M de sulfate de lithium, 0,1M MES pH 5,6. Les cristaux de complexes ficoline M / ligands ont été obtenus en trempant les cristaux obtenus à pH 7 dans une solution de cryoprotection composée de 11-14% PEG 4000, 15% PEG400, 0,1M HEPES et 500mM de ligand (NAcGlc, NAcGal, Neu5Ac) juste avant de les congeler dans l'azote liquide. Les conditions de cristallisation sont répertoriées dans le tableau XI.

2.3.4.4 C1q

Les têtes globulaires de C1q ont été concentrées dans une solution à 250mM NaCl, 2% glycérol, 50mM Tris-HCl, pH 7,6 contenant 100mM de sulfobétaïne 195 non-détergente comme agent de solubilisation. Les cristaux sont obtenus à partir d'une solution réservoir contenant 30-41 % PEG4000, 20mM CaCl₂, 10nM β-mercaptoéthanol, 100mM Tris pH 7,2 ou pH 7,4. Le micro-ensemencement est utilisé afin d'obtenir des cristaux plus reproductibles. De nombreux tests de co-cristallisation ont été effectués en pré-incubant les têtes globulaires de C1q avec 10 ou 20mM de glycérophosphatidylcholine puis en cristallisant dans les conditions du C1q natif. Le robot de l'EMBL a permis de tester également de nouvelles conditions de cristallisation pour le complexe. Aucun de ces tests n'a permis d'obtenir autre chose que des cristaux natifs. Les cristaux des complexes C1q/PS sont obtenus par long trempage (plus de 2 jours) des cristaux de têtes globulaires dans une solution contenant 42% PEG4000, 10mM CaCl₂, 100mM Tris-HCl pH 7,4 et 12,5mM phosphosérine. Les expériences de trempage n'ont pas été effectuées avec de la glycérophosphatidylcholine à cause de son fort taux de précipitation dans ces conditions. Les conditions de cristallisation sont répertoriées dans le tableau XII.

2.4 Diffraction aux rayons X

2.4.1 Enregistrement des données de diffraction

Les données de diffraction ont été enregistrées à l'ESRF de Grenoble sur différentes lignes : ID14, ID23, ID29, BM30 et BM16. Le cristal est soumis à un faisceau de rayons X et des images de diffractions sont enregistrées à chaque rotation d'un degré du cristal. Le nombre d'images enregistrées dépend de la symétrie et de la qualité du cristal sachant que pour obtenir des données complètes pour un cristal monoclinique (de plus faible symétrie) il faut enregistrer 180 images.

Code PDB	Ligne ESRF	Gamme de résolution (Å)	Réflexions observées	Réflexions uniques	Redondance	Complétude (%)	I/SigI	Rsym (%)
Ficoline L								
2j3g	ID29	2.50- (2.5-2.65)	111529 (17545)	52303 (8249)	2.13 (2.12)	97.3 (95)	7.8 (3.2)	8.6 (29.6)
2j2p	ID23- eh2	2.8- (2.8-2.96)	81067 (12014)	33431 (5063)	2.42 (2.37)	90.9 (85.4)	6.3 (2.8)	13.1 (34.1)
2j0y	ID23- eh1	2.35-15 (2.35-2.4)	269263 (13016)	58888 (3453)	4.57 (3.77)	98.1 (94.7)	12 (3.25)	8.8 (44.6)
2j3u	ID14- eh2	2.15 (2.15-2.3)	236903 (34862)	75886 (12682)	3.12 (2.75)	95.8 (87.2)	12.7 (3.3)	6.5 (35.5)
2j0g	ID29	2.85 (2.85-2.96)	107336 (16250)	33923 (5153)	3.16 (3.15)	97.6 (92.2)	11.6 (2.75)	8.4 (36.4)
2j3f	BM30	2.8 (2.8-2.9)	106670 (10296)	35520 (3450)	3.0 (2.98)	96.8 (93.5)	11.9 (3.3)	7.8 (37.5)
2j0h	BM16	2.85 (2.85-2.9)	100884 (2721)	32678 (1176)	3.08 (2.31)	94.9 (68.6)	11.7 (2.65)	7.7 (36.5)
2j1g	ID29	1.95 (1.95-2.0)	711085 (49609)	111804 (7816)	6.36 (6.35)	98.5 (94.9)	15 (4.1)	7.2 (45.9)
2j3o	ID29	2.65 (2.75)	202148 (21231)	57851 (6031)	3.49 (3.52)	98.5 (98.8)	9.6 (3.5)	9.0 (36)
2j61	BM30	2.7 (2.7-2.8)	116721 (12061)	16911 (1739)	6.90 (6.93)	99.8 (100)	24.6 (4.2)	5.4 (41.9)

Tableau XIII: Statistiques de diffraction des cristaux de ficoline L utilisés pendant cette étude

2.4.2 Traitement des données

2.4.2.1 *Déterminer la maille, le groupe d'espace et estimer les facteurs de structure*

Nous avons utilisé essentiellement le logiciel XDS (Kabsch, 1993) et ponctuellement le logiciel mosflm de la suite ccp4 (1994). La différence principale entre ces deux logiciels est l'interface. Mosflm permet de visualiser les images de diffraction et l'interprétation qu'en fait le logiciel. Dans XDS, les retours que nous avons de la qualité des données sont les statistiques finales et les profils d'intégration. Par contre, les étapes de traitement des données sont les mêmes. Je vais ici m'appuyer sur le fonctionnement de XDS.

Tout d'abord, nous cherchons à indexer les données de diffraction, c'est-à-dire à déterminer les paramètres de maille et le groupe d'espace afin d'en déduire les indices h,k,l des taches de diffraction. Ceci peut être réalisé en utilisant un petit nombre d'images dans un premier temps. Le logiciel commence par éliminer le bruit de fond (XYCORR, INIT) puis il cherche les points de diffraction les plus intenses (COLSPOT). Finalement, il compare le profil de ces points avec sa banque de groupes d'espace et de mailles pour l'indexation. En sortie, le logiciel nous donne pour chaque groupe d'espace une maille possible ainsi qu'un score. Parmi les groupes d'espace ayant un score correct (inférieur à 20), nous prenons celui de plus haute symétrie. Suite à cette procédure, nous pouvons également estimer la qualité des données en fonction du nombre de points rejetés.

La deuxième étape est l'intégration (INTEGRATE), c'est-à-dire l'estimation des valeurs d'intensités afin de déterminer les facteurs de structures (h,k,l) qui donnent des informations sur le contenu atomique de l'unité asymétrique. On complète par une mise à l'échelle des données (CORRECT, XSCALE) qui permet de corriger de légères incohérences possibles entre les images dues à la variation de l'intensité du faisceau de rayons X au cours de la collecte, à la dégradation du cristal ou encore à la polarisation. On obtient un fichier (ASCII) pour les facteurs de structures ainsi qu'une évaluation des paramètres suivants :

- La redondance : nombre de fois qu'est répétée la même information dans le jeu de données. Plus le degré de symétrie du cristal est élevé, plus il est possible d'augmenter la redondance.
- La complétude : le pourcentage d'informations obtenues sur l'information totale disponible théoriquement.
- I/σ : informe sur la valeur du rapport signal sur bruit. On se base sur cette valeur pour déterminer la limite de résolution du jeu de données.

Code PDB	Ligne ESRF	Gamme de résolution (Å)	Reflections observées	Réflexions uniques	Redondance	Complétude (%)	I/SigI	Rsym (%)
Ficoline H								
2j60	ID23-eh1	2.35- (2.35-2.4)	201568 (12169)	29088 (1702)	6.93 (7.14)	99.0 (97.6)	12.5 (4.2)	12.3 (49.8)
2j60	ID23-eh1	1.80- (1.8-1.9)	553996 (28792)	56892 (6802)	9.73 (4.23)	88.3 (72.0)	9.51 4.27	18.5 39.0
2j5z	ID23-eh1	1.7 (1.7-.8)	564316 (65123)	69069 (5292)	8.10 (12,30)	98.1 (90.7)	17.7 (4.4)	7.3 (36.5)
Ficoline M								
2jhm	ID14-eh2	1.52-56.8 (1.52 -1.60)	98652 (9529)	36615 (4482)	2.7 (2.1)	94.3 (94.3)	11.3 (3.0)	7.4 (27.7)
2jhk	ID23-eh2	1.75 - 23.7 (1.75- 1.80)	146501 (11878)	25519 (2072)	5.7 (5.72)	99.3 (98.7)	17.66 (4.25)	6.3 (27.4)
2jhi	ID23-eh2	1.80 - 28.3 (1.80- 1.85)	135776 (10669)	23757 (1862)	5.7 (5.72)	99.3 (97.7)	10.36 (3.20)	9 (36.4)
2jhl	ID14-eh4	1.75 - 28.0 (1.75- 1.80)	137933 (11099)	24703 (1973)	5.6 (5.6)	98.9 (97.6)	23.56 (4.94)	4.6 (24.4)
2jhh	ID23-eh2	1.70 - 28.0 (1.70 -1.75)	258896 (20733)	45425 (3642)	5.7 (5.7)	98.7 (95.5)	14.93 (3.88)	7.3 (36.9)
C1q								
2jg8	ID14-eh2	2,05- (2.05-2.1)	75256 (2841)	38993 (1672)	1.9 (1.6)	89.7 (77.2)	13.5 (7.9)	4.2 (9)
2jg9	ID29	1.95- (1.95-2.0)	107754 (6751)	50005 (3140)	2.1 (2.15)	95 (84.3)	16 (9.2)	4.2 (8.4)

Tableau XIV : Statistiques de diffraction des cristaux de ficolines H et M et de C1q

Le fichier ASCII contenant les facteurs de structure est ensuite converti au format mtz pour la suite du traitement. Les statistiques obtenues au cours de cette étude sont répertoriées dans les tableaux XIII et IV.

2.4.2.2 Le remplacement moléculaire : estimer des phases pour visualiser et corriger un modèle

Pour cette étape, nous avons besoin d'un modèle tridimensionnel d'une protéine homologue. Pour résoudre la structure de la ficoline L, nous avons utilisé celle de la tachylectine TL5a (code pdb 1jC9) identique à 49%. Puis la structure de la ficoline L a servi de modèle pour les ficolines M et H identiques respectivement à 83% et à 53%.

Au préalable, il faut déterminer le coefficient de Mathews qui donne le pourcentage de solvant dans l'unité asymétrique et permet d'estimer le nombre probable de molécules contenues dans celle-ci. Ensuite, nous avons utilisé le logiciel PHASER (McCoy *et al.*, 2007) ou le logiciel AMoRe (Navaza, 2001) pour réaliser le remplacement moléculaire proprement dit. Nous lui donnons les facteurs de structure de notre cristal, les paramètres de maille et le groupe d'espace ainsi que la molécule modèle et le nombre de fois où elle est répétée dans la maille. Le logiciel va orienter la ou les molécules dans la maille en tenant compte de tous ces paramètres et nous propose une ou plusieurs solutions. Cette première structure obtenue n'a ni les bons résidus ni les molécules de solvant. Il faut donc affiner cette structure de façon à tendre vers notre protéine cristallisée.

2.4.2.3 Affiner la structure

L'affinement de la structure se fait grâce au logiciel Refmac5 (Murshudov *et al.*, 1997). Il est capable à partir du fichier de structure fourni et des facteurs de structure de minimiser l'écart entre les facteurs de structure mesurés et ceux calculés à partir du modèle. Pour estimer la corrélation entre les facteurs de structure et la structure elle-même, il donne un paramètre d'accord nommé Rfact. Il utilise également un certain nombre de réflexions exclues du calcul de minimisation pour estimer le biais de suraffinement du modèle et calcule un second coefficient Rfree. Ces deux coefficients doivent rester proches et évoluer de concert au cours de l'affinement. L'écart acceptable entre ces deux paramètres dépend de la résolution du jeu de données. Il calcule aussi pour chaque atome un facteur d'agitation thermique B.

Une des limites de Refmac5 est qu'il peut modifier légèrement la position des atomes mais ne peut pas modifier la nature du modèle. Il faut donc manuellement modifier la structure grâce

au logiciel COOT (Emsley and Cowtan, 2004). Il permet d'afficher la structure et les cartes de densité électronique déduites des facteurs de structure. Une des cartes de densité électronique tend vers les facteurs de structure observés (F_o) $2F_o - F_c$ (F_c facteurs de structure calculés à partir du modèle). Une autre est la carte de densité électronique résiduelle qui doit tendre vers 0 : $F_o - F_c$. Cette dernière permet de savoir s'il y a trop ou pas assez d'atomes à un endroit. Nous allons donc remplacer les acides aminés du modèle par ceux de notre protéine d'intérêt, ajouter les molécules de solvant ou de ligand et modifier l'orientation des atomes. Suite à chaque série de modifications, le nouveau modèle est soumis à une minimisation de façon à l'améliorer et à estimer sa progression grâce aux facteurs R_{fact} et R_{free} .

2.4.2.4 Le problème des ligands

Modéliser les ligands n'est pas toujours évident pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ils ne sont pas disponibles directement dans la banque de molécules utilisées par COOT. Il faut donc aller les chercher dans une banque de données disponible en ligne (HIC-UP, <http://alpha2.bmc.uu.se/hicup>) ou alors les coder soit même à partir de molécules proches (ici uniquement dans le cas de l'acétylcystéine). Refmac5 sait reconnaître un grand nombre de ces molécules quand le nom attribué est correct (exemple glucose GLC). Dans le cas des molécules créées, il faut compléter sa banque de molécules.

2.4.2.5 Dépôt et validation de la structure

Une fois un modèle satisfaisant obtenu, il faut tout de même vérifier la qualité de la structure notamment du point de vue du respect de la géométrie : respect du diagramme de Ramachandran ou des distances interatomiques. Le logiciel COOT permet de faire des vérifications préliminaires puis il est possible d'avoir une vision globale de la qualité de la structure en utilisant le logiciel PROCHECK de la suite ccp4 (1994). Les structures sont déposées et contrôlées par la Protein Data Bank (www.rcsb.org).

PDB code	Ficoline	Résolution haute/basse (Å) (dernier)	R_{work} /R_{free} (%)	R.m.s.d. Liaison/Angle (Å/°)	Facteur B moyen Protéine/Ligand (Å²)	Ramachandran ^a RF/RAA/RAE/RI (%)
2jhm	M	1.52-56.79 (1.52-1.56)	18.1 / 20.7 (21.9 / 25.6)	0.009/1.19	11.66	84.5/15.5/0.0/0.0
2j64	H	2.20-40 (2.20-2.28)	20.1 / 26.5 (21.3 / 27.5)	0.009/1.247	26.3	85.1/13.8/0.9/0.2
2j3g	L	2.50-15 (2.50-2.585)	20.2-25.8 (24.6-30.2)	0.012/1.335	35.88	80.0/19.7/0.3/0.0

^a RF :Régions Favorables; RAA :Régions Autorisées Additionnelles; RAE :Régions Autorisées Elargies; RI : Régions Interdites

Tableau XV : Statistiques d'affinement des cristaux de ficolines obtenus à pH 7

3 Résultats

Le laboratoire a entrepris l'analyse au niveau atomique des complexes d'initiation du complément. Parmi les questions qui ont été posées, l'une d'elles est la compréhension des modalités de reconnaissance des complexes initiateurs. Compte tenu de la publication de la structure du site de reconnaissance de la MBL (Weis *et al.*, 1992), nous nous sommes attachés à déterminer la structure des domaines de reconnaissance de C1q et des ficolines avec ou sans leurs ligands potentiels. La structure des têtes globulaires de C1q a été résolue en 2003 (Gaboriaud *et al.*, 2003) au laboratoire. Juste avant mon arrivée, les jeux de données concernant les ficolines H et L natives avaient été collectés et en partie résolues. J'ai donc participé pour cette partie surtout à l'analyse de la structure globale.

3.1 Structure globale des domaines de reconnaissance des ficolines

3.1.1 Obtention des structures natives des domaines de reconnaissance

Les segments correspondant aux domaines de reconnaissance (résidus 70-288, 58-276 et 80-297 des ficolines L, H et M matures) ont été produits dans le système baculovirus/cellules d'insectes. Trois formes cristallines ont été utilisées pour la ficoline L contre une seule pour les ficolines H et M. Les structures ont été affinées jusqu'à des résolutions variables selon les ficolines. Nous avons réussi à monter jusqu'à de fortes résolutions pour les ficolines H et M, respectivement jusqu'à 1,5Å et 1,7Å. Au contraire, pour la ficoline L nous n'avons pas réussi à obtenir de résolution supérieure à 1,95Å, et encore, nous étions le plus souvent limités à une résolution de l'ordre de 2,8 Å. Cette plus basse résolution des structures de ficolines L peut être expliquée par une forte agitation d'une des sous-unités du trimère dans la forme cristalline A. Cette sous-unité est très mal définie en densité à son extrémité et présente souvent des facteurs d'agitation thermique élevés. De plus, une des conséquences de cette particularité est la tendance au suraffinement : un R_{fact} qui diminue avec un R_{free} qui augmente. Pour résoudre partiellement ce problème, nous avons eu recours à l'utilisation de contraintes non cristallographiques. Celles-ci imposent une structure similaire de plusieurs zones des protomères dans les trois sous-unités. Nous avons contraint très fortement les chaînes principales uniquement. Selon les jeux de données, le jeu de contrainte utilisé a été adapté. Les statistiques d'affinement des trois structures natives sont données dans le tableau XV.

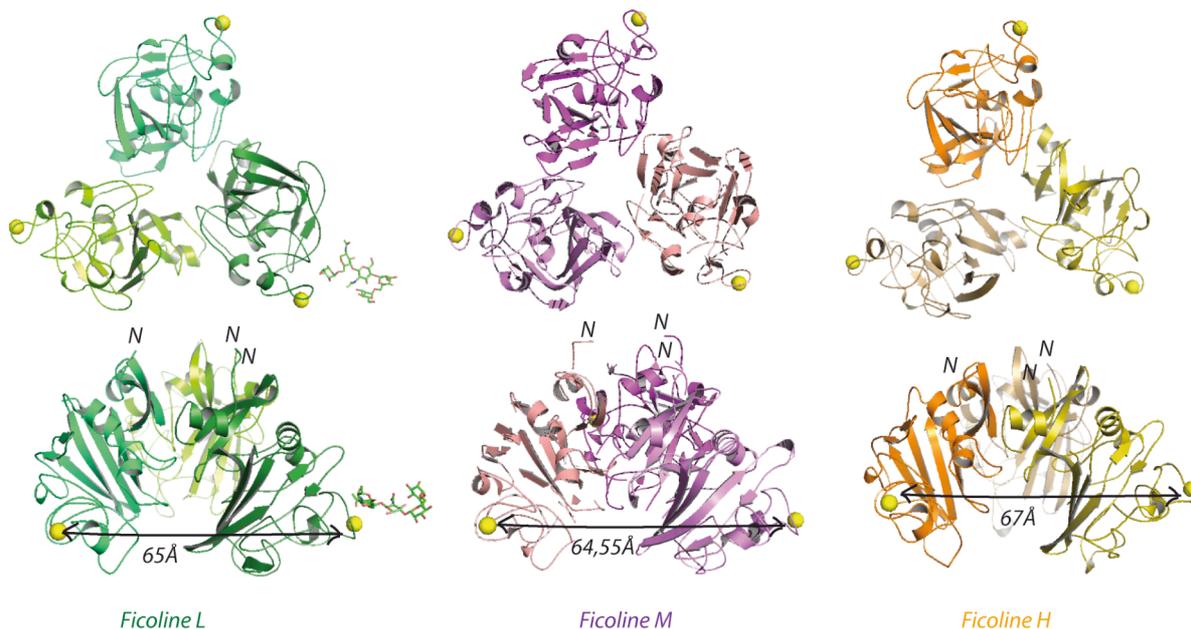


Figure 17: Structure des trimères de ficolines.

Les vues de dessous (première ligne) et latérales (deuxième ligne) des trimères des ficolines L (vert), M (violet) et H (orange) sont présentées avec l'ion calcium représenté par une sphère jaune et les glycosylations en bâtonnets. Les distances entre les cycles calciques sont indiquées sur la vue latérale. Les extrémités N-terminales visibles sont notées *N*.

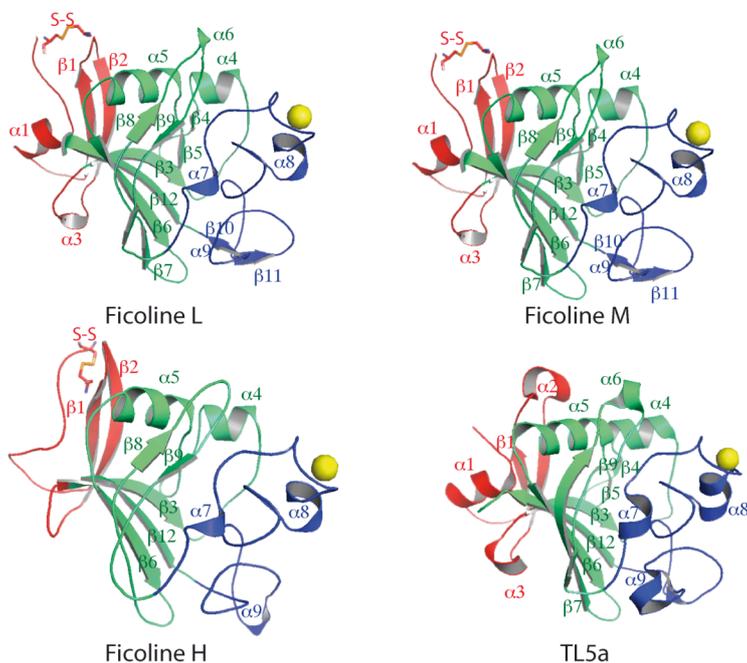


Figure 18 : Protomère de ficolines et de TL5a

Les protomères sont représentés avec en rouge le domaine A en vert le domaine B et en bleu le domaine P. La nature des structures secondaires est indiquée avec β pour les brins β et α pour les hélices α suivi du numéro du repliement dans la structure dans la tachylectine. Le calcium est représenté par une sphère jaune et le pont disulfure supplémentaire des ficolines est noté S-S.

3.1.2 Des protéines homotrimériques.

En accord avec la nature trimérique des ficolines (Matsushita and Fujita, 2001), leurs domaines de reconnaissance forment un homotrimère dans le cristal. Les protomères s'associent selon une structure tri-lobée en forme de trèfle avec un pseudo-axe de symétrie d'ordre 3 (figure 17). Dans le cas de la ficoline M, cet axe est aussi un axe cristallographique de même que dans les cristaux de forme B de la ficoline L. Il semblerait donc que dans certaines conditions les trois protomères puissent être parfaitement identiques. Les trimères possèdent une cavité centrale relativement ouverte avec des sillons séparants les parties basses des protomères. Les parties N-terminales des trois protomères sont réunies dans la partie haute des trimères, ce qui est cohérent avec la formation d'une queue collagène dans la molécule intacte (figure 17). Le volume des trimères est de l'ordre de 50Å en hauteur et 80Å de diamètre maximal pour les trois ficolines.

Un site de fixation du calcium est observé dans chaque protomère, à une position homologue à celle de TL5a (Kairies *et al.*, 2001) c'est-à-dire dans une boucle située dans la région la plus externe du trimère. Les ions calciques sont séparés de 64,55Å dans la ficoline M, 65Å pour la L et 67Å pour la H. En corrélation avec les résultats de spectrométrie de masse, parmi les deux sites potentiels de N-glycosylation dans la ficoline L (Asn215 et Asn275) seul le premier est occupé par une chaîne oligosaccharidique. Dans les cas les plus favorables, un segment comprenant deux NAcGlc avec un fucose lié au premier et deux mannoses additionnels ont pu être construits dans une densité électronique bien définie (figure 17). Le site de glycosylation unique de la ficoline H (Asn266) est clairement lié à un oligosaccharide, mais celui-ci n'a pu être caractérisé par manque d'information structurale. Dans les deux structures, les oligosaccharides sont localisés à la périphérie du trimère.

3.1.3 Topologie des protomères

Les protomères des ficolines humaines ont une structure ellipsoïdale similaire à celle de TL5a (Kairies *et al.*, 2001). Ils sont subdivisés en trois sous-domaines (figure 18). Dans le domaine A N-terminal (résidus 70 à 116 sur la ficoline L), une différence majeure entre les ficolines et TL5a est le raccourcissement de la boucle entre les brins $\beta 1$ et $\beta 2$ qui perd sa structure α -hélicoïdale. De plus, dans les ficolines, cette boucle est attachée au segment N-terminal par un pont disulfure (ficoline M : Cys82 et Cys110) absent dans TL5a (figure 18). Les autres ponts disulfures sont conservés entre les ficolines et TL5a. Si on superpose les domaines B des ficolines et de TL5a, le domaine A des ficolines est légèrement tourné d'environ 6° au niveau de la boucle entre $\alpha 3$ et $\beta 3$.

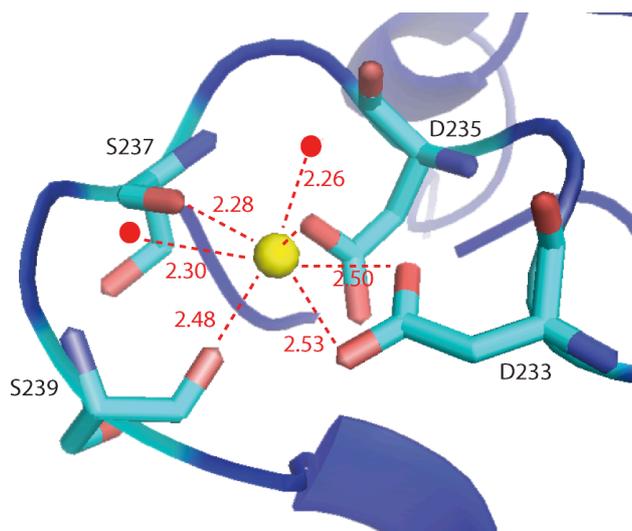


Figure 19 : Site calcique de la ficoline M.

L'ion calcium (sphère jaune) est coordonné par des chaînes latérales de résidus polaires et de groupements carboxyles de la chaîne principale (en bâtonnets cyan) ainsi que par deux molécules d'eau (point rouge). Les interactions sont indiquées en pointillés rouges. Les distances interatomiques sont indiquées en rouge et la nature des résidus en noir.

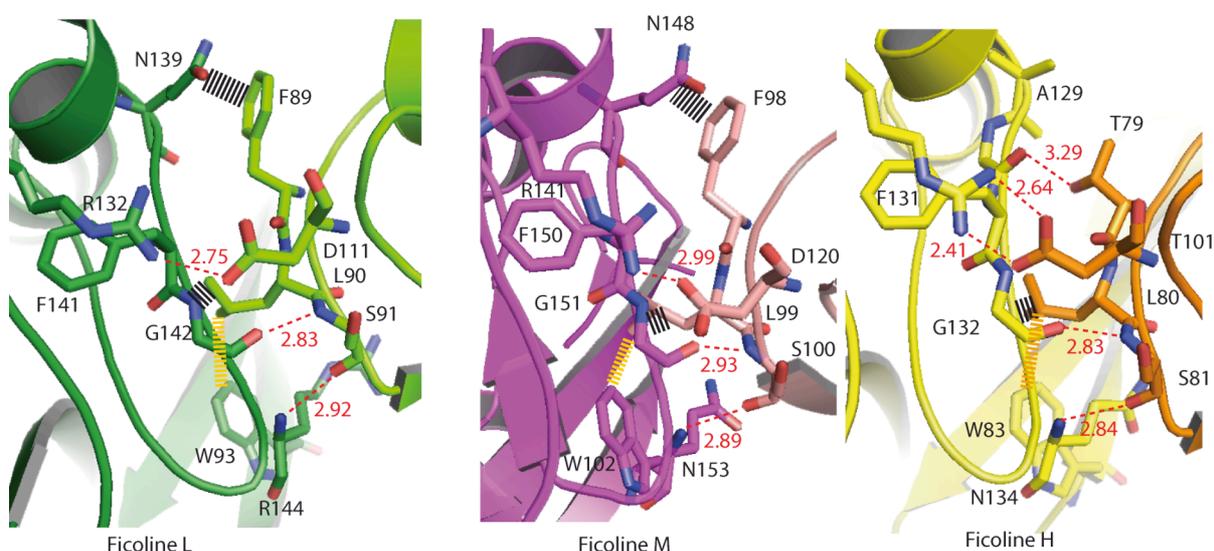


Figure 20 : Interfaces entre les protomères des ficolines L, M et H.

Les interfaces des ficolines L (vert foncé-clair), M (violet-rose) et H (jaune-orangé) sont constituées d'interactions polaires (traits pointillés rouges) et de contacts de Van Der Walls (pointillés larges noirs). Les résidus impliqués dans ces interactions sont représentés sous forme de bâtonnets et leur nature est indiquée en noir. Les distances interatomiques sont indiquées en rouge.

Le domaine B, très larges (résidus 117 à 206 et 279 à 288 pour la ficoline L), est contenu entre les domaines A et P. Il contient les sept brins β anti-parallèles et les deux hélices déjà décrits pour TL5a. Quelques différences significatives existent tout de même entre TL5a et les ficolines notamment au niveau de la boucle entre $\beta 3$ et $\alpha 4$ qui est raccourcie tout comme le segment C-terminal suivant $\beta 12$.

Les domaines P des ficolines L et M (résidus 207 à 278 pour la ficoline L) contiennent deux courtes hélices et deux courts brins β anti-parallèles similaires à ceux qui sont observés dans TL5a. Dans la ficoline H, la région correspondant à $\beta 10$, $\alpha 9$ et $\beta 11$ a une séquence bien différente et ne montre pas de structure secondaire particulière (figure 18). Dans cette région le déplacement maximal entre les chaînes des ficoline L et H (8Å) a lieu au niveau des sérines 250 (ficoline H) et 260 (ficoline L). Dans toutes les ficolines humaines, ce domaine contient le site de fixation du Ca^{2+} situé dans la boucle reliant les hélices $\alpha 7$ et $\alpha 8$. La coordination de l'ion implique deux molécules d'eau, les deux oxygènes du groupe carboxylate d'un aspartate, un des deux oxygènes de la chaîne latérale d'un second aspartate ainsi que les oxygènes des carbonyles de la chaîne principale de deux sérines. Nous retrouvons une distance moyenne de coordination de l'ordre de 2,4Å très caractéristique de l'ion calcique (figure 19). L'organisation des sites calciques de TL5a est très similaire.

3.1.4 Les interfaces

L'analyse des interfaces entre les protomères des ficolines humaines montre une très forte similitude (Garlatti *et al.*, 2007a). L'interaction entre les protomères concerne principalement les résidus situés avant ou dans le brin $\beta 1$ d'un côté et les résidus entre l'hélice $\alpha 4$ et le brin $\beta 4$ de l'autre (figure 18). Ces résidus (figure 20) fournissent un réseau d'interaction consistant, selon la numérotation de la ficoline L :

- Deux liaisons hydrogènes entre la chaîne principale de la Ser91 et les chaînes principales de Gly142 et Arg144
- Un pont salin entre Asp111 et Arg132
- Des contacts de Van Der Waals entre Phe89 et Gln139 (qui n'existent pas dans la ficoline H), entre Phe141/Gly142 et Leu90 et entre Leu90 et Trp93 qui n'est pas toujours conservée dans la ficoline L.

PDB code	Ficoline	Résolution haute/basse (Å) (dernier)	R _{work} /R _{free} (%)	R.m.s.d. Liaison/Angle (Å/°)	Facteur B moyen Protéine/Ligand (Å ²)	Ramachandran ^a RF/RAA/RAE/RI (%)
Ficoline M						
2jhk	NAcGlc S1	1.75-23.71 (1.75-1.81)	17.3 / 18.6 (20.4 / 23.9)	0.008/1.17	21.0 / 42.1	85.0/15.0/0.0/0.0
2jhi	NAcGal S1	1.80-28.35 (1.80-1.86)	19.6 / 21.4 (23.8 / 31.7)	0.01/1.23	25.3 / 36.7	85.0/15.0/0.0/0.0
2jhl	Neu5Ac S1	1.75-27.98 (1.75-1.81)	21.0 / 23.9 (23.2 / 23.7)	0.008/1.24	27.4 / 36.0	84.5/15.5/0.0/0.0
Ficoline H						
2j60	D-fuc S1	1.80-15 (1.80-1.862)	21.1 / 25.7 (29.1 / 32.9)	0.010/1.228	33.67 / 64.68	85.5/13.7/0.7/0.0
2j5z	Gal S1	1.73-19.0 (1.73-1.79)	20.1 / 23.2 (25.5 / 29.3)	0/007/1.047	24.21 / 55.56	86.8/12.3/0.9/0.0
Ficoline L						
2j1g	CysNac S2	1.95-15 (1.95-2.017)	17.6 / 21.0 (21.3 / 25.7)	0.008/1.091	38.77 / 53.41	84.0/15.4/0.5/0.1
2j3o	NAcGlc S2	2.65-19 (2.65-2/741)	22.7 / 28.2 (34.9 / 40.9)	0.013 / 1.402	55.8 / 59.42	79.6/19.3/1.0/0.1
2j61	NAcGlc S2	2.7-15 (2.7-2.792)	20.6 / 29.1 (24.1 / 39.6)	0.019 / 2.043	56.48 / 69.27	73.8/24.9/1.1/0.3
2j2p	CysNac S2 S3	2.8-19.97 (2.80-2.90)	19.7 / 26.9 (26.2 / 35.1)	0.008/1.098	29.31 / 43.3	80.1/18.5/1.2/0.3
2j3u	Gal S2(S3S4)	2.15-19.95 (2.15-2.225)	18.8 / 23.7 (24.5 / 29.5)	0.008/1.122	38.81 / 53.1	81.6/17.8/0.5/0.1
2j0h	Ach S3	2.85-15 (2.85-2.946)	21.0 / 27.5 (30.6 / 39.2)	0.012/1.399	35.79 / 43.23	78.0/21.4/0.5/0.1
2j3f	NAcGal S3	2.80-15 (2.80-2.895)	22.1 / 27.6 (32.2 / 36.4)	0.005/0.922	41.924 / 60.49	75.2/22.9/1.9/0.0
2j0g	NacMan S3	2.85-15 (2.85-2.946)	19.2 / 24.8 (31.0 / 38.4)	0.011/1.394	40.37 / 55.69	78.6/20.3/1.0/0.1
2j0y	β-glucan S3-S4	2.35-19.95 (2.35-2.432)	19.5 / 24.2 (26.6 / 26)	0.011/1.303	45.98 / 53.61	82.1/17.4/0.5/0.0

^a RF :Régions Favorables; RAA :Régions Autorisées Additionnelles; RAE :Régions Autorisées Elargies; RI : Régions Interdites

Tableau XVI : Statistiques d'affinement des complexes ficoline/ligand

Une interaction supplémentaire peut être identifiée dans la ficoline H entre Thr79 et Ala129 . Des différences plus significatives sont observées avec TL5a notamment dans les régions correspondant aux segments Phe89-His94 et Arg144-Gly146 de la ficoline L.

Une caractéristique singulière du trimère de la ficoline L est la variabilité de l'angle entre les trois protomères. Parmi les différentes structures analysées, une seule a un véritable axe de symétrie d'ordre trois avec un angle de 120°C entre les protomères. Dans tous les autres cas, les interfaces, et particulièrement A/C et A/B, sont stabilisées par un nombre variable d'interactions de Van Der Waals. En conséquence, les angles entre les protomères varient de 117°C à 122°C, avec une variation d'amplitude maximale pour le protomère A des structures 2j3g et 2j0h qui divergent l'une de l'autre de 14°C. Ces rotations ne détruisent pas le réseau d'interactions décrit ci-dessus, soulignant la remarquable plasticité de ces interfaces.

3.2 Modalités de reconnaissance des ficolines humaines

3.2.1 Obtention de complexes protéine-ligand

Afin de mettre en évidence les propriétés de reconnaissance des ficolines humaines à l'échelle atomique, des ligands connus de ces ficolines ont été co-cristallisés avec les domaines de type fibrinogène. Lorsque que la co-cristallisation ne fonctionnait pas, nous avons adopté la stratégie de trempage. Le temps et les conditions de trempage doivent être mis au point pour chaque expérience. En effet, certains réactifs présents dans la solution de précipitation (acétate, isopropanol) ou dans les solutions de cryoprotection (glycérol) peuvent saturer les sites de reconnaissance. Il faut donc les exclure des solutions de trempage ou augmenter fortement la concentration de ligand pour déplacer l'équilibre par compétition. De plus, dans le cas des ficolines L et H nous avons eu recours à des temps de trempage assez longs (quelques heures) alors que pour la ficoline M l'obtention des complexes a nécessité de coupler l'étape de trempage et l'étape de congélation. Les complexes obtenus ainsi que les statistiques de diffraction et d'affinement sont présentés dans les tableaux XIII , XIV et XVI.

Au cours de l'affinement des structures, nous avons dû être vigilants sur la structure des ligands. En effet, même si le logiciel Refmac reconnaît les coordonnées des ligands que nous lui introduisons, il a tendance à déformer leur structure probablement à cause du peu d'information qu'il dispose à propos des contraintes géométriques de ces molécules. De plus, le logiciel déplace les ligands sucres de façon à réaliser des liaisons glycosidiques. En ce qui concerne la ficoline L, nous avons dû résoudre un problème majeur. En effet, au cours de l'affinement, les facteurs B (facteurs d'agitation thermique) du ligand augmentaient de façon

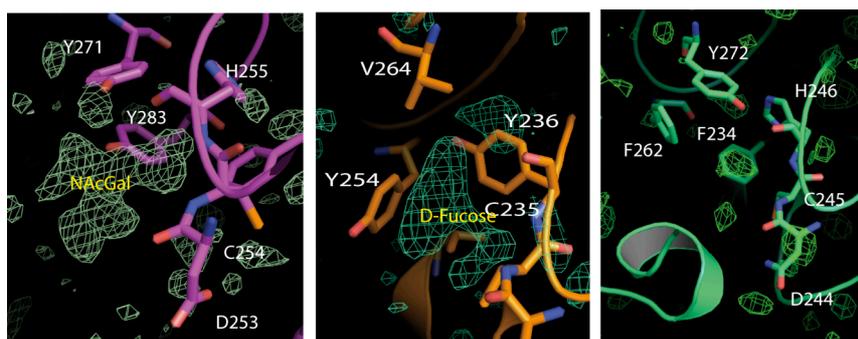


Figure 21 : Densités électroniques résiduelles (filet vert) dans les sites S1 des ficolines M (magenta), H (orange) et L (vert). A. 2jhi B. 2j60 C. 2j3u

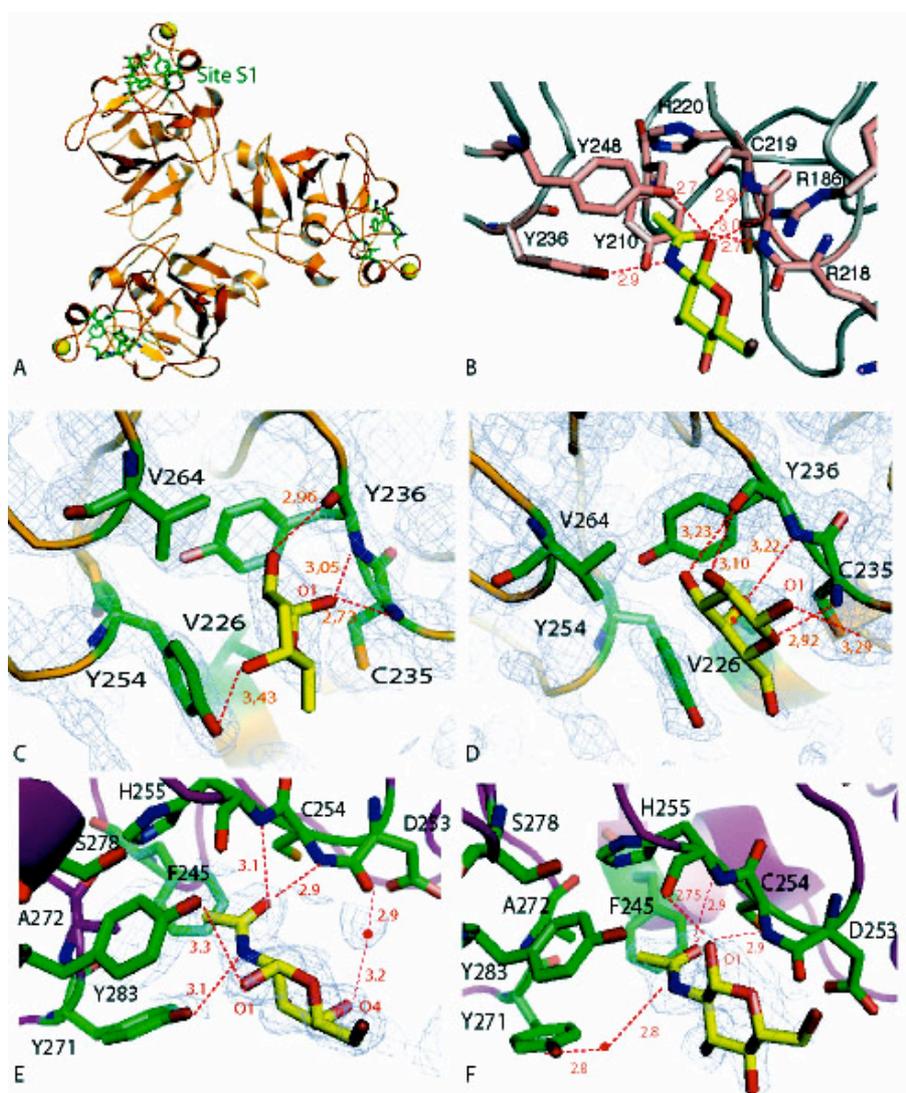


Figure 22 : Fixation des ligands dans le site externe des ficolines H et L et de TL5a

A. Localisation du site S1 conservé (bâtons verts) sur la ficoline H (orange). B. Site de la Tachylectine avec du NAcGlc. C. Ficoline H avec D-fucose (2j60). D. Ficoline H avec galactose (2j5z) E. Ficoline M avec NAcGal (2jhk) F. Ficoline M avec NAcGlc (2jhi) Les pointillés rouges représentent les interactions polaires et les points rouges les molécules d'eau. La carte de densité électronique (2Fo-Fc) est indiquée par un filet bleu pâle.

importante. Nous avons eu recours à des outils particuliers comme les tenseurs TLS (pour « Translation, Libration et Screw rotation ») qui permettent de définir des paramètres tridimensionnels de l'agitation thermique pour des groupes d'atomes. Nous avons aussi joué sur l'occupation des atomes. Nous reviendrons sur ce point notamment dans la partie concernant les ligands acétylés de la ficoline L.

Deux modalités de reconnaissance ont été mises en évidence : les ficolines H et M reconnaissent leur cible par l'intermédiaire d'un site conservé au sein des domaines de type fibrinogène alors que la ficoline L dispose d'une large surface de reconnaissance.

3.2.2 Les ficolines H et M : un seul site conservé

3.2.2.1 *Le site de reconnaissance est conservé*

Les études structurales de protéines à domaines de type FBG (Kairies *et al.*, 2001) ainsi que les alignements de séquences permettent de prédire un site de fixation conservé chez les ficolines. Ce site, que nous appellerons S1, est situé à proximité du site calcique et semble très conservé entre la Tachylectine (TL5a, 1jC9) et les ficolines M et L mais un peu moins en ce qui concerne la ficoline H. Les expériences de cristallisation des domaines de fixation des trois ficolines humaines ont montré que ce site fixe des sucres dans les ficolines H et M, par contre aucune fixation significative n'a été observée dans la ficoline L. De plus, nous avons obtenu une densité électronique résiduelle très bien définie en ce qui concerne les cristaux de ficoline M trempés dans des solutions de ligand à très haute concentration (500mM) pendant un temps très court (trempage simultané avec la cryoprotection). Ceci nous a permis d'orienter très précisément les ligands dans le site de la ficoline M. Au contraire, la densité résiduelle des ligands dans la ficoline H était moins précise, ce qui laisse un doute sur la précision du positionnement des ligands dans le site (figure 21).

La figure 22 montre la fixation des ligands dans le site S1 des ficolines et son homologue dans la Tachylectine. Ce site forme une poche aromatique en C-terminal des protomères. Une particularité de ce site est la présence d'une liaison en conformation cis (Asp253-Cys254 dans la ficoline M) qui permet d'exposer deux azotes de la chaîne principale qui vont participer à la fixation du ligand. Ces azotes stabilisent le plus souvent l'oxygène d'un groupement N-acétyle ou, dans le cas de la ficoline H, un oxygène du cycle carbone. Une troisième interaction semble essentielle à la fixation des ligands : la liaison hydrogène offerte par l'oxygène de la chaîne latérale d'une tyrosine conservée (Tyr271 dans la ficoline M). Elle

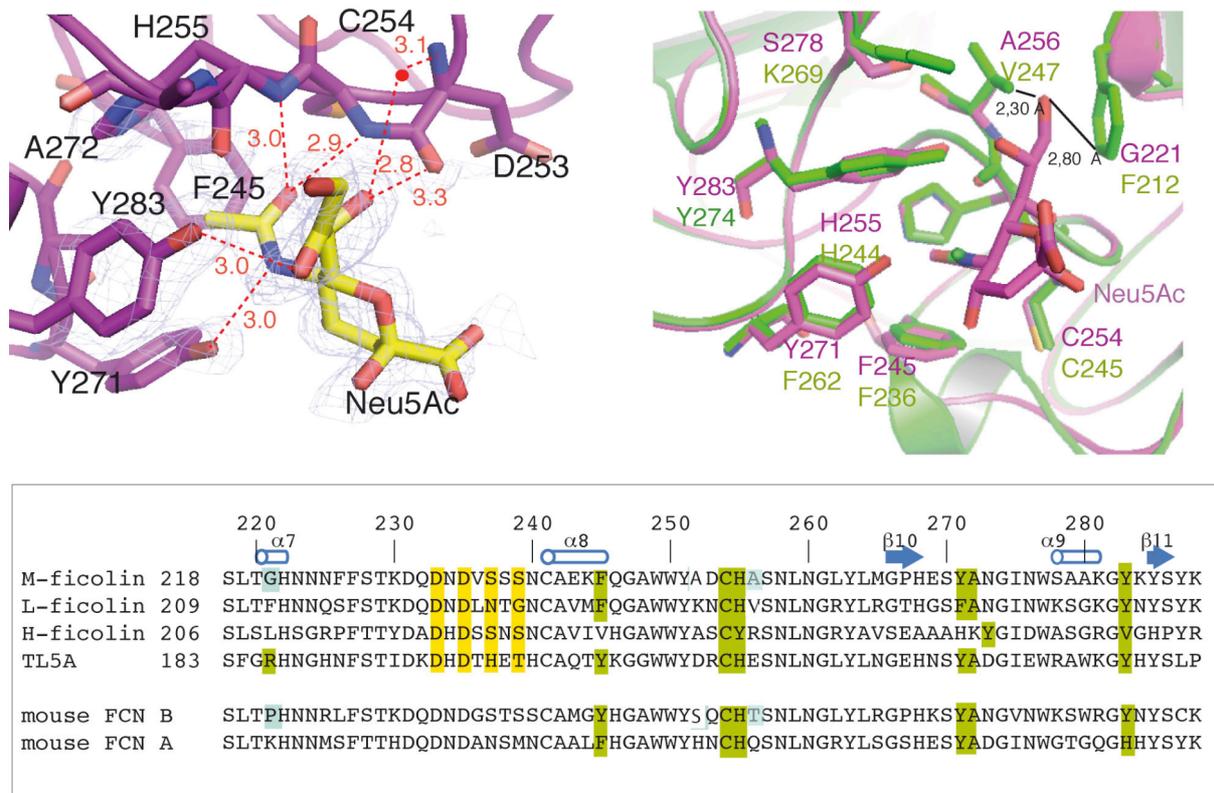


Figure 23: Reconnaissance de l'acide sialique.

A. Interaction de l'acide sialique Neu5Ac (jaune) dans le site externe de la ficoline M (résidus du site en bâtonnets violets et identifiés en noir) (2jhl). La carte de densité électronique (2Fo-Fc) est un filet bleu. B. Superposition des sites externes de la ficoline L (en vert) et de la ficoline M (en violet). La nature des résidus est indiquée en vert pour ceux de la ficoline L et en violet pour ceux de la ficoline M. Les traits noirs indiquent une gêne stérique. Les traits pointillés rouges indiquent une interaction polaire dont la distance est précisée en rouge à côté. C. Alignement des séquences des boucles formant le site externe des ficolines M, L et H humaines, A et B, murines avec la séquence de TL5A. Les structures secondaires sont représentées en bleu au dessus de l'alignement. Les résidus surlignés en vert sont les résidus conservés du site externe, les résidus surlignés en jaune ceux du site de fixation du calcium et les résidus surlignés en cyan sont ceux impliqués dans la reconnaissance du Neu5Ac.

stabilise l'azote du groupement N-Acétyle ou, dans le cas de la ficoline H, un oxygène du cycle carbone. De plus, le seul résidu du site remplacé entre les ficolines L et M est cette tyrosine. Cette seule mutation d'une tyrosine en phénylalanine semble inactiver le site dans la ficoline L. Des interactions supplémentaires complètent ces trois interactions conservées afin de stabiliser chaque ligand différemment.

Il semblerait que ce site soit avant tout un site de reconnaissance des groupements acétyles, en particulier dans la ficoline M. En effet, les trois interactions essentielles visent à stabiliser ce groupement, les autres interactions ne venant qu'en soutien. En ce qui concerne la ficoline H nous n'avons pas encore testé la fixation de dérivés N-acétylés mais uniquement de sucres non substitués. Même si les interactions principales sont conservées, ce site est tout de même assez éloigné des trois autres. En effet, la seconde tyrosine est remplacée par une valine, hydrophobe, non aromatique et plus petite. L'histidine et la phénylalanine sont remplacées par des tyrosines. Il y a donc une répartition différente des charges ainsi qu'une modification de la forme de la poche qui devient plus profonde et plus étroite. Nous pouvons supposer que ceci facilite l'accès au cycle pyranne des sucres non substitués, permettant ainsi leur fixation.

3.2.2.2 Particularité de la ficoline M : reconnaître l'acide sialique, un marqueur du soi

La capacité à fixer l'acide sialique est une particularité partagée uniquement par la ficoline M humaine et la ficoline B de souris. Les autres ficolines en sont incapables (Liu et al., 2005). L'acide sialique est essentiellement stabilisé dans le site S1 par son groupement N-acétyle selon les mêmes interactions que les autres dérivés acétylés. Le groupement sialylé est fixé via deux interactions avec la chaîne principale de la ficoline (figure 23A). Par contre, rien ne contre-indique au premier abord la reconnaissance de l'acide sialique par d'autres membres de la famille des ficolines.

En superposant le site de la ficoline L vide et celui de la ficoline M contenant l'acide sialique, une particularité du site de la ficoline M se dégage : les résidus situés à proximité du groupement sialylé sont de petite taille : Ala256 et Gly221 alors que la ficoline L aux mêmes positions possède des résidus encombrants : Val247 et Phe212 (figure 23B). La gêne stérique pourrait être importante. En effet, les résidus Val247 et Phe212 se trouveraient respectivement à 2,30Å et 2,00Å du groupement sialylé. L'alignement des séquences des ficolines humaines et murines avec TL5a montre que les ficolines M et B sont les seules à posséder des petits résidus à ces positions (figure 23C), en particulier à la position homologue de la Gly221. Nous pouvons donc en déduire que la reconnaissance de l'acide sialique par les ficolines pourrait dépendre essentiellement de la largeur de la poche de fixation.

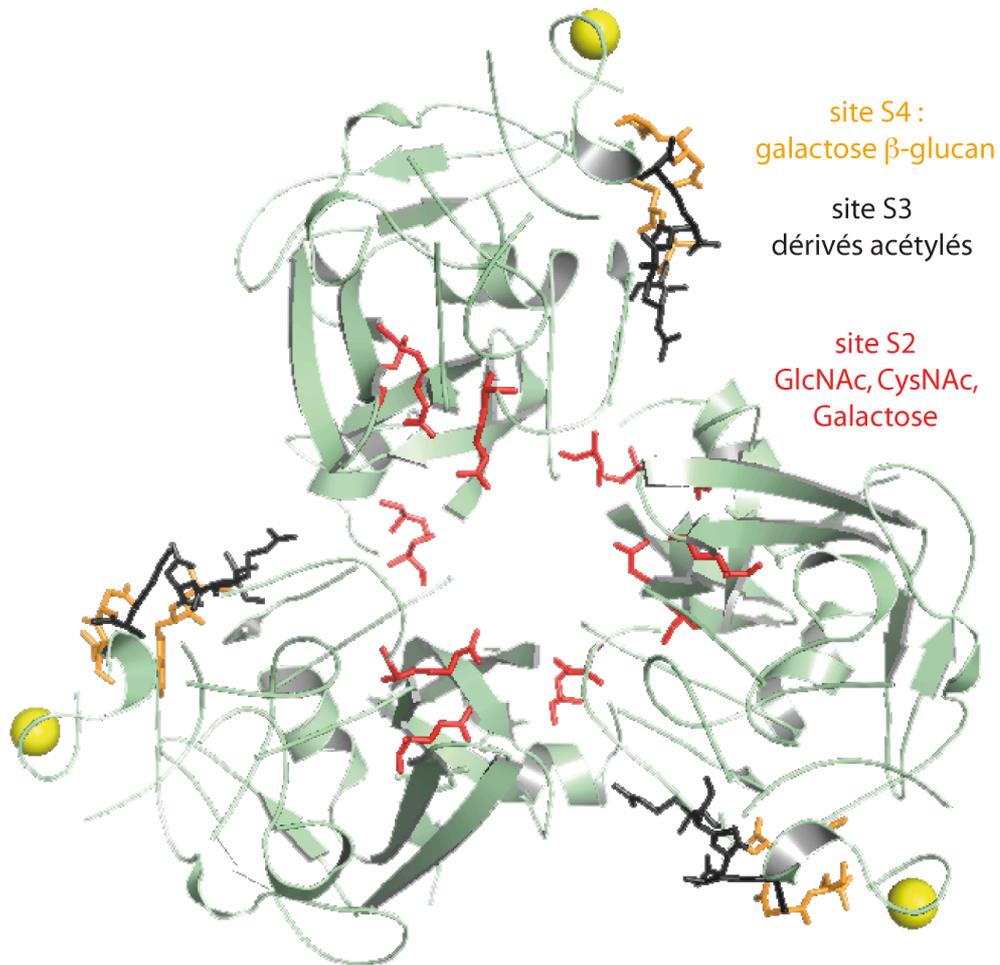


Figure 24: Localisations des sites de fixation de la ficoline L.

Le trimère de ficoline L est présenté en vert avec les résidus impliqués dans les sites de fixation en bâtonnets : rouges pour le site S2, noirs pour le site S3 et oranges pour le site S4. Les ligands de chaque site sont indiqués en rouge pour le site S2, en noir pour le site S3 et en orange pour le site S4. Les ions calcium sont représentés par des sphères jaunes.

3.2.3 La surface de reconnaissance de la ficoline L

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, le site conservé S1 ne semble pas fonctionnel dans la ficoline L, probablement à cause du remplacement d'une tyrosine par une phénylalanine en position 262. Nous avons vu en introduction que la ficoline L est capable de fixer un large spectre de ligands allant des dérivés acétylés de toute nature à des structures bactériennes complexes : le β -glucan ou les acides teichoïques. De plus, au premier abord tous ces ligands ne semblent partager aucune structure commune. Les expériences de co-cristallisation et de trempage sur les domaines de type FBG de la ficoline L nous ont mené à identifier trois nouveaux sites (figure 24) qui, comme nous le montreront, forment une véritable surface de reconnaissance.

3.2.3.1 *Localisation des sites de fixation de la ficoline L*

Une étude structurale extensive a été menée sur la ficoline L via l'utilisation de différents ligands glycosidiques ou non. Cette étude nous a permis d'identifier trois sites supplémentaires S2-S4 qui définissent une nouvelle surface de reconnaissance, s'étendant de chaque côté du sillon entre les parties hautes de deux protomères. La plupart des ligands se fixent sur les deux sites majeurs S2 et/ou S3, principalement via des résidus polaires ou chargés. Le site interne S2 est situé à l'interface entre deux protomères et contient les résidus Ser91, Glu109, Glu111, Arg122, Asp282 et Lys284 de l'un des protomères ainsi que la Ser143 du second protomère. S3 est situé à une position intermédiaire entre S2 et le site de fixation du calcium. Il implique les résidus : Arg132, Gln133, Thr136 et Lys221. S4 est situé directement après S3 du côté du site calcique et contient les résidus hydrophobes Trp135 et A136 ainsi que les résidus polaires Glu222 et Gln223. Ce site apparaît comme un site de fixation mineur dans notre étude puisqu'il n'a fixé que deux sucres différents.

3.2.3.2 *Reconnaissance d'un large spectre de dérivés acétylés dans des orientations variables.*

La ficoline L a été considérée dès les premières données comme une protéine de reconnaissance des dérivés acétylés. Nous avons donc commencé par tester ces ligands dans nos cristaux. Nous n'avons pas obtenu des cartes de densités électroniques résiduelles bien définies (Fo-Fc). Le plus souvent les densités résiduelles laissaient imaginer quelques positions possibles pour le ligand mais nous avons dû utiliser la cohérence entre les distances atomiques et la densité résiduelle pour être capables de les orienter correctement. Nous avons

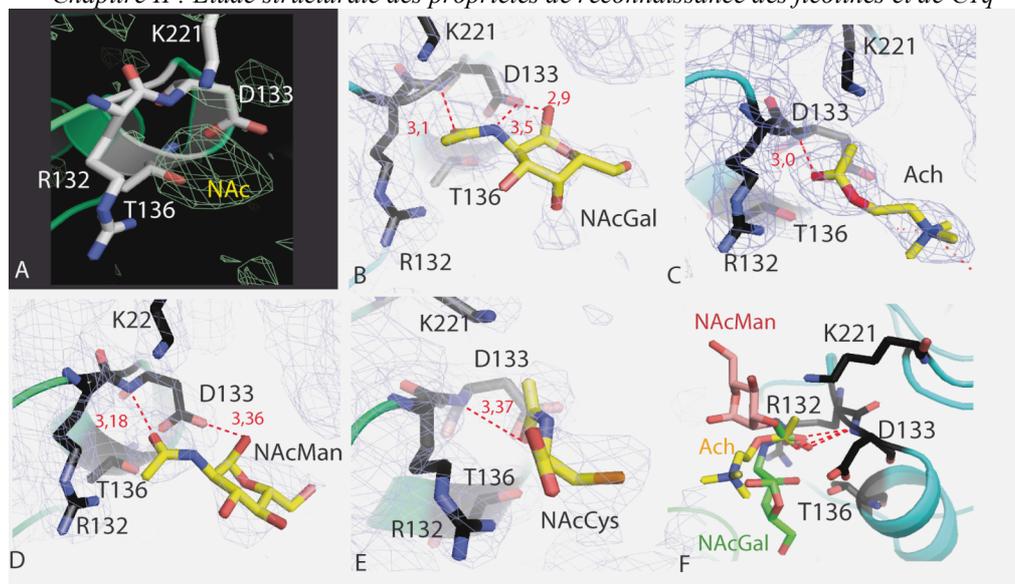


Figure 25 : Fixation des dérivés acétylés dans le site intermédiaire S3 de la ficoline L.

Les traits pointillés sont les interactions polaires, la carte de densité électronique (Fo-Fc) est un filet bleu et la carte de densité électronique résiduelle (Fo-Fc) en filet vert. Les résidus noirs sont les résidus du site S3. A. Carte de densité électronique résiduelle dans le site intermédiaire avant insertion NAcMan (2j0g) B. Site en présence de NAcGal (2j3f) C. Site en présence d'acétylcholine (2j0h). D. Site en présence de NAcMan (2j0g). E. Site NAcCys (2j2p) F. Superposition d'une position du NAcGal (vert), du NAcMan (rose) et de l'acétylcholine (jaune) dans le site S3.

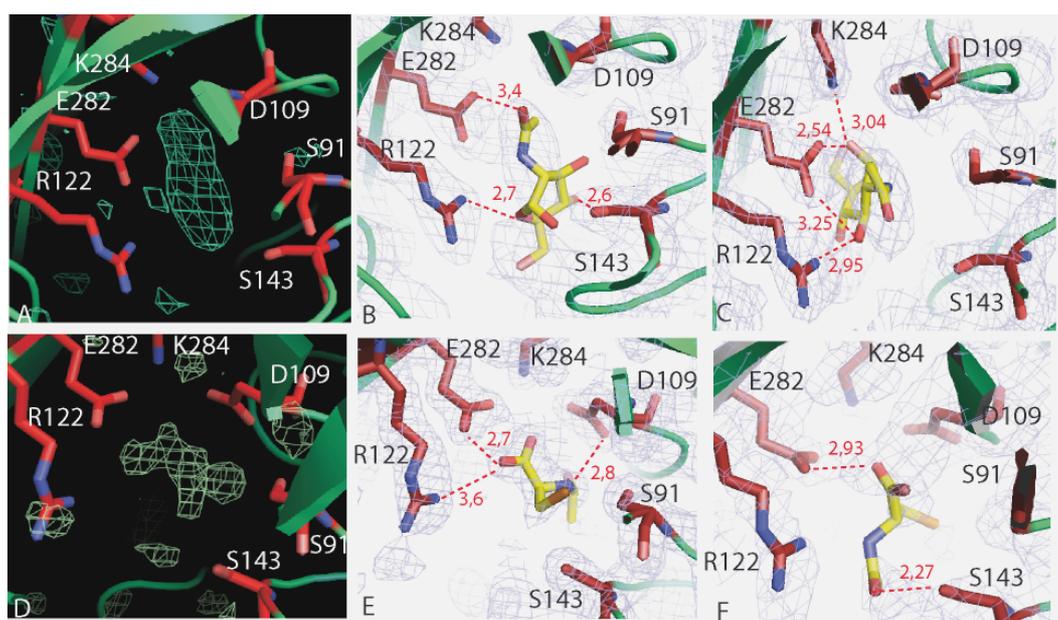


Figure 26: Fixation des dérivés acétylés dans le site interne S2 de la ficoline L.

Les traits pointillés sont les interactions polaires, la carte de densité électronique (2Fo-Fc) est un filet bleu A,B,C. Ficoline L en présence de NAcGlc (2j30) A. Carte de densité électronique résiduelle observée (Fo-Fc, vert) avant de placer le ligand de B. Position 1 du NAcGlc C. Position 2 du NAcGlc. D,E,F. Ficoline L en présence de NAcCys D. Carte de densité électronique résiduelle observée (Fo-Fc, vert) avant de placer le ligand de E. Position du NAcCys (2j1g) F. Position de NAcCys (2j2p).

également, dans la majorité des cas, joué sur l'occupation des atomes et ce pour différentes raisons :

- Certaines rotations semblent être autorisées dans les sites. Certains atomes peuvent donc ne pas être définis en densité (occupation 0).
- Certains ligands peuvent être trouvés à deux positions différentes dans le cristal et il est essentiel d'attribuer un taux d'occupation correct à la position majoritaire.

Le premier site identifié au cours de notre étude est le site intermédiaire S3 qui semblait fixer tous les dérivés acétylés. La modélisation des ligands dans ce site a posé des problèmes majeurs. Tout d'abord, pour la plupart des molécules acétylées, seul le groupement acétyle était identifiable par la carte de densité électronique résiduelle, indiquant des mouvements importants du reste de la molécule (figure 25AF). L'acétylcholine est une exception dans ces motifs car une densité électronique bien définie, indiquant une orientation unique, a été observée à de faibles concentrations en ligand (figure 25C). Ceci doit être dû à la relative rigidité de cette molécule. Ensuite, les facteurs d'agitation thermique (B) de ces ligands augmentaient fortement au cours de l'affinement s'éloignant des facteurs B des résidus environnants. Afin de palier à ce problème, nous avons eu recours à l'utilisation des tenseurs TLS. Cet outil permet d'imposer une évolution cohérente des facteurs B dans une molécule à partir d'un point fixe dont l'agitation thermique est faible : le résidu 144. Nous avons ainsi réussi à rétablir une cohérence entre l'agitation des résidus du site S3 et celle des ligands. Une fois ces problèmes résolus, nous avons pu observer que la seule contrainte pour se fixer dans le site était de posséder un groupement acétyle dont l'oxygène est capable d'interagir avec l'azote de l'Asp133. Certains dérivés acétylés forment des liaisons hydrogène supplémentaires avec les résidus du site (figure 25).

Dans le site S2, les quelques techniques présentées en début de paragraphe (occupations, distances inter atomiques) ont suffi pour orienter les ligands acétylés malgré des densités électroniques résiduelles peu précises (figure 26AD). Seuls deux dérivés acétylés, NAcCys et NAcGlc ont été observés et le groupement acétyle n'est pas reconnu de la même façon dans les deux cas. De plus, plusieurs orientations peuvent être modélisées pour le même ligand sur des protomères différents ou selon les formes cristallines (figure 26BCEF). Ainsi, la topologie particulière du site S2, avec des chaînes polaires ou chargées arrangées sous forme d'anneau, fournit un site de fixation alternatif pour les groupements N-acétylés, avec pour conséquence une versatilité dans la fixation de ces petits ligands. De plus, la forme de la cavité du site S2

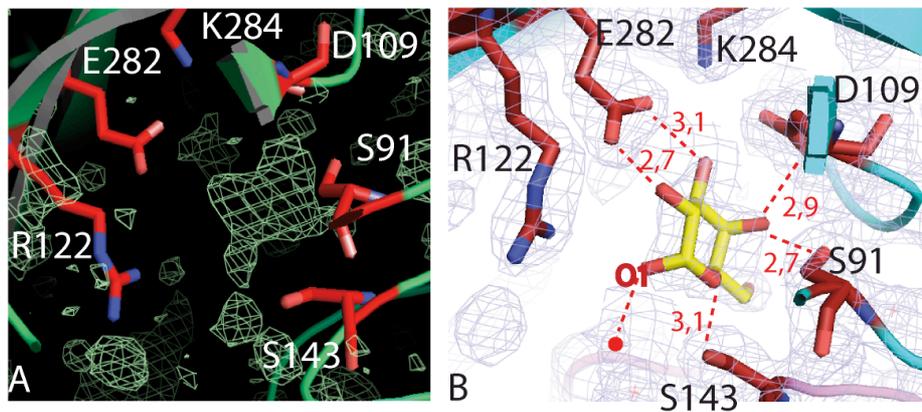


Figure 27: Fixation du galactose dans le site interne S2 de la ficoline L (2j3u).

Les traits pointillés rouges représentent les interactions polaires. Le filet bleu pâle représente la carte de densité électronique (2Fo-Fc) et le filet vert la carte de densité électronique résiduelle (Fo-Fc). A. Carte de densité électronique résiduelle avant de placer le galactose. B. Fixation du galactose dans S2.

peut être modulée par la plasticité à l'interface entre les protomères ce qui explique sûrement la possibilité d'avoir plusieurs orientations pour des ligands de petite taille.

Contrairement à la reconnaissance très spécifique du NAcGlc par TL5a (Kairies *et al.*, 2001) ou la ficoline M, la spécificité de la ficoline L pour les composés acétylés ne s'explique pas par un unique mode de reconnaissance au niveau atomique. À la place, la reconnaissance de ces molécules semble impliquer un minimum de spécificités structurales pour le groupement acétyle et aucune pour le reste de la molécule. Cependant, ceci est cohérent avec la capacité de la ficoline L à fixer un large spectre de ligands (Krarup *et al.*, 2004).

3.2.3.3 Reconnaissance très spécifique des sucres neutres

Suite à des données supplémentaires sur la reconnaissance du galactose (N. Thielens, Résonance Plasmonique de Surface) et du β -glucan (Ma *et al.*, 2004) par la ficoline L, nous avons trempé nos cristaux dans des solutions contenant ces deux sucres neutres. Les données de diffraction nous ont permis d'observer des densités électroniques résiduelles dessinant très bien les contours de ces deux ligands (figure 27A et 28A). Nous avons pu ainsi orienter correctement ces molécules et placer chaque atome dans la densité électronique. Ceci reflète probablement un mode de reconnaissance unique et très spécifique pour chacun d'entre eux avec une possibilité de mouvement très faible autour de cette position.

La fixation du galactose dans les cristaux a été testée par trempage suite à des résultats de Résonance Plasmonique de Surface montrant qu'à la fois la ficoline L recombinante et la ficoline L plasmatiques fixent spécifiquement de la BSA-galactose immobilisée ($K_d = 0,8$ nM) (N. Thielens). Le galactose se fixe essentiellement dans le site S2, malgré une fixation mineure dans S4. Tous les atomes d'oxygène du cycle pyranne sont stabilisés dans le site S2 via une, voire deux liaisons hydrogène. Ces liaisons impliquent les groupements carboxyles de Asp282 et Glu109 (2-, 3- et 4-OH), le groupe hydroxyle de Ser91 (4-OH) et Ser143 (5-OH) et le groupe carboxyle de Glu111 (6-OH). Le groupe 1-OH interagit avec une molécule d'eau orientée vers le canal de solvant, dans une position mimant une liaison avec une chaîne glycosidique (figure 27B). En conséquence, il est tentant de postuler que le site S2 fournit une poche de reconnaissance pour le galactose terminal d'une chaîne glycosidique.

Une autre densité électronique joliment définie a été obtenue pour l'oligosaccharide linéaire 1-3- β -D-glucan, composé de quatre glucoses en liaison β -1-3 (figure 28A). Les trois premiers glucoses de la chaîne sont arrangés de façon linéaire et se fixent à la Ficoline L via des interactions nécessitant les sites S3 et S4 formant ainsi un réseau d'interactions directes ou

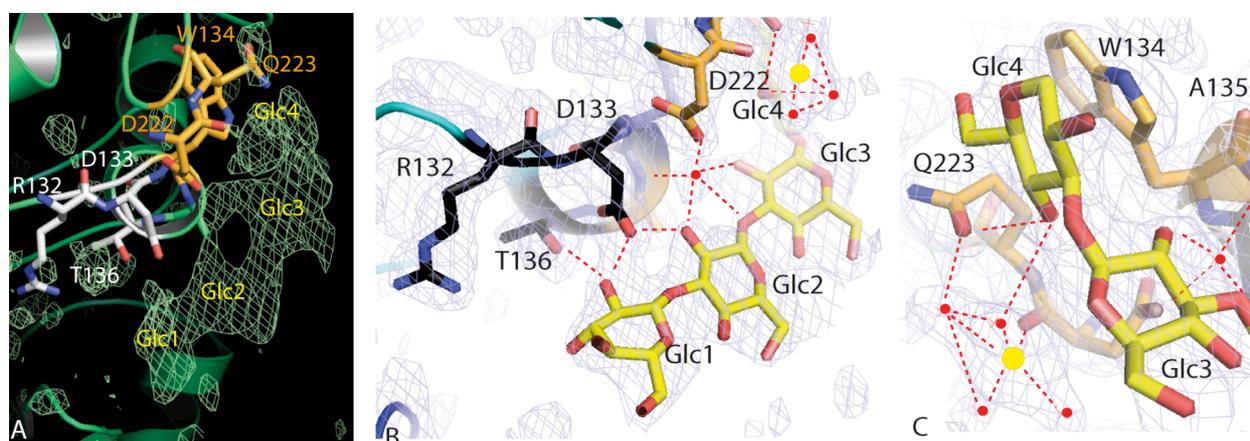


Figure 28 : Reconnaissance du β -glucan par la ficolline L (2j0y).

Les traits pointillés sont les interactions polaires, les points rouges les molécules d'eau et le point jaune un atome de calcium. La carte de densité électronique (2Fo-Fc) est un filet bleu et la carte de densité électronique résiduelle (Fo-Fc) un filet vert. Les résidus noirs sont les résidus du site S3 et les résidus oranges ceux du sous-site S4. A. Carte de densité électronique résiduelle avant de placer le β -glucan. B,C Fixation du β -glucan.

médiées par une molécule d'eau stabilisant les groupements 2-OH des glucoses (figure 28B). Le dernier glucose s'incurve et interagit dans le site S4 via une interaction d'empilement avec la chaîne latérale du Trp134. Une stabilisation supplémentaire du 4-OH est fournie par un réseau de liaisons hydrogène impliquant la chaîne latérale de Gln223 et un ion calcique additionnel essentiellement coordonné par des molécules d'eau (figure 28C). La ficoline L est la seule protéine sérique capable de fixer le β -D-glucan, un marqueur moléculaire des levures et champignons. C'est la première description d'une modalité d'interaction entre ce polymère et une molécule de reconnaissance.

Des essais de modélisation à partir de nos structures montrent qu'il y a la place derrière le glucose 1 pour ajouter un sucre acétylé dont le groupement acétyle interagirait avec l'azote du Asp133 du site intermédiaire. Ceci laisse supposer que ce site intermédiaire aurait comme rôle la stabilisation d'un sucre acétylé d'une chaîne polysaccharidique et non des petits ligands acétylés isolés. Ceci expliquerait la versatilité de reconnaissance décrite précédemment.

3.2.4 Ces sites S2 et S3 existent-ils potentiellement sur les ficolines M et H ?

Afin de comprendre les déterminants structuraux des sites de la ficoline L, nous avons comparé les structures des ficolines H et M avec la ficoline L par superposition.

En ce qui concerne le site intermédiaire S3 celui-ci est très peu conservé entre les ficolines :

- Dans la ficoline M : la Thr136 est remplacée par une alanine
- Dans la ficoline H : les résidus Asp133, Thr136 et Lys221 de la ficoline L sont remplacés respectivement par deux sérines et une tyrosine.

En ce qui concerne le site interne S2, la situation est plus complexe. Ce site est localisé à l'interface entre deux protomères et, comme nous l'avons vu plus haut, cette interface est très conservée entre les ficolines. Dans la ficoline H, on observe le remplacement de Glu282 par une arginine. Celle-ci prend l'espace destiné au ligand au centre de l'anneau de résidus polaires. Il semblerait donc qu'il y ait une gêne stérique au positionnement d'un ligand dans le site interne sur la ficoline H. Le site interne de la ficoline M est parfaitement identique à celui de la ficoline L. De plus, certaines expériences de trempage ont montré des cartes de densité électronique résiduelle mal définies dans le site interne de la ficoline M. Malheureusement, il n'a pas été possible de placer de ligands vu la faible qualité de la carte différence. Ceci peut s'expliquer par la proximité de l'axe de symétrie d'ordre 3. Il ne faut pas oublier non plus qu'une plasticité élevée des interfaces a été observée dans la ficoline L comparée aux deux

PDB code	Ficoline	Résolution haute/basse (Å) (dernier)	R _{work} /R _{free} (%)	R.m.s.d. Liaison/Angle (Å/°)	Facteur B moyen Protéine/Ligand (Å ²)	Ramachandran ^a RF/RAA/RAE/RI (%)
2jhh	M	1.70-28.03 (1.70-1.74)	21.9 / 25.1 (26.0 / 30.0)	0.009/1.27	22.55	87.3/12.4/0.3/0.0
	H	2.59-19.73 (2.59- 2.66)	24.4 / 28.8 (29.8 / 35.0)	0.038/3.024	22.82	80.7/17.4/1.7/0.2
	L	2.7-19.87 (2.7-2.77)	19.9-28.8 (27.2-34.4)	0.040 / 3.22	44.57	71.2/26.3/2.2/0.2

^a RF :Régions Favorables; RAA :Régions Autorisées Additionnelles; RAE :Régions Autorisées Elargies; RI : Régions Interdites

Tableau XVII : Statistiques d'affinement des ficolines à pH acide

Interruption	Code PDB	Sous-unité	Boucle
277-288	2JHH ^b	C	L4
277-286	2JHH ^b	F	L4
262-268 ^a	2D39 ^c	A	L3
79-81 ^a	2D39 ^c	B	
260-268 ^a	2D39 ^c	B	L3
274-281 ^a	2D39 ^c	B	L4
79-82 ^a	2D39 ^c	C	

^a Numérotation correspondant à nos constructions ^b Etude du laboratoire ^c Tanio *et al.*

Tableau XVIII : Interruptions de structure correspondant aux segments désordonnés à pH 5,6.

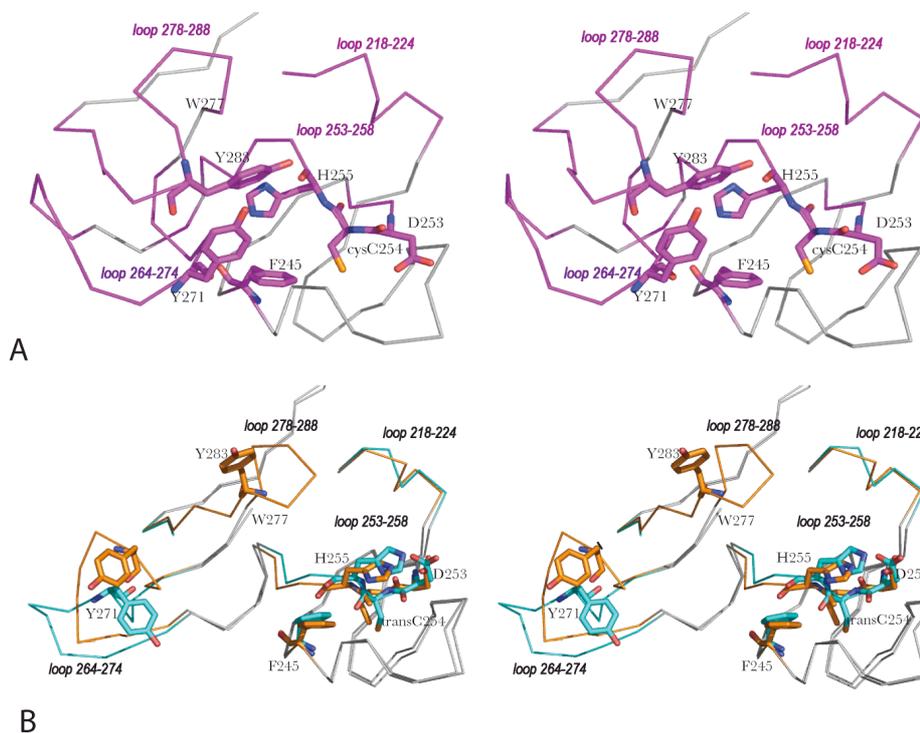


Figure 29 : Destruction du site S1 lors du changement conformationnel à pH 5,6.

Vues stéréoscopiques A. La conformation active du site à pH 7 implique quatre boucles externes du domaine P. B. Conformation du site en état inactif à pH 5,6. La structure déterminée dans notre étude (cyan) et la structure obtenue précédemment par Tanio et al. (orange) sont superposées. Le changement de pH détruit les quatre boucles du site S1.

autres ficolines. Cette plasticité facilite certainement l'accès du ligand au site interne. De plus, pour la ficoline M nous avons réalisé des trempages rapides, limitant certainement la diffusion dans le site S2.

3.3 Contrôle par le pH de l'activité de reconnaissance de la ficoline M

D'après la littérature, l'activité de fixation de la ficoline M semble sensible au pH, et la structure obtenue de celle-ci à pH 5,6 montre des conformations différentes des boucles autour du site S1 (Tanio *et al.*, 2007). Ces différences de conformations entre leur structure en conditions acides et nos structures à pH 7 pouvaient être liées à la présence de l'étiquette additionnelle C-terminale sur leurs domaines ou à un effet du pH. Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé des cristaux des trois ficolines à pH 5,6. Les structures à pH 5,6 ont été résolues en utilisant comme modèles nos structures à pH 7 (tableau XVII).

Pour les ficolines L et H, l'analyse des cristaux à pH 5,6 n'a révélé aucune différence structurale avec les domaines à pH 7. Par contre, pour la ficoline M, nous avons tout de suite observé des densités électroniques mal définies autour du site S1 ainsi que de nombreuses densités résiduelles alors que le reste de la structure était totalement identique. Nous avons ainsi reconstruit les boucles ayant changé de conformation lorsque les informations le permettaient. En effet, certaines boucles n'ont pas pu être reconstruites par manque d'information quant à la densité électronique, ceci étant certainement dû à une grande flexibilité (tableau XVIII). Dans l'ensemble cette forme acide de la ficoline M est très proche de la forme neutre puisque le rmsd global est de l'ordre de 0,7Å. Par contre, autant les domaines A et B sont identiques (rmsd 81-219 de 0,5Å) autant le domaine P contenant le site S1 est largement modifié (rmsd 3,8Å). Quelles sont les conséquences pour le site de fixation des ligands ?

Comme l'avaient décrit Tanio *et al.*, à pH acide, il y a un changement de conformation de la boucle portant la liaison cis Cys254-Asp253 (boucle L2 253-258) qui est alors modifiée en configuration trans, n'exposant plus les deux azotes de la chaîne principale au ligand. Cela se traduit également par un déplacement d'une amplitude de 6Å de cette boucle qui vient se placer à la place du groupement acétyle du ligand et la chaîne latérale de l'His255 occupe l'espace qui correspond à la poche du ligand. Trois autres boucles portant les résidus du site de fixation se déplacent (figure 29) :

- La boucle L1 allant des résidus 218 à 224 se déplace avec une faible amplitude modifiant la position de Gly221, importante dans la position de l'acide sialique.

Code PDB	Sous-unité	pH	Ligand	Facteur B		Facteur B		Facteur B		Facteur B		B moyen de la structure complète
				moyen L1	RBB ^a L1	moyen L2	RBB ^a L2	moyen L3	RBB ^a L3	moyen L4	RBB ^a L4	
2JHM ^b	F	7.0	aucun	11,33	-2,83	8,94	23,33	14,58	25,04	12,44	6,69	11,66
2JHK ^b	F	7.0	NAcGlc	18,89	-10,05	16,73	20,33	29,39	39,95	25,11	19,57	21,00
2JHI ^b	F	7.0	NAcGal	24,4	-3,56	20,11	20,51	30,42	20,24	27,61	9,13	25,30
2JHL ^b	F	7.0	Neu5Ac	27,18	-0,80	22,10	19,34	32,12	17,23	30,30	10,58	27,40
2JHH ^b	F	5.6	aucun	24,7	9,34	31,90	41,21	33,63	48,87	27,27	20,72	22,59
2JHH ^b	C	5.6	aucun	25,3	12,59	31,05	38,18	33,87	50,73	28,51	26,88	22,47
2D39 ^c	A	5.6	aucun	40,38	126,98	21,19	19,11	29,85	67,79	30,21	69,81	17,79
2D39 ^c	B	5.6	aucun	41,22	96,77	35,12	67,64	34,31	63,77	28,80	37,47	20,95
2D39 ^c	C	5.6	aucun	19,45	-12,23	37,58	69,58	32,28	45,65	28,77	29,83	22,16

^a RBB : ratio B des boucles = (B moyen de la boucle - B moyen du protomère)*100/ B moyen du protomère ^b Notre étude ^c Tanio *et al.*

Tableau XIX : Analyse détaillée des facteurs B des différentes structures de la Ficoline M.

pH	L1	L2	L3	L4
7.0	-4.3	-20.9	25.6	11.5
5.6	46.7	47.1	55.4	36.9

Tableau XX : Ratio B moyen des boucles selon le pH

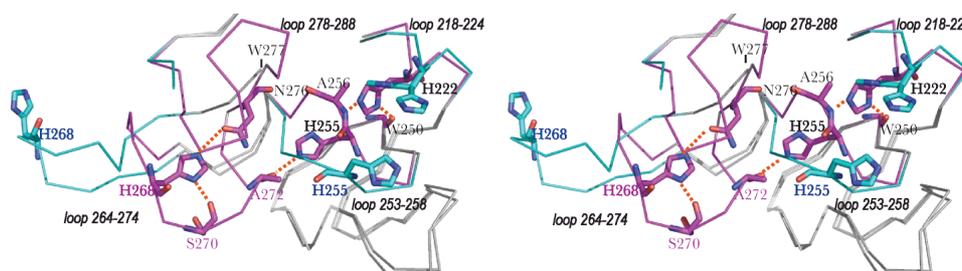


Figure 30 : Le rôle de stabilisation des histidines à pH 7 se perd à pH 5,6.

Superposition de l'état actif (magenta) et de l'état inactif (cyan) du site de fixation des ligands de la ficoline M illustrant le rôle fondamental des histidines. Les liaisons hydrogène sont indiquées en traits rouges pointillés.

- La boucle L3 allant des résidus 264 à 274 emporte 12Å plus loin la Tyr271 essentielle à la stabilisation des groupements N-acétyles.
- La boucle L4 allant des résidus 278 à 288 déplace de 6Å la Tyr283.

Certains résidus entre ces boucles peuvent être vus comme des résidus d'ancrage dont la position n'est absolument pas modifiée, par exemple, le Trp277. Ces mouvements bien définis de boucles autour du site actif laissent supposer que ce changement de conformation pourrait être impliqué dans une régulation de l'activité de la ficoline M.

Comme le montre le tableau XIX, de nombreux segments désorganisés sont trouvés dans les boucles L3 et L4 dans les deux structures obtenues à pH 5,6. Ceci montre une forte flexibilité de ces boucles, ce qui est cohérent avec l'observation selon laquelle ce sont les boucles les plus déplacées par comparaison avec la forme à pH 7 (figure 29).

Une analyse détaillée des facteurs B moyens dans les boucles L1-L4 de la ficoline M est présentée tableau XIX. Nous avons appelé « ratio B de la boucle » l'écart entre le facteur B de la boucle et celui de la structure complète. Un ratio positif signifie que la boucle est plus agitée que l'ensemble de la structure. Les ratios positifs les plus élevés sont observés pour la boucle L1 dans la structure à pH acide obtenue par Tanio *et al.* montrant une forte augmentation de la flexibilité de cette boucle en conditions acides. Au contraire, dans les structures en conditions neutres, les ratios sont négatifs indiquant une très forte stabilisation de cette boucle. Afin d'avoir une vue plus claire sur l'augmentation de flexibilité des boucles en conditions acides, le tableau XX récapitule les ratios moyens pour chaque boucle en fonction du pH.

S'il semble clair que la structure du site de fixation de la ficoline M est modifiée à pH acide, il semble important de décrire un mécanisme potentiel expliquant un déplacement concerté de ces quatre boucles. Tanio *et al.* ont estimé à 6,2 le pKa de la régulation de l'activité de fixation du NAcGlc par le pH. Cette valeur est très proche du pKa d'un groupement imidazole (6,8). Nous avons donc supposé que la protonation du groupement imidazole d'histidines pouvait être à l'origine des mouvements de boucles. De plus, les histidines ont déjà été impliquées dans des phénomènes de régulation des protéines par le pH (Xu *et al.*, 2001). Nous pouvons identifier trois histidines potentiellement impliquées dans ce phénomène dans les boucles L1 à L4 : His268, His255 et His222. Les chaînes latérales de ces trois histidines forment des liaisons hydrogène à pH 7 avec certains acides aminés stabilisant ainsi les quatre boucles : His222 avec Trp250, His255 avec Ala272 et His268 avec Ser270 et Asn276. Si nous regardons maintenant la structure à pH 5,6, ces

PDB code	Ligand	Résolution haute/basse (Å) (dernier)	R _{work} /R _{free} (%)	R.m.s.d. Liaison/Angle (Å/°)	Facteur B moyen Protéine (Å ²)	Ramachandran ^a RF/RAA/RAE/RI (%)
2jg9	aucun	1.95-15 (1.95-2.017)	21.2 / 25.4 (20.0 / 25.5)	0.008/1.458	12.98	86.0/12.8/0.9/0.3
2jg8	Phosphoserine	2.05-19.94 (2.05-2.121)	17.7 / 23.8 (18.2 / 27.6)	0.007/1.019	16.57	85.6/12.9/1.4/0.2

^a RF :Régions Favorables; RAA :Régions Autorisées Additionnelles; RAE :Régions Autorisées Elargies; RI : Régions Interdites

Tableau XXI : Statistiques d'affinement des têtes globulaires de C1q

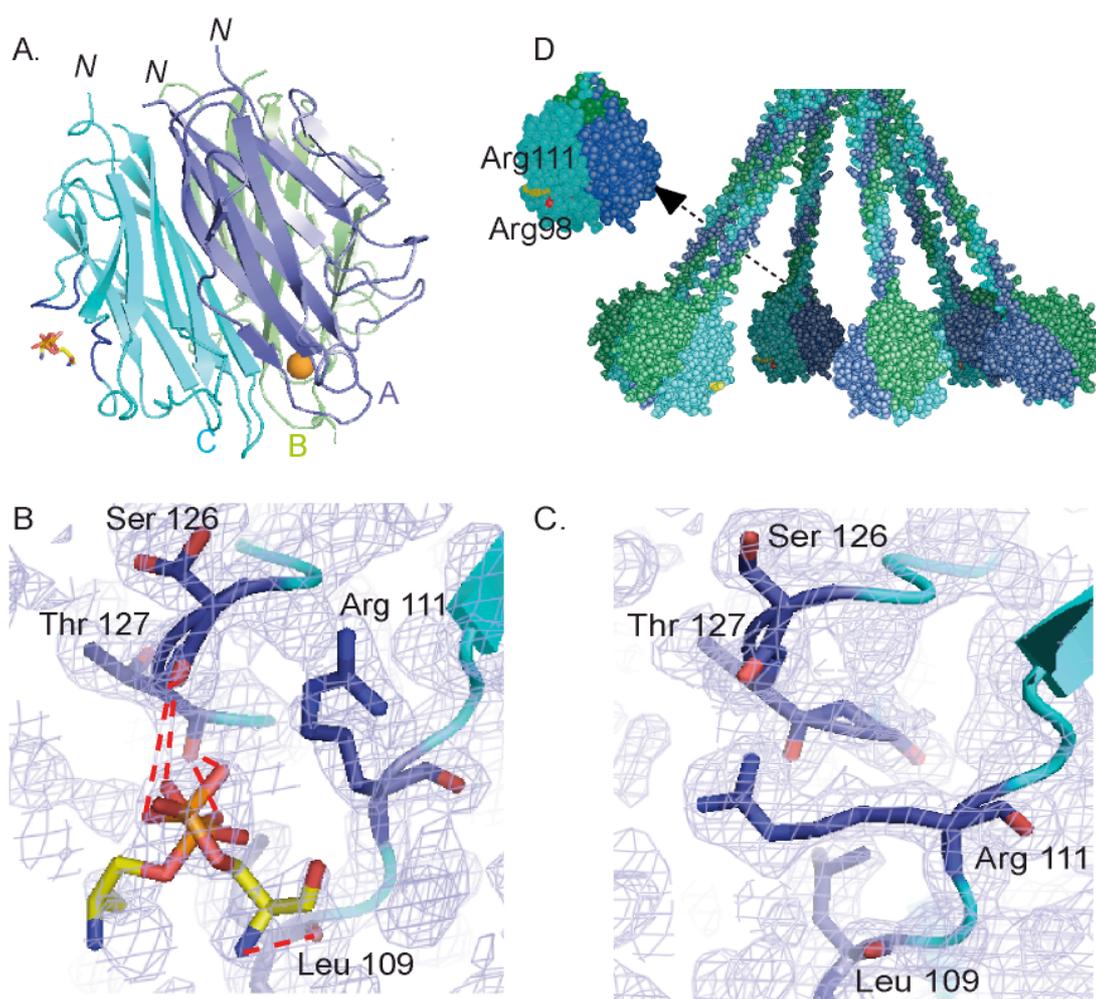


Figure 31 : Site de fixation potentiel de la phosphosérine sur les têtes globulaires de C1q.

A. Localisation de la phosphosérine sur la sous-unité C. B. Deux positions possibles pour la phosphosérine dans le site. Les liaisons hydrogènes sont indiquées en pointillés rouges et la carte de densité électronique (Fo-Fc) par un filet bleu. C. Site en absence de ligand. D. Localisation du site sur un modèle de la molécule entière de C1q.

interactions ont totalement disparu (figure 30). Compte tenu de l'amplitude des déplacements et de la flexibilité relative de chaque boucle, nous pouvons supposer que le mouvement commencerait au niveau de l'histidine 222 (boucle L1) supprimant son interaction avec la boucle L2, ce mouvement se propageant alors vers les boucles L3 et L4 avec une amplitude croissante.

3.4 C1q reconnaît un marqueur des cellules apoptotiques

Les études menées au Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire par Helena Paidassi ont montré par diverses techniques (résonance plasmonique de surface, cytométrie en flux, microscopie à fluorescence) que le C1q reconnaît la phosphatidylsérine, un marqueur de l'apoptose (Paidassi *et al.*, 2008). Afin de déterminer le site de fixation de cette molécule sur les têtes globulaires, nous avons entrepris la cristallisation du complexe. Pour cela, nous avons utilisé deux stratégies : la co-cristallisation avec le glycérophosphatidylsérine et le trempage des cristaux de tête globulaire avec de la phosphosérine. Aucune densité électronique résiduelle n'a été observée dans le cas de la co-cristallisation ou d'un trempage court de deux heures. Par contre, après deux jours de trempage dans une solution de phosphosérine, une densité électronique supplémentaire a pu être mise évidence dans les cristaux (tableau XXI).

Cette densité électronique a permis de placer la phosphosérine dans la structure de C1q sur la sous-unité C au niveau de deux boucles de surface (108-111 et 126-129) dans deux conformations alternatives. Dans les deux positions, le groupe phosphoester est stabilisé via des liaisons hydrogène par les carbonyles 126 et 127 de la chaîne principale et via des interactions électrostatiques avec l'arginine 111 (figure 31). Si l'on se réfère à notre modèle de la molécule de C1q, le site serait localisé sur la face interne du cône C1q et orienté vers la surface de la cible. La chaîne latérale de l'Arg111, qui est impliquée dans les contacts cristallins dans la structure native, est déplacée vers l'intérieur de la protéine en présence de phosphosérine. Cette molécule est donc en partie stabilisée par des interactions avec la boucle de surface (158-162) de la sous-unité A de la molécule voisine. Même si la phosphosérine est clairement attirée vers cette position observée dans le cristal, sa position est fortement contrainte par l'arrangement cristallin et pourrait être légèrement différente de celle observée dans une situation physiologique. Cette hypothèse est corrélée avec les résultats de Résonance Plasmonique de Surface qui montrent que le complexe entre les têtes globulaires de C1q et la phosphosérine implique des interactions minimales avec la partie sérine (Paidassi *et al.*, 2008).

Dans ces conditions, la zone voisine située entre l'Arg111 et l'Arg 98, qui n'est pas accessible dans le cristal, apparaît comme un site de fixation alternatif. Cette position rapprocherait encore le groupement phosphosérine de la surface.

La structure observée supprime l'hypothèse d'une fixation de la phosphosérine à côté du site calcique, qui est lui très accessible dans le cristal. De plus, il avait été observé par Résonance Plasmonique de Surface (Paidassi *et al.*, 2008) que la fixation est la même en présence ou en absence d'ions calciques. Le site de fixation observé est donc très différent des sites connus pour la phosphatidylsérine comme celui de l'annexine V (Campos *et al.*, 1998) ou de la protéine kinase C qui impliquent tous deux des liaisons au calcium.

4 DISCUSSION

4.1 Qu'apportent les études structurales sur l'analyse des déterminants de la reconnaissance ?

4.1.1 Le rôle du calcium dans les propriétés reconnaissance des ficolines et de C1q

Nous avons vu en introduction que les ions calcium ont un rôle central dans les interactions au sein des complexes initiateurs (Gaboriaud *et al.*, 2007). Les propriétés de reconnaissance des collectines, comme la MBL, dépendent directement du calcium. En effet, les ligands se fixent via un des calciums présents sur le domaine de reconnaissance. En ce qui concerne les ficolines, la dépendance vis-à-vis du calcium n'a pas été clairement établie et est une question débattue dans la communauté scientifique (Ng *et al.*, 1996). Pour certains ligands, une baisse d'affinité a été observée en présence d'EDTA (Matsushita *et al.*, 1996; Krarup *et al.*, 2004). Pour le C1q, la dépendance au calcium dépend également du ligand considéré. Nos résultats d'interactions ne montrent aucune fixation de ligand *via* le calcium du domaine fibrinogène des ficolines. Le seul calcium impliqué dans des interactions avec un ligand est le calcium additionnel qui se fixe au β -glucan mais rien n'indique que sa présence soit nécessaire et physiologique. Il semblerait donc que l'effet de l'EDTA sur les ficolines soit indirect, le calcium stabilisant la structure du site de fixation.

En ce qui concerne le C1q, la phosphosérine se fixe sur la sous-unité C des têtes globulaires. Contrairement à ce que laissaient supposer les données précédentes sur la reconnaissance de la phosphosérine par l'annexine V (Campos *et al.*, 1998), cette reconnaissance n'implique pas l'ion calcium.

4.1.2 Les sites de fixation identifiés précisent la nature des micromotifs reconnus par les trois ficolines

4.1.2.1 *Un site conservé de reconnaissance des dérivés acétylés*

Nous avons décrit des sites de fixation des ligands dans les ficolines. Chacun de ces sites possède une organisation particulière qui détermine les ligands qui s'y fixent. Le site externe, conservé au sein des domaines fibrinogènes, semble dessiné pour fixer les ligands N-acétylés. En effet, les structures obtenues avec la ficoline M montrent que trois interactions permettent de stabiliser le groupement N-acétyle dont deux avec les azotes de la chaîne principale en

liaison cis et une avec la tyrosine notée 271 dans la ficoline M. Ces trois interactions sont conservées pour la fixation du NAcGlc dans la tachylectine (Kairies *et al.*, 2001). Afin de confirmer l'importance de ces interactions dans la stabilisation du groupement N-acétylé, des expériences de mutagenèse dirigée sont prévues au moins concernant la Tyr271. Bien que nous n'ayons pas encore testé la fixation des dérivés acétylés sur la ficoline H, nos résultats suggèrent qu'elle possède les déterminants structuraux permettant la stabilisation des dérivés acétylés. Les quelques particularités de chaque site donnent à chaque ficoline des propriétés particulières.

La ficoline M fixe l'acide sialique α -Neu5Ac via le groupement N-acétyle qui est stabilisé dans le site externe conservé. La présence de résidus de petite taille Gly221 et Ala256 à proximité du site permet l'accès au groupement sialylé. Cette particularité est partagée avec la ficoline B de souris. Ce sont les deux seules ficolines qui ont clairement montré une spécificité pour les acides sialiques (Liu *et al.*, 2005) mais aussi les seules, d'après nos alignements de séquence, qui possèdent des petits résidus à ces positions. Afin de confirmer le rôle de ces résidus de petite taille dans la fixation du Neu5Ac, nous allons réaliser une mutagenèse dirigée de ces résidus de façon à les remplacer par des résidus de grande taille.

Le remplacement de certains résidus aromatiques par des valines (Val224 et Val226) semble permettre la fixation du D-fucose dans le site externe de la ficoline H. De plus, la tyrosine 254 responsable d'une des interactions conservées est décalée de quelques résidus dans la séquence par rapport à la ficoline M. Ces modifications changent la forme du site : il devient plus profond mais moins large.

Ces résultats sont cohérents avec les quelques observations décrites dans la littérature qui décrivaient la ficoline M comme une protéine de fixation des sucres acétylés avec comme particularité de reconnaître les acides sialiques (Teh *et al.*, 2000; Frederiksen *et al.*, 2005) ; (Liu *et al.*, 2005) et la ficoline H comme étant capable en plus de fixer le D-fucose (Sugimoto *et al.*, 1998).

4.1.2.2 Le micromotif reconnu par la ficoline L ne serait pas uniquement l'acétylation

En ce qui concerne la ficoline L, nous n'avons pas pu observer de fixation des dérivés acétylés dans le site conservé probablement parce qu'une des tyrosines (Tyr271 dans la ficoline M) est remplacée par une phénylalanine, soulignant l'importance de ce résidu pour la stabilisation des groupements N-acétylés. Par contre, il semblerait que les dérivés acétylés puissent se fixer dans deux autres sites de la ficoline L. En effet, un site intermédiaire (S3)

fixe le groupement acétyle de ces dérivés mais cette fixation est extrêmement versatile. Ce site n'est absolument pas conservé dans les deux autres ficolines humaines. L'absence de fixation de monosaccharides neutres dans ce site pourrait expliquer que de nombreuses expériences de compétition montrent que les sucres neutres n'inhibent pas la fixation de la ficoline L sur la BSA-NAcGlc (Krarup *et al.*, 2004). La pertinence physiologique de ce site est discutable au vu de la faible stabilisation des ligands. Par contre, la fixation du β -glucan à proximité de ce site suggère qu'un dérivé acétylé placé au sein d'un polymère pourrait être correctement stabilisé.

Certains dérivés acétylés (NAcGlc, NAcCys) peuvent aussi se fixer dans le site interne (S2) situé à l'interface entre deux protomères. Nous pouvons noter que compte-tenu de l'emplacement de ce site, il est peut être difficilement accessible pour des petits ligands fixés à la BSA. Ce site est constitué d'un anneau de résidus polaires ou chargés qui offrent de nombreuses interactions mais dans lequel les dérivés acétylés ne semblent pas non plus parfaitement stabilisés. En effet, plusieurs positions ont été observées.

Contrairement à la fixation des dérivés acétylés, la fixation du galactose dans le site interne est très spécifique. La répartition en anneau des résidus polaires ou chargés correspondent parfaitement à la répartition des groupements hydroxyles autour du cycle pyranne du galactose. De même, la fixation du β -glucan le long des domaines fibrinogènes de la ficoline L est aussi parfaitement stabilisée par un réseau d'interactions hydrogène. Ces résultats suggèrent que contrairement à l'idée avancée dans un premier temps (Krarup *et al.*, 2004), la spécificité de la ficoline L ne se serait pas uniquement liée à la présence ou non de dérivés acétylés. Ceci expliquerait qu'il n'y ait pas de lien direct entre le contenu en NAcGlc des polysaccharides de capsule des souches de *S.aureus* et *S. pneumoniae* et la fixation de la ficoline L sur ces souches (Krarup *et al.*, 2005).

4.1.2.3 La surface de reconnaissance de la ficoline L

Nos résultats permettent de faire émerger une notion nouvelle : la ficoline L possède plusieurs sites de fixation, permettant de fixer des ligands de différente nature et ces sites appartiennent à une même surface de reconnaissance. En effet, nous avons montré que quatre sucres consécutifs pouvaient se fixer sur la surface du domaine fibrinogène contenue entre le site calcique et le site interne. Nous avons également observé qu'en augmentant les concentrations en NAcCys lors des expériences de trempage, nous observions la fixation de ce ligand tout au long de cette surface. La ficoline L a donc la capacité de fixer des polymères

et notamment des polymères étendus de sucres. La stabilisation des dérivés acétylés dans les sites S2 et S3 nécessite peut-être leur appartenance à un oligosaccharide. En comparant les structures des ficolines M et L, la ficoline M semble posséder les déterminants nécessaires à ce type d'interaction. Afin de comprendre les contraintes structurales sur les oligosaccharides pour qu'ils se fixent sur la surface de reconnaissance de la ficoline L, il faudrait tester d'autres sucres complexes. Les ficolines ont été soumises par N. Thielens au « Consortium For Functional Genomics » pour définir les propriétés de fixation sur des puces présentant des oligosaccharides variés. Ceci permet de tester les propriétés de chacune des ficolines et éventuellement analyser ensuite les interactions observées par cristallographie aux rayons X. Nous reviendrons dans la suite sur les premiers résultats obtenus.

4.1.3 Les études structurales permettent de comprendre la variété de ligands identifiés pour la ficoline L et le C1q

La littérature décrit pour la ficoline L tout comme pour C1q de nombreux ligands. De plus, les ligands ou partenaires de C1q sont variés : protéines, sucres, lipides et ne partagent pas toujours de motif moléculaire commun. D'après nos résultats, et les données de la littérature, il semblerait que C1q possède de nombreux sites d'interaction permis par sa nature hétérotrimérique. Deux sites potentiels d'interaction sont décrits pour C1q. CRP (C reactive protein) est une protéine majeure de phase aigue chez l'homme qui fixe les groupements phosphocholine des lipides membranaires et qui est à son tour reconnue par C1q (Szalai *et al.*, 1999). A partir de la structure cristalline pentamérique de CRP (Thompson *et al.*, 1999) et trimérique de C1q (Gaboriaud *et al.*, 2003) et des données de mutagenèse dirigée (Agrawal *et al.*, 2001) un modèle d'interaction entre ces deux protéines a été proposé (Gaboriaud *et al.*, 2003). L'extrémité basique des têtes globulaires de C1q interagirait avec le pore central de la CRP chargé négativement. Cette interaction impliquerait les sous-unités A et B de C1q. Un autre modèle propose que l'interaction de C1q avec les IgG soit médiée par la région équatoriale de la sous-unité B de C1q (Gaboriaud *et al.*, 2003). Ce modèle est compatible avec les expérimentations de mutagenèse dirigée décrits dans la littérature (Idusogie *et al.*, 2000; Idusogie *et al.*, 2001). Nous avons ici identifié un site putatif d'interaction entre C1q et la phosphosérine. Ce site est localisé sur la sous-unité C, assez proche de la surface membranaire, et en position interne par rapport à l'hexamère.

Il existe certainement d'autres sites d'interactions possibles sur la molécule de C1q qui viendraient compléter la liste des sites déjà identifiés. La diversité d'interactions proposée

par la molécule de C1q explique les nombreux ligands identifiés mais aussi ses fonctions diverses et variées.

4.1.4 Les spectres de reconnaissance des micromotifs sont complémentaires

Nous avons décrit dans l'introduction les spectres de reconnaissance des ficolines, de la MBL et du C1q. Il en ressortait un certain nombre de spécificités : la MBL reconnaît préférentiellement des souches non capsulées au contraire de la ficoline L. Seule la ficoline H semble reconnaître le D-fucose. Par contre, certains motifs semblent être communs, notamment au niveau des sucres acétylés. A la lumière de nos résultats, nous pouvons montrer que cette redondance n'est qu'une apparence. La MBL reconnaît deux hydroxyles successifs en position sur un sucre (Ng *et al.*, 1996). Ce n'est donc pas le groupement acétylé qui est stabilisé mais le cycle pyranne. Au contraire, sur la ficoline M, c'est le groupement N-acétylé qui est stabilisé alors que dans le site interne de la ficoline L, tous les groupements polaires du NAcGlc semblent pouvoir interagir avec le site. Si on replace ces monosaccharides au sein d'une chaîne, nous pouvons remarquer que, suivant le site, les possibilités concernant les liaisons avec les sucres environnants ne sont pas les mêmes (figure 32).

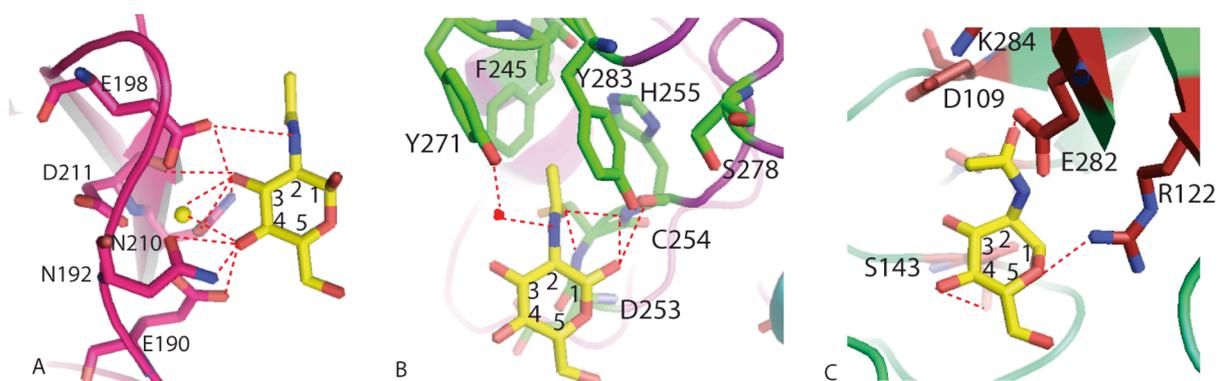


Figure 32 : Modalités d'interaction du NAcGlc avec les ficolines et la MBL.

Le NAcGlc est représenté en jaune et le numéro des carbones du cycle pyranne en noir. Le calcium est une sphère jaune et les interactions polaires sont des traits pointillés rouges. A. interaction de la MBL avec le NAcGlc. (Ng *et al.*, 1996) B. Fixation du NAcGlc dans le site externe de la ficoline M. C. Fixation du NAcGlc dans le site interne de la ficoline L. (Garlatti *et al.*, 2007a; Garlatti *et al.*, 2007b)

Dans le site interne de la ficoline L, il semble impossible de fixer autre chose qu'un sucre terminal, ce site peut être vu comme une impasse. Par contre, sur les sites de la ficoline M et de la MBL, ce NAcGlc peut être interne à la chaîne mais certainement dans une position différente compte-tenu de l'orientation du sucre dans les deux sites. Les sites des ficolines et

de la MBL semblent reconnaître le NAcGlc dans des contextes polysaccharidiques différents et certainement complémentaires.

4.1.5 Quelles informations apportent les structures sur le macromotif reconnu ?

Jusque-là, nous nous sommes appliqués à essayer de comprendre les déterminants de fixation des micromotifs sur les domaines de reconnaissance « isolés ». Nos structures fournissent un certain nombre d'informations quant aux exigences de la répartition de ces micromotifs sur une surface. La forme homotrimérique des têtes globulaires des ficolines et des collectines définit une répartition régulière des sites de reconnaissance. La distance entre les sites dépend de la position des sites sur les protomères mais aussi de l'agencement du trimère. La MBL nécessite la région neck pour l'assemblage des domaines CRD en trimère et il n'existe aucune interaction directe entre les domaines lectine. Les têtes globulaires de MBL ont donc une structure très ouverte éloignant presque au maximum les sites de reconnaissance qui se trouvent alors à 54 Å. Les trimères de ficoline sont intermédiaires entre la structure très compacte de C1q et la structure très ouverte de la MBL. Ceci est dû aux interactions directes entre les protomères qui vont alors légèrement rapprocher les sites : les sites externes sont à environ 65Å malgré la taille importante des protomères et les sites internes à 20Å environ.

Nous pouvons supposer que pour une avidité maximale des têtes globulaires, les motifs doivent être répétés sur la surface ou au sein d'une même chaîne polysaccharidique de façon à respecter ces distances. Cela peut modifier, par exemple, la reconnaissance de différentes ramifications d'une même chaîne polysaccharidique. De plus, outre l'avidité due à la trimérisation, un degré supplémentaire de contraintes structurales est imposé aux trimères : leur oligomérisation. En effet, la distance entre les têtes de reconnaissance dépend aussi du degré d'oligomérisation, de la taille de la queue collagène, de la présence ou non de protéines interagissant avec elles.

Ces contraintes quant à la répartition des motifs sur la surface, ajoutée aux variations dans la façon de fixer un ligand identique dans chaque site laisse supposer que les spectres de reconnaissance sont plus complémentaires que redondants.

4.1.6 Une reconnaissance régulable ?

Une caractéristique majeure observée dans cette étude est la dépendance au pH de l'activité de fixation de la ficoline M. Cette particularité n'est pas partagée avec les ficolines H et L. Le changement de conformation du site de fixation en conditions acides implique quatre boucles de surface : les boucles 218–224, 253–258, 264–274, and 278–288, avec le Trp277 servant de

point fixe. La fixation du NAcGlc sur la ficoline M est dépendante du pH et le pKa de la modulation de cette activité est de 6,2. Il a été proposé que les histidines aient un rôle dans ce changement conformationnel (Tanio *et al.*, 2007). Nous avons identifié trois histidines qui stabilisent la structure du site dans la structure en condition neutre, mais plus en conditions acides, et nous avons proposé que la protonation de ces histidines entraîne le déplacement concerté des boucles formant le site de fixation.

Le fait que ces modifications conformationnelles ne touchent que les boucles formant le site de fixation suggère que ce changement conformationnel a un rôle physiologique sur lequel nous reviendrons plus loin.

4.2 Structure, reconnaissance et fonctions biologiques

4.2.1 Peut-on prédire les spécificités de reconnaissance des ficolines ?

Les résultats que nous avons obtenus permettent de décrire un certain nombre de déterminants structuraux nécessaires à la fixation des ligands que nous avons testés. Par contre, il nous est difficile de prédire des ligands reconnus ou non. Par exemple, nous n'avons pas encore de résultats quant à la reconnaissance de polysaccharides étendus par les ficolines M et H et trop peu pour la ficoline L. Ces ficolines ont été soumises à une banque d'oligosaccharides du « Consortium For Fonctionnal Génomics » par le Dr. Nicole Thielens de façon à mieux comprendre leurs spécificités et à confronter les résultats à nos analyses structurales.

Les premiers résultats obtenus montrent que la ficoline H ne semble être spécifique d'aucun polysaccharide testé. Cela est dans la lignée du faible nombre de ligands de la ficoline H identifiés dans la littérature. Pour la ficoline L, il est difficile de s'avancer pour l'instant car les résultats obtenus ne sont pas tous reproductibles. Par contre, la ficoline M semble très spécifique de certains sucres. Elle semble reconnaître préférentiellement les sucres possédant des acides sialiques Neu5Ac en position terminale ou à l'intérieur de la chaîne ainsi que pour les 9OAcNeu5Ac α terminaux. Aucune spécificité particulièrement marquée pour le NAcGlc n'a été observée.

Ces analyses montrent qu'il existe bien, au moins pour la ficoline M, une spécificité très forte pour certains oligosaccharides. Par contre, nos résultats ne nous permettent pas pour l'instant de totalement l'expliquer. Des structures des domaines de reconnaissance avec les sucres identifiés par cette méthode apporteront certainement des réponses.

4.2.2 Implications quant à la reconnaissance des surfaces

Nous avons vu dans la partie précédente que malgré nos avancées, il est difficile de prévoir les spécificités des ficolines envers tous les oligosaccharides. Par contre, nous pouvons avoir une nouvelle lecture des résultats d'interactions décrits à partir de nos résultats.

La ficoline L a été impliquée dans la reconnaissance de souches de Streptocoques du groupe B (Aoyagi *et al.*, 2005). Le polysaccharide de capsule des streptocoques montre une structure étendue comprenant des résidus glucose, galactose et NAcGlc en liaisons β -1,3 ou β -1,4 (Kadirvelraj *et al.*, 2006). Ceci est parfaitement cohérent avec notre observation selon laquelle la ficoline L pourrait reconnaître des oligosaccharides étendus notamment en liaison β -1,3. Tout comme les autres protéines fixant le β -1,3-D-glucan, la ficoline L pourrait être impliquée dans la fixation des levures ou d'autres cellules fongiques (Wang *et al.*, 2006). De plus, l'interaction entre la ficoline L et le β -1,3-D-glucan n'implique pas les hydroxyles en position 4 sur le cycle pyranne, une interaction similaire peut donc être extrapolée aux polysaccharides β -1,3-D-galactosyl qui sont des facteurs de virulence des parasites *Leishmania major* (Pelletier *et al.*, 2003).

Nos résultats peuvent également éclairer la reconnaissance des cellules apoptotiques par ces protéines. Nous avons montré que C1q fixe la phosphatidylsérine, un signal exposé à la surface des cellules apoptotiques, via un site situé sur le domaine ghC. De plus, parmi les marqueurs des cellules apoptotiques ont été décrits le galactose (Bilyy *et al.*, 2004; Yuita *et al.*, 2005) et le NAcGlc (Orlando and Pittman, 2006). Or nous avons montré que le galactose interagit avec les ficolines L et H et le NAcGlc avec les ficolines M et L.

Nous avons montré dans cette étude que la ficoline M possédait la propriété atypique de reconnaître l'acide sialique Neu5Ac grâce à un élargissement de la poche de fixation à proximité du site de reconnaissance. Or les acides sialiques, présents à haute concentration à la surface des cellules de mammifères, sont considérés comme des marqueurs du soi. La ficoline M pourrait avoir un rôle dans la médiation ou la modulation des interactions cellule-cellule comme il a été proposé pour d'autres récepteurs comme la lectine de type galactose des macrophages (van Vliet *et al.*, 2006) ou DC-SIGN (Geijtenbeek *et al.*, 2000). Il est aussi fort possible que la reconnaissance des acides sialiques permette de reconnaître les capsules comme il a été proposé pour la ficoline L (Aoyagi *et al.*, 2005). Dans ce domaine, notre interprétation se trouve limitée par la connaissance que nous avons des sucres à la surface des cellules viables et des pathogènes. Par exemple, nous avons vu plus haut que la ficoline M

fixerait des 9OAcNeu5Ac α , unités répertoriées à la surface des streptocoques du Groupe B (Carlin *et al.*, 2007), ainsi que le Neu5Ac. Nous avons vu en introduction que de nombreux inhibiteurs du complément se fixe *via* les acides sialiques à la surface des cellules viables et que ces inhibiteurs empêchent l'activation du complément mais ils pourraient aussi cacher certains motifs aux ficolines limitant ainsi leur fixation à la surface des cellules viables.

4.2.3 Les conséquences biologiques de la reconnaissance

Nous avons abordé dans la partie précédente la question de la spécificité de reconnaissance de motifs par les ficolines. Pourtant, nous savons que les conséquences biologiques ne sont pas toujours les mêmes : inflammation dans le cas d'un pathogène mais pas dans celui des corps apoptotiques. Les causes peuvent être diverses et variées et surtout impliquer d'autres récepteurs voire des régulateurs. Ce n'est pas mon propos que de discuter de ceci. Par contre, je vais essayer de dégager des concepts qui expliqueraient une lecture différente de cette reconnaissance en fonction de la cible.

4.2.3.1 *Activation du complément*

En introduction, nous avons décrit un modèle d'activation du complexe C1 : sous l'effet d'un stress mécanique les tiges collagène de C1q s'écartent ce qui permet la coupure des protéases associées. L'interaction équatoriale entre les fragments Fc des immunoglobulines et le C1q est compatible avec ce modèle (Gaboriaud *et al.*, 2003). En effet, dans un complexe immun, l'interaction entre plusieurs fragments Fc et les têtes de C1q pourrait « écarteler » C1q créant ainsi un stress mécanique. Qu'en est-il des interactions avec une surface médiée par la phosphosérine ou par CRP ? Nous pouvons imaginer que, si les ligands sont correctement éloignés, l'interaction des têtes de C1q avec plusieurs ligands tirerait également sur les queues collagènes provoquant un écrasement de C1q sur la surface et donc un stress mécanique (figure 33, page 112).

Les mêmes contraintes mécaniques pourraient être envisagées sur les ficolines et la MBL. Contrairement au C1q, les sites de reconnaissance des ficolines ne se situent pas sur les faces externes d'un trimère compact mais au cœur d'un trimère plus ouvert. La position des têtes serait alors un peu différente de celles de C1q ce qui pourrait modifier les contraintes mécaniques et donc l'activation. Les contraintes que pourraient exercer ces interactions sur les queues collagènes sont schématisées sur la figure 33.

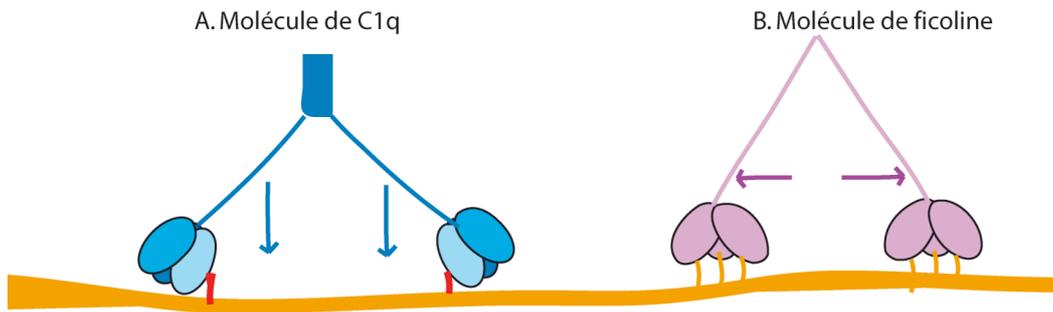


Figure 33 : Schématisation des contraintes qui pourraient s'exercer sur les queues collagènes

A. Deux hétérotrimères de la molécule de C1q (bleu) interagissant avec la phosphatidylsérine (rouge) répétée sur une surface. Les flèches indiquent le sens des contraintes possibles exercées sur les queues collagènes lors de cette interaction. B. Deux homotrimères de ficoline (mauve) reconnaissant un sucre (orange) répété sur une surface. Les flèches représentent les contraintes possibles exercées sur les queues. Ces schémas ne sont que des propositions pour montrer l'importance de la position des sites sur la façon dont s'exercent les contraintes mécaniques sur les queues collagènes.

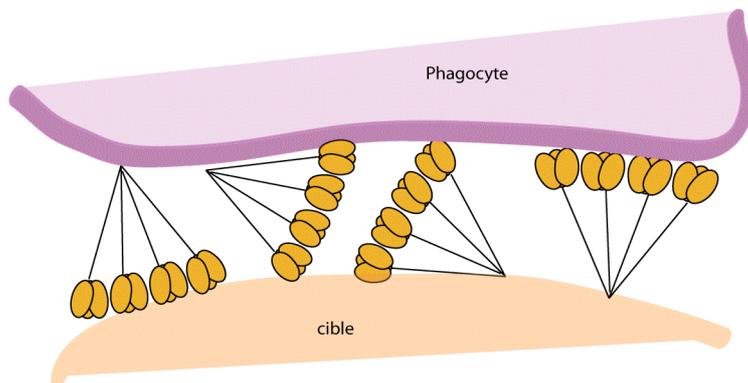
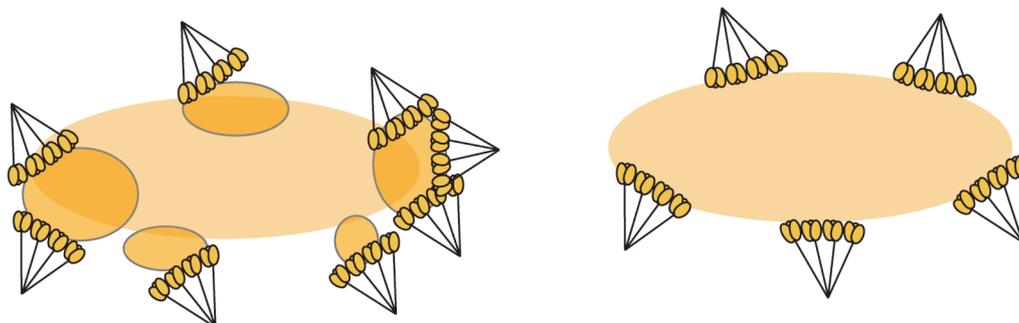


Figure 34 : Schématisation de quelques orientations possibles des ficolines, C1q, MBL.

Les ficolines, C1q ou MBL pourraient avoir au moins trois orientations : les têtes globulaires sur la cible, et les queues collagènes vers le phagocyte ou l'inverse; couchées sur la cible (ou couchées sur le phagocyte).



A. Répartition hétérogène sur une cellule apoptotique

B. Répartition homogène sur une cellule viable

Figure 35 : Répartitions homogènes ou hétérogènes des ficolines, C1q ou MBL sur une cible.

A. Sur les cellules apoptotiques, ces protéines se concentreraient sur les excroissances de la membrane. B. Sur les cellules viables, les molécules seraient réparties de façon homogène.

Ce modèle implique que l'activation du complément dépend de la concentration des ligands à la surface d'une cible. Certaines études montrent que la fixation de la ficoline L sur *S.pneumoniae* 11F est importante mais n'active en rien la voie du complément (Krarup *et al.*, 2005). Ceci laisse supposer que la répartition des ligands présents à la surface de *S.pneumoniae* 11F ne contraint pas suffisamment les queues collagènes pour activer le complément. Une reconnaissance n'est donc pas forcément synonyme d'activation.

4.2.3.2 Reconnaissance par le phagocyte

La lecture que fait le phagocyte des opsonines déposées à la surface d'une cible est bien plus complexe que la détection d'une molécule unique. Nous allons ici essayer de comprendre comment la présence d'une même molécule de C1q, ficoline ou MBL pourrait être interprétée différemment par le phagocyte selon la cible.

Selon le contexte, la conformation des protéines de reconnaissance du complément peut être modifiée. Par exemple, une étude récente sur des mutants de la MBL montre que la région collagène n'est reconnue par la calréticuline qu'en absence de liaison aux MASPs, ce qui permettrait éventuellement la facilitation de la phagocytose sans activation du complément (Pagh *et al.*, 2008).

De même, l'orientation de ces protéines pourrait changer selon les surfaces. Classiquement, on présente les têtes globulaires liant la cible et la queue collagène liée à un récepteur des macrophages. Mais pourquoi pas l'inverse ? Une étude récente montre que la calréticuline serait localisée à la surface des corps apoptotiques (Gardai *et al.*, 2005), or la calréticuline fixe les queues collagènes. De plus, il existe un récepteur des têtes globulaires de C1q à la surface des phagocytes. On peut donc imaginer C1q avec la queue collagène fixée sur les corps apoptotiques et les têtes globulaires sur leur récepteur phagocytaire. De même, la ficoline M pourrait fixer les monocytes via ses têtes globulaires et exposer à la surface sa queue collagène. Selon l'orientation de ces protéines sur leur cible, le phagocyte, mais aussi les cellules environnantes, pourraient lire différemment le signal. Dans la figure 34, sont représentées quelques façons d'imaginer les choses.

De même, outre l'orientation, on peut imaginer que la répartition des protéines de reconnaissance sur la surface change selon les cibles (figure 35). Par exemple, les corps apoptotiques ont la particularité de présenter des boursouflures à leur surface. Nous savons également que les signaux dits « eat-me » sont concentrés dans ces régions (Gardai *et al.*, 2005; Paidassi *et al.*, 2008). Une étude menée au laboratoire sur C1q montre qu'il reconnaît

les corps apoptotiques mais aussi partiellement les cellules viables. Par contre, la répartition est très différente : sur les cellules viables C1q est réparti à la surface de façon homogène et diffuse alors qu'il est concentré sur les boursofflures autour des corps apoptotiques (Gardai *et al.*, 2005; Paidassi *et al.*, 2008). On peut aisément imaginer que selon les motifs reconnus et les pathogènes considérés la répartition des protéines de reconnaissance varie, entraînant une lecture différente par les autres acteurs du système immunitaire (figure 35).

Nous avons vu que l'activité de liaison de la ficoline M était régulée par le pH. Compte-tenu qu'une étude récente montre que l'orthologue murin de la ficoline M (ficoline B) est localisé dans les lysosomes des macrophages activés (Runza *et al.*, 2006), il est tentant de postuler que ce mécanisme est impliqué dans le relargage du ligand. Ainsi, la ficoline M serait sécrétée par les macrophages et fixerait les microorganismes environnants avec lesquels elle serait internalisée. Le pH faible présent dans les lysosomes déclencherait le relargage du ligand. Ce trafic intracellulaire serait proche de ceux déjà décrits pour d'autres récepteurs tels que le récepteur de l'asialoglycoprotéine (Wragg and Drickamer, 1999) ou encore la famille des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (Rudenko *et al.*, 2002; Beglova and Blacklow, 2005; van Vliet *et al.*, 2006).

L'interaction entre les protéines de reconnaissance du complément et les phagocytes n'est pas encore clairement établie. Le laboratoire d'enzymologie moléculaire prévoit d'étudier l'interaction entre ces protéines et les récepteurs de surface des phagocytes. De plus, les capacités immunosuppressives de la MBL et du C1q (Fraser *et al.*, 2006) supposent le déclenchement de voies anti-inflammatoires dans les phagocytes professionnels suite à la reconnaissance de ces protéines. Les voies de signalisation impliquées dans la phagocytose anti-inflammatoire des cellules apoptotiques est le sujet du chapitre III.

**CHAPITRE III ÉTUDE CELLULAIRE DU ROLE DE LA
PROTÉINE ELMO1 DANS L'ÉLIMINATION DES CELLULES
APOPTOTIQUES**

1 Introduction bibliographique

1.1 Apoptose : Une mort cellulaire « sans danger »

1.1.1 Définition

La mort cellulaire normale a d'abord été observée durant la métamorphose des amphibiens puis, dans plusieurs tissus en développement. Le terme apoptose a été utilisé pour la première fois en 1972 pour décrire un certain mode de mort cellulaire responsable de la perte de cellules dans les tissus sains (Kerr *et al.*, 1972).

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus actif par lequel les cellules prennent part à leur propre destruction. Cette mort physiologique, génétiquement programmée est nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires (Wyllie *et al.*, 1980). Elle est opposée à la mort accidentelle des cellules appelée nécrose.

1.1.2 Fonctions physiologiques

L'apoptose a un rôle essentiel dans le développement des organismes animaux ou végétaux. Les cellules excédentaires sont éliminées de façon à modeler la morphologie des organes ou assurer des connections nerveuses ou sanguines correctes (Vaux and Korsmeyer, 1999). Parmi les défauts morphologiques dus à une déficience de l'apoptose au cours du développement, on peut citer les doigts collés ou palmés ou encore le maintien d'une queue rudimentaire chez l'homme.

L'apoptose intervient également dans l'élimination des cellules endommagées de façon irréversible par des facteurs de stress, des dommages à l'ADN ou un virus par exemple. Le suicide de la cellule est alors un moyen de protéger l'organisme.

Le renouvellement tissulaire correct est maintenu par un équilibre entre apoptose et division cellulaire. Les cellules devenant moins efficaces et perdant leur capacité à remplir leur fonction sont éliminées par apoptose alors qu'en parallèle des cellules souches se divisent pour compenser la perte (Raff, 1992). Dans le cas des muqueuses, la mort cellulaire est déclenchée par la perte de contact des cellules « âgées » avec la matrice extracellulaire. Dans ce cas, on parle d'anoïkis (Yamaki *et al.*, 2007).

L'apoptose a un rôle central dans le système immunitaire à la fois pour éliminer les cellules auto-réactives mais aussi pour mettre fin à la réponse immunitaire. Les lymphocytes autoréactifs dans le thymus, la moelle osseuse, voire en périphérie, sont éliminés par

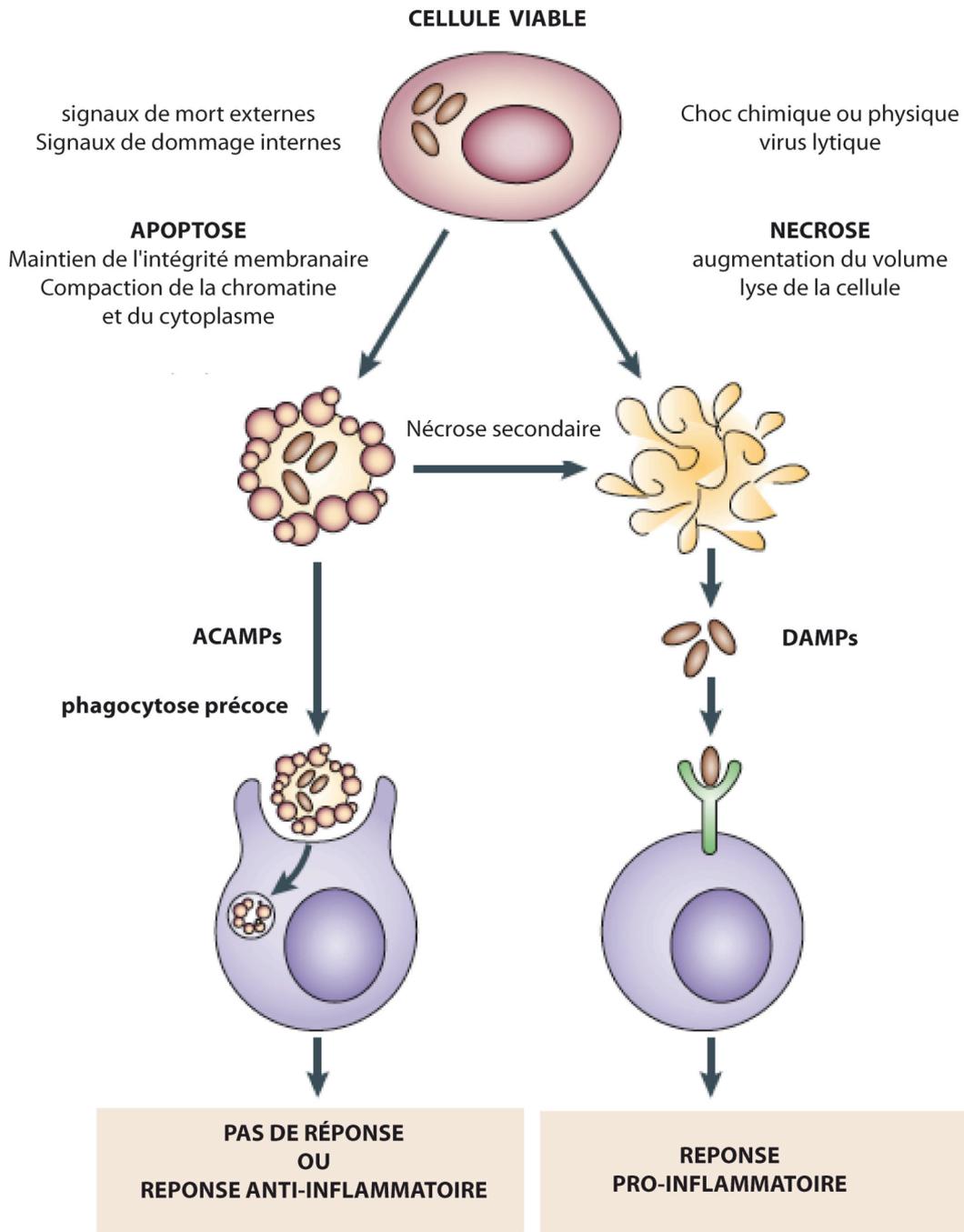


Figure 36 : Apoptose ou nécrose, deux morts cellulaires aux conséquences opposées (d'après (Kono and Rock, 2008))

Une cellule peut subir deux types de mort cellulaire. L'apoptose est une mort cellulaire programmée, activée par des dommages internes ou externe, dont la principale caractéristique est le maintien de l'intégrité membranaire. La nécrose est une mort accidentelle due à des conditions extrêmes ou à l'infection par un virus. Elle se caractérise par une perte immédiate de l'intégrité membranaire, relargant ainsi dans le milieu des signaux de danger appelés DAMPs. Les cellules apoptotiques peuvent subir une nécrose secondaire *in vitro*, mais, *in vivo*, elles sont rapidement éliminées par phagocytose et cette élimination n'engage pas de réponse inflammatoire. Au contraire, les DAMPs relargués par les cellules nécrotiques activent le système immunitaire.

apoptose. De même, les lymphocytes T auxiliaires, responsables de l'activation des Lymphocytes effecteurs T et B, sont éliminés par apoptose en fin d'inflammation (Janeway *et al.*, 2001).

1.1.3 Caractéristiques des cellules apoptotiques

1.1.3.1 *Morphologie*

Selon la nature ou le degré des altérations causées à la cellule, la mort cellulaire peut être soit nécrotique, soit apoptotique. Ces deux mécanismes diffèrent radicalement (Albert *et al.*, 2002) (figure 36).

La nécrose a généralement lieu lorsque la cellule est exposée à des conditions extrêmes éloignées des conditions physiologiques, comme l'hyperthermie par exemple. Elle s'accompagne de la perte d'intégrité de la membrane plasmique et du relargage du contenu cellulaire dans le milieu. La nécrose peut également être induite par des virus lytiques ou le complexe d'attaque membranaire du complément. Le plus souvent, cette mort accidentelle est associée à des dommages tissulaires importants et une réponse inflammatoire intense. L'inflammation est due au relargage dans le milieu de molécules appelées DAMPS (Damage/Danger Associated Molecular Pattern) telles que HMGB-1 ou les protéines de choc thermique (Kono and Rock, 2008). Ces DAMPs sont, comme les PAMPs décrits dans les chapitres I et II, des signaux de dangers qui vont alerter le système immunitaire inné puis le système adaptatif.

À l'inverse, l'apoptose est une mort cellulaire physiologique qui n'entraîne pas de réaction inflammatoire. Le processus commence par une compaction et une ségrégation de la chromatine et la condensation du cytoplasme. Finalement, l'ADN et la cellule se fragmentent. Durant tout le processus, l'intégrité membranaire est conservée, limitant le relargage du contenu cellulaire dans le milieu et donc de DAMPs, évitant ainsi toute inflammation (Kono and Rock, 2008).

1.1.3.2 *Voies d'induction*

Deux voies d'induction de l'apoptose sont connues actuellement : une voie intrinsèque et une voie extrinsèque (Youle and Strasser, 2008). Le point commun entre ces deux voies est qu'elles aboutissent à l'activation d'enzymes de l'apoptose : les caspases. Ce sont des protéases à cystéines qui coupent au niveau des résidus aspartiques. La voie intrinsèque, aussi

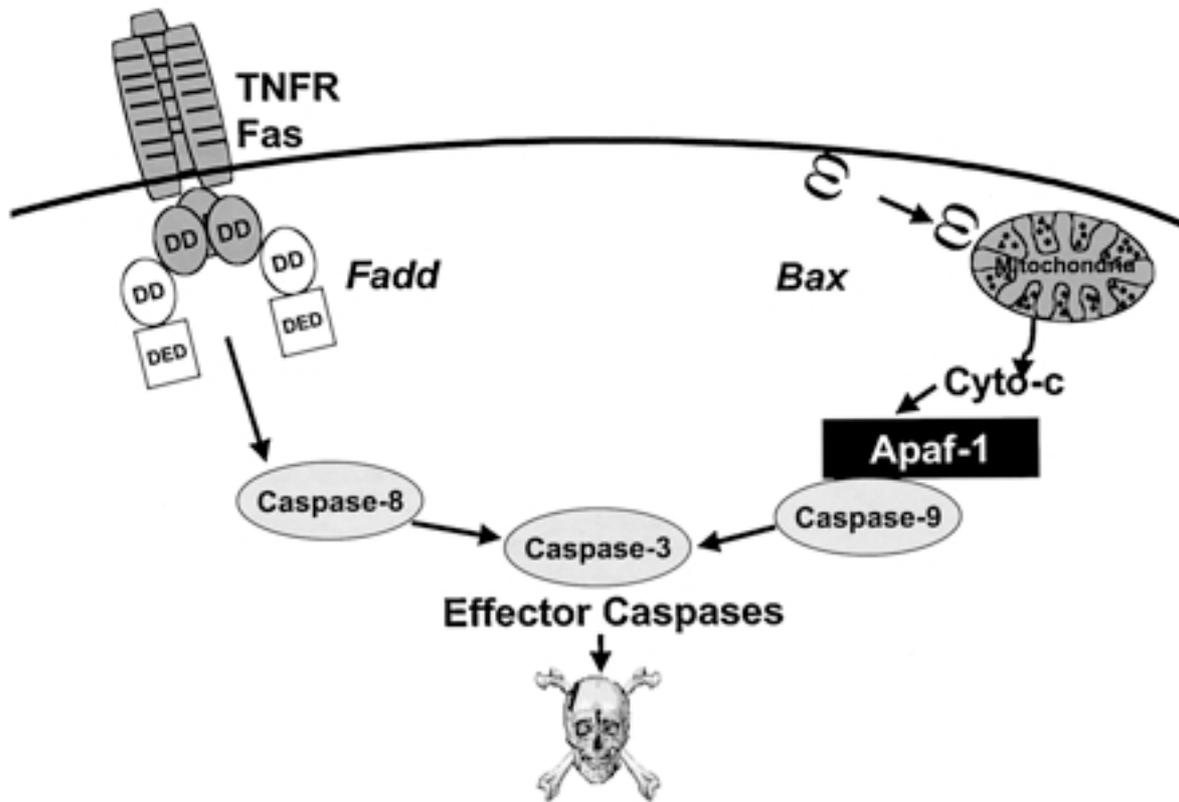


Figure 37 : Voies d'induction de l'apoptose.

L'apoptose peut être induite selon une voie extrinsèque ou une voie intrinsèque. La voie extrinsèque implique l'activation de récepteurs de mort comme Fas. L'activation des récepteurs mène à l'activation des caspases effectrices. La voie intrinsèque dépend de l'activation de BAX qui va entraîner le relargage du cytochrome c ou de la mitochondrie et ainsi activer le complexe APAF-1/Caspase 9. Ce complexe va activer les caspases effectrices.

appelée voie mitochondriale, est déclenchée par des signaux intracellulaires : dommages à l'ADN, infection virale, signaux développementaux, privation de facteurs de croissance. Cette voie est contrôlée par des protéines de la famille BCL-2 qui peuvent être pro- (BAX, BAK, BID) ou anti- (BCL-2, BCL-XL, BCL-W) apoptotique. L'activation des signaux d'apoptose entraîne le relargage du cytochrome c de la mitochondrie et l'activation d'APAF-1. Cet apoptosome active la caspase 3 (figure 37).

La voie extrinsèque est déclenchée par l'activation des récepteurs de morts (membres de la famille du récepteur TNF « Tumor Necrosis Factor »). Ces récepteurs détectent des signaux extracellulaires défavorables qui déclenchent une voie de signalisation aboutissant à l'activation de caspases 3, 6 ou 7 (figure 37).

L'équilibre entre signaux de mort et signaux de vie décide de l'avenir de la cellule et l'état d'activation des membres de la famille BCL-2 sont les témoins de cet équilibre.

1.1.3.3 Elimination

In vitro, les cellules en apoptose atteignent une étape très peu observée *in vivo* : la nécrose secondaire, caractérisée par une rupture de l'intégrité membranaire. Cette nécrose secondaire mène quant à elle à la libération de DAMPs inflammatoires et doit donc être à tout prix évitée *in vivo* (Kono and Rock, 2008). Dans l'organisme, les cellules apoptotiques sont éliminées avant d'atteindre ce stade (van Nieuwenhuijze *et al.*, 2003) figure 36). Cette élimination est assurée par les cellules environnantes et les cellules du système immunitaire inné qui phagocytent ces « déchets cellulaires » de façon silencieuse, c'est à dire sans alerter les défenses immunitaires. L'importance de ce processus dans l'équilibre immunitaire de l'organisme est soulignée par les conséquences dramatiques d'un défaut d'élimination de ces cellules comme certaines maladies auto-immunes humaines telles que le Lupus Erythémateux Systémique (Gaipl *et al.*, 2007). De plus, la délétion de gènes chez la souris diminuant les capacités de phagocytose des cellules entraîne le développement des maladies auto-immunes de type Lupus (Viorritto *et al.*, 2007). Cette étape de phagocytose « silencieuse » est essentielle à l'homéostasie immunitaire de l'organisme.

1.2 Reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes

1.2.1 Signaux « find-me »

Les acteurs de cette élimination semblent pouvoir être des phagocytes professionnels mais aussi des cellules environnantes. Dans ce cas, ou dans le cas des phagocytes déjà infiltrés dans

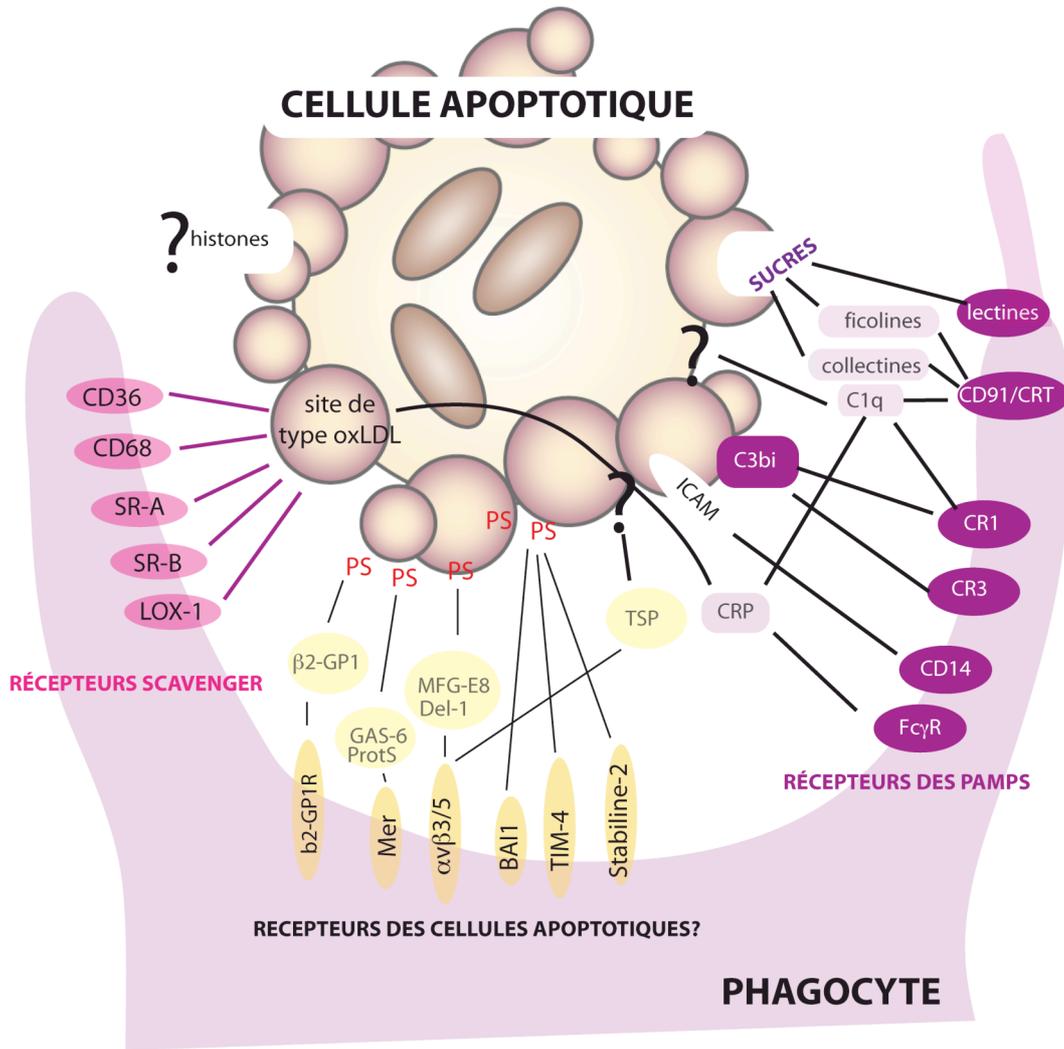


Figure 38 : Reconnaissance des cellules apoptotiques par un phagocyte

Les cellules apoptotiques exposent à leur surface des signaux dits « eat-me » comme la phosphatidylsérine (notée PS), des sucres modifiés, des lipides oxydés, des protéines ou des structures chromatinienne (histones). Ces signaux peuvent être reconnus par des récepteurs membranaires ou par des molécules pontantes qui recouvrent la surface de la cellule et sont elles mêmes reconnues par des récepteurs membranaires du phagocyte. Certains récepteurs sont aussi impliqués dans la reconnaissance des pathogènes (violet), dans le trafic des lipides (en rose) et d'autres semblent spécifiques de l'élimination des cellules apoptotiques (en jaune). D'après Paidassi, 2008.

le tissu, il est possible d'imaginer qu'il y ait contact direct entre ces cellules et leur cible. Par contre, dans le cas d'un recrutement sur un site d'apoptose intense, il faut supposer que certains signaux dits « find-me » sont envoyés par la cellule apoptotique. Il existe très peu de données dans la littérature quant à l'existence de ces signaux. Il y a quelques années, Lauber et col. ont identifié un lipide, la lipophosphatidylcholine en tant que signal « find-me ». Ce lipide serait sécrété par la cellule apoptotique (UV-dépendante) et attire des monocytes THP-1 (Lauber *et al.*, 2003). Dernièrement, il a été montré que le relargage de nucléotides par les neurones endommagés attire les cellules microgliales (Koizumi *et al.*, 2007)

1.2.2 Les signaux « eat-me »

La discrimination entre cellules apoptotiques et cellules viables par les phagocytes a lieu avant la lyse de la cellule, ce qui implique des modifications de surface précoces appelés signaux « eat-me » (figure 38).

Le changement le mieux caractérisé de la membrane plasmique au cours de l'apoptose est la perte de l'asymétrie membranaire et l'exposition de phosphatidylsérine sur le feuillet externe (Fadok *et al.*, 1992a; Fadok *et al.*, 1992b; Fadok *et al.*, 1998a; Fadok *et al.*, 2001). Cette modification est permise par une baisse d'activité d'une translocase des aminophospholipides dépendante de l'ATP qui en temps normal ramène la phosphatidylsérine sur le feuillet interne (Bever *et al.*, 1999). De plus, une scramblase bidirectionnelle non spécifique qui déplace les phospholipides d'un feuillet à l'autre est activée (Wiedmer *et al.*, 2000).

Une autre propriété de surface modifiée est la nature des glycosylations. Les oligosaccharides présents à la surface des cellules viables sont sialilés. Les acides sialiques sont caractérisés par une charge nette négative et ils ont un rôle essentiel dans l'inhibition du complément (fixation du facteur H) ou dans les interactions cellulaires. Les cellules apoptotiques perdent l'acide sialique terminal exposant ainsi les résidus sous-jacents galactose et N-acétylglucosamine par exemple.

Les cellules apoptotiques sont aussi caractérisées par une modification de l'oxydation des macromolécules. Différents stimuli apoptotiques, dont les UV, induisent un stress oxydant conduisant à la peroxydation des lipides membranaires (Buttke and Sandstrom, 1994).

Il a été montré que les cellules apoptotiques exposent à leur surface des nucléosomes (Radic et al, 2004). Les nucléosomes constituent l'unité fondamentale de la chromatine eucaryote (Albert *et al.*, 2002) : un octamère d'histone entouré d'ADN. De plus, les patients atteints de Lupus Erythémateux Systémique qui présentent une accumulation des corps apoptotiques

possèdent également des anticorps dirigés contre les composants de la chromatine (Gruenbaum and Shoenfeld, 1997)

Nous avons évoqué dans le chapitre II, la calréticuline en tant que récepteur des queues collagènes des collectines, C1q et ficolines. Il semblerait qu'au cours de l'apoptose la présence de cette protéine à la surface soit augmentée mais aussi redistribuée sur cette surface (Gardai *et al.*, 2005).

Tous ces signaux « eat-me » semblent localisés sur les « bulles » à la surface des corps apoptotiques. Sur les cellules viables, il existe des signaux « don't eat-me » qui repoussent les phagocytes. Ces signaux sont diminués et redistribués au cours de l'apoptose (Gardai *et al.*, 2005; Paidassi *et al.*, 2008).

1.2.3 Les récepteurs connus

De nombreux récepteurs ont été impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques (figure 38). Nous avons vu dans le chapitre II que le C1q, les ficolines et la MBL sont capables de reconnaître les cellules apoptotiques et de faciliter ainsi la phagocytose directement ou indirectement en augmentant le dépôt de C3b, C4b ou C3bi à la surface. Ces molécules pontantes sont reconnues par le phagocyte via CR1, CD91/Calréticuline, CR3 ou encore $\alpha 2\beta 1$. Nous n'allons pas revenir sur ces molécules, par contre, nous allons compléter en décrivant les autres récepteurs impliqués dans cette reconnaissance. Parmi les autres molécules de pontage connues nous pouvons citer les collectines SP-A et SP-D (Vandivier *et al.*, 2002) qui fixent des sucres et sont reconnues par CD91/CRT, les petites pentraxines CRP (« C-réactive protein ») et SAP (« Serum Amyloid P component »), protéines produites en réponse à une inflammation (Steel and Whitehead, 1994). CRP, qui se fixerait aux lipides oxydés, serait reconnue par Fc γ R. De nombreuses molécules de pontage reconnaissent la phosphatidylsérine : $\beta 2$ -GP1 ($\beta 2$ -glycoprotéine 1), ProtS, GAS-6 (« Growth Arrest Specific gen 6 »), MFG-E8 (« milk fat Globule-EGF-factor 8 ») ou encore Del-1 (« developmental endothelium locus-1 ») (Balasubramanian *et al.*, 1997; Nakano *et al.*, 1997) Hanayama *et al.*, 2004). La protéine GAS-6, par exemple, est reconnue par le récepteur tyrosine-kinase Mer (Nagata *et al.*, 1996) et MFG-E8 par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ couplée à CD36 dans les macrophages et par $\alpha_v\beta_5$ dans les cellules dendritiques (Korb and Ahearn, 1997; Albert *et al.*, 2000; Hanayama *et al.*, 2002; Akakura *et al.*, 2004; Hanayama *et al.*, 2004).

Certains récepteurs membranaires du phagocyte reconnaissent directement des signaux sur la cellule apoptotique. BAI1 (« brain-specific angiogenesis factor»), TIM-4 (« T-cell

immunoglobulin domain and mucin domain 4») et la stabiline 2 reconnaissent la PS (Miyanishi *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008). Des récepteurs de type Scavenger (« éboueur »), encore notés SR, classiquement impliqués dans l'internalisation des lipides, pourraient reconnaître des lipides peroxydés (CD36, CD68, SR-A, SR-B, LOX-1) (Platt *et al.*, 1998; Lauber *et al.*, 2004).

Le nombre de récepteurs et de signaux impliqués peut varier d'un couple cellule apoptotique/phagocyte à l'autre. Par contre, que se passe-t-il une fois la cellule reconnue ?

1.3 Internalisation et élimination « silencieuses »

La reconnaissance de la cellule apoptotique par un phagocyte, professionnel ou non, entraîne sa phagocytose telle que décrite dans le chapitre I : internalisation et destruction de la cible, à ceci près que dans le cas d'une cellule apoptotique, ce processus n'entraîne pas de maturation complète des phagocytes professionnels ni de sécrétion de signaux pro-inflammatoires. Nous allons faire le point dans cette partie sur ce que nous connaissons des voies de signalisation impliquées. Nous allons tout d'abord nous attacher aux voies de signalisations impliquées dans le remodelage de l'actine nécessaire à l'internalisation de la cible, puis dans le contrôle de l'état inflammatoire des phagocytes professionnels.

1.3.1 Remodelage de l'actine pour l'internalisation

Les mécanismes de la phagocytose ont été étudiés chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. C'est un organisme modèle dans l'étude du développement des organismes pluricellulaires. La phagocytose dans cet organisme n'a lieu que pour éliminer les cellules apoptotiques.

Chez le nématode, 7 gènes, nommés *ced* pour « cell death abnormal », ont été impliqués dans l'élimination des cellules apoptotiques (Ellis *et al.*, 1991). Ils appartiennent à deux voies de signalisation qui aboutissent à l'activation de la petite GTPase CED-10 impliquée dans le remodelage de l'actine (figure 39). Chez les mammifères, ces mêmes voies ont été mises en évidence.

1.3.1.1 *Les voies CED-10/Rac dépendantes*

- *CED-10/Rac1 et remodelage de l'actine*

Rac est une petite GTPase membre de la famille des petites protéines G. Les protéines de cette famille subissent un cycle d'activation. Leur forme active est une forme liée au GTP. L'hydrolyse de ce GTP en GDP, activé par des protéines appelées GAP («GTPase Activating

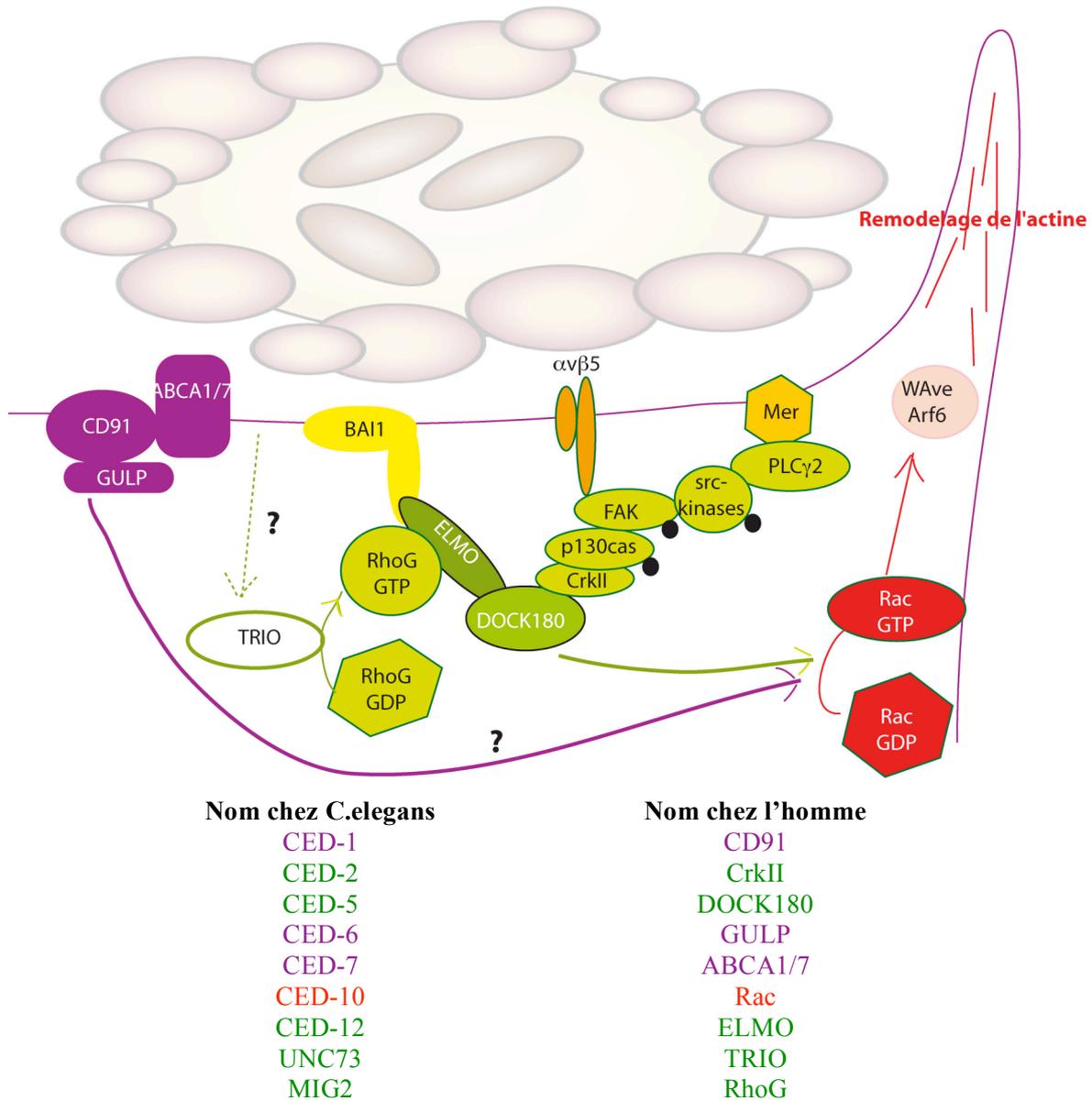


Figure 39 : Voies de signalisations connues menant à l'activation de Rac/ced10 dans les cellules de mammifère.

La voie CED91/GULP est indiquée en violet, la voie ELMO/DOCK en vert et le remodelage de l'actine en rouge. Les points d'interrogations signalent les voies non connues et les points noirs les phosphorylations. Les protéines sur le schéma sont indiquées avec leur nom chez l'homme. Les correspondances avec les protéines chez *C.elegans* sont récapitulées sous le schéma.

Protein »), fait passer les petites GTPases sous leur forme inactive, celle liée au GDP. L'échange du GDP pour un GTP, qui permet de rendre la protéine à nouveau active dépend d'une GEF (« GDP/GTP Exchange Factor ») qui stabilise la forme non liée et facilite l'échange. La forme liée au GTP de Rac1/CED-10 permet d'activer la polymérisation de l'actine par l'intermédiaire des facteurs WAVE (« WASP family Verprolin-homologous protein ») et Arp2/3 (« Actine related protein »). Cela entraîne la formation d'extensions cellulaires, appelées pseudopodes dans le cas de la phagocytose. Ceux-ci entourent la cible et forment une coupe phagocytique qui finit par se fermer (pour revue, (Takenawa and Miki, 2001) (figure 39).

- La voie CED-1/CED-6/CED-7

Les protéines CED-1, CED-6 et CED-7, orthologues respectivement aux récepteurs CD91/LRP1/MGF10, la protéine adaptatrice GULP et la protéine transporteur ABCA1 (« ATP Binding Cassette Transporteur A1 ») chez les mammifères, forment la première voie de signalisation. CED-1 est un récepteur transmembranaire qui se rassemble autour des corps apoptotiques en réponse à un ligand inconnu et initierait la voie de signalisation via son domaine intracellulaire (Zhou *et al.*, 2001a). Il est fortement probable que ces signaux soient transduits via CED-6. Cette protéine adaptatrice contient de nombreux domaines d'interaction protéine-protéine et son homologue GULP interagit physiquement avec CED-1 et LRP1 (Su *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter que LRP1/CD91 est un co-récepteur des queues collagène de certaines collectines et du C1q (Vandivier *et al.*, 2002). Chez la drosophile, les orthologues de CED-1 et CED-6 (Draper et Dced-6) jouent également un rôle dans l'élimination des cellules apoptotiques (Manaka *et al.*, 2004).

La protéine CED-7 reste une énigme, car elle est unique par de nombreux aspects. Tout d'abord, c'est la seule protéine dont le fonctionnement est nécessaire à la fois dans la cellule apoptotique et dans le phagocyte (Wu and Horvitz, 1998b). De plus, son rôle semble limité dans le temps chez *C.elegans* (Ellis *et al.*, 1991). Le fort déficit des mutants *ced-7* pendant l'embryogenèse semble être résorbé à la fin du développement (Wu and Horvitz, 1998b). Néanmoins, CED-7 semble favoriser la relocalisation de CED-1 autour de la cellule apoptotique (Zhou *et al.*, 2001b; Kinchen *et al.*, 2005). L'identité des orthologues de *ced-7* chez les mammifères est aussi controversée : ABCA1 (Luciani and Chimini, 1996) et ABCA7 (Jehle *et al.*, 2006) ont été impliqués dans différentes études et les deux ont été impliqués dans l'élimination des cellules apoptotiques. ABCA1 coopère avec MEGF10 pour

promouvoir la phagocytose (Hamon *et al.*, 2006) mais semble aussi avoir un rôle dans le transport du cholestérol (Landry, 2006) tout comme LRP1 et GULP (Kiss *et al.*, 2006).

- La voie CED-2/CED-5/CED-12

Les gènes *ced-2*, *ced-5*, et *ced-12* homologues des gènes de mammifères codant les protéines CrkII, DOCK180, et ELMO (« Engulfment and Motility protein ») forment la seconde voie de signalisation. CED-2 serait impliqué dans la relocalisation de CED-12 et CED-5 à la membrane plasmique de façon à activer CED-10. Chez *C.elegans*, le récepteur membranaire impliqué dans cette voie n'est pas connu (Gumienny *et al.*, 2001).

Recrutement de CrkII chez les mammifères

Chez les mammifères, les orthologues DOCK180, ELMO et CrkII ont exactement le même comportement. Par contre, les connections entre cette voie et les récepteurs identifiés se précisent. Dans les cellules dendritiques immatures, le recrutement de CrkII/DOCK180/ELMO est notamment une conséquence de l'interaction de $\alpha\beta 5$ (récepteur des cellules dendritiques immatures) avec MFG-E8 (Albert *et al.*, 2000). L'activation de cette intégrine entraîne la phosphorylation de FAK et l'activation des tyrosines kinases de la famille Src. La position en amont ou en aval des kinases par rapport à FAK ne semble pas très claire, par contre, la conséquence est la phosphorylation et le recrutement de p130^{cas} qui recrute CrkII. L'ensemble du complexe DOCK180-ELMO est alors re-localisé à la membrane (Albert *et al.*, 2000). Il semblerait également que l'activation du récepteur MER (par fixation de GAS-6 sur la phosphatidylsérine) entraînerait le recrutement de FAK phosphorylé sur - $\beta 5$ menant au recrutement de p130^{cas} puis CrkII et enfin le complexe DOCK180-ELMO, témoignant d'une communication entre les récepteurs (Wu *et al.*, 2005).

Recrutement de ELMO

Le récepteur MER activé libère aussi la GEF Vav1, qui lui est constitutivement liée, qui va pouvoir activer la petite GTPase RhoG (Wu *et al.*, 2005). RhoG a été impliquée dans la voie DOCK-ELMO en amont de Rac1. Sa forme active se fixe à ELMO1 et augmente la phagocytose (deBakker, 2004). La GEF impliquée dans cette voie est TRIO. L'orthologue de TRIO chez *C.elegans*, UNC-73, peut activer l'orthologue de RhoG, MIG-2 qui fixe CED-12 (deBakker *et al.*, 2004). De plus, il semblerait que le complexe ternaire entre une autre GEF de RhoG, nommée PKGL6, l'ERZIN et ELMO soit impliqué dans la macropinocytose (d'Angelo 2005).

Dernièrement, il a été montré que le récepteur BAI1, qui reconnaît la phosphatidylsérine, peut recruter le complexe DOCK180-ELMO en interagissant directement avec ELMO (Park *et al.*, 2007).

Le complexe DOCK180-ELMO chez les mammifères, tout comme le complexe CED-5 CED-12 chez *C.elegans*, a non seulement un rôle important dans l'élimination des corps apoptotiques mais aussi dans la migration cellulaire, deux phénomènes nécessitant le remodelage directionnel de l'actine (Gumienny *et al.*, 2001).

1.3.1.2 Des voies indépendantes de Rac/CED-10 ?

- Voie de phagocytose ?

Des travaux ont montré que, chez les mutants *ced-10* de *C.elegans*, il existerait toujours une voie de phagocytose même si celle-ci se montre inefficace (Kinchen *et al.*, 2005). Des données récentes montrent également qu'aucune des deux voies décrites précédemment n'est nécessaire pour l'internalisation de cellules subissant une « apoptose » caspase-indépendante (Abraham *et al.*, 2007). Le rôle des autres petites GTPases de la famille Rho dans la phagocytose des corps apoptotiques commence tout juste à être évoqué. Cdc42 est un candidat dans cette voie. De même, la surexpression de Rab5 augmente considérablement la phagocytose. Rab5 est connu en tant que marqueur des endosomes précoces et sa localisation ne laissait pas prévoir une telle observation (Nakaya *et al.*, 2006).

Certaines voies seraient également impliquées non pas dans le remodelage de l'actine mais dans l'activité contractile. Notamment, la voie de signalisation en aval du récepteur du complément CR-3 entraîne l'activation de Rho puis de la kinase ROCK qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine. La phosphorylation des chaînes légères de myosine favorise l'interaction myosine/actine et donc l'activité contractile (Olazabal *et al.*, 2002).

- Ou voie de régulation ?

Le rôle de Rab5 pourrait être lié à un rôle dans la dégradation des cellules apoptotiques. En effet, de nouvelles études suggèrent que la capacité à dégrader les cellules apoptotiques pourrait influencer l'internalisation de nouvelles cellules apoptotiques (Schrijvers *et al.*, 2005). De plus, il a été observé que la petite GTPase RhoA s'accumule sous sa forme GTP-liée en présence d'un excès de cellules apoptotiques (Tosello-Tramont *et al.*, 2003). Il serait possible que cette accumulation de RhoA-GTP prévienne la phagocytose d'une autre cellule apoptotique (Erwing *et al.* 2006). Ce phénomène limiterait l'accumulation de corps

apoptotiques en cours d'internalisation. L'interaction indirecte entre RhoA et ELMO via les protéines ERM pourrait être à l'origine de cette inhibition (Grimsley *et al.*, 2006).

1.3.2 Voies anti-inflammatoires

Même si de nombreuses études montrent qu'un défaut d'élimination des cellules apoptotiques mènent au développement de l'auto-immunité, il est aussi notoire que la disruption de certains récepteurs dans la souris entraîne l'accumulation de corps apoptotiques mais pas de pathologie auto-immune : CD14 (Devitt *et al.*, 2004), CD36, β 3 ou β 5 intégrine (Lucas *et al.*, 2006) ou la MBL (Stuart *et al.*, 2005). Ce phénotype pourrait être dû à un effet immunosuppresseur des cellules apoptotiques (Voll *et al.*, 1997).

Effets immunosuppresseurs des cellules apoptotiques

Parmi les effets immunosuppresseurs des cellules apoptotiques, nous pouvons citer la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires par les phagocytes professionnels. En effet, des mesures *in vitro* ont montré que des macrophages qui internalisent des cellules apoptotiques sécrètent du TGF- β et de l'IL-10 (Voll *et al.*, 1997; Fadok *et al.*, 1998b; Devitt *et al.*, 2004). De plus, il semblerait que la présence de cellules apoptotiques inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires (INF γ , IL-1 et IL-12) produites par les monocytes en réponse au lipopolysaccharide (Voll *et al.*, 1997). Il est suggéré que cette inhibition puisse être due à la production de TGF- β par les phagocytes (Lucas *et al.*, 2006). Visiblement, les cellules apoptotiques entières ne sont pas requises pour de tels effets, des fragments de membrane apoptotique ou des vésicules avec de la phosphatidylsérine, suffiraient aux effets anti-inflammatoires (Huynh *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004). De même, la délétion de CD-36 et des intégrines β 5 et β 3 chez les souris ne modifient pas la production de TGF- β (Lucas *et al.*, 2006).

Voies de signalisations favorisant la synthèse de cytokines anti-inflammatoires

Malgré l'importance fondamentale de ce processus, les voies de signalisation impliquées sont encore mal comprises. Un facteur de transcription appelé GC Binding Protein (GC-BP) semble impliqué dans l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 médiée par les cellules apoptotiques (Kim *et al.*, 2004). Il semblerait qu'une déficience en transglutaminase 2 chez la souris supprime la production de TGF- β chez les macrophages entraînant une pathologie de type auto-immune (Szondy *et al.*, 2003). Par contre, rien n'est connu quant aux voies de signalisations impliquées. Il a été montré, par contre, que la reconnaissance de la phosphatidylsérine par les récepteurs du phagocyte inhiberait la production des cytokines pro-

inflammatoires et favoriserait la production des cytokines anti-inflammatoires (Cvetanovic and Ucker, 2004; Mitchell *et al.*, 2006). De même, la reconnaissance de la MBL ou du C1q entraîne la production de cytokines anti-inflammatoires, ces protéines déclenchent donc des voies de signalisation impliquées dans la régulation des cytokines (Fraser *et al.*, 2006).

Effets tolérogènes des cellules apoptotiques

L'autre aspect immunosuppresseur des cellules apoptotiques est la présentation tolérogène des peptides par les cellules dendritiques aux lymphocytes T. Les cellules dendritiques immatures sont capables de phagocytose. Une fois une cible ingérée, la cellule dendritique se différencie pour devenir une cellule présentatrice d'antigènes qui migre dans les organes lymphoïdes pour activer le système immunitaire adaptatif. Il a été montré, dans de nombreux modèles animaux, que les cellules dendritiques, en absence de signal immunogène, étaient capables de présenter des auto-antigènes dans les organes lymphoïdes. Ceci aurait un rôle fondamental dans la tolérance périphérique (Huang *et al.*, 2000; Scheinecker *et al.*, 2002). Il a été montré que les cellules dendritiques immatures étaient capables d'induire la délétion clonale ou l'anergisation des cellules T CD8⁺ autoréactives (Davey *et al.*, 2002; Lambolez *et al.*, 2002). La maturation partielle voir absente des cellules dendritiques en présence de cellules apoptotiques pourrait être due à l'absence de cytokines inflammatoires et de signaux de maturation mais aussi à des signaux d'inhibition via les récepteurs de la phagocytose. Les processus cellulaires liés à la maturation des cellules dendritiques sont largement étudiés mais les voies de signalisation encore peu comprises.

1.3.3 L'activation de DOCK/ELMO, une voie anti-inflammatoire ?

Les études sur le développement de *C.elegans* ont impliqué les complexes CED-5/CED-12 dans la voie d'élimination des cellules apoptotiques et dans les voies de migration cellulaire. Aucun lien n'a été établi actuellement entre l'activation de DOCK180/ELMO et les signaux anti-inflammatoires. Dans cette partie, nous allons faire le point sur les données qui peuvent éclairer ce point.

1.3.3.1 Les déficiences génétiques et l'interruption des gènes

La majorité des informations dont nous disposons quant à l'implication du complexe ELMO/DOCK spécifiquement dans l'élimination des cellules apoptotiques, provient de l'étude des mutants chez *C.elegans*. Les nématodes mutés dans les gènes *ced-5* et *ced-12* présentent des défauts morphologiques. Les mutants dans les gènes *ced-5* et *ced-12* possèdent des gonades malformées due à une migration incorrecte des cellules le long des muscles

dorsaux. De plus, les embryons montrent une accumulation de cellules apoptotiques à différents stades du développement (Wu and Horvitz, 1998a; Gumienny *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001). Chez la drosophile et le poisson zèbre, l'inactivation des gènes orthologues à *ced-5* et *ced-12* sont à l'origine de défauts dans la fusion des cellules myoblastiques (Bianco *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2007; Geisbrecht *et al.*, 2008).

Très peu de déficiences génétiques humaines dans ces voies de signalisations sont connues actuellement. Les déficiences les mieux caractérisées sont des déficiences en protéines de reconnaissance ou en opsonines (C1q, C3) qui sont à l'origine de maladies autoimmunes. Il semblerait que des variations génétiques dans le gène *Elmo1* soit à l'origine d'une susceptibilité accrue à la néphropathie chez les diabétiques (Shimazaki *et al.*, 2005).

1.3.3.2 Interactions entre ces voies de signalisation et les pathogènes

Des interactions entre les voies de signalisation impliquées dans le remodelage de l'actine et certains pathogènes commencent à être mises en évidence. Par exemple, il semblerait que l'entrée de *Shigella* dans les cellules mette en jeu la voie DOCK180-ELMO. En effet, *Shigella* sécrète dans les cellules épithéliales le facteur IpgB1. Ce facteur est capable d'interagir avec ELMO de la même façon que RhoG-GTP et d'induire le remodelage de l'actine et une phagocytose « non inflammatoire » des bactéries. C'est une première étape dans l'invasion bactérienne des cellules (Handa *et al.*, 2007).

L'ajout de cellules apoptotiques dans des cultures de cellules infectées par HIV-1 entraîne une inhibition de la transcription virale dépendante d'ELMO (Gekonge *et al.*, 2006). La protéine ELMO interagirait avec la protéine NEF de HIV-1 (Janardhan *et al.*, 2004).

Ces observations sont des indices qui laissent penser que la voie DOCK-ELMO aurait des conséquences anti-inflammatoires.

1.3.3.3 Les partenaires d'ELMO1 impliqués dans les voies de signalisation pro-inflammatoires

Parmi les pistes intéressantes, une étude montre que la kinase Hck interagit avec ELMO de la même manière que DOCK180 et entraîne sa phosphorylation. Hck est une tyrosine kinase de la famille Src spécifique des cellules hématopoïétiques. Elle est activée en réponse aux récepteurs du complément ou du récepteur de l'IL-6 et est impliquée dans des phagocytoses de type pro-inflammatoire (Scott *et al.*, 2002). Cette interaction entre Hck et ELMO pourrait

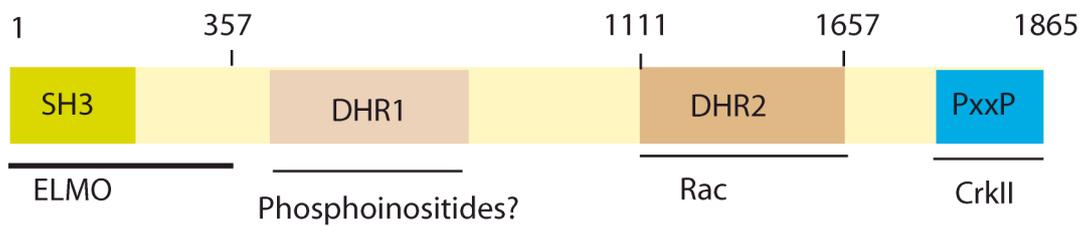


Figure 40 : Organisation des différents domaines de DOCK180 et leurs interactants.

DOCK180 (numéro d'accèsion sur swissprot : Q14185) possède un domaine SH3 (kaki), qui interagit avec ELMO, un domaine DHR1 (beige) qui pourrait fixer les phosphoinositides, et domaine DHR2 de liaison à Rac (marron) et un domaine polyproline (PxxP, bleu) de fixation à CrkII.

être impliquée dans l'association ou la dissociation du complexe ELMO/DOCK. Le site d'interaction appuie tout de même la seconde hypothèse mais cela reste à étudier.

1.4 Le complexe ELMO/DOCK

Nous avons vu dans la partie précédente que de nombreuses voies de signalisation convergent vers le complexe ELMO/DOCK pour l'activation de Rac-1. De plus, ELMO semble impliqué à la fois dans la régulation de cette voie, dans l'interaction avec les pathogènes ainsi que dans la pathologie néphrétique du diabète. Cette protéine semble au carrefour entre différentes voies et a donc tout particulièrement attiré notre attention.

1.4.1 Les protéines de la famille Dock180

La protéine DOCK180 est une GEF originale. Les Rho GEFs connues jusqu'à présent possèdent deux domaines : un domaine Dbl, possédant l'activité de liaison à la petite GTPase, et un domaine PH (Pleckstrine Homology) responsable de la re-localisation à la membrane par fixation de phosphoinositides. DOCK180 possède deux domaines conservés : un domaine DHR-2 (DOCK180 Homology Region 2) qui fixe la petite GTPase et un domaine DHR-1 contenant une région C2 qui pourrait lier les phosphoinositides (Cote and Vuori, 2002 ; (Cote *et al.*, 2005). À ces deux domaines peuvent s'ajouter, un domaine polyprolines C-terminale et un domaine SH3 N-terminal (Src Homology 3) qui peut interagir avec les domaines polyprolines. La région N-terminale interagit avec ELMO alors que le polyproline C-terminal fixe CrkII. Les domaines de DOCK180 ainsi que les protéines connues pour interagir avec chacun de ces domaines sont présentés dans la figure 40.

Des analyses de bioinformatique ont identifié 11 protéines de la famille DOCK180 chez l'homme qui partagent les domaines DHR-1 et DHR-2 (Cote and Vuori, 2002). Ces protéines ont été classées en quatre sous familles en fonction de l'identité de séquence des domaines DHR. DOCK180 appartient à la sous famille DOCK-A avec DHR-2. DOCK3 (encore appelée MOCA pour « Modifier of Cell Adhesion ») et DOCK4 appartiennent à la famille DOCK-B. Ces deux sous-familles possèdent le domaine SH3 N-terminal nécessaire à la fixation d'ELMO ainsi qu'une région C2 dans DHR-1, liant les phosphoinositides dans DOCK180. Les protéines de la famille DOCK-C (DOCK6,7 et 8) et DOCK-D (DOCK9,10,11) ne possèdent ni SH-3 ni région C2. DOCK9, encore appelée zizimin possède par contre un domaine PH. Les deux sous-familles C et D sont regroupées pour former la famille des zizimines. Chez la drosophile, quatre protéines de la famille DOCK180 ont été identifiées, une par sous-famille. La spécificité par rapport aux petites GTPases dépend des familles, la.

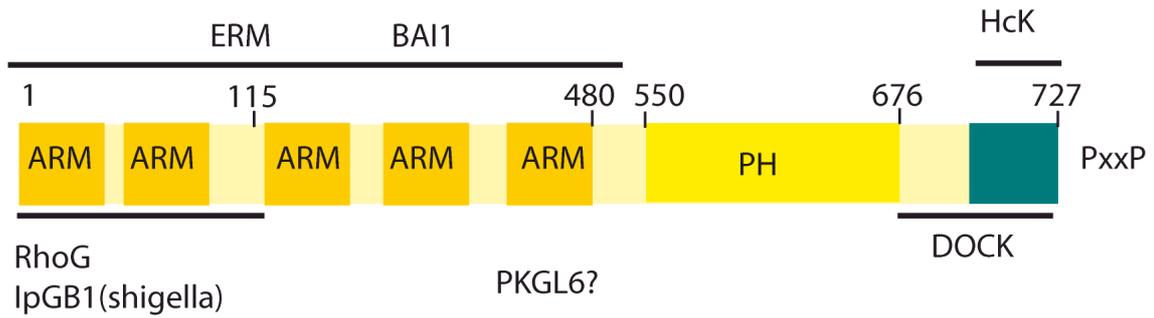


Figure 41 : Organisation de la protéine ELMO1 et de ses sites d'interaction avec ses partenaires

La protéine ELMO1 humaine (numéro d'accèsion sur swissprot : Q92556) possède cinq domaines N-terminaux appelés armadillo (orange, ARM) qui fixent RhoG, IpGB1, les protéines de la famille ERM ainsi que le récepteur BAI1. La partie C-terminale contient un domaine PH (jaune) et un domaine polyproline (PxxP, vert) de liaison à DOCK.

famille DOCK-A semble bien être spécifique de Rac1 alors que DOCK9 active Cdc42 (Cote and Vuori, 2002). Nous avons largement étudié le rôle de DOCK180 dans l'élimination des cellules apoptotiques dans le chapitre précédent. Nous avons également évoqué son rôle dans la migration cellulaire. Les autres protéines de cette famille ont aussi des rôles liés aux mouvements membranaires.

DOCK2 est exprimé dans les cellules hématopoïétiques dont les lymphocytes et les cellules dendritiques. Au contraire, DOCK180 qui semble presque ubiquitaire, est exclu des lymphocytes (Nishihara, 1999; Fukui *et al.*, 2001). DOCK2 a été impliqué dans de nombreux processus immunitaires tels que : le développement, le « homing », l'activation, l'adhésion, la polarisation et les processus de migration des lymphocytes (Fukui *et al.*, 2001 ; Sanui *et al.*, 2003a). De même, la translocation du TCR au niveau des synapses immunologiques semble dépendante de DOCK2 (Sanui *et al.*, 2003a).

La protéine DOCK3 est exprimée de façon prédominante dans les neurones et se localise dans les cônes de croissance et les « ruffles » membranaires. Elle semble être impliquée dans la croissance des neurites (Namekata *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005).

Le gène de DOCK4 a été cloné dans un screen cherchant les gènes délétés lors de la progression tumorale. L'activation de la petite GTPase Rap1 par DOCK4 est essentielle à la formation des jonctions adhérentes (Yajnik *et al.*, 2003).

1.4.2 Les protéines de la famille ELMO

ELMO est un co-facteur de DOCK180 essentiel dans l'activité GEF de DOCK180, à tel point qu'on a considéré que le complexe DOCK -ELMO forme une GEF bi-partite, ELMO possédant le domaine PH des GEF et DOCK180 le domaine d'activation de la petite GTPase Rac1 (Gumienny *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001a; Brugnera *et al.*, 2002). Les données montrant la capacité de fixation des phosphoinositides par le domaine DHR-1 de DOCK180 remet en question cette notion de GEF bi-partite (Cote *et al.*, 2005). Chez l'homme, il existe trois protéines ELMO : ELMO1, ELMO2 et ELMO3. Ces protéines, d'environ 700 résidus sont caractérisées par des répétitions de types Armadillo dans la région N-terminale et de domaines PH (Pleckstrin Homology) et Poly-Prolines en C-terminal (Wu and Horvitz, 1998b). Parmi ces protéines, deux semblent interagir avec Dock180 et trois des cinq protéines detestées interagissent avec ELMO ce qui montre que l'interaction entre ces deux protéines semble conservée. Les protéines de la sous-famille des zizimines sont incapables de fixer ELMO. Des formes courtes des protéines ELMO ont également été identifiées mais leur rôle

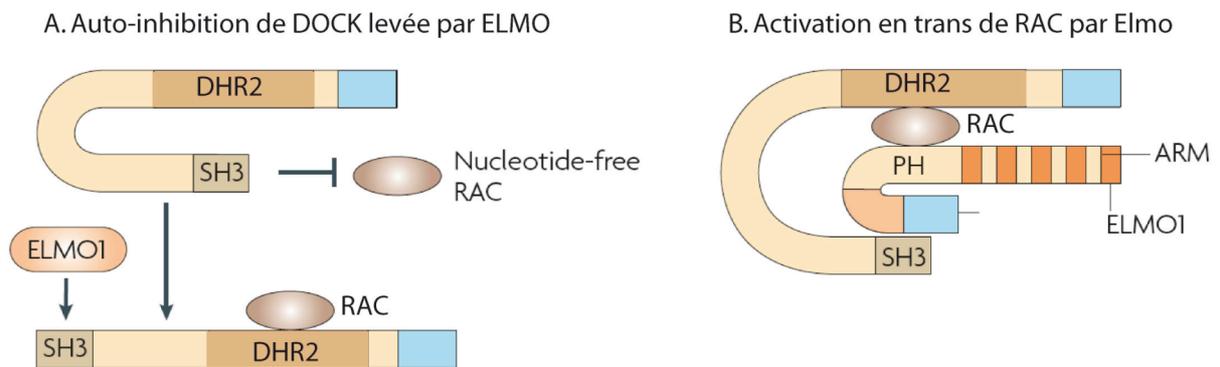


Figure 42 : Modèles d'activation de DOCK par ELMO.

Deux modèles d'activation de DOCK par ELMO sont proposés dans la littérature. A. DOCK serait auto-inhibé par interaction entre son domaine polyproline et son domaine SH3. L'interaction entre le SH3 de DOCK et le polyproline de ELMO lèverait cette inhibition et permettrait l'accès de Rac au domaine DHR-2. B. Le deuxième modèle suppose qu'en plus ELMO pourrait fixer Rac et stabiliser, ainsi, son interaction avec le domaine DHR-2 de DOCK. (D'après (Ravichandran and Lorenz, 2007)).

est inconnu. L'organisation de la protéine ELMO1 ainsi que les sites d'interaction identifiées sont présentés dans la figure 41. L'expression des différentes protéines ELMO semble également être cellule dépendante. Par exemple, la protéine ELMO1 est très peu exprimée dans les cellules HeLa dans lesquelles un complexe DOCK180-ELMO2-ELMO3 est détecté essentiellement dans le noyau (Yin *et al.*, 2004).

1.4.3 Interaction entre DOCK180 et ELMO

Les modalités d'interaction entre les protéines DOCK et ELMO semblent complexes et plusieurs modèles sont proposés. La partie C-terminal de ELMO est suffisante pour l'interaction avec DOCK et ceci semble engager trois interactions différentes (figure 42) : le polyproline de ELMO se fixe au SH3 de DOCK, le domaine PH de ELMO avec le complexe Rac- DOCK(DHR-2), et 100 résidus du domaine C-terminal de ELMO (autre que PP) interagissent avec les 357 résidus N-terminaux de DOCK180 (autres que le domaine SH-3) (Sanui *et al.*, 2003b; Lu *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005). Il semblerait qu'en absence d'ELMO, la protéine DOCK180 serait sous forme inactive due à l'interaction entre le domaine polyproline C-terminal et le domaine SH3 N-terminal (Lu *et al.*, 2005). L'interaction avec ELMO leverait cette inhibition et permettrait de rendre le domaine DHR-2 accessible à Rac (Brugnera *et al.*, 2002; deBakker *et al.*, 2004; Grimsley *et al.*, 2004). Il est également envisagé que ELMO facilite directement le recrutement de Rac en interagissant avec lui via son domaine PH (Lu *et al.*, 2004). Les modèles sont présentés figure 42.

Des données montrent également qu'ELMO1 stabilise DOCK180 en inhibant l'ubiquitination de celle-ci et donc sa dégradation par le protéasome (Makino *et al.*, 2006).

1.4.4 Projet : étudier le rôle de ce complexe dans la phagocytose

Le complexe CED-5/CED-12 a été découvert chez *C.elegans* chez lequel il joue un rôle dans l'élimination des cellules apoptotiques et la migration cellulaire. Comme nous l'avons vu depuis il a aussi été montré que les orthologues DOCK/ELMO chez les mammifères jouent aussi un rôle important dans ces processus et la protéine ELMO semble un site de régulation de ces voies. Lorsque que nous avons initié le projet nous nous sommes posé plusieurs questions quant à ces protéines :

- Comment DOCK et ELMO interagissent de façon à augmenter l'activation de Rac1 ?
- Peut-on identifier de nouveaux partenaires de la protéine ELMO dans la cellule ? A quel moment interviennent-ils ?

- Ce complexe est-il vraiment spécifique de la phagocytose des cellules apoptotiques ?

Ces questions se posent à différentes échelles depuis le niveau atomique jusqu'au niveau cellulaire. La production de domaines ou de protéines entières ELMO1 murines (noté ELMO1MS) et DOCK180 a donc été initiée de façon à réaliser des études biochimiques mais aussi une étude structurale de ces protéines et de l'interaction de leurs différents domaines.

En parallèle, nous avons besoin d'un modèle cellulaire de phagocytose pour étudier leurs comportements mais aussi trouver de nouveaux partenaires. Il était donc nécessaire de choisir une ou plusieurs lignées cellulaires capables de phagocytose. Il fallait aussi choisir des cibles à internaliser : des cellules apoptotiques, des billes de latex ou des pathogènes. Le choix de ce modèle est essentiel pour envisager le rôle de DOCK/ELMO dans différents types de phagocytose. Chaque modèle utilisé peut aussi potentiellement influencer les partenaires principaux impliqués.

Au cours de ma thèse, j'ai donc mis au point des modèles de phagocytose et développé des outils de façon à suivre ELMO1 ou ses domaines dans la cellule (protéine de fusion ELMO1MS-GFP, marquage immunofluorescent) mais aussi de déterminer les partenaires de cette protéine (surexpression de protéines étiquetées dans la cellule).

2 Matériel et méthodes

2.1 Obtention de vecteurs d'expression eucaryotes

2.1.1 Méthodes de biologie moléculaire

2.1.1.1 *Matériel*

Les bactéries TopTen sont mises en cultures sur des milieux de cultures LB et LB agar avec l'antibiotique approprié.

Le plasmide pEGFPc1 (BD Bioscience Clontech) permet de placer une protéine d'intérêt en phase avec l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein, λ_{exc} 495nm, λ_{em} 508nm) en C-terminal de celle-ci. L'expression est sous le contrôle du promoteur du cyclomegalovirus et l'origine de répllication eucaryote est celle de SV-40. Le plasmide peut être transfecté de façon stable sous une sélection Gentamycine.

Le vecteur pZome-1N (CellZome) est un vecteur d'expression eucaryote qui permet d'exprimer dans des cellules de mammifère une protéine d'intérêt couplée à une étiquette N-terminale composée du domaine de reconnaissance des IgG de la protéine A et du domaine de liaison de la calmoduline. Les deux domaines sont séparés par un site de coupure à la TEV (Tabacco Etch Virus protease). Cette étiquette est appelée TAP pour Tandem Affinity Purification et permet de purifier grâce à deux étapes sur colonne (IgG et Calmoduline) la protéine d'intérêt et les protéines qui lui sont associées (Gregan *et al.*, 2007). L'expression est sous contrôle du promoteur du gène gag et le plasmide peut être transfecté de façon stable sous une sélection puromycine.

Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification en chaîne ont été synthétisés par MWG biotech.

2.1.1.2 *Techniques de biologie moléculaire*

Les principales techniques de génétique moléculaire ont été réalisées d'après Maniatis *et al.* (Maniatis *et al.*, 1989). Les digestions enzymatiques ont été réalisées selon les conditions préconisées par New England Biolabs.

Les kits d'extraction de plasmide à petite échelle («Plasmid Mini preps») ou de purification des fragments d'ADN («NucleoSpin Extract II») proviennent de chez Macherey-Nagel. Les kits de purification à grande échelle de plasmides pour la biologie moléculaire («HiSpeed

	Cycle long		Cycle court	
Mise à température	98°C 2min		95°C 2min	
Lancement de la réaction	98°C 1min 72°C 30s	3 fois		
Dénaturation	98°C 30s	30 fois	95°C 30s	30 fois
Appariement	58-69°C 30s		58-69°C 30s	
Elongation	72°C 3min +2s/cycle		72°C 30s	
Fin	72°C 10min		72°C 10min	

Tableau XXII : Cycles utilisés pour l'amplification d'ADN

Les domaines d'ELMO1MS ont été amplifiés par polymérisation en chaîne à partir de deux cycles, un cycle long pour les grands fragments et un cycle court pour les petits fragments.

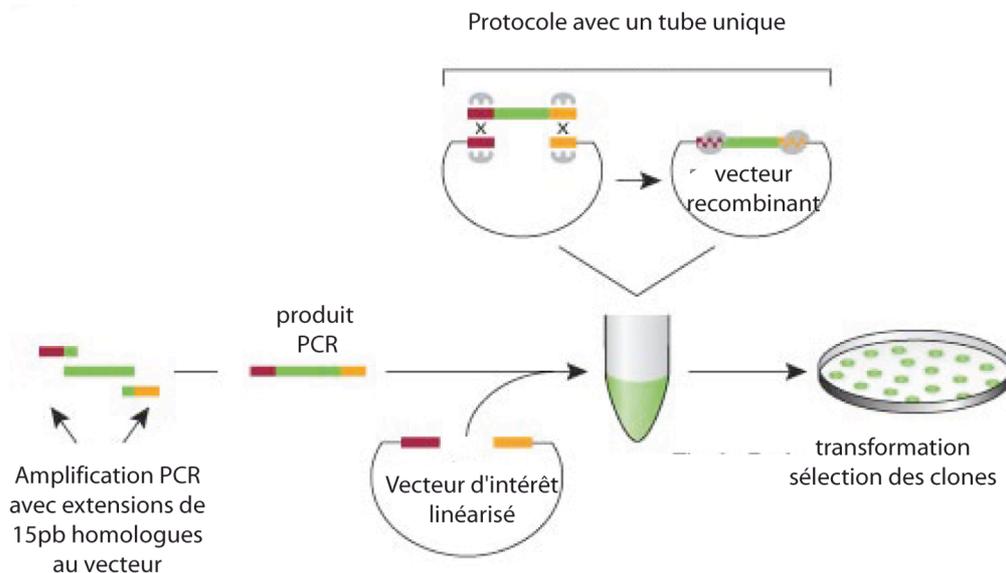


Figure 43 : Principe du Kit Infusion (Clontech, schéma du fournisseur)

Le fragment d'intérêt est amplifié avec des amorces appropriées et le vecteur est linéarisé. Ils sont mélangés dans le réactif du kit de façon à créer des extrémités cohésives sur le vecteur et permettre l'appariement entre vecteur et insert. Le vecteur recombinant est utilisé pour transformer des bactéries.

Plasmid Midi Kit ») ou pour la biologie cellulaire (« Maxi kit endo-free ») proviennent de chez Qiagen.

Les séquençages systématiques des constructions obtenues sont réalisés par MWG biotech.

2.1.2 Amplification des séquences d'Elmo1MS (PCR)

Le cDNA de notre protéine d'intérêt Elmo1MS (souris) nous a été fourni par le Professeur Yoshinori Fukui (Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University). Tous les fragments PCR ont été amplifiés en utilisant l'enzyme PHUSIONTM (Finzyme). Cette enzyme est née de la fusion entre une polymérase de *Pyrococcus* et d'un domaine de fixation aspécifique de l'ADN. Elle possède ainsi une activité de correction importante (6 fois plus que la Pfu) tout en conservant une forte processivité (10 fois plus que la Pfu). Elle est fournie avec un tampon optimisé et conservée à -20°C dans ce tampon à une concentration deux fois supérieure à celle d'utilisation. Pour réaliser les PCR, l'enzyme PHUSIONTM dans son tampon optimisé est diluée deux fois dans un mélange contenant 0,25µg d'ADN matrice et 1µl (100pmol) de chaque oligonucléotide. Nous avons utilisé deux cycles PCR selon la taille des fragments à amplifier (tableau XXII). Les températures utilisées pour l'appariement ont pu être légèrement modifiées en fonction des couples d'oligonucléotides utilisés.

Pour amplifier correctement les grands fragments, nous avons réalisé une phase d'amplification très longue (3min) qui est augmentée de 2s à chaque cycle pour tenir compte de la perte de processivité probable de la polymérase. Les trois cycles préliminaires servent à amorcer la réaction. Pour les petits fragments, la phase d'amplification est très courte afin d'éviter une dégradation inutile des réactifs. Les fragments amplifiés ainsi que le cycle utilisé sera précisé pour chaque stratégie de clonage par la suite.

2.1.3 Obtentions de vecteurs de fusion GFP

Afin de cloner 5 régions d'ELMO1MS de souris dans pEGFPc1, nous avons utilisé le kit InFusion (In-FusionTM 2.0 PCR Cloning Kit, Clontech). Ce kit permet de créer des extrémités cohésives assez longues entre des produits de PCR à insérer et le vecteur de façon à faciliter l'insertion de la séquence d'intérêt. Les extrémités cohésives possèdent la séquence du vecteur de part et d'autre du site de clonage choisi (figure 43).

Les amorces ont été dessinées de façon à posséder une extension complémentaire du MCS de pEGFPc1, le site XhoI et une séquence complémentaire du fragment à amplifier. Il est également important d'insérer lorsqu'il n'existe pas un codon STOP (tableau XXIII).

Fragment amplifié	Taille	Région d'ELMO1MS	Oligonucléotides	Cycle
Elmo1MS	2214	Elmo1MS complet	InfusElmoF InfusElmoR	long
Elmo-Nter	2061	Région N-terminale sans PH-PP	InfusElmoF InfusElmoPHR	long
ElmoV2	774	Variant V2 de Elmo	InfusElmo-V2F InfusElmoR	court
Elmo-PH-PP	564	Domaines PH et PP	InFusELMO-PH_PP_F InfusElmoR	court
Elmo-PH	411	Domaine PH	InFusELMO-PH_PP_F InfusElmoPHR	court

Tableau XXIV: Fragments d'ELMO1MS amplifiés par PCR pour le clonage dans pEGFPc1.

Nous avons essayé d'amplifier cinq régions à partir de l'ADNc d'ELMO1MS. Ce tableau présente les caractéristiques des régions amplifiées ainsi que les conditions d'amplification.

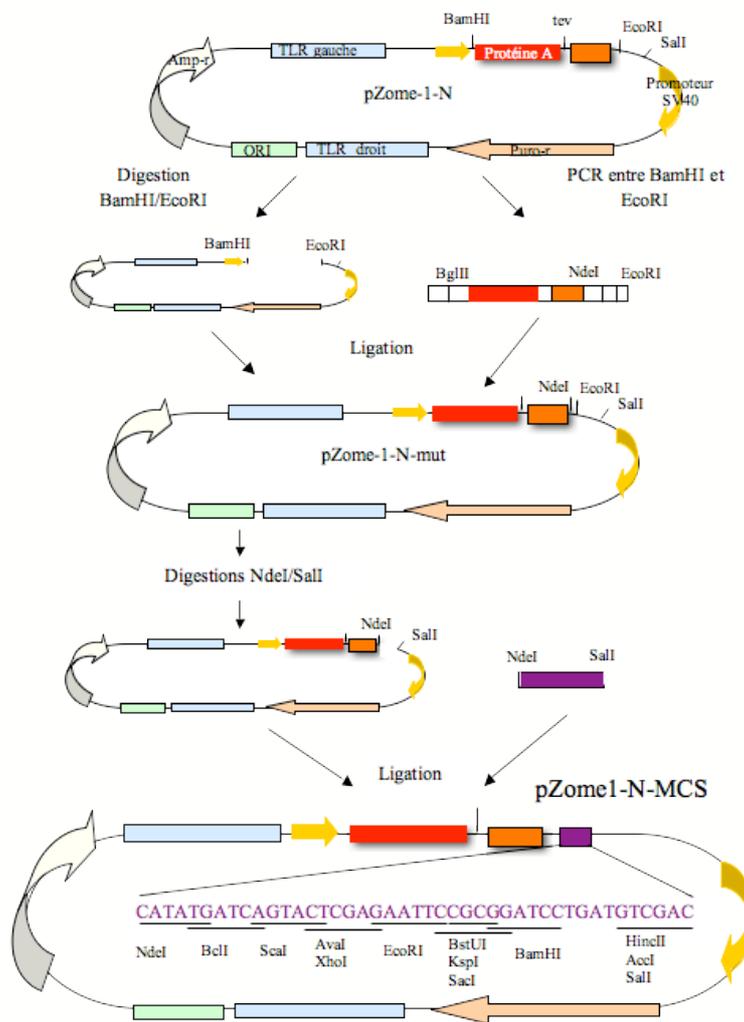


Figure 44: Obtention de pZome1-N-MCS

Le site BamHI du vecteur pZome-1N est muté et un site NdeI est ajouté en amont du site EcoRI. Un site de clonage multiple est inséré entre les sites NdeI et SalI.

Oligonucléotide	séquence	Complémentaire de	TM°C
InFusELMO F	GGACTCAGAT C TCGAG ATGCCGCCGCTTCGGAC	Région 5' brin codant Elmo1MS	65,3
InFusELMO R	GAAGCTTGAG C TCGAG TCAGTTACAGTCATAGACAAAGTC	Région 3' brin non-codant Elmo1M	60,2
InFusELMO-V2 F	GGACTCAGAT C TCGAG ATGCAGGTGGTGAAGGAGC	Région 5' brin codant correspondant au début de la forme V2 de Elmo	62,6
InFusELMO-PH_PP F	GGACTCAGAT C TCGAG CAGCGCTGAACCGCCTTGTGG	Région 5' du domaine PH brin codant	67,1
InFusELMOPH R	GAAGCTTGAG C TCGAG TCAGTCCTTCCCAAGCAGTGC	Région 3' de domaine PH brin non codant	63,7

Tableau XXIII : Oligonucléotides utilisés pour insérer des fragments d'ELMO1MS en phase avec la GFP.

Les séquences soulignées correspondent aux séquences non complémentaires de l'ADNc d'ELMO. Elles contiennent le site XhoI (surligné en jaune) ainsi que les séquences flanquantes de ce site (en 5' pour les oligonucléotides en sens direct et en 3' pour les oligonucléotides en sens indirect) dans le site de clonage multiple de pEGFPc1. Le site reste donc intact après clonage.

Cinq fragments ont été amplifiés selon le protocole décrit ci-dessus. Les couples d'amorces utilisés ainsi que les fragments sont décrits dans le tableau XXIV. L'amplification correcte des fragments est vérifiée par migration sur gel d'agarose. Le vecteur pEGFPc1 (4µg) est digéré par XhoI, déposé sur gel puis la bande correspondant au vecteur linéarisé est découpée et l'ADN est purifié. L'insertion des produits de PCR dans ce plasmide est réalisée selon les recommandations du kit tout comme la transformation des bactéries. Les clones sont sélectionnés sur milieu agarose avec Kanamycine (15mg.mL⁻¹). L'ADN plasmidique des clones est ensuite purifié puis cartographié à l'aide d'enzymes de restrictions appropriées et séquencé.

2.1.4 Obtention d'un vecteur de TAP-tag modifié et insertion d'Elmo1MS

2.1.4.1 *Modification de pZome-1N*

La stratégie est présentée figure 44Le vecteur pZome-1N possède deux sites uniques : un site BamHI en 5' du TAG et un site EcoRI en 3' de l'étiquette. Compte tenu de la présence de sites EcoRI dans les ADNc des protéines étudiées au laboratoire, nous avons décidé de modifier ce plasmide de façon à remplacer le site EcoRI par un site de clonage multiple. Dans notre cahier des charges, nous voulions avoir un site BamHI au sein du site de clonage multiple, il nous fallait donc muter le site déjà présent, ainsi qu'un site NdeI en phase avec

Oligonucléotide	Séquence	Tm	Utilisation
mutB-zomeN-for	GGCC AGATCT ACCATGGCAGGCCTTGCACA	63,2	Mutation site BamHI et ajout d'un site NdeI dans pZome 1N
mutB-zomeN-rev	CTGGC GAATTC <u>CATATG</u> AAGTGCCCCGGAGGATGAG	62,8	
MCS-ZOMEN-for	TATGATCAGTACTCGAGAATTCCGCGGATCCTG <u>ATG</u>	60,4	Fabrication d'un MCS
MCS-ZOMEN-rev	<u>TCGAC</u> ATCAGGATCCGCGGAATTCTCGAGTACTGATC A	62,6	

Tableau XXV : Oligonucléotides utilisés pour la modification de pZome-1N

Quatre oligonucléotides ont été utilisés pour modifier le vecteur pZome-1N. Les deux premiers ont servi à muter le site BamHI utilisant le site de l'enzyme BglIII (vert) et à ajouter un site NdeI (souligné) en amont de EcoRI (rouge). Les deux autres oligonucléotides sont complémentaires afin de former un site de clonage multiple et permettent de l'insérer entre NdeI (souligné) et Sall (bleu). Le Tm, température de fusion, est donné en °C.

Oligonucléotide	séquence	Complémentaire de	Tm
Elmo-XhoI-for	GCGC <u>CTCGAG</u> CTCCGCCGCTTCGGAC	Région 5' brin codant	67,3
Elmo-BamHI-rev	GCGCGC GGATCCT CAGTCCTTCCCAAGCAGTGC	Région 3' brin non-codant	61,6
ElmoV2-XhoI-for	GCGC <u>CTCGAG</u> CTCAGGTGGTGAAGGAGCAGG	Région 5' brin codant de la forme V2 de Elmo	65,6

Tableau XXVI: Oligonucléotides d'amplification d'ELMO1MS pour le clonage dans pZome1N-MCS.

Les oligonucléotides ont été utilisés pour amplifier deux fragments d'ELMO1MS. Les deux premiers pour amplifier l'ADNc d'ELMO1MS complet et les deux derniers pour amplifier le produit 2 d'épissage d'ELMO1MS. Les sites BamHI sont notés en rouge et les sites XhoI en bleu. Le codon STOP est surligné en gras. Le Tm, température de fusion, est donné en °C.

l'étiquette. Le site NdeI possède une séquence ATG et permet d'insérer un fragment en limitant le nombre de nucléotides ajoutés avant l'ATG initiateur.

Afin de muter le site BamHI et de rajouter le site de l'enzyme NdeI, nous avons amplifié l'étiquette située entre les sites BamHI et EcoRI (cycle court) avec des amorces appropriées (tableau XXV). L'amorce en sens direct possède un site BglII compatible avec le site BamHI. L'amorce en sens indirect possède le site NdeI en phase avec l'étiquette suivi du site EcoRI. Après amplification, le fragment est digéré par EcoRI seule d'abord pendant 15min (tampon 2 Biolabs) puis BglII est ajouté pour 45min supplémentaires. On réalise ainsi une digestion totale par EcoRI et partielle par BglII. En effet, l'étiquette possède un site BglII. Le vecteur pZome-1N est digéré totalement par BamHI/EcoRI. Le fragment correspondant à la digestion partielle voulue ainsi que le vecteur digéré sont identifiés sur gel d'agarose puis purifiés. La ligation est réalisée grâce au kit QiaQuick (Qiagen) pendant 5min à température ambiante dans un volume de 20uL avec un rapport vecteur (75ng) : insert de l'ordre de 1 : 3. Les colonies sont sélectionnées sur milieu LB agarose avec ampicilline ($100\mu\text{g.mL}^{-1}$). Après purification de l'ADN plasmidique, celui-ci est cartographié par des digestions appropriées et séquencé. Le plasmide est renommé pZome-1N-mut (figure 44, page 144).

Le MCS a été obtenu à partir de deux oligonucléotides complémentaires que nous avons dessiné de façon à ce que leur appariement crée le site de clonage voulu avec de part et d'autres les sites NdeI et Sall pré-digérés. Pour l'appariement, nous avons repris 9mmol de chaque oligonucléotide dans un tampon contenant 200mM de Tris-HCl pH=8, 10mM MgCl_2 . Le tout a été incubé 3 min à 95°C puis 1h à température ambiante. Le vecteur pZome-1N-mut est digéré totalement en deux étapes par les enzymes NdeI puis Sall, déposé sur gel et la bande d'intérêt est purifiée. La ligation est réalisée grâce au kit QiaQuick (Qiagen) pendant 5min à température ambiante dans un volume de 20uL avec un rapport vecteur (75ng) : insert de l'ordre de 1 : 6. Les colonies sont sélectionnées sur milieu LB agarose avec ampicilline ($100\mu\text{g.mL}^{-1}$). Après purification de l'ADN plasmidique, celui-ci est cartographié par des digestions appropriées et séquencé. Le plasmide est renommé pZome-1N-MCS.

2.1.4.2 Insertion d'Elmo1MS et d'Elmo1MS-V2

Les fragments Elmo1MS et Elmo1MS-V2 sont amplifiés selon le protocole décrit précédemment respectivement avec les couples d'amorces elmo-Xho-for/elmo-BamHI-rev et ElmoV2-XhoI-for / Elmo-BamHI-rev (tableau XXVI) et les cycles de PCR 1 et 2. Ces fragments sont purifiés sur gel puis digérés par les enzymes XhoI et BamHI. Le vecteur

pZome-1N-MCS (4 μ g) est digéré par ces mêmes enzymes. Les produits de digestion sont déposés sur gel, les bandes découpées et l'ADN purifié. Les ligations et les sélections sont réalisées comme décrit pour l'obtention du vecteur pZome-1N-mut.

2.2 Analyse de l'expression d'ELMO1 in silico

2.2.1 Matériel

2.2.1.1 *Les lignées cellulaires*

Nous avons utilisé 5 lignées cellulaires adhérentes. Toutes les cellules sont cultivées à 37% 5% CO₂ en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza) ou RPMI (Roosevelt Park Memorial Institute) pour les HL-60, supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal décomplémenté, pénicilline, streptomycine et glutamine aux concentrations standards. Les cellules sont passées tous les deux ou trois jours selon besoin au 5^{ème} en utilisant du PBS-EDTA (Lonza) pour décoller ces cellules adhérentes. Les congélations ont été réalisées dans du sérum de veau foetal décomplémenté avec 10% DMSO à 5. 10⁶ cellules par mL.

Les cellules RAW264.7 sont des macrophages murins issus d'une leucémie d'Albeson induite par un virus. Elles sont répertoriées comme étant capables de phagocyter des billes de latex mais aussi le zymosan. Les cellules J774A.1 sont des monocytes/macrophages murins issus d'un sarcome qui sont capables de phagocytose anticorps-dépendante. Les RAW264.7 et les J774.1 nous ont été données par le Dr Y. Leverrier. Les cellules HEK293, données par le Dr. S. Behlke et les cellules HeLa (Henrietta Lack) sont des lignées humaines issues respectivement du rein et d'un cancer du col de l'utérus. Ces cellules sont des lignées humaines classiques, facilement transfectables et utilisées dans de nombreux domaines de recherche. Les cellules HL-60, données par le Dr. F. Cretin, sont des cellules hématopoiétiques humaines qui peuvent être différenciées en cellules de type monocyte par du TPA (ici 2,5 μ g .mL⁻¹ pendant 48h). Ces cellules sont difficilement transfectables.

2.2.1.2 *Les anticorps*

Nous avons utilisé deux anticorps primaires :

- une immunoglobuline G de chèvre ELMO1(N-20), à 200 μ g.mL⁻¹ (Santa Cruz Biotechnology), dirigé contre la partie N-terminale de la protéine ELMO1 murine, humaine ou de rat. Cet anticorps est utilisé au 50^{ème} en immunocytochimie et au 200^{ème} en immunotransfert.

- Une immunoglobuline G monoclonale de souris, anti-GFP, à 1mg.mL^{-1} (Clontech), dirigé contre la GFP. Cet anticorps est utilisé au $500^{\text{ème}}$ en immunotransfert.

Un jeu de trois anticorps secondaires a été utilisé :

- une IgG d'âne anti-IgG de chèvre ($400\mu\text{g.mL}^{-1}$, Santa Cruz Biotechnology) couplée à la HRP (Horse Radish Peroxydase) utilisée au $5000^{\text{ème}}$ en immunotransfert.
- une IgG de chèvre anti-IgG de souris, couplée à la HRP (KPL, $0,1\text{mg.mL}^{-1}$) utilisée au $5000^{\text{ème}}$ en immunotransfert.
- une IgG d'âne anti-IgG de chèvre (2mg.mL^{-1} , Molecular Probes), couplée à au fluorochrome AlexaFluor488 (λ_{exc} 495nm, λ_{em} 519nm) et utilisée au $250^{\text{ème}}$ en immunocytochimie.
- Une IgG de lapin (1mg.mL^{-1} , Jackson Immunoresearch) couplé au TRITC (λ_{exc} 541nm, λ_{em} 572nm).

2.2.2 Transfection des vecteurs d'expression

Les cellules sont mises en culture la veille dans des boîtes 6 puits à raison de 5.10^5 cellules par puits. Le lendemain, $10\mu\text{L}$ de lipofectamine (Invitrogen) sont dilués dans $240\mu\text{l}$ de milieu OptiMEM (GIBCO), mélangés délicatement et incubés 5min à température ambiante. En parallèle, $8\mu\text{g}$ d'ADN sont dilués dans $250\mu\text{l}$ de milieu OptiMEM puis on y ajoute les $250\mu\text{l}$ de lipofectamine. Le tout est mélangé au vortex à très basse vitesse et incubé 20min à température ambiante.

Le milieu de culture des cellules est remplacé par $1,5\text{mL}$ de OptiMEM plus $500\mu\text{L}$ de mélange lipofectamine-ADN. Les cellules sont incubées 4 à 6h à 37°C puis re-placée dans leur milieu de culture.

Le lendemain, les cellules transfectées sont diluées par deux dans deux objectifs :

- Observation au microscope
- Analyse des protéines par biochimie

2.2.3 Visualisation des protéines et de l'ADN par microscopie à fluorescence

2.2.3.1 *Principe des techniques de microscopie utilisées*

- *Le contraste interférentiel différentiel (DIC)*

Le contraste interférentiel différentiel aussi appelé contraste de "Nomarski" est utilisé pour l'observation de préparations non colorées. Le principe repose sur la division d'un rayon

lumineux polarisé en deux rayons de même longueur d'onde mais polarisés orthogonalement et séparé spatialement d'une distance très courte (une fraction de longueur d'onde). Ceci est permis par un assemblage particulier appelé Wollaston. Les deux rayons vont traverser l'objet en deux points différents mais très proches. S'ils rencontrent une structure différente alors ils seront déphasés différemment. Un second assemblage de type Wollaston permet de recombinaison les deux rayons qui interfèrent sur un analyseur. Suivant la différence de phase entre les deux rayons, un contraste positif ou négatif sera observé.

- Microscope à épi fluorescence (LX81 Olympus)

La fluorescence est une propriété optique de certaines molécules. Si on les excite à une faible longueur d'onde, elles émettent de la lumière à une longueur d'onde supérieure. Le microscope à fluorescence utilise ce principe. La source lumineuse est déportée sur le côté et est constituée par une lampe offrant un spectre de longueur d'onde étendu vers les UV. Un filtre d'excitation permet de sélectionner une bande de longueur d'onde adaptée au fluorochrome à visualiser. Un miroir dichroïque réfléchit la lumière d'excitation vers l'objectif qui joue ici le rôle de condenseur. La fluorescence émise est collectée par l'objectif et va traverser le miroir dichroïque. Un filtre d'émission permet de sélectionner la longueur d'onde d'émission correspondant au fluorochrome. L'acquisition est réalisée grâce à une caméra associée à un ordinateur. Selon l'intensité du signal, le temps d'acquisition du signal par la caméra peut être réglé de façon à détecter un signal sans pour autant que l'image soit saturée. Les saturations de l'image limitent la qualité de l'analyse de celles-ci.

- Analyse des images

L'acquisition ainsi que l'analyse des images ont été réalisées grâce au logiciel Volocity (Improvision). L'analyse des images permet de les visualiser et de corriger, après coup, les phénomènes optiques qui créent un bruit de fond. La formation d'une image dans un microscope est la résultante de deux fonctions de répartition de la lumière : une fonction d'étalement du point dans le plan focal (en x et y) et une fonction de défocalisation conditionnant la résolution axiale (en z, en profondeur). Cet étalement de la lumière dans les différents plans est à l'origine de la résolution limite en x/y mais aussi de bruit de fond dû à l'étalement du signal en z provenant des autres plans de l'objet. Une fonction d'étalement du point permet de décrire l'image d'un point lumineux extrêmement petit à travers un objectif donné et selon la longueur d'onde. La connaissance de cette fonction permet de corriger cet

étalement de la lumière sur les images acquises : on parle de déconvolution. Pour cela, il est préférable d'avoir pris un nombre élevé d'images dans les plans autour du plan focal selon un pas dépendant de l'objectif. La déconvolution peut faire deux choses :

- Une restauration rapide élimine juste le bruit de fond dû à l'étalement du signal.
- Une déconvolution complète non seulement supprime la lumière due à la diffusion d'un objet mais la ré-applique à celui-ci. Ceci évite les pertes d'informations obtenues avec une restauration rapide.

2.2.3.2 Fixation des cellules

Les observations ont été réalisées sur des échantillons de cellules fixées. Les cellules sont cultivées sur des lamelles recouvertes de polylysine puis fixées par un tampon PBS paraformaldéhyde 1% chaud pendant 10min à température ambiante. Après lavage au PBS, les lamelles sont incubées 5min à -20°C dans de l'éthanol 96% et lavées trois fois au PBS.

2.2.3.3 Détection d'ELMO1

Des cellules à 90% de confluence sont passées sur des lamelles au 5^{ème} et mises en culture sur la nuit. Le lendemain, elles sont fixées comme décrit précédemment. Les tubes d'anticorps sont centrifugés avant utilisation et le prélèvement se fait dans le surnageant. L'anticorps primaire ELMO1 (N-20) est dilué au 50^{ème} dans un tampon PBT (PBS, BSA 3% (p/v) Tween 0,05% (v/v)) et incubé sur les lamelles pendant 1h à 37°C en chambre humide. Après trois lavages de 5min au PBS, les lamelles sont incubées 45min en chambre humide avec l'anticorps secondaire (Anti-Goat, AlexaFluor488) dilué dans le tampon PBT au 250^{ème}. Trois lavages de 5min au PBS à l'obscurité permettent de supprimer l'excès d'anticorps avant de monter les lamelles sur lames dans du Vectashield-DAPI (cliniscience). Le DAPI marque l'ADN en bleu (λ_{exc} 310nm, λ_{em} 456nm).

2.2.3.4 Détection du domaine protéine A

Les cellules transfectées par des vecteurs pZome expriment normalement l'étiquette protéine A. Cette étiquette reconnaît les régions Fc des IgG provenant de certains organismes dont les IgG de lapin. Les cellules transfectées la veille sont passées à la demie et mises en culture sur des lamelles cotées polylysine au moins 4h à 37°C. Les cellules sont ensuite fixées comme décrit précédemment et lavées trois fois 10min au PBS. L'anticorps de lapin couplé à TRITC, après centrifugation, est dilué au 500^{ème} dans le tampon PBT et mis à incubé sur les lamelles

en chambre humide pendant 1h. Après trois lavages PBS de 5min dans l'obscurité, les lamelles sont montées dans du Vectashield-DAPI (Cliniscience).

2.3 Analyse biochimique des protéines cellulaires

Afin d'analyser les protéines présentes dans les différents types cellulaires, transfectés ou non, nous avons lysé ces cellules puis analysé les protéines par gel SDS PAGE et immunotransfert.

2.3.1 Lysats cellulaires

Les cellules en culture sont détachées de la boîte par du PBS/EDTA (Lonza), comptées puis centrifugées. Après plusieurs lavages dans du PBS sans EDTA, les cellules sont reprises dans un tampon de lyse PBS Triton 1%, CaCl₂ 1mM, Mg Cl₂ 1mM, et anti-protéases (cocktail anti-protéase, Invitrogen) à raison de 50uL de tampon pour 10⁶ cellules. Les cellules sont incubées 1h dans la glace. Les lysats bruts sont immédiatement dilués dans du tampon de charge dénaturant (tampon 4X : 250mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 8mM β-mercaptoéthanol, 40% glycérol(v/v), Bleu de Bromophénol 0.4% (p/v)) afin de limiter les agrégats de protéines et les dégradations. Les échantillons sont conservés à -20°C.

2.3.2 Gel SDS-PAGE

La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium (Laemmli, 1970) permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire dans des conditions dénaturantes.

Les échantillons protéiques sont dénaturés dans le tampon de charge (250mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 8mM β-mercaptoéthanol, 40% glycérol (v/v), Bleu de Bromophénol 0.4% (p/v)) dilué quatre fois par chauffage 3min à 98°C. Un mélange protéique contenant des protéines de tailles connues sert d'étalon. Chaque protéine est colorée (en bleu ou en rouge) de façon à suivre la migration du marqueur et éventuellement son transfert sur membrane.

Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide constitué d'un gel de concentration (acrylamide-bisacrylamide 19 :1 4%, Tris-HCl pH 6,8 0,125M, SDS 0,1 % (p/v) persulfate d'ammonium 0,04 % (p/v) et TEMED 0,4% (v/v)) et d'un gel de séparation dont le pourcentage d'acrylamide est choisi en fonction du poids moléculaire des protéines à séparer (acrylamide –bisacrylamide 19 :1 10% (p/v), Tris-HCl 0,375M pH 8,8, SDS 0,1% (p/v), persulfate d'ammonium 0,025 % (p/v), TEMED 0,2% (v/v)).

Le tampon de migration est composé de Tris 25mM, glycine 192 mM, SDS 0,1% (p/v). La migration des échantillons protéiques s'effectue en deux étapes. Tout d'abord, le gel est mis à migrer à 100V le temps de concentrer les échantillons à l'entrée du gel de séparation, puis la tension est augmentée à 160V. La migration est arrêtée lorsque que le front de migration atteint le bas du gel.

Suite à cela, le gel peut avoir deux utilisations :

- Soit il est coloré dans une solution contenant du bleu de Coomassie R250 0,25% (p/v), de l'acide acétique 9% (v/v) et de l'éthanol 45% (v/v). L'excès de colorant est ensuite éliminé par plusieurs bains d'acide acétique 7,5% (v/v) et éthanol 5% (v/v).
- Soit utilisé pour le transfert des protéines sur membrane.

2.3.3 Electrotransfert sur membrane.

L'électrotransfert est utilisé ici en vue d'une immunorévélation et les membranes utilisées sont en nitrocellulose. Le transfert est réalisé en conditions semi sec via trois tampons A (Tris base 0,025M, acide aminocaproïque 0,04M, isopropanol 20% (v/v)), B (0,025M Tris Base, 20% isopropanol (v/v)) et C (0,25M Tris base, 20% isopropanol (v/v)). Un étagement est effectué de la façon suivante : six couches de papier absorbant (watman) imbibé de tampon C, trois couches de papier imbibé de tampon B sur lesquelles la membrane puis le gel d'acrylamide imbibés de tampon B sont déposés ; le tout est recouvert de papier absorbant imbibé de tampon A. Le transfert est réalisé à raison de 50mA par membrane pendant 40min.

La membrane peut être colorée de façon réversible à l'aide d'une solution de rougeponceau 0,2% (Sigma), afin de vérifier que les protéines ont bien été transférées. Le rougeponceau est éliminé par lavage à l'eau. Le marqueur moléculaire utilisé lors de la migration étant coloré et visible sur la membrane, cette étape n'est pas nécessaire en dehors des étapes de mise au point des conditions de transfert.

2.3.4 Immunorévélation

La membrane est incubée pendant une heure à température ambiante dans une solution de blocage composée de Tris 10mM pH 7,2, NaCl 200mM Tween 0,5% (v/v) (TNT low) et lait 5%. L'anticorps primaire est dilué dans une la solution de blocage et la membrane est incubée la nuit à 4°C sous agitation. Après trois lavages de la membrane dans du TNT « low », l'anticorps secondaire dilué au 1/5000^{ème} dans le tampon de blocage pendant 1h30 à température ambiante sous agitation. Cet anticorps secondaire est couplé à la HRP (Horse

radish peroxidase) et permet une révélation par chimiluminescence via le système ECL (Amersham Bioscience). Les zones lumineuses sont révélées sur un film photographique.

2.4 Tests fonctionnels en biologie cellulaire

2.4.1 Matériel

2.4.1.1 *Les billes*

Pour les tests de phagocytose, nous avons utilisé des billes fluorescentes issues de deux fournisseurs. Les billes de latex utilisées pour la cytométrie sont des billes recouvertes de carboxylate de 2 μ m de diamètre fluorescent dans le vert (Sigma, 2,5% (m/v), λ_{exc} 470nm, λ_{em} 505nm). Les billes de latex utilisées pour la microscopie sont des billes recouvertes de carboxylate de 2 μ m de diamètre fluorescent dans le rouge (Invitrogen, 2,5% (m/v), λ_{exc} 580nm, λ_{em} 605nm).

2.4.1.2 *Principe du cytomètre de flux*

La cytométrie de flux est une technique qui permet de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse devant un faisceau laser. La lumière réémise permet de classer les objets en fonction de leurs propriétés physiques.

Les objets passent dans un petit capillaire dans un flux liquide un par un et plusieurs propriétés optiques sont analysées. Ainsi, la lumière diffractée mesurée en face du rayon laser permet d'évaluer la taille des cellules (paramètre FSC). La lumière diffractée, mesurée à 90° (SSC) donne une mesure de la granulosité de la cellule. De plus, si on ajoute aux objets des fluorochromes, on peut détecter le degré de fluorescence par objet. Ceci est permis par des jeux de filtres d'excitation et d'émission. Au laboratoire, nous disposons d'un FACScan (Becton Dickinson) avec des filtres permettant de détecter les signaux de différents fluorophore : GFP, DAPI, cy3, cy5. Pour chaque expérience, il est nécessaire de définir des « zeros » de fluorescence car certains objets présentent des taux de fluorescence intrinsèque élevés pouvant interférer avec l'analyse.

Les propriétés optiques sont analysées par ordinateur. Le logiciel disponible au laboratoire est le logiciel CellQuest.

2.4.2 Déclenchement et analyse de l'apoptose

2.4.2.1 *Apoptose des cellules HeLa*

Des cellules HeLa sont mises en culture en milieu DMEM dans des boîtes de 3,5cm de diamètre soit la veille à 4.10^5 cellules par boîtes soit une heure avant l'induction de l'apoptose à 8.10^5 cellules par boîte. L'apoptose est induite par un traitement aux ultra-violets (312nm) à raison de 1 J.cm^{-2} . Les cellules sont ensuite remises en culture.

2.4.2.2 *Marquage Annexine V PI (fournisseur)*

Afin d'estimer la quantité de cellules apoptotiques, nous utilisons un kit de marquage annexine V/iodure de propidium (Calbiochem). Le milieu de culture des cellules est prélevé et les cellules restantes décollées avec de la trypsine puis centrifugées (1000g 5min) et reprises dans le surnageant de culture. Le volume est ajusté à 1mL. Les cellules sont marquées à l'annexine V par ajout de 1,25 μ l d'annexine V et 10 μ L de tampon dans 500 μ L de cellules. Le mélange est incubé 15min dans l'obscurité. Il est important à partir de ce stade de garder au maximum les échantillons à l'abri de la lumière. Les échantillons sont ensuite centrifugés (1000g 5min) et repris dans 500 μ l de tampon de fixation avec 1 μ l de PI. Les résultats sont analysés par cytométrie de flux. L'annexine V est marquée avec le fluochrome FITC (λ_{exc} 488nm, λ_{em} 520nm) et l'iodure de propidium marque l'ADN en rouge (λ_{exc} 540nm, λ_{em} 625nm).

2.4.3 Quantification de la phagocytose par FAC's

2.4.3.1 *Phagocytose des billes de latex*

- *Observation au cytomètre de flux*

Les cellules sont mises en culture dans des boîtes 6 puits à 30% de confluence et incubées la nuit à 37°C. Le matin, elles sont placées 5min à 4°C puis on ajoute $5,7.10^7$ billes de latex dans le milieu et on centrifuge 5min à 1000g. Après des temps variables d'incubation à 37°C, le milieu est retiré et les cellules lavées trois fois au PBS froid. Elles sont ensuite décollées au PBS EDTA puis centrifugées 5min à 1000g.

Le culot est repris dans du PBS-EDTA avec 1% paraformaldéhyde chaud et incubé pendant 10min à température ambiante. À l'issue de cette incubation, les échantillons sont lavés trois fois au PBS-EDTA et finalement repris dans un tampon citrate de sodium $1,18\text{g.L}^{-1}$, triton 5%, ribonucléase 30U.mL^{-1} et iodure de propidium 5ng.mL^{-1} (λ_{exc} 540nm, λ_{em} 625nm) puis

incubés 10min à 37°C. La réaction est arrêtée par ajout de 27 μ l.mL⁻¹ de NaCl 5M. Les résultats sont analysés par cytométrie de flux. Pour cela, on passe une première fois les cellules pour avoir le profil FSH/SSH puis on sélectionne les événements correspondant aux cellules vivantes. Les résultats sont réalisés sur 3.10⁴ événements dans l'ensemble cellule.

2.4.3.2 *Phagocytose de corps apoptotiques*

- Marquages DiI/DiO (vibrant cell labelling, Invitrogen) des membranes

Les cellules à phagocyter sont marquées DiO (vert) alors que les cellules phagocytaires sont marquées DiI (rouge). En ce qui concerne les cellules apoptotiques, le marquage se fait après 20min à 37°C suite à l'induction aux UV.

Les cellules HeLA sont des cellules adhérentes et le marquage se fait directement sur les cellules en culture en boîte de 3,5cm de diamètre. Le milieu est remplacé par un milieu chaud sans sérum contenant 5 μ l.mL⁻¹ de marqueur pendant 8min à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois 10min dans du milieu chaud avec sérum. Le milieu est ajusté à 1mL.

Les cellules HL-60 différenciées n'adhèrent pas suffisamment, elles sont détachées, centrifugées à 1000g pendant 5min puis reprises dans 1mL de milieu chaud avec 5 μ l de marqueur. Après 5min d'incubation à 37°C, les cellules sont lavées trois fois dans du milieu chaud.

- Test de phagocytose

Les cellules HL60 différenciées et les apoptotiques sont incubées ensemble pendant des temps variables à 37°C puis le surnageant et les cellules adhérentes sont récupérées (PBS-EDTA froid). Les cellules sont lavées au PBS-EDTA froid puis finalement reprises dans 500 μ l de celui-ci. Les résultats sont analysés par cytométrie.

3 Résultats

L'objectif de ce travail était de développer des outils de façon à étudier la protéine ELMO1 et ses partenaires dans un modèle de phagocytose des cellules apoptotiques. Ce type de modèle n'ayant jamais été étudié auparavant dans l'Institut, nous nous sommes appuyés sur la littérature.

3.1 Mise au point de tests quantitatifs de phagocytose

Pour commencer, nous avons cherché un modèle simple, nous permettant d'estimer le taux de phagocytose de lignées cellulaires connues et facilement transfectables. À terme, il sera bien sûr nécessaire de passer sur un modèle plus complet avec des macrophages humains et des cellules apoptotiques. Nous avons réalisé des premiers tests dans ce sens en collaboration avec le Dr Yann Leverrier (Lyon).

3.1.1 Phagocytose de billes de latex

3.1.1.1 *Mise au point du test*

D'après la littérature, les billes de latex portant des groupements carboxylates (2 μ m) sont de bons modèles pour l'étude de la phagocytose des corps apoptotiques et tout particulièrement pour l'étude du complexe DOCK180-ELMO1 dont la co-surexpression potentialiserait la phagocytose de ces billes (Gumienny *et al.*, 2001; Tosello-Tramont *et al.*, 2007). Nous avons utilisé deux types cellulaires : les HEK293 qui semblent être un bon modèle pour étudier les voies de signalisation de type cellules dendritiques immatures (Albert *et al.*, 2000; Akakura *et al.*, 2004) et les RAW264.7 qui sont des macrophages murins. Ce sont des lignées établies facilement transfectables.

Nous avons donc centrifugé des billes de latex de 2 μ m de diamètre fluorescent dans le vert (5,7.10⁷ billes) avec des cellules à 30% de confluence. En effet, après avoir testé différentes concentrations de cellules et de billes, les cellules à 30% de confluence avec 5,7.10⁷ billes ont montré un résultat optimal (données non montrées). Les cellules sont ensuite fixées au paraformaldéhyde 1% (PFA) dans du PBS-EDTA et l'ADN est marqué à l'iodure de propidium. Le rôle de l'EDTA est de détacher les billes non internalisées.

La figure 45 (page 158) montre les profils obtenus par cytométrie de flux après une demi heure de contact entre des cellules RAW264.7 et les billes. Les cellules et les billes isolées peuvent être séparées en fonction de leurs morphologies. Cela permet d'analyser les profils de

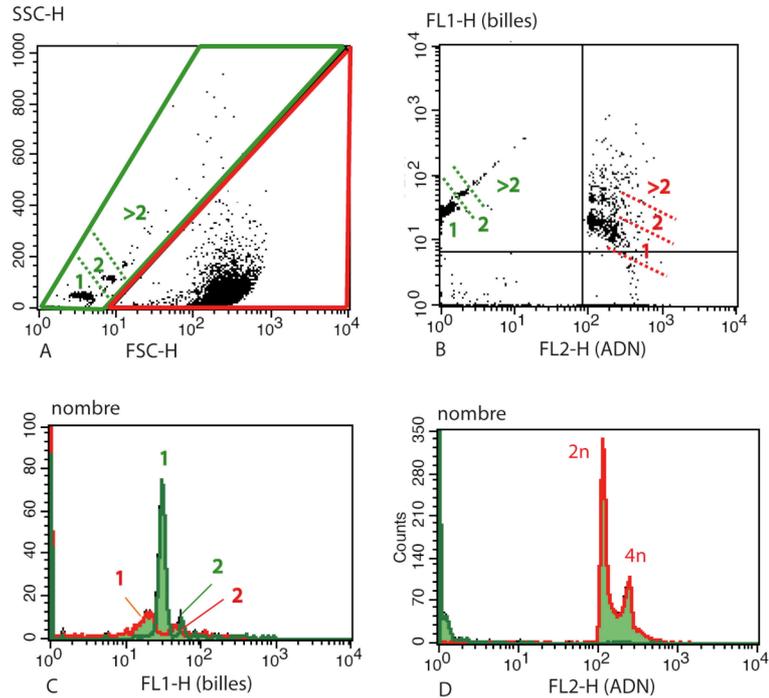


Figure 45 : Phagocytose de billes de latex par les cellules RAW264.7.

4,5.10⁷ billes sont centrifugées sur des RAW264.7 puis incubées 30mn à 37°C. Les cellules sont fixées au PFA1% puis l'ADN est marqué à l'iodure de propidium. Les résultats sont analysés par cytométrie de flux. Les chiffres indiquent le nombre de billes. Les chiffres, profils ou cadres en rouge correspondent à la population des cellules et les indications en vert foncé aux billes isolées. A. Morphologie des objets. B. Profil de fluorescence vert (FL1-H) et rouge (FL2-H) des objets. C. Répartition des objets en fonction de leur fluorescence dans le vert. D. Répartitions des objets en fonction de la fluorescence dans le rouge.

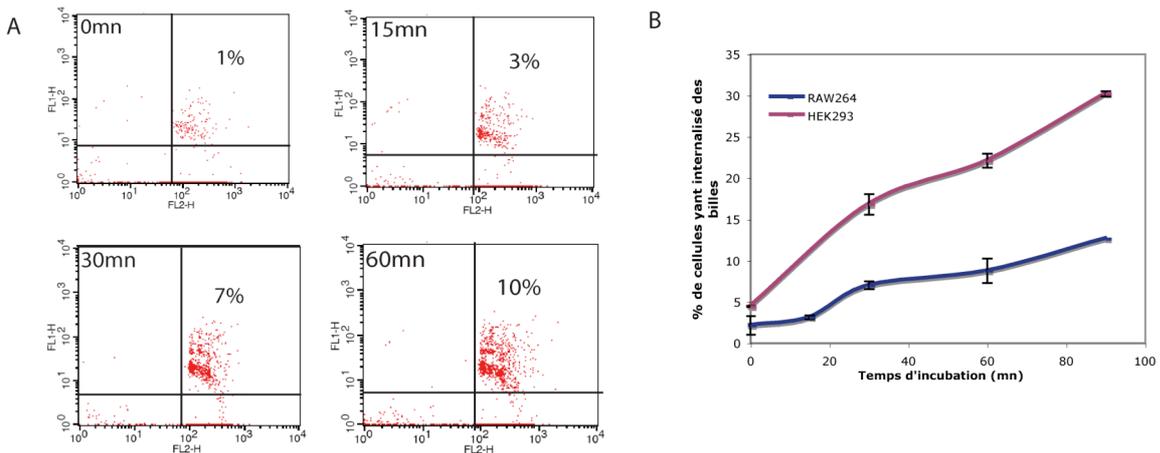


Figure 46 : Cinétique d'internalisation des billes par les RAW264 et les HEK293.

A. Les diagrammes présentent uniquement les événements correspondant aux cellules. Les temps d'incubation sont précisés dans chaque cadre et les pourcentages correspondent au pourcentage d'objets sélectionnés fluoresçant à la fois dans le rouge et dans le vert. B. Cinétique d'internalisation des billes au cours du temps pour les HEK 293 (rouge) et les RAW264.7 (bleu). Les barres verticales indiquent les écart-types sur 2 (HEK293) à 3 expériences (RAW264.7).

fluorescence de chaque population (figure 45A). La population « billes isolées » (en vert) peut être séparée en sous-populations en fonction du nombre de billes par objet à la fois dans le profil FSC-H/SSC-H (figure 45A) mais aussi dans le profil de fluorescence (figure 45B et C). Nous confirmons également une absence de fluorescence dans le rouge (figure 45D). La population « RAW264.7 » (en rouge) est bien entièrement marquée au PI et révèle un profil ADN classique avec des cellules contenant 2n chromosomes dans le pic a et 4n chromosomes dans le pic b (figure 45D). Il a été vérifié que ces cellules ne fluorescent pas dans le vert en absence de billes (données non montrées). Par contre, en présence de bille, certaines fluorescent dans le vert et la fonction de répartition de cette fluorescence est discrète, il est possible de distinguer plusieurs sous-populations : sans fluorescence, avec la fluorescence d'une bille, de deux billes ou de plus de deux billes (figures 45B et C). De plus, nous pouvons observer que la fluorescence des billes associées aux cellules est légèrement plus faible que celle des billes isolées témoignant d'une internalisation de celles-ci (figure 45C).

Ces résultats montrent que nous sommes capables d'identifier les cellules ayant internalisé ces billes ainsi que le nombre de billes par cellule. Les expériences réalisées avec les cellules J774.1 ou les HEK293 donnent le même type de résultats (données non montrées). Dans la suite, les pourcentages de phagocytose correspondront au pourcentage de cellules ayant internalisé des billes. La vitesse du flux entrant de billes dans une cellule peut être estimé en établissant la cinétique de phagocytose au cours du temps.

3.1.1.2 Cinétique de phagocytose

Etablir une cinétique peut être important pour choisir un temps de phagocytose optimal mais aussi pour vérifier que l'internalisation augmente avec le temps et donc que le processus est actif. Les cellules sont incubées à 4°C avant l'ajout des billes de façon à fixer le t = 0min de l'expérience. La réaction est arrêtée en remplaçant le milieu de culture par du PBS froid. Le temps d'incubation varie entre 0min et 90min.

La figure 46 montre les cinétiques d'internalisation. Le nombre de cellules RAW264.7 fluorescent à la fois dans le vert (billes) et dans le rouge (ADN) augmente au cours du temps comme le montrent les résultats obtenus par cytométrie (figure 46A). Ceci laisse supposer que le double marquage est le résultat d'un processus actif. Ceci a été confirmé par une expérience d'une heure et demie à quatre degrés avec les cellules HEK293 qui a montré une chute du nombre de cellules doublement marquées de 28% (données non montrées). Les cinétiques ont

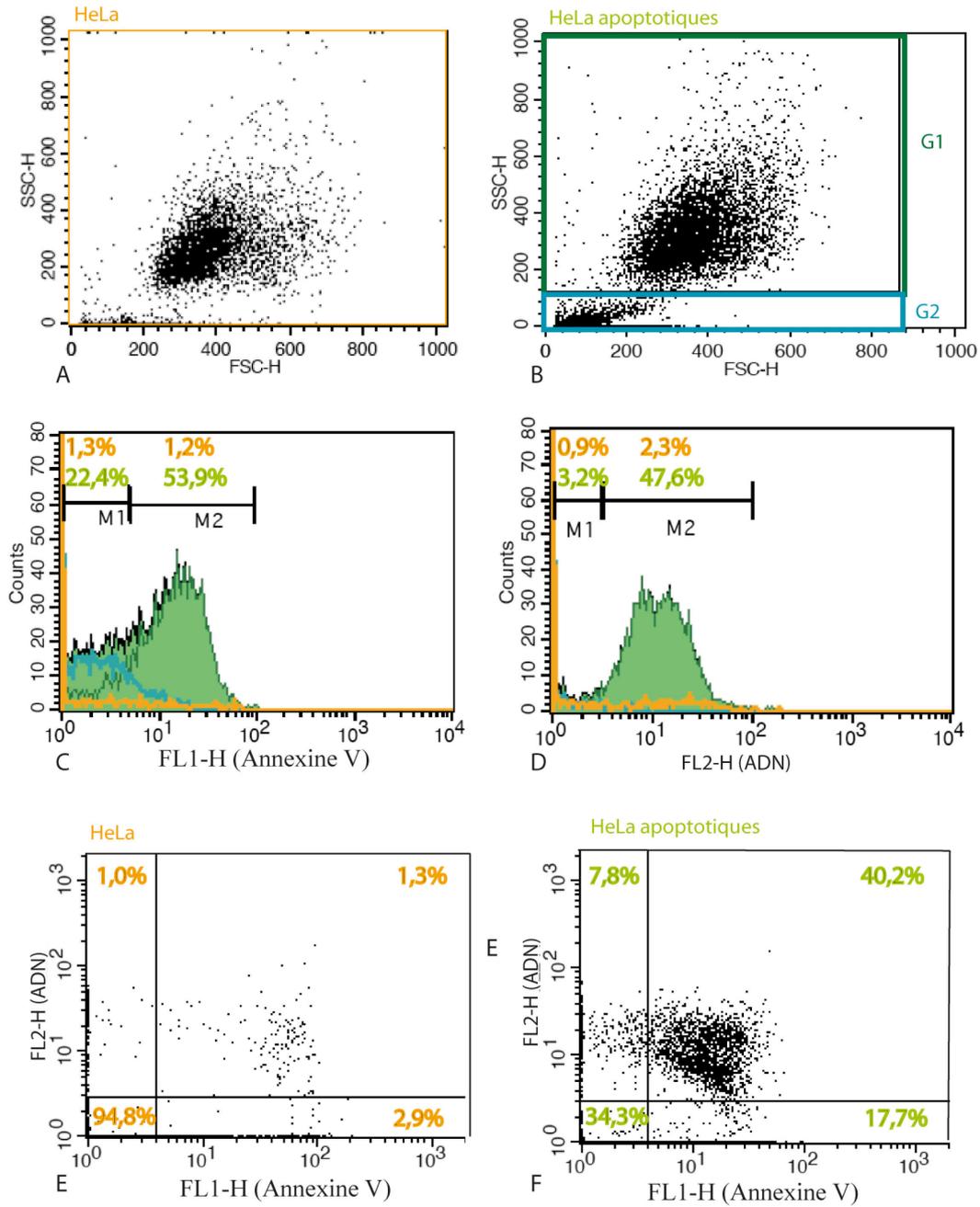


Figure 47 : Marquage Annexine V/PI de cellules HeLa

Des cellules HeLa sont, ou non, traitées aux UV ($1000\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$) puis incubée 20h à 37°C . Les cellules sont marquées à l'annexineV-FITC, qui marque les cellules apoptotiques, et à l'iodure de propidium, qui marque l'ADN des cellules perméables. A. Morphologie des cellules HeLa non irradiées. B. Morphologie des cellules HeLa irradiées. C. Marquage annexine V des HeLa non irradiées (orange) des HeLa irradiées (vert pour les cellules de G1 et bleu pour les cellules de G2). D. Marquage de l'ADN. E. Marquage ADN et annexine des cellules HeLa non irradiées. F. Marquage ADN et annexine V des cellules irradiées.

la même allure pour les deux types cellulaires testés mais le taux d'internalisation est supérieur pour les HEK293. De plus, les écarts-types obtenus, même sur très peu d'expérience, laissent supposer une bonne reproductibilité des résultats.

Le test de quantification de l'internalisation de billes fonctionne, et ce, sur différentes lignées cellulaires : des HEK293 assimilables à des cellules dendritiques immatures (mais moins efficaces), des macrophages murins avec un faible taux d'internalisation les RAW264.7 et des macrophages murins avec un fort taux d'internalisation, les J774.1. Ces différents comportements en phagocytose des cellules pourraient être liés à des variations d'expression ou de modifications post-traductionnelles des protéines qui nous intéressent, ou des variations dans leurs partenaires par exemple.

3.1.2 Phagocytose des corps apoptotiques

Pour cette étude, nous ne pouvons nous passer de l'utilisation d'un modèle plus physiologique. En effet, les billes de latex, bien que pouvant être assimilées à des corps apoptotiques de part leur charge nette négative, ne présentent en aucun cas des signaux aussi complexes qu'une cellule apoptotique. Il nous paraît donc essentiel d'être capable de quantifier l'internalisation de ces dernières. De plus, les RAW264.7 ou les J774.1 sont des macrophages murins, il est fort possible que le comportement des macrophages de rongeurs soit différents de ceux des macrophages humains. Il nous faut donc un modèle de macrophages humains. Nous avons choisi les HL-60.

3.1.2.1 *Production de cellules apoptotiques*

Avec la collaboration du Dr. Philippe Frachet, nous avons tout d'abord vérifié notre capacité à produire des cellules apoptotiques. L'apoptose des cellules HeLa est induite par un traitement aux ultra-violets, c'est un cas d'induction par la voie interne (dommages à l'ADN) classiquement utilisé. Afin de vérifier l'efficacité de ce traitement sur l'apoptose des cellules, nous marquons ces cellules à l'annexine V pour révéler la présence de phosphatidylsérine à la surface des cellules et à l'iodure de propidium pour vérifier l'intégrité de la membrane.

La figure 47 montre les résultats obtenus lors du double marquage de cellules HeLa avant et après traitement aux UV (20h d'incubation). Les résultats montrés sont ceux d'une seule expérience. Nous pouvons observer que 20h après induction aux UV, 50% des cellules sont fortement annexine V positives (région M2). Ces cellules sont de tailles identiques aux

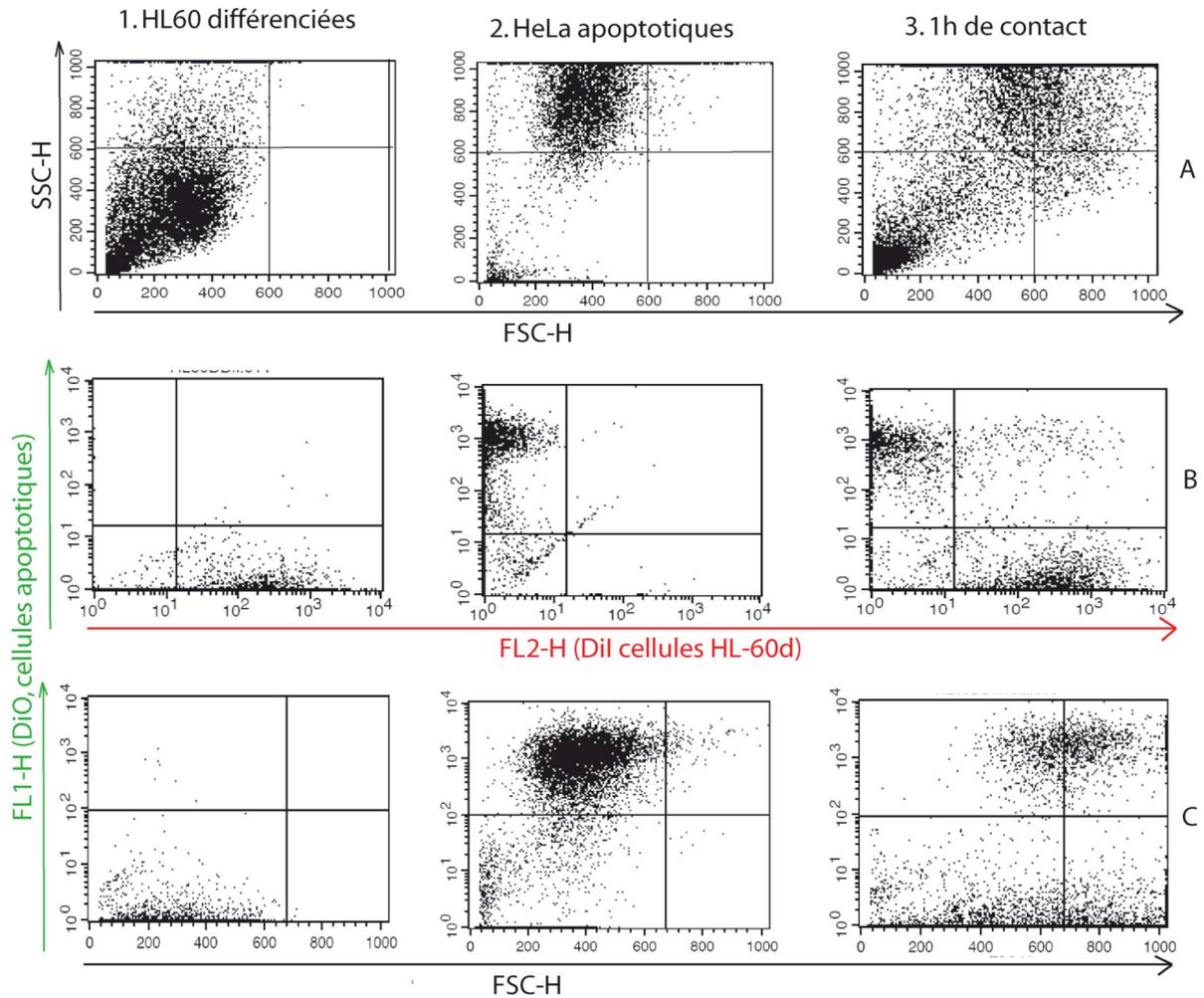


Figure 48 : Phagocytose de corps apoptotiques par les cellules HL-60 différenciées.

Les HL-60 sont marquées par DiI (fluorescence dans le rouge) et les HeLa apoptotiques par DiO (fluorescence dans le vert). Les HL-60 seules (colonne 1), des HeLa apoptotiques (colonne 2) ainsi que les deux types cellulaires après une mise en contact d'une heure à 37°C (colonne 3) sont analysés en fonction de leur morphologie (ligne A), de leur fluorescence dans le rouge et dans le vert (ligne B) ou de leur fluorescence dans le vert en fonction de leur morphologie (ligne C).

cellules viables (groupe 1). Les « cellules » du groupe 2, plus petites sont également positives à l'annexine V (région M1). Cela correspond à environ 20% des cellules. Ce marquage annexine V est presque inexistant sur les cellules avant UV. 20h après induction de l'apoptose, 40 % des cellules annexine V positives sont également perméables à l'iodure de potassium. Ceci laisse supposer que l'intégrité de la membrane est rompue. Ces cellules sont donc en fin d'apoptose voir début de nécrose secondaire. Les UV semblent donc avoir induit l'apoptose même si la population est certainement hétérogène.

3.1.2.2 Test de phagocytose

Le test de phagocytose des corps apoptotiques a été réalisé sur des macrophages humains, des cellules HL-60. Ces cellules peuvent être différenciées en plusieurs types de cellules immunitaires : des polynucléaires neutrophiles avec du DMSO ou en macrophages avec des esters de phorbol (TPA) ou de l'INF- γ . L'utilisation de l'INF- γ ne nous paraissait pas très judicieux. En effet, c'est une cytokine pro-inflammatoire et l'élimination des cellules apoptotiques est réalisée dans un contexte anti-inflammatoire. Nous avons donc utilisé des cellules HL-60 différenciées en macrophage par utilisation des esters de phorbol (notées HL-60d).

Les cellules HeLa sont traitées aux UV la veille et immédiatement marquées avec DiO (fluorescence dans le vert). Les HL-60d sont marquées par le marqueur de membrane DiI (fluorescence dans le rouge). Les cellules sont mises en contact dans un rapport 1:1 à 37°C pendant une heure, puis centrifugées et reprises dans du PBS-EDTA avant d'être analysées par cytométrie de flux. Les marqueurs membranaires sont décrits dans la littérature pour des tests de phagocytose (Schrijvers *et al.*, 2004).

La figure 48 montre les résultats obtenus pour chaque population cellulaire isolée ainsi qu'après un contact d'une heure. La morphologie des cellules permet de les distinguer selon leur profil SSC-H (figure 48 A1 et A2). Si nous regardons le profil morphologique des cellules après une heure de contact, nous pouvons remarquer que la population cellulaire a un profil FSC-H en augmentation témoignant d'une augmentation de taille des objets analysés. Les profils de fluorescence des cellules HeLa et HL-60d isolées montre que les marquages par DiO et DiI ne sont pas efficaces à 100%, certains objets ne sont pas marqués. Par contre, il y a très peu d'interférence entre les deux marqueurs. En effet, la fluorescence dans le vert du marqueur DiI des cellules HL-60d est très faible. De même, le marquage des cellules HeLa apoptotiques par DiO transfère très peu dans le rouge (figure 48 B1 et B2). Il semblerait donc

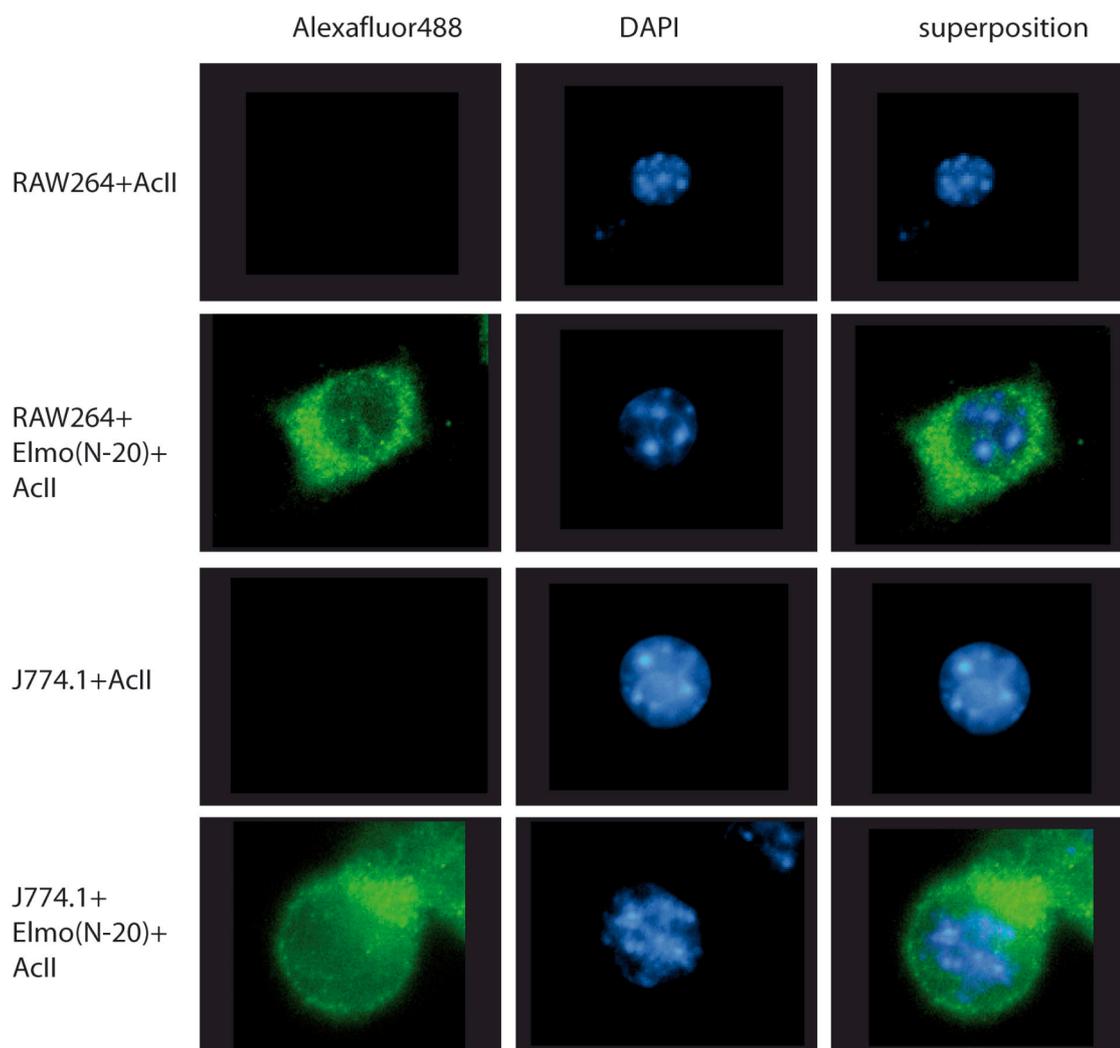


Figure 49 :Localisation de Elmo1 dans les cellules RAW264.7 et J774.1

Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 1% puis perméabilisées à l'éthanol 96%. Elles sont incubées ou non avec l'anticorps Elmo1(N-20) puis avec un anticorps secondaire marqué à l'AlexaFluor 488 (vert). Les lamelles sont montées sur lame dans du vectashield-DAPI de façon à marquer les noyaux en bleu. Les temps d'expositions ont été adaptés à chaque type cellulaire mais sont identiques pour les deux conditions.

que la population doublement marquée qui apparaît après contact entre les deux types cellulaires soit bien spécifique de l'expérience. Cette population correspondrait aux cellules HL-60d ayant internalisé des HeLa apoptotiques (figure 48 B3). Finalement, outre le double marquage, nous pouvons aussi visualiser les corps apoptotiques internalisés en analysant la taille des cellules fluorescent dans le vert (figure 48 C1, 2 et 3). En effet, après contact entre les deux types cellulaires, ces cellules ont une taille supérieure à celle des cellules isolées (figure 48 C2 et C3).

Finalement, cette expérience préliminaire montre qu'il est possible d'évaluer la phagocytose des corps apoptotiques au cytomètre de flux de deux manières : en utilisant deux marqueurs de membrane fluorescents ou en marquant uniquement les corps apoptotiques et en regardant l'augmentation de taille. Cette dernière méthode manque de précision car, contrairement aux billes, la fluorescence et la taille des corps apoptotiques ne sont pas répartis de façon discrète rendant une analyse précise difficile. La méthode de double marquage semble la plus précise même si selon les types cellulaires le marquage de membrane peut être très hétérogène. La même expérience réalisée sur des cellules HL-60 non différenciées n'ont pas permis de détecter des cellules phagocytées (données non montrées) ce qui montre que la méthode de différenciation utilisée permet bien de différencier les cellules en phagocytes.

Suite à la mise en place de ces tests, il nous fallait choisir un modèle d'étude pour mettre au point les premières techniques. Les cellules HL-60 différenciées, bien qu'intéressantes en tant que modèle humain, se sont montrées difficilement transfectables. Nous avons donc abandonné cette lignée pour l'instant. Nous voulions garder une lignée de phagocytes professionnels afin d'avoir un modèle d'inflammation physiologique, nous nous sommes donc tournés vers les macrophages murins RAW264.7 et J774.1.

3.2 Expression cellulaire d'Elmo1MS

Dans un premier temps, il nous fallait vérifier que les lignées cellulaires que nous avons choisies exprimaient la protéine ELMO1.

3.2.1 Expression d'ELMO1 dans les cellules de mammifères

Nous avons tout d'abord localisé l'expression de la protéine ELMO1 dans les cellules à l'aide d'un anticorps Elmo1(N-20) et d'un anticorps secondaire marqué à l'AlexaFluor488. Pour chaque type cellulaire, nous avons également marqué des cellules avec l'anticorps secondaire seul. Le temps d'exposition utilisé est constant par lignée cellulaire. Nous pouvons observer

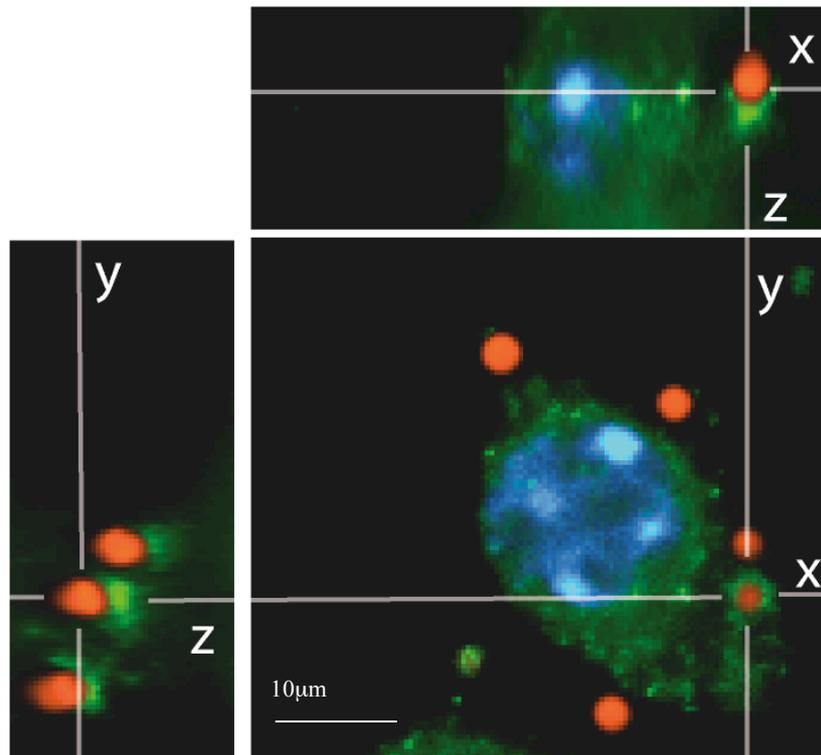


Figure 50: Relocalisation d'ELMO1 endogène en présence de billes.

Des billes de latex de $2\mu\text{m}$ de diamètre (rouge) substituées de groupements carboxylates sont mis en contact deux heures avec des cellules RAW264. Les cellules sont ensuite marquées avec Elmo(N-20) puis un anticorps secondaire marqué à l'Alexafluor 488 (vert). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Des images ont été prises au microscope à fluorescence tous les $z=2\mu\text{m}$ (60X) puis déconvoluées à l'aide de fonctions théoriques d'étalement du point dans le plan focal. Ceci permet de diminuer le bruit de fond dû à la fluorescence des autres plans focaux.

dans la figure 49 un signal dans les cellules incubées avec l'anticorps Elmo1(N-20) alors qu'aucun signal n'est détecté à ces temps d'exposition en absence de l'anticorps primaire. Ce signal est cytoplasmique dans les deux lignées cellulaires et légèrement ponctué typique des protéines associées aux membranes internes. Ce signal est cohérent avec la littérature (Gumienny *et al.*, 2001) mais ne semble pas très spécifique d'une protéine impliquée dans des voies de migration ou de phagocytose.

Afin d'observer une localisation plus en rapport avec la fonction de la protéine, nous avons marqué de la même façon des cellules RAW264.7 préalablement incubées deux heures avec des billes de latex. Le choix des billes de latex a posé un certain nombre de soucis. En effet, les billes commandées initialement chez Sigma-Aldrich et utilisées pour les tests de cytométrie présentaient deux défauts pour la microscopie : un signal beaucoup trop fort mais aussi une tendance à fluorescer dans d'autres longueurs d'ondes. Après différents essais (données non montrées), nous avons donc utilisé des billes de chez Invitrogen qui ont permis de faire des réglages corrects sur le microscope.

La figure 50 montre les résultats obtenus sur les cellules RAW264.7 car les temps d'exposition utilisés précédemment étaient inférieurs à ceux des J774.1. Nous pouvons observer que le signal détecté est différent de celui observé en absence de billes. Nous retrouvons un signal cytoplasmique mais aussi un signal un peu plus fort autour des billes. Ce signal dans le plan (x,z) a la forme d'une coupe phagocytique. Ces résultats laissent supposer que nous détectons bien avec cet anticorps un signal spécifique d'une protéine impliquée dans la phagocytose et donc probablement ELMO1. Pour vérifier la présence d'ELMO1 dans ces cellules, nous avons réalisé des immunotransferts sur des lysats cellulaires. Nous n'avons pas pu détecter ELMO1 dans ces cellules par cette méthode donc ELMO1 est en dessous du seuil de détection de la technique. La forme recombinante d'ELMO1MS purifiée au laboratoire (Dr. JB Reiser) est elle par contre correctement détectée par cette méthode.

L'étude de la protéine ELMO1 cellulaire pose deux problèmes :

- Tout d'abord, cette technique ne permet pas d'observer la dynamique de la re-localisation d'ELMO1. Pour cela, il faut utiliser des techniques de microscopie sur cellules vivantes.
- Elle est difficilement détectable en immunotransfert ce qui rend plus délicat une recherche de partenaires par co-immunoprécipitation, notamment en terme de matériel cellulaire à utiliser pour obtenir un signal convainquant.

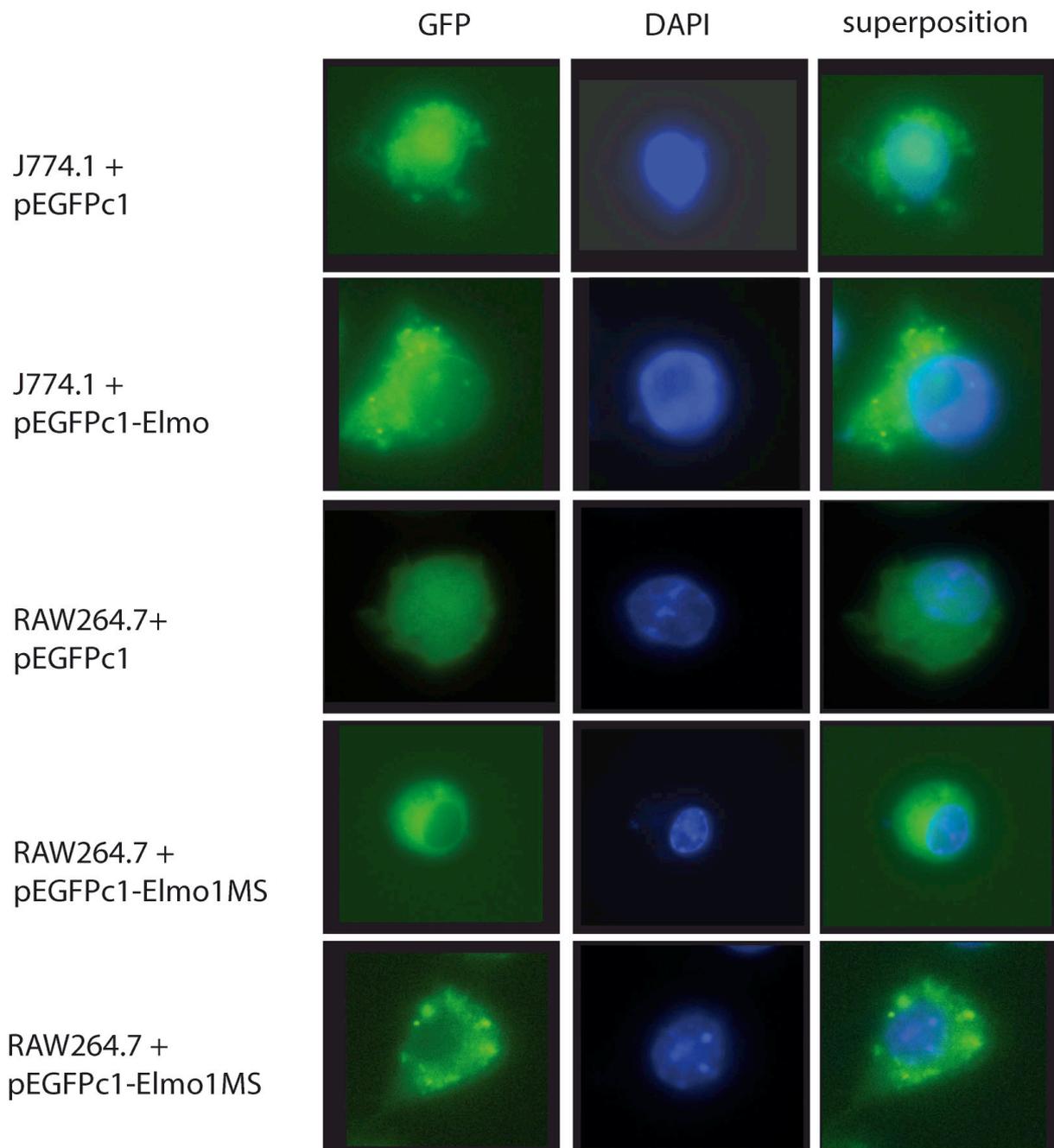


Figure 51 : Surexpression des protéines de fusion GFP dans les RAW264 et les J774.1.

La GFP (vert) et la protéine ELMO1MS fusionnée à la GFP (vert) ont été sur-exprimées dans des cellules RAW264.1 et des J774.1. Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde puis perméabilisées à l'éthanol. Le noyau est marqué au DAPI (bleu). La GFP est exprimée dans l'ensemble de la cellule alors que la fusion ELMO1MS-GFP semble être exprimée dans le cytoplasme.

Nous nous sommes donc penchés sur des méthodes de surexpression de la protéine ELMO1MS dans ces lignées cellulaires : l'une utilisant une fusion avec la GFP afin de suivre ELMO1 dans la cellule mais aussi de vérifier facilement les taux d'expression, l'autre permettant d'isoler de nouveaux partenaires par la méthode de TAP-Tag.

3.2.2 Expression de ELMO1MS fusionné à la GFP

Nous avons transfecté des cellules J774.1 et RAW264.7 avec les vecteurs pEGFPc1, exprimant la GFP et pEGFPc1-ELMO1MS, exprimant la protéine ELMO1MS fusionnée à la GFP en C-terminal. Ces vecteurs ont été préalablement vérifiés par séquençage.

La figure 51 montre les résultats obtenus en microscopie pour la sur-expression de ELMO1MS couplée à la GFP. Tout d'abord, nous pouvons remarquer que la GFP seule s'exprime dans l'ensemble de la cellule dont le noyau quelque soit la lignée cellulaire J774.1 ou RAW264.7. Par contre, la GFP fusionnée à la protéine ELMO1MS est exclue du noyau, ce qui laisse supposer que la protéine de fusion est intacte. Par contre, le profil d'expression de cette protéine dans le cytoplasme, même s'il reste cohérent avec la littérature (Gumienny *et al.*, 2001), ne présente aucune particularité et est commun à de nombreuses protéines. Comme nous l'avons fait précédemment, les cellules transfectées ont été incubées deux heures avec des billes de latex. Par contre, dans ce cas, aucune re-localisation n'a été observée. Ceci avait déjà été observé pour la surexpression d'ELMO1 seul dans le cas de l'étude des « ruffles », ces mouvements membranaires dynamiques impliqués dans la migration cellulaire. La co-expression de DOCK180 était suffisante pour observer une re-localisation d'ELMO1MS à la membrane (Gumienny *et al.*, 2001). Il est possible que la quantité de partenaires d'ELMO1 disponible dans la cellule soit trop faible pour re-localiser la protéine surexprimée.

L'intégrité de la protéine de fusion a été vérifiée par immunotransfert. Dans les cellules transfectées uniquement avec la GFP, un anticorps primaire anti-GFP permet de détecter celle-ci. Par contre, que ce soit avec l'anticorps Elmo1(N-20) ou l'anticorps anti-GFP, aucun signal n'est obtenu dans les cellules transfectées avec pEGFPc1-ELMO1MS. Il semblerait que des forts taux de surexpression d'ELMO1MS-GFP par les cellules soit plus difficiles à obtenir que dans le cas de la GFP. Ces résultats ne sont pas très encourageants quant aux surexpressions de la protéine ELMO1MS dans les cellules. Peut-être qu'une autre protéine recombinante poserait moins de soucis : une fusion en N-terminal de la GFP ou une autre construction.

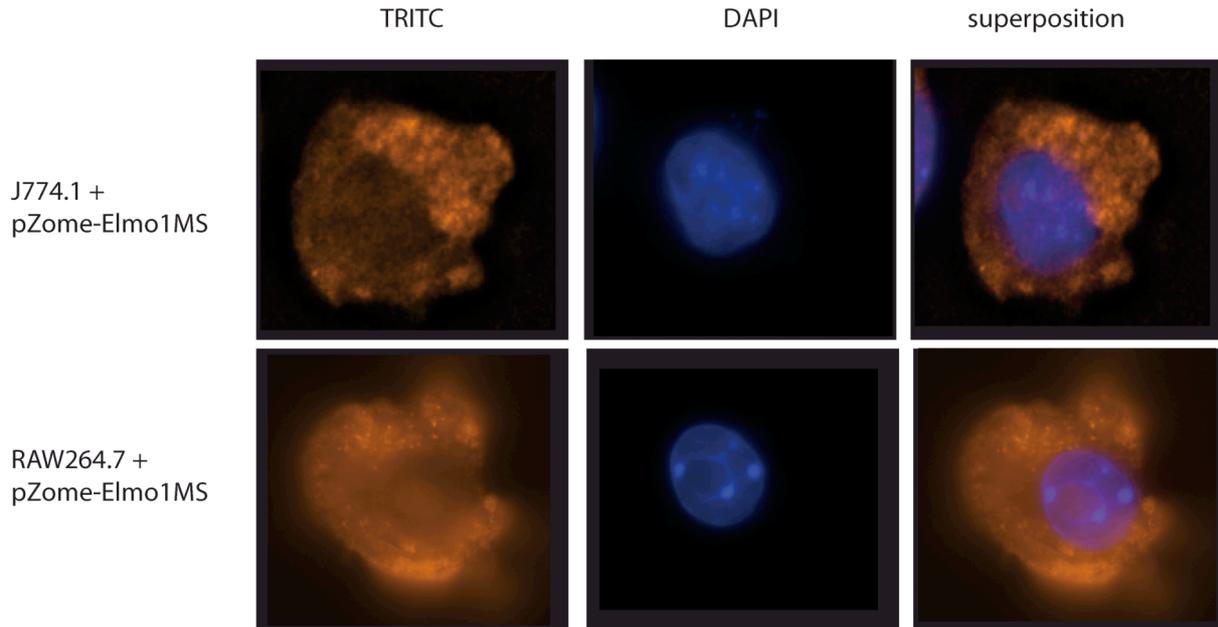


Figure 52 : Analyse de l'expression de la protéine Elmo1MS recombinante (TAP-tag)

Le vecteur pZome1N-MCS-ELMO1MS est transfecté dans des cellules J774.1 et RAW264.7. Le TAG protéine A est détecté avec une IgG de lapin marqué TRITC (rouge) et l'ADN est marqué au DAPI (bleu). Les images des cellules J774 ont subi une restauration rapide. Nous pouvons observer un signal cytoplasmique proche de celui obtenu pour les fusions GFP.

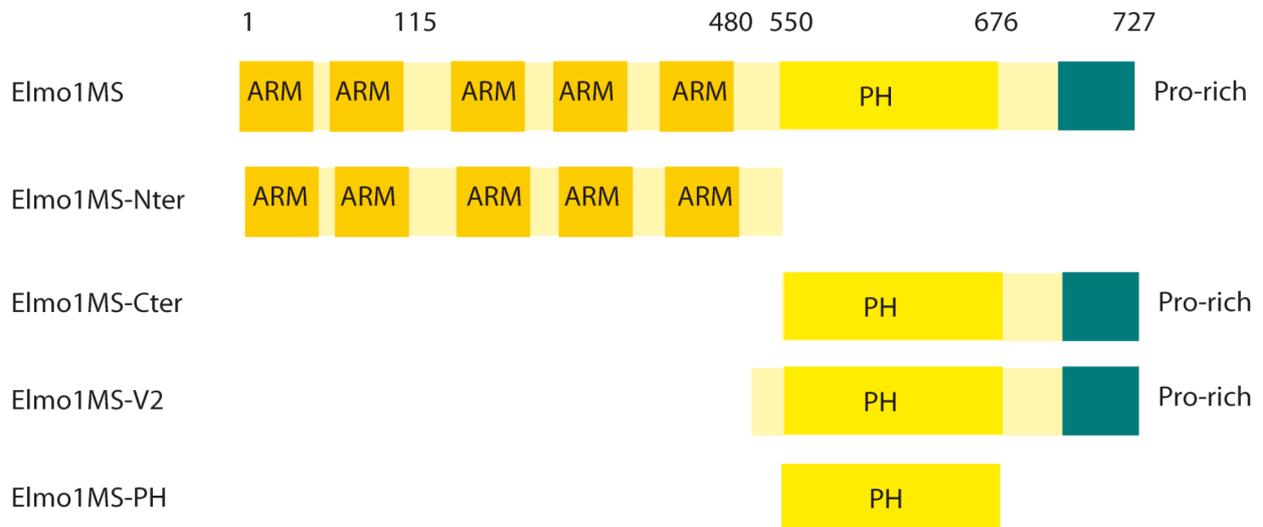


Figure 53 : Régions d'ELMO1MS choisies pour être amplifiées et clonées dans un vecteur d'expression.

Cinq régions ont été choisies : la protéine entière, la région N-terminale permettant l'interaction avec de nombreux partenaires sauf DOCK180, la région C-terminale d'interaction avec DOCK180, la région correspondant au produit d'épissage V2 du gène Elmo1 et le domaine PH isolé.

3.2.3 A la recherche de partenaires d'ELMO1 par TAP-Tag

Compte-tenu du faible taux d'expression d'ELMO1 dans la cellule, nous avons envisagé de partir à la recherche de partenaires d'ELMO1MS par une méthode appelée TAP-Tag (Gregan *et al.*, 2007). Cette méthode consiste à surexprimer dans les cellules une protéine recombinante d'intérêt fusionnée à une double étiquette : un domaine protéine A, fixant les IgG, et un domaine de fixation du calcium nommé CBP (figure 44, page 144). La protéine de fusion et ses partenaires peuvent être purifiés en utilisant deux colonnes d'affinité successives.

Nous venons de voir que la sur-expression de la fusion GFP-ELMO1MS était relativement difficile. Nous avons cloné ELMO1MS dans le vecteur de TAP-Tag pZome-1N-MCS en espérant que nous aurions moins de soucis avec cette construction plus courte et que la recherche de partenaires d'ELMO1MS serait plus fructueuse que le suivi de cette protéine dans une cellule vivante.

Afin de vérifier que nous pouvions exprimer cette protéine dans les cellules J774.1 et RAW264.7, nous avons transfecté ces cellules avec le vecteur pZome-1N-MCS-ELMO1MS ou avec le vecteur vide. Nous avons utilisé la propriété de liaison des IgG de l'étiquette pour détecter l'expression de la protéine de fusion et donc traité les cellules avec une IgG de lapin marqué avec TRITC.

Nous pouvons observer sur la figure 52 le signal obtenu dans quelques cellules RAW264.7 et J774.1. Le signal est réparti dans le cytoplasme de la même façon que celui de la protéine de fusion GFP-ELMO1MS. Par contre, très peu de cellules dans chaque expérience de transfection étaient marquées. Il semblerait donc que se soit bien la protéine ELMO1MS qui pose des soucis lors de la surexpression. Nous avons donc envisagé la possibilité de n'exprimer que certains domaines de cette protéine.

3.3 Expression de domaines isolés d'ELMO1MS

La stratégie de dissection d'une protéine en domaines peut donner de nombreuses informations sur la fonction de ces domaines. Nous pouvons observer la localisation des domaines dans la cellule et ainsi définir lequel est responsable de la dynamique d'ELMO1 au cours de la phagocytose. Nous pouvons également identifier les partenaires associés à chaque domaine lors de la phagocytose. En reliant les deux informations, nous pouvons établir des modèles dynamiques d'interaction de partenaires avec ELMO1.

-

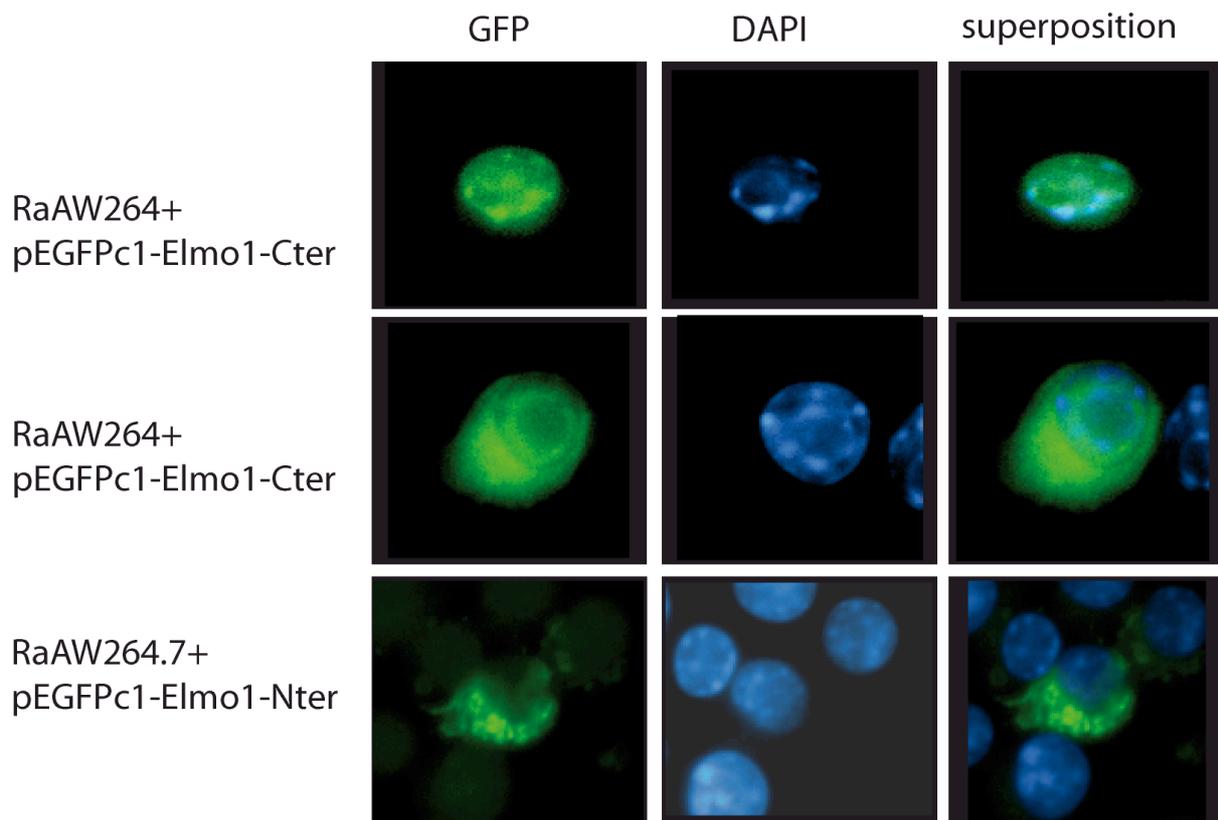


Figure 54 : Surexpression des protéines de fusion ELMO1MS-Nter-GFP et ELMO1MS-Cter-GFP dans les RAW264 .7.

Les domaines N-terminaux et C-terminaux de la protéine ELMO1MS fusionnés à la GFP (vert) ont été sur-exprimés dans des cellules RAW264.7. Après fixation, l'ADN de ces cellules est marqué au DAPI (bleu). Le domaine N-terminal semble s'exprimer dans le cytoplasme alors que le domaine C-terminal semble être nucléaire.

3.3.1 Choix des domaines à exprimer

Nous avons choisi de cloner quatre régions d'ELMO1MS, afin de regarder leur localisation cellulaire mais aussi leurs interactants (figure 53) :

- La région dite N-terminale qui n'interagit pas avec DOCK mais avec les autres partenaires d'ELMO1. Cette région contient des domaines Armadillo mais surtout la région 319-550 a été renommée en tant que domaine de type ELMO, soit spécifique de cette protéine.
- La région C-terminale, responsable de l'interaction avec DOCK mais aussi probablement d'une localisation membranaire via le domaine PH.
- Le domaine PH seul.
- Une région 480-727 qui correspond à la forme V2 de ELMO1MS obtenue par épissage alternatif.

Ces mêmes régions vont être exprimées de façon recombinante et étudiées par des techniques de biochimie dans le laboratoire.

3.3.2 Les constructions obtenues et leur expression

Nous avons cloné pour l'instant ELMO1MS-Nter et ELMO1MS-Cter dans le vecteur pEGFPc1 afin de comparer l'expression de ces domaines avec celle de la protéine totale.

La figure montre les résultats obtenus pour l'expression dans les cellules RAW264.7. Nous pouvons observer que le domaine N-terminal d'ELMO1MS fusionné à la GFP est cytoplasmique tout comme la protéine entière. Par contre, la région C-terminale a une localisation très proche de la GFP (figure 54) laissant supposer que la GFP guide la localisation de la fusion. Nous sommes donc en train de cloner ce domaine en N-terminal de la GFP de façon à voir si la localisation semble plus cohérente.

Par contre, l'expression de ces domaines est dramatiquement rare. En effet, sur les 5.10^6 cellulesensemencées avant transfection, on en compte au final moins de dix cellules fluorescentes pour les deux domaines testés. Ceci s'explique par un très fort taux de mort cellulaire lors de la transfection mais aussi un très faible nombre de cellules fluorescentes sur celles qui survivent. Ces constructions ont donc l'air de se comporter comme des dominants négatifs de la protéine ELMO1 et ces dominants négatifs semblent létaux pour les cellules.

4 Discussion et perspectives

4.1 Un modèle de phagocytose

Nous avons établi un modèle simple de phagocytose des corps apoptotiques en utilisant des billes de latex et des lignées cellulaires facilement transfectables : les macrophages murins RAW264.7 et J774.1 ainsi qu'une lignée de cellules rénales humaines ayant un comportement proche des cellules dendritiques immatures (Albert *et al.*, 2000; Akakura *et al.*, 2004), les HEK293. Le taux d'expression de la protéine ELMO1 dans les lignées cellulaires utilisées est trop faible pour pouvoir être détectée en immunotransfert. Par contre, le marquage avec l'anticorps Elmo1(N-20) a permis de détecter un signal cytoplasmique dans les deux lignées murines. Nous avons pu montrer qu'une partie de ce signal se relocalise dans la coupe phagocytaire lors de l'internalisation des billes par les RAW264.7 (voir figure 50). Ces données laissent supposer que le signal correspond bien à la protéine ELMO1 et qu'ELMO1 est bien recrutée au cortex cellulaire des coupes phagocytiques lors de l'internalisation des billes modèles. Cette relocalisation devra être confirmée dans les J774.1 mais aussi dans les HEK293 afin de valider ou non ces deux lignées pour leur usage ultérieur.

Nous avons également débuté la mise en place d'un modèle plus physiologique utilisant des macrophages humains, des cellules HL-60 différenciées aux esters de phorbol, et des cellules HeLa rendues apoptotiques par induction aux UV. Quantifier la phagocytose avec ce modèle est plus difficile qu'avec les billes. En effet, il faut pour pouvoir suivre les corps apoptotiques, pouvoir les marquer spécifiquement. Comme montré dans le cours de ce chapitre, nous avons utilisé les marqueurs de membrane DiO et DiI qui permettent un marquage vital vert ou rouge, compatible avec les méthodologies disponibles au laboratoire : Cytométrie en flux, et microscopie optique tant sur du matériel fixé que sur des échantillons destinés à la vidéo-microscopie. Dans nos conditions expérimentales, le marquage membranaire n'est pas très efficace sur les HL-60 différenciées. De même, les membranes des cellules subissent des changements drastiques au cours du processus d'apoptose ce qui rend le marquage délicat. Ce modèle sera particulièrement important pour confirmer les résultats que nous pourrions obtenir avec notre modèle simplifié dans lequel les corps apoptotiques peuvent être modélisés par des billes recouvertes éventuellement d'un déterminant choisi.

4.2 Surexpression d'ELMO1MS dans les cellules

La surexpression d'ELMO1MS semble pour l'instant difficilement exploitable. En effet, quelle que soit la construction utilisée : protéine entière ou domaines, vecteur pEGFPc1 ou pZome, l'expression de forts taux de protéine recombinante semble difficile. Celle-ci ne peut pas être détectée par immunotransfert et si certaines cellules sont fluorescentes la localisation du signal est peu convaincante. Il s'est avéré difficile d'observer par exemple la relocalisation au cortex membranaire de ces constructions au cours de tests de phagocytose (présence de billes).

Parce que l'immunodétection après transfert était impossible sur des extraits d'une population nouvellement transfectée, nous avons essayé d'enrichir les cultures en cellules exprimant la construction pEGFPc1-ELMO1MS en ajoutant au milieu de culture l'antibiotique correspondant à la résistance apportée par les vecteurs transfectés (ici la généticine / G418). Nous espérons ainsi augmenter la quantité de protéines de fusion et pouvoir ainsi en vérifier l'expression sous la forme attendue. Dans les premiers jours qui suivent l'ajout de la G418, on peut observer que la majorité des cellules sont faiblement fluorescentes mais après 48 à 72 heures le taux de fluorescence chute jusqu'à devenir à peine détectable au microscope. Dans ces conditions, aucune protéine n'est détectée en immunotransfert malgré la pression de sélection. Ces observations confirment que la surexpression de la protéine ELMO1MS est défavorable à la survie des cellules et il est peu probable que nous arrivions à stabiliser un clone exprimant cette protéine. Dans le meilleur des cas, nous pourrions enrichir les cultures en cellules transfectées en maintenant une pression de sélection sur un jour ou deux.

Ces observations ne sont pas très favorables à l'utilisation des surexpressions pour chercher des partenaires de la protéine ELMO1MS ou de ses domaines. Nous allons devoir envisager de nouvelles stratégies mais tout en ré-itérant les constructions en fusionnant ELMO1MS en N-terminal de façon à voir si ces constructions poseraient moins de soucis.

4.3 Perspectives : étude du comportement d'ELMO1 lors de la phagocytose

4.3.1 Disséquer les signaux permettant de recruter ELMO1

Le modèle de phagocytose choisi, utilisant des lignées et des billes de latex, peut être extrapolé de façon à comprendre les signaux permettant de recruter ELMO1 à la membrane. En effet, les billes peuvent être recouvertes de protéines choisies, comme, par exemple, l'opsonine C1q. Nous pourrions alors quantifier le taux de phagocytose de ces billes en

comparaison avec des billes contrôle recouvertes d'une protéine témoin et observer la re-localisation d'ELMO1 dans ces deux conditions. Les billes pourront aussi être remplacées par des billes de zymosan ou des bactéries marquées afin d'estimer le taux de phagocytose ainsi que la re-localisation d'ELMO1 dans ces modèles classiques de la phagocytose des pathogènes. Cette étude devra être réalisée sur plusieurs lignées cellulaires car le recrutement ou non d'ELMO1 pourrait ne pas dépendre de la nature de la cible mais du jeu de récepteurs présents sur chaque type cellulaire (macrophage, cellules dendritiques, fibroblastes par exemple).

Une fois le comportement d'ELMO1 établi selon les différents signaux, il s'agira bien sûr d'étudier d'éventuelles modifications d'ELMO1MS. En effet, il a été montré qu'ELMO1MS était phosphorylable par la protéine Hck sans que le contexte dans lequel peuvent intervenir ces modifications ne soit établi (Scott *et al.*, 2002). Il serait donc judicieux de lyser des cellules en présence de différentes cibles et de regarder grâce à un anticorps dirigé contre les phosphotyrosines, la phosphorylation ou non de la protéine ELMO1. De plus, il est fort probable que les protéines impliquées dans le recrutement ou non d'ELMO1 change suivant la cible phagocytée. Il serait donc intéressant d'identifier les protéines en complexe avec ELMO1 par immunoprécipitation. Nous pourrions regarder, par exemple, la présence de RhoG, Hck, de protéines de la famille DOCK180 ou encore de BAI1. Par contre, pour ces études nous allons nous heurter au taux d'expression de la protéine ELMO1.

4.3.2 Détecter l'expression de la protéine ELMO1MS

Au cours de notre travail, nous nous sommes confrontés à un facteur limitant dans l'étude de la protéine ELMO1 : son taux d'expression endogène est très faible et malgré les hauts taux de transfection obtenus, il semble difficile de la surexprimer. Or que se soient pour étudier les modifications post-traductionnelles de cette protéine ou pour trouver de nouveaux partenaires, il faut absolument la détecter en immunotransfert. Il faut donc trouver une solution pour enrichir les extraits cellulaires en protéine ELMO1. Nous allons dans un premier temps essayer de réaliser une immunoprécipitation sur un grand nombre de cellules de façon à essayer d'enrichir l'extrait déposé sur gel en protéine ELMO1. Si cette technique ne fonctionne pas, la transfection protéique est maintenant envisageable par différents types de composés ou de vecteurs qui permettent l'entrée directe des protéines dans les cellules en culture. En effet, le Dr JB Reiser de notre équipe produit en bactéries et purifie la protéine ELMO1MS. La transfection protéique nous permettrait non seulement d'enrichir les cellules en protéine ELMO1MS mais éventuellement en domaines d'ELMO1MS voire en protéines

mutées. Nous pourrions, par exemple, muter les sites d'interaction avec les partenaires, ou les sites de phosphorylation et comparer le comportement de la protéine mutante avec la protéine sauvage à la fois dans le contexte cellulaire mais aussi biochimiquement. En effet, la perte d'interaction avec un partenaire cellulaire ou la perte de phosphorylation par Hck peut être vérifiée *in vitro* avec des protéines recombinantes. Suite à cela, il sera possible de vérifier *ex vivo* à la fois le comportement de la protéine et la nature des protéines qui lui sont complexées. Par exemple, on peut se demander si la phosphorylation par Hck empêche certaines interactions et donc la relocalisation membranaire d'ELMO1.

Si la méthode de transfection protéique se révèle tout aussi toxique que la surexpression, il faudra envisager de partir de l'étude d'une autre protéine de cette voie de signalisation. Parmi les cibles intéressantes, nous pouvons citer RhoG ou sa GEF TRIO dont la voie d'activation dans ce contexte n'est pas connue (figure 39, page 126). Nous pouvons également utiliser un autre interactant d'ELMO1, le récepteur BAI1 à la phosphatidylsérine. Finalement, il est toujours possible de tester le recrutement de DOCK/ELMO en surexprimant des récepteurs dont les voies de signalisation sont mal connues comme TIM-4.

4.3.3 L'avenir immédiat du projet

Ce projet est né de la collaboration du Dr J.P. Kleman avec le Dr P. Frachet, il y a trois ans, à l'Institut de Biologie Structurale. La petite équipe se compose de biophysiciens, de biochimistes et de biologistes cellulaires. Malgré les soucis d'expression de la protéine ELMO1 dans les cellules, nous avons avancé sur les modèles de phagocytose et la production de protéines recombinantes (ELMO, DOCK180, Rac1, BAI1) (Dr Kleman, Dr Reiser, A. Chouquet). Des tests de cristallisation de la protéine ELMO1MS sont en cours et des co-cristallisations avec le domaine SH3 de la protéine DOCK180 sont envisageables (Dr Reiser, Dr Housset). De plus, afin de mieux comprendre l'interaction du domaine SH3 de DOCK180 avec des peptides polyproline d'ELMO1, des analyses par Résonance Magnétique Nucléaire de ce complexe sont en cours (Dr. P.Gans). L'équipe cherche également à identifier les domaines stables d'ELMO1 par des méthodes de protéolyse ménagée. De même, les domaines solubles de DOCK180 sont en cours d'étude. La plateforme ESPRIT du Partnership for Structural Biology à Grenoble va permettre de déterminer les limites de repliement des domaines de DOCK180 de façon à faciliter la production de domaines solubles. Une fois définis ces domaines biochimiques, les premières analyses par cristallographie aux rayons X et par Résonance Magnétique Nucléaire seront complétées par l'étude des interactions entre les différents domaines.

**CHAPITRE IV CONCLUSION ET PERSPECTIVES
GENERALES**

Au cours de mes années de doctorat, j'ai participé à deux projets dont les enjeux étaient complètement différents et qui m'ont permis de découvrir deux aspects de la recherche.

1 Un projet déjà bien avancé : l'étude structurale des propriétés de reconnaissance des ficolines et de C1q

Le projet de biologie structurale sur les spécificités de reconnaissance des ficolines et du C1q était un projet bien avancé, dont de nombreux obstacles avaient été franchis par l'équipe du Dr. C.Gaboriaud et du Dr. G.Arlaud avant mon arrivée. J'ai donc pu participer à la phase particulièrement stimulante de l'analyse et de l'interprétation de structures entre les domaines de reconnaissance de ces protéines et de leurs ligands. J'ai également acquis des savoir-faire très éloignés de ma formation initiale en traitement des données de diffraction et résolution de structures. Ce projet m'a permis de participer à deux congrès internationaux afin d'y présenter mes résultats et ce travail a aussi fait l'objet de trois publications que vous trouverez à la fin du manuscrit.

Nous avons pu montrer que les ficolines H et M possèdent un site de reconnaissance conservé au sein des domaines de type fibrinogène capable de stabiliser les groupements acétylés. Le remplacement de certains résidus, dans ou autour de ce site, explique la spécificité de la ficoline H pour le D-fucose et celle de la ficoline M pour les acides sialiques. Les spécificités de la ficoline L étaient mal comprises : une spécificité élevée pour les petits ligands acétylés, mais qui n'expliquait pas les spécificités décrites pour certains polysaccharides de capsule des Staphylocoques ou des Streptocoques. Nous avons pu montrer que la ficoline L possède plusieurs sites, qui forment une véritable surface de reconnaissance pour des polymères. L'étude de ligands étendus semble alors plus pertinente pour comprendre les propriétés de cette protéine. Afin de compléter la compréhension des déterminants structuraux des capacités de reconnaissance des ficolines, nous envisageons deux stratégies : la mutagenèse dirigée et de nouvelles co-cristallisations avec des ligands plus étendus. En effet, la mutagenèse dirigée de résidus dans la ficoline M tels que la Tyr271, impliquée dans la stabilisation du groupement acétylés, et les résidus Gly221 et Ala256 permettant l'accès au site des acides sialiques permettrait de confirmer le rôle de ces résidus. En ce qui concerne la ficoline L, la surface de reconnaissance est tellement étendue qu'il semble difficile pour l'instant de définir des sites de mutagenèse pertinents autres que la mutation de la Phe262 en Tyr262 pour vérifier que nous rétablissons l'activité du site externe.

Par contre, les oligosaccharides identifiés grâce au « Consortium for Functional Genomics » pourront être testés en co-cristallisation afin de mieux définir les déterminants de reconnaissance de la ficoline L voire de la ficoline M.

Nous avons également identifié un nouveau site de reconnaissance pour C1q impliqué dans la fixation de la phosphatidylsérine, un marqueur des cellules apoptotiques. Les ligands ou partenaires de C1q sont nombreux et de nombreuses expériences de co-cristallisation sont en cours afin de mieux définir les résidus impliqués dans la fixation de ceux-ci (héparanes sulfate, NAcGlc, la protéine prion).

Une fois définies les spécificités de reconnaissance, il restera à établir le lien entre ces spécificités et les conséquences biologiques sur les phagocytes ou sur l'activation du complément. Dans cette optique, des cristallisations du complexe C1 sont en cours. Le laboratoire d'enzymologie moléculaire prévoit aussi de définir les interactions entre les protéines de reconnaissance du complément et les récepteurs à la surface des cellules immunitaires.

2 Un projet à construire : Etude de la protéine ELMO1 au cours de la phagocytose des cellules apoptotiques.

Ce projet a été choisi à la fois pour sa pertinence scientifique mais aussi pour sa cohérence au sein des axes prioritaires de l'Institut. Notre petite équipe composée du Dr JP Kleman, du Dr D. Housset, du Dr JB Reiser, du Dr. P.Gans et de J. Perard, en Master à l'époque dans le laboratoire, et de moi-même a choisi cette thématique avec l'appui des Dr P.Frchet et C. Gaboriaud qui travaillaient déjà dans cette thématique à d'autres niveaux. Cette équipe a été montée avec une volonté de pluridisciplinarité de façon à étudier notre modèle du niveau atomique au niveau cellulaire. J'ai donc pu assister aux toutes premières phases de la construction d'un projet scientifique, la mise en place du laboratoire au sein du Partnership for Structural Biology mais aussi la mise en place de modèles d'études encore inusités à l'Institut. Cette partie du projet ne m'a pas permis de publier des résultats, mais, par contre, m'a certainement permis de comprendre les difficultés liées à la mise en place d'une nouvelle thématique, difficultés d'ordre scientifique, car il est nécessaire de rencontrer des spécialistes du domaine et de s'appuyer d'autant plus sur la littérature pour choisir un modèle pertinent, mais aussi difficultés techniques dans la mise en place des modèles.

Guidée par les biologistes cellulaires du projet, le Dr JP Kleman mais aussi le Dr P. Frchet, avec qui j'avais déjà travaillé sur le projet de biologie structurale (Paidassi *et al.*, 2008), j'ai

mis en place un modèle de phagocytose simple utilisant des billes de latex mais aussi commencé l'étude d'un modèle plus physiologique entre des macrophages humains et des cellules apoptotiques. L'étude de la protéine ELMO1 dans les cellules pose des problèmes techniques limitants. C'est une protéine qui est très peu exprimée et dont la surexpression semble défavorable à la survie des cellules. Malgré les nombreuses expériences réalisées, nous n'avons pas encore surmonté cet obstacle. D'autres techniques d'enrichissement sont encore à notre disposition pour résoudre ces problèmes, mais il faudra certainement envisager de choisir une autre cible pour disséquer les voies de signalisations impliquées dans la phagocytose des corps apoptotiques. Si le modèle cellulaire semble difficile à mettre en place, de nombreuses avancées ont été réalisées sur le plan biochimique au sein de l'équipe. Ces avancées pourront être mises à profit afin de redéfinir des modalités d'étude cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abraham, M.C., Lu, Y., and Shaham, S. (2007). A morphologically conserved nonapoptotic program promotes linker cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell* 12, 73-86.
- Agrawal, A., Shrive, A.K., Greenhough, T.J., and Volanakis, J.E. (2001). Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *J Immunol* 166, 3998-4004.
- Akaiwa, M., Yae, Y., Sugimoto, R., Suzuki, S.O., Iwaki, T., Izuhara, K., and Hamasaki, N. (1999). Hakata antigen, a new member of the ficolin/opsonin p35 family, is a novel human lectin secreted into bronchus/alveolus and bile. *J Histochem Cytochem* 47, 777-786.
- Akakura, S., Singh, S., Spataro, M., Akakura, R., Kim, J.I., Albert, M.L., and Birge, R.B. (2004). The opsonin MFG-E8 is a ligand for the α v β 5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 292, 403-416.
- Albert, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (2002). *Biologie Moléculaire de la cellule*.
- Albert, M.L., Kim, J.I., and Birge, R.B. (2000). α v β 5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* 2, 899-905.
- Aoyagi, Y., Adderson, E.E., Rubens, C.E., Bohnsack, J.F., Min, J.G., Matsushita, M., Fujita, T., Okuwaki, Y., and Takahashi, S. (2008). L-Ficolin/mannose-binding lectin-associated serine protease complexes bind to group B streptococci primarily through N-acetylneuraminic acid of capsular polysaccharide and activate the complement pathway. *Infect Immun* 76, 179-188.
- Arlaud, G.J., Sim, R.B., Duplaa, A.M., and Colomb, M.G. (1979). Differential elution of Clq,Clr and Cls from human C1 bound to immune aggregates. Use in the rapid purification of C1 subcomponents. *Mol Immunol* 16, 445-450.
- Arlaud, G.J., Volanakis, J.E., Thielens, N.M., Narayana, S.V., Rossi, V., and Xu, Y. (1998). The atypical serine proteases of the complement system. *Adv Immunol* 69, 249-307.
- Atkinson, A.P., Cedzynski, M., Szemraj, J., St Swierzko, A., Bak-Romaniszyn, L., Banasik, M., Zeman, K., Matsushita, M., Turner, M.L., and Kilpatrick, D.C. (2004). L-ficolin in children with recurrent respiratory infections. *Clin Exp Immunol* 138, 517-520.

B

- Balasubramanian, K., Chandra, J., and Schroit, A.J. (1997). Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem* 272, 31113-31117.
- Banki, Z., Soederholm, A., Mullauer, B., Dierich, M.P., and Stoiber, H. (2007). Tracing complement-retroviral interactions from mucosal surfaces to the lymphatic tissue. *Front Biosci* 12, 2096-2106.
- Baruah, P., Dumitriu, I.E., Peri, G., Russo, V., Mantovani, A., Manfredi, A.A., and Rovere-Querini, P. (2006). The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells. *J Leukoc Biol* 80, 87-95.
- Beglova, N., and Blacklow, S.C. (2005). The LDL receptor: how acid pulls the trigger. *Trends Biochem Sci* 30, 309-317.
- Bevers, E.M., Comfurius, P., Dekkers, D.W., and Zwaal, R.F. (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1439, 317-330.
- Bexborn, F., Andersson, P.O., Chen, H., Nilsson, B., and Ekdahl, K.N. (2008). The tick-over theory revisited: Formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H₂O)Bb). *Mol Immunol* 45, 2370-2379.
- Bianco, A., Poukkula, M., Cliffe, A., Mathieu, J., Luque, C.M., Fulga, T.A., and Rorth, P. (2007). Two distinct modes of guidance signalling during collective migration of border cells. *Nature* 448, 362-365.
- Bilyy, R.O., Antonyuk, V.O., and Stoika, R.S. (2004). Cytochemical study of role of alpha-d-mannose- and beta-d-galactose-containing glycoproteins in apoptosis. *J Mol Histol* 35, 829-838.
- Botto, M., Dell'Agnola, C., Bygrave, A.E., Thompson, E.M., Cook, H.T., Petry, F., Loos, M., Pandolfi, P.P., and Walport, M.J. (1998). Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet* 19, 56-59.
- Bredt, W., Wellek, B., Brunner, H., and Loos, M. (1977). Interactions between mycoplasma pneumoniae and the first components of complement. *Infect Immun* 15, 7-12.

Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Tramont, A.C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R., and Ravichandran, K.S. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol* 4, 574-582.

Bulla, R., Agostinis, C., Bossi, F., Rizzi, L., Debeus, A., Tripodo, C., Radillo, O., De Seta, F., Ghebrehiwet, B., and Tedesco, F. (2008). Decidual endothelial cells express surface-bound C1q as a molecular bridge between endovascular trophoblast and decidual endothelium. *Mol Immunol* 45, 2629-2640.

Burton, D.R., Boyd, J., Brampton, A.D., Easterbrook-Smith, S.B., Emanuel, E.J., Novotny, J., Rademacher, T.W., van Schravendijk, M.R., Sternberg, M.J., and Dwek, R.A. (1980). The C1q receptor site on immunoglobulin G. *Nature* 288, 338-344.

Buttke, T.M., and Sandstrom, P.A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15, 7-10.

C

Campos, B., Mo, Y.D., Mealy, T.R., Li, C.W., Swairjo, M.A., Balch, C., Head, J.F., Retzinger, G., Dedman, J.R., and Seaton, B.A. (1998). Mutational and crystallographic analyses of interfacial residues in annexin V suggest direct interactions with phospholipid membrane components. *Biochemistry* 37, 8004-8010.

Carlin, A.F., Lewis, A.L., Varki, A., and Nizet, V. (2007). Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *J Bacteriol* 189, 1231-1237.

Cedzynski, M., Nuytinck, L., Atkinson, A.P., St Swierzko, A., Zeman, K., Szemraj, J., Szala, A., Turner, M.L., and Kilpatrick, D.C. (2007). Extremes of L-ficolin concentration in children with recurrent infections are associated with single nucleotide polymorphisms in the FCN2 gene. *Clin Exp Immunol* 150, 99-104.

Chen, Q., Chen, T.J., Letourneau, P.C., Costa Lda, F., and Schubert, D. (2005). Modifier of cell adhesion regulates N-cadherin-mediated cell-cell adhesion and neurite outgrowth. *J Neurosci* 25, 281-290.

Collaborative Computational Project number 4. (1994). *Acta. Crystallogr. D* 50, 760-763.

Collard, C.D., Montalto, M.C., Reenstra, W.R., Buras, J.A., and Stahl, G.L. (2001). Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: role of cytokeratin 1. *Am J Pathol* *159*, 1045-1054.

Compston, D.A., Morgan, B.P., Campbell, A.K., Wilkins, P., Cole, G., Thomas, N.D., and Jasani, B. (1989). Immunocytochemical localization of the terminal complement complex in multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* *15*, 307-316.

Cooper, N.R. (1985). The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol* *37*, 151-216.

Cote, J.F., Motoyama, A.B., Bush, J.A., and Vuori, K. (2005). A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P₃-binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nat Cell Biol* *7*, 797-807.

Cote, J.F., and Vuori, K. (2002). Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci* *115*, 4901-4913.

Cutler, A.J., Botto, M., van Essen, D., Rivi, R., Davies, K.A., Gray, D., and Walport, M.J. (1998). T cell-dependent immune response in C1q-deficient mice: defective interferon gamma production by antigen-specific T cells. *J Exp Med* *187*, 1789-1797.

Cvetanovic, M., and Ucker, D.S. (2004). Innate immune discrimination of apoptotic cells: repression of proinflammatory macrophage transcription is coupled directly to specific recognition. *J Immunol* *172*, 880-889.

D

Davey, G.M., Kurts, C., Miller, J.F., Bouillet, P., Strasser, A., Brooks, A.G., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2002). Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J Exp Med* *196*, 947-955.

deBakker, C.D., Haney, L.B., Kinchen, J.M., Grimsley, C., Lu, M., Klingele, D., Hsu, P.K., Chou, B.K., Cheng, L.C., Blangy, A., Sondek, J., Hengartner, M.O., Wu, Y.C., and Ravichandran, K.S. (2004). Phagocytosis of apoptotic cells is regulated by a UNC-73/TRIO-

MIG-2/RhoG signaling module and armadillo repeats of CED-12/ELMO. *Curr Biol* 14, 2208-2216.

Devitt, A., Parker, K.G., Ogden, C.A., Oldreive, C., Clay, M.F., Melville, L.A., Bellamy, C.O., Lacy-Hulbert, A., Gangloff, S.C., Goyert, S.M., and Gregory, C.D. (2004). Persistence of apoptotic cells without autoimmune disease or inflammation in CD14^{-/-} mice. *J Cell Biol* 167, 1161-1170.

Devyatyarova-Johnson, M., Rees, I.H., Robertson, B.D., Turner, M.W., Klein, N.J., and Jack, D.L. (2000). The lipopolysaccharide structures of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Neisseria gonorrhoeae* determine the attachment of human mannose-binding lectin to intact organisms. *Infect Immun* 68, 3894-3899.

Duncan, A.R., and Winter, G. (1988). The binding site for C1q on IgG. *Nature* 332, 738-740.

E

Edgar, P.F. (1995). Hucolin, a new corticosteroid-binding protein from human plasma with structural similarities to ficolins, transforming growth factor-beta 1-binding proteins. *FEBS Lett* 375, 159-161.

Ellis, R.E., Jacobson, D.M., and Horvitz, H.R. (1991). Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 129, 79-94.

Elward, K., Griffiths, M., Mizuno, M., Harris, C.L., Neal, J.W., Morgan, B.P., and Gasque, P. (2005). CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *J Biol Chem* 280, 36342-36354.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot : model-building tools for molecular graphics. . *Acta Crystallograph. D.* 60, 2126-2132.

Endo, Y., Sato, Y., Matsushita, M., and Fujita, T. (1996). Cloning and characterization of the human lectin P35 gene and its related gene. *Genomics* 36, 515-521.

Endo, Y., Takahashi, M., and Fujita, T. (2006). Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology* 211, 283-293.

F

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Frasch, S.C., Warner, M.L., and Henson, P.M. (1998a). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5, 551-562.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (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, 890-898.

Fadok, V.A., de Cathelineau, A., Daleke, D.L., Henson, P.M., and Bratton, D.L. (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, 1071-1077.

Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.E., Campbell, P.A., and Henson, P.M. (1992a). Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149, 4029-4035.

Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992b). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216.

Flierman, R., and Daha, M.R. (2007). The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology* 212, 363-370.

Fourgeaud, L., and Boulanger, L.M. (2007). Synapse remodeling, compliments of the complement system. *Cell* 131, 1034-1036.

Fraser, D.A., Bohlsion, S.S., Jasinskiene, N., Rawal, N., Palmarini, G., Ruiz, S., Rochford, R., and Tenner, A.J. (2006). C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression. *J Leukoc Biol* 80, 107-116.

Frederiksen, P.D., Thiel, S., Larsen, C.B., and Jensenius, J.C. (2005). M-ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement. *Scand J Immunol* 62, 462-473.

Fukui, Y., Hashimoto, O., Sanui, T., Oono, T., Koga, H., Abe, M., Inayoshi, A., Noda, M., Oike, M., Shirai, T., and Sasazuki, T. (2001). Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature* 412, 826-831.

G

Gaboriaud, C., Juanhuix, J., Gruez, A., Lacroix, M., Darnault, C., Pignol, D., Verger, D., Fontecilla-Camps, J.C., and Arlaud, G.J. (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.

Gaboriaud, C., Teillet, F., Gregory, L.A., Thielens, N.M., and Arlaud, G.J. (2007). Assembly of C1 and the MBL- and ficolin-MASP complexes: structural insights. *Immunobiology* 212, 279-288.

Gaboriaud, C., Thielens, N.M., Gregory, L.A., Rossi, V., Fontecilla-Camps, J.C., and Arlaud, G.J. (2004). Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol* 25, 368-373.

Gaipl, U.S., Munoz, L.E., Grossmayer, G., Lauber, K., Franz, S., Sarter, K., Voll, R.E., Winkler, T., Kuhn, A., Kalden, J., Kern, P., and Herrmann, M. (2007). Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun* 28, 114-121.

Garcia-Garcia, E., and Rosales, C. (2002). Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 72, 1092-1108.

Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.A., Michalak, M., and Henson, P.M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123, 321-334.

Garlatti, V., Belloy, N., Martin, L., Lacroix, M., Matsushita, M., Endo, Y., Fujita, T., Fontecilla-Camps, J.C., Arlaud, G.J., Thielens, N.M., and Gaboriaud, C. (2007a). Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins. *Embo J* 26, 623-633.

Garlatti, V., Martin, L., Gout, E., Reiser, J.B., Fujita, T., Arlaud, G.J., Thielens, N.M., and Gaboriaud, C. (2007b). Structural basis for innate immune sensing by M-ficolin and its control by a pH-dependent conformational switch. *J Biol Chem* 282, 35814-35820.

Garred, P., Pressler, T., Madsen, H.O., Frederiksen, B., Svejgaard, A., Hoiby, N., Schwartz, M., and Koch, C. (1999). Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 104, 431-437.

Gasque, P., Singhrao, S.K., Neal, J.W., Wang, P., Sayah, S., Fontaine, M., and Morgan, B.P. (1998). The receptor for complement anaphylatoxin C3a is expressed by myeloid cells and nonmyeloid cells in inflamed human central nervous system: analysis in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *J Immunol* 160, 3543-3554.

Geijtenbeek, T.B., Krooshoop, D.J., Bleijs, D.A., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 1, 353-357.

Geisbrecht, E.R., Haralalka, S., Swanson, S.K., Florens, L., Washburn, M.P., and Abmayr, S.M. (2008). Drosophila ELMO/CED-12 interacts with Myoblast city to direct myoblast fusion and ommatidial organization. *Dev Biol* 314, 137-149.

Gekonge, B.N., Schiralli, G., Schlegel, R.A., and Henderson, A.J. (2006). Signal transduction induced by apoptotic cells inhibits HIV transcription in monocytes/macrophages. *J Leukoc Biol* 80, 953-960.

Gregan, J., Riedel, C.G., Petronczki, M., Cipak, L., Rumpf, C., Poser, I., Buchholz, F., Mechtler, K., and Nasmyth, K. (2007). Tandem affinity purification of functional TAP-tagged proteins from human cells. *Nat Protoc* 2, 1145-1151.

Griffiths, M., Neal, J.W., and Gasque, P. (2007). Innate immunity and protective neuroinflammation: new emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. *Int Rev Neurobiol* 82, 29-55.

Grimsley, C.M., Kinchen, J.M., Tosello-Tramont, A.C., Brugnera, E., Haney, L.B., Lu, M., Chen, Q., Klingele, D., Hengartner, M.O., and Ravichandran, K.S. (2004). Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration. *J Biol Chem* 279, 6087-6097.

Grimsley, C.M., Lu, M., Haney, L.B., Kinchen, J.M., and Ravichandran, K.S. (2006). Characterization of a novel interaction between ELMO1 and ERM proteins. *J Biol Chem* *281*, 5928-5937.

Gruenbaum, E., and Shoenfeld, Y. (1997). [Nucleosome as an autoantigen in systemic lupus erythematosus]. *Harefuah* *132*, 475-478.

Gumienny, T.L., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A.C., Kinchen, J.M., Haney, L.B., Nishiwaki, K., Walk, S.F., Nemergut, M.E., Macara, I.G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Van Aelst, L., Hengartner, M.O., and Ravichandran, K.S. (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* *107*, 27-41.

H

Hamon, Y., Trompier, D., Ma, Z., Venegas, V., Pophillat, M., Mignotte, V., Zhou, Z., and Chimini, G. (2006). Cooperation between engulfment receptors: the case of ABCA1 and MEGF10. *PLoS ONE* *1*, e120.

Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., and Nagata, S. (2004). Expression of developmental endothelial locus-1 in a subset of macrophages for engulfment of apoptotic cells. *J Immunol* *172*, 3876-3882.

Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2002). Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* *417*, 182-187.

Handa, Y., Suzuki, M., Ohya, K., Iwai, H., Ishijima, N., Koleske, A.J., Fukui, Y., and Sasakawa, C. (2007). Shigella IpgB1 promotes bacterial entry through the ELMO-Dock180 machinery. *Nat Cell Biol* *9*, 121-128.

Harboe, M., and Mollnes, T.E. (2008). The alternative complement pathway revisited. *J Cell Mol Med*.

Hart, M.L., Saifuddin, M., and Spear, G.T. (2003). Glycosylation inhibitors and neuraminidase enhance human immunodeficiency virus type 1 binding and neutralization by mannose-binding lectin. *J Gen Virol* *84*, 353-360.

Hart, M.L., Saifuddin, M., Uemura, K., Bremer, E.G., Hooker, B., Kawasaki, T., and Spear, G.T. (2002). High mannose glycans and sialic acid on gp120 regulate binding of mannose-binding lectin (MBL) to HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* *18*, 1311-1317.

- Hartshorn, K.L., Sastry, K., White, M.R., Anders, E.M., Super, M., Ezekowitz, R.A., and Tauber, A.I. (1993). Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. *J Clin Invest* *91*, 1414-1420.
- Harumiya, S., Omori, A., Sugiura, T., Fukumoto, Y., Tachikawa, H., and Fujimoto, D. (1995). EBP-37, a new elastin-binding protein in human plasma: structural similarity to ficolins, transforming growth factor-beta 1-binding proteins. *J Biochem* *117*, 1029-1035.
- Harumiya, S., Takeda, K., Sugiura, T., Fukumoto, Y., Tachikawa, H., Miyazono, K., Fujimoto, D., and Ichijo, H. (1996). Characterization of ficolins as novel elastin-binding proteins and molecular cloning of human ficolin-1. *J Biochem (Tokyo)* *120*, 745-751.
- Honore, C., Hummelshoj, T., Hansen, B.E., Madsen, H.O., Eggleton, P., and Garred, P. (2007). The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. *Arthritis Rheum* *56*, 1598-1607.
- Huang, F.P., Platt, N., Wykes, M., Major, J.R., Powell, T.J., Jenkins, C.D., and MacPherson, G.G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* *191*, 435-444.
- Hummelshoj, T., Munthe-Fog, L., Madsen, H.O., Fujita, T., Matsushita, M., and Garred, P. (2005). Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. *Hum Mol Genet* *14*, 1651-1658.
- Hummelshoj, T., Thielens, N.M., Madsen, H.O., Arlaud, G.J., Sim, R.B., and Garred, P. (2007). Molecular organization of human Ficolin-2. *Mol Immunol* *44*, 401-411.
- Huynh, M.L., Fadok, V.A., and Henson, P.M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* *109*, 41-50.

I

- Ichijo, H., Hellman, U., Wernstedt, C., Gonez, L.J., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H., and Miyazono, K. (1993). Molecular cloning and characterization of ficolin, a multimeric protein with fibrinogen- and collagen-like domains. *J Biol Chem* *268*, 14505-14513.

Idusogie, E.E., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Wong, P.Y., Ultsch, M., Meng, Y.G., and Mulkerrin, M.G. (2000). Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol* *164*, 4178-4184.

Idusogie, E.E., Wong, P.Y., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Ultsch, M., and Mulkerrin, M.G. (2001). Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol* *166*, 2571-2575.

Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., Kawasaki, T., and Yamashina, I. (1987). Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J Biol Chem* *262*, 7451-7454.

J

Janardhan, A., Swigut, T., Hill, B., Myers, M.P., and Skowronski, J. (2004). HIV-1 Nef binds the DOCK2-ELMO1 complex to activate rac and inhibit lymphocyte chemotaxis. *PLoS Biol* *2*, E6.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology*. Garland Publishing.

Jehle, A.W., Gardai, S.J., Li, S., Linsel-Nitschke, P., Morimoto, K., Janssen, W.J., Vandivier, R.W., Wang, N., Greenberg, S., Dale, B.M., Qin, C., Henson, P.M., and Tall, A.R. (2006). ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages. *J Cell Biol* *174*, 547-556.

Jensen, M.L., Honore, C., Hummelshoj, T., Hansen, B.E., Madsen, H.O., and Garred, P. (2007). Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells. *Mol Immunol* *44*, 856-865.

K

Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* *26*, 795-800.

Kadirvelraj, R., Gonzalez-Outeirino, J., Foley, B.L., Beckham, M.L., Jennings, H.J., Foote, S., Ford, M.G., and Woods, R.J. (2006). Understanding the bacterial polysaccharide

antigenicity of *Streptococcus agalactiae* versus *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 8149-8154.

Kairies, N., Beisel, H.G., Fuentes-Prior, P., Tsuda, R., Muta, T., Iwanaga, S., Bode, W., Huber, R., and Kawabata, S. (2001). The 2.0-Å crystal structure of tachylectin 5A provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 13519-13524.

Kang, Y.S., Do, Y., Lee, H.K., Park, S.H., Cheong, C., Lynch, R.M., Loeffler, J.M., Steinman, R.M., and Park, C.G. (2006). A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell* *125*, 47-58.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* *26*, 239-257.

Kilpatrick, D.C., Fujita, T., and Matsushita, M. (1999). P35, an opsonic lectin of the ficolin family, in human blood from neonates, normal adults, and recurrent miscarriage patients. *Immunol Lett* *67*, 109-112.

Kim, S., Elkon, K.B., and Ma, X. (2004). Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity* *21*, 643-653.

Kinchen, J.M., Cabello, J., Klingele, D., Wong, K., Feichtinger, R., Schnabel, H., Schnabel, R., and Hengartner, M.O. (2005). Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature* *434*, 93-99.

Kiss, R.S., Ma, Z., Nakada-Tsukui, K., Brugnera, E., Vassiliou, G., McBride, H.M., Ravichandran, K.S., and Marcel, Y.L. (2006). The lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP) adapter protein GULP mediates trafficking of the LRP ligand prosaposin, leading to sphingolipid and free cholesterol accumulation in late endosomes and impaired efflux. *J Biol Chem* *281*, 12081-12092.

Klein, M.A., Kaeser, P.S., Schwarz, P., Weyd, H., Xenarios, I., Zinkernagel, R.M., Carroll, M.C., Verbeek, J.S., Botto, M., Walport, M.J., Molina, H., Kalinke, U., Acha-Orbea, H., and Aguzzi, A. (2001). Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med* *7*, 488-492.

Klickstein, L.B., Barbashov, S.F., Liu, T., Jack, R.M., and Nicholson-Weller, A. (1997). Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity* *7*, 345-355.

Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S., and Inoue, K. (2007). UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446, 1091-1095.

Kono, H., and Rock, K.L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8, 279-289.

Korb, L.C., and 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.

Krarpup, A., Sorensen, U.B., Matsushita, M., Jensenius, J.C., and Thiel, S. (2005). Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. *Infect Immun* 73, 1052-1060.

Krarpup, A., Thiel, S., Hansen, A., Fujita, T., and Jensenius, J.C. (2004). L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. *J Biol Chem* 279, 47513-47519.

Kuraya, M., Matsushita, M., Endo, Y., Thiel, S., and Fujita, T. (2003). Expression of H-ficolin/Hakata antigen, mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and MASP-3 by human glioma cell line T98G. *Int Immunol* 15, 109-117.

Kuraya, M., Ming, Z., Liu, X., Matsushita, M., and Fujita, T. (2005). Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. *Immunobiology* 209, 689-697.

L

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lambolez, F., Jooss, K., Vasseur, F., and Sarukhan, A. (2002). Tolerance induction to self antigens by peripheral dendritic cells. *Eur J Immunol* 32, 2588-2597.

Lauber, K., Blumenthal, S.G., Waibel, M., and Wesselborg, S. (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 14, 277-287.

Lauber, K., Bohn, E., Krober, S.M., Xiao, Y.J., Blumenthal, S.G., Lindemann, R.K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., Xu, Y., Autenrieth, I.B., Schulze-Osthoff, K.,

- Belka, C., Stuhler, G., and Wesselborg, S. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* *113*, 717-730.
- Lepow, I.H., Naff, G.B., Todd, E.W., Pensky, J., and Hinz, C.F. (1963). Chromatographic resolution of the first component of human complement into three activities. *J Exp Med* *117*, 983-1008.
- Linington, C., Morgan, B.P., Scolding, N.J., Wilkins, P., Piddlesden, S., and Compston, D.A. (1989). The role of complement in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis. *Brain* *112 (Pt 4)*, 895-911.
- Linscott, W.D. (1968). Complement: purification of the first component from rabbit and guinea pig serum. *Immunochemistry* *5*, 311-314.
- Liu, Y., Endo, Y., Iwaki, D., Nakata, M., Matsushita, M., Wada, I., Inoue, K., Munakata, M., and Fujita, T. (2005). Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. *J Immunol* *175*, 3150-3156.
- Loos, M., Martin, H., and Petry, F. (1989). The biosynthesis of C1q, the collagen-like and Fc-recognizing molecule of the complement system. *Behring Inst Mitt*, 32-41.
- Lu, J., Tay, P.N., Kon, O.L., and Reid, K.B. (1996). Human ficolin: cDNA cloning, demonstration of peripheral blood leucocytes as the major site of synthesis and assignment of the gene to chromosome 9. *Biochem J* *313 (Pt 2)*, 473-478.
- Lu, M., Kinchen, J.M., Rossman, K.L., Grimsley, C., deBakker, C., Brugnera, E., Tosello-Tramont, A.C., Haney, L.B., Klingele, D., Sondek, J., Hengartner, M.O., and Ravichandran, K.S. (2004). PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 756-762.
- Lu, M., Kinchen, J.M., Rossman, K.L., Grimsley, C., Hall, M., Sondek, J., Hengartner, M.O., Yajnik, V., and Ravichandran, K.S. (2005). A Steric-inhibition model for regulation of nucleotide exchange via the Dock180 family of GEFs. *Curr Biol* *15*, 371-377.
- Lucas, M., Stuart, L.M., Zhang, A., Hodivala-Dilke, K., Febbraio, M., Silverstein, R., Savill, J., and Lacy-Hulbert, A. (2006). Requirements for apoptotic cell contact in regulation of macrophage responses. *J Immunol* *177*, 4047-4054.
- Luciani, M.F., and Chimini, G. (1996). The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death. *Embo J* *15*, 226-235.

Lynch, N.J., Roscher, S., Hartung, T., Morath, S., Matsushita, M., Maennel, D.N., Kuraya, M., Fujita, T., and Schwaeble, W.J. (2004). L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of Gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement. *J Immunol* 172, 1198-1202.

M

Ma, Y.G., Cho, M.Y., Zhao, M., Park, J.W., Matsushita, M., Fujita, T., and Lee, B.L. (2004). Human mannose-binding lectin and L-ficolin function as specific pattern recognition proteins in the lectin activation pathway of complement. *J Biol Chem* 279, 25307-25312.

Makino, Y., Tsuda, M., Ichihara, S., Watanabe, T., Sakai, M., Sawa, H., Nagashima, K., Hatakeyama, S., and Tanaka, S. (2006). Elmo1 inhibits ubiquitylation of Dock180. *J Cell Sci* 119, 923-932.

Manaka, J., Kuraishi, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Higashida, H., Henson, P., and Nakanishi, Y. (2004). Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J Biol Chem* 279, 48466-48476.

Maniatis, T., Futsch, E.F., and Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning*. In: *A laboratory Manual*.

Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M., and Mizuochi, T. (1996). A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J Biol Chem* 271, 2448-2454.

Matsushita, M., and Fujita, T. (1992). Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 176, 1497-1502.

Matsushita, M., and Fujita, T. (2001). Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol Rev* 180, 78-85.

Matsushita, M., Kuraya, M., Hamasaki, N., Tsujimura, M., Shiraki, H., and Fujita, T. (2002). Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen). *J Immunol* 168, 3502-3506.

McCormack, F.X., Kuroki, Y., Stewart, J.J., Mason, R.J., and Voelker, D.R. (1994). Surfactant protein A amino acids Glu195 and Arg197 are essential for receptor binding,

phospholipid aggregation, regulation of secretion, and the facilitated uptake of phospholipid by type II cells. *J Biol Chem* *269*, 29801-29807.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* *40*, 654-674.

McGreal, E.P., Ikewaki, N., Akatsu, H., Morgan, B.P., and Gasque, P. (2002). Human C1qRp is identical with CD93 and the mNI-11 antigen but does not bind C1q. *J Immunol* *168*, 5222-5232.

Metchnikoff, E. (1905). *Immunity in the Unfeetious Diseases*. Macmillian Press: New York.

Mitchell, J.E., Cvetanovic, M., Tibrewal, N., Patel, V., Colamonici, O.R., Li, M.O., Flavell, R.A., Levine, J.S., Birge, R.B., and Ucker, D.S. (2006). The presumptive phosphatidylserine receptor is dispensable for innate anti-inflammatory recognition and clearance of apoptotic cells. *J Biol Chem* *281*, 5718-5725.

Miyaniishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., and Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* *450*, 435-439.

Moore, C.A., Parkin, C.A., Bidet, Y., and Ingham, P.W. (2007). A role for the Myoblast city homologues Dock1 and Dock5 and the adaptor proteins Crk and Crk-like in zebrafish myoblast fusion. *Development* *134*, 3145-3153.

Muller, W., Hanauske-Abel, H., and Loos, M. (1978). Biosynthesis of the first component of complement by human and guinea pig peritoneal macrophages: evidence for an independent production of the C1 subunits. *J Immunol* *121*, 1578-1584.

Muller-Eberhard, H.J., and Kunkel, H.G. (1961). Isolation of a thermolabile serum protein which precipitates gamma-globulin aggregates and participates in immune hemolysis. *Proc Soc Exp Biol Med* *106*, 291-295.

Munthe-Fog, L., Hummelshoj, T., Hansen, B.E., Koch, C., Madsen, H.O., Skjodt, K., and Garred, P. (2007). The impact of FCN2 polymorphisms and haplotypes on the Ficolin-2 serum levels. *Scand J Immunol* *65*, 383-392.

Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D.* *53*, 247-255.

N

- Nagata, K., Ohashi, K., Nakano, T., Arita, H., Zong, C., Hanafusa, H., and Mizuno, K. (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, 30022-30027.
- Nakano, T., Ishimoto, Y., Kishino, J., Umeda, M., Inoue, K., Nagata, K., Ohashi, K., Mizuno, K., and Arita, H. (1997). Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* 272, 29411-29414.
- Nakaya, M., Tanaka, M., Okabe, Y., Hanayama, R., and Nagata, S. (2006). Opposite effects of rho family GTPases on engulfment of apoptotic cells by macrophages. *J Biol Chem* 281, 8836-8842.
- Namekata, K., Enokido, Y., Iwasawa, K., and Kimura, H. (2004). MOCA induces membrane spreading by activating Rac1. *J Biol Chem* 279, 14331-14337.
- Napirei, M., Karsunky, H., Zevnik, B., Stephan, H., Mannherz, H.G., and Moroy, T. (2000). Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet* 25, 177-181.
- Navaza, J. (2001). Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta. Crystallogr. D* 57, 1367-1372.
- Navratil, J.S., Watkins, S.C., Wisnieski, J.J., and Ahearn, J.M. (2001). The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. *J Immunol* 166, 3231-3239.
- Neth, O., Jack, D.L., Dodds, A.W., Holzel, H., Klein, N.J., and Turner, M.W. (2000). Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun* 68, 688-693.
- Ng, K.K., Drickamer, K., and Weis, W.I. (1996). Structural analysis of monosaccharide recognition by rat liver mannose-binding protein. *J Biol Chem* 271, 663-674.
- Nisengard, R.J., Jablonska, S., Chorzelski, T.P., Blaszyk, M., Jarret, C., and Beutner, E.H. (1975). Diagnosis of systemic lupus erythematosus. Importance of antinuclear antibody titers and peripheral staining patterns. *Arch Dermatol* 111, 1298-1300.
- Nishihara, H. (1999). Analysis of hematopoietic cell specific protein, M-DOCK. *Hokkaido Igaku Zasshi* 74, 157-166.

O

O'Neill, L.A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2000, RE1.

Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A., and 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.

Ohashi, T., and Erickson, H.P. (1997). Two oligomeric forms of plasma ficolin have differential lectin activity. *J Biol Chem* 272, 14220-14226.

Olazabal, I.M., Caron, E., May, R.C., Schilling, K., Knecht, D.A., and Machesky, L.M. (2002). Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcγR, phagocytosis. *Curr Biol* 12, 1413-1418.

Orlando, K.A., and Pittman, R.N. (2006). Rho kinase regulates phagocytosis, surface expression of GlcNAc, and Golgi fragmentation of apoptotic PC12 cells. *Exp Cell Res* 312, 3298-3311.

P

Pagh, R., Duus, K., Laursen, I., Hansen, P.R., Mangor, J., Thielens, N., Arlaud, G.J., Kongerslev, L., Hojrup, P., and Houen, G. (2008). The chaperone and potential mannan-binding lectin (MBL) co-receptor calreticulin interacts with MBL through the binding site for MBL-associated serine proteases. *Febs J* 275, 515-526.

Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Garlatti, V., Darnault, C., Ghebrehiwet, B., Gaboriaud, C., Arlaud, G.J., and Frachet, P. (2008). C1q Binds Phosphatidylserine and Likely Acts as a Multiligand-Bridging Molecule in Apoptotic Cell Recognition. *J Immunol* 180, 2329-2338.

Paidassi, H. (2008) *Caractérisation des ligands de C1q impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques*. PhD thesis. Université Joseph Fourier.

Park, D., Tosello-Tramont, A.C., Elliott, M.R., Lu, M., Haney, L.B., Ma, Z., Klivanov, A.L., Mandell, J.W., and Ravichandran, K.S. (2007). BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* 450, 430-434.

Park, S.Y., Jung, M.Y., Kim, H.J., Lee, S.J., Kim, S.Y., Lee, B.H., Kwon, T.H., Park, R.W., and Kim, I.S. (2008). Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ* 15, 192-201.

Peerschke, E.I., and Ghebrehiwet, B. (2001). Human blood platelet gC1qR/p33. *Immunol Rev* 180, 56-64.

Pelletier, I., Hashidate, T., Urashima, T., Nishi, N., Nakamura, T., Futai, M., Arata, Y., Kasai, K., Hirashima, M., Hirabayashi, J., and Sato, S. (2003). Specific recognition of *Leishmania* major poly-beta-galactosyl epitopes by galectin-9: possible implication of galectin-9 in interaction between *L. major* and host cells. *J Biol Chem* 278, 22223-22230.

Platt, N., da Silva, R.P., and Gordon, S. (1998a). Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Biochem Soc Trans* 26, 639-644.

Platt, N., da Silva, R.P., and Gordon, S. (1998b). Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* 8, 365-372.

Polotsky, V.Y., Fischer, W., Ezekowitz, R.A., and Joiner, K.A. (1996). Interactions of human mannose-binding protein with lipoteichoic acids. *Infect Immun* 64, 380-383.

R

Raff, M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400.

Ravichandran, K.S., and Lorenz, U. (2007). Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol* 7, 964-974.

Reid, K.B., Lowe, D.M., and Porter, R.R. (1972). Isolation and characterization of C1q, a subcomponent of the first component of complement, from human and rabbit sera. *Biochem J* 130, 749-763.

Richards, A., Kavanagh, D., and Atkinson, J.P. (2007). Inherited complement regulatory protein deficiency predisposes to human disease in acute injury and chronic inflammatory states: the examples of vascular damage in atypical hemolytic uremic syndrome and debris accumulation in age-related macular degeneration. *Adv Immunol* 96, 141-177.

Robinson, D., Phillips, N.C., and Winchester, B. (1975). Affinity chromatography of human liver alpha-D-mannosidase. *FEBS Lett* 53, 110-112.

Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., Ichtchenko, K., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Deisenhofer, J. (2002). Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science* 298, 2353-2358.

Runza, V.L., Hehlgans, T., Echtenacher, B., Zahringer, U., Schwaeble, W.J., and Mannel, D.N. (2006). Localization of the mouse defense lectin ficolin B in lysosomes of activated macrophages. *J Endotoxin Res* 12, 120-126.

S

Santoro, F., Ouaiissi, M.A., Pestel, J., and Capron, A. (1980). Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system: binding of C1q to schistosomula. *J Immunol* 124, 2886-2891.

Sanui, T., Inayoshi, A., Noda, M., Iwata, E., Oike, M., Sasazuki, T., and Fukui, Y. (2003a). DOCK2 is essential for antigen-induced translocation of TCR and lipid rafts, but not PKC- θ and LFA-1, in T cells. *Immunity* 19, 119-129.

Sanui, T., Inayoshi, A., Noda, M., Iwata, E., Stein, J.V., Sasazuki, T., and Fukui, Y. (2003b). DOCK2 regulates Rac activation and cytoskeletal reorganization through interaction with ELMO1. *Blood* 102, 2948-2950.

Schafer, M.K., Schwaeble, W.J., Post, C., Salvati, P., Calabresi, M., Sim, R.B., Petry, F., Loos, M., and Weihe, E. (2000). Complement C1q is dramatically up-regulated in brain microglia in response to transient global cerebral ischemia. *J Immunol* 164, 5446-5452.

Scheinecker, C., McHugh, R., Shevach, E.M., and Germain, R.N. (2002). Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 196, 1079-1090.

Schelenz, S., Malhotra, R., Sim, R.B., Holmskov, U., and Bancroft, G.J. (1995). Binding of host collectins to the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*: human surfactant protein D acts as an agglutinin for acapsular yeast cells. *Infect Immun* 63, 3360-3366.

Schrijvers, D.M., De Meyer, G.R., Kockx, M.M., Herman, A.G., and Martinet, W. (2005). Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1256-1261.

Schrijvers, D.M., Martinet, W., De Meyer, G.R., Andries, L., Herman, A.G., and Kockx, M.M. (2004). Flow cytometric evaluation of a model for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Immunol Methods* 287, 101-108.

Scott, M.P., Zappacosta, F., Kim, E.Y., Annan, R.S., and Miller, W.T. (2002). Identification of novel SH3 domain ligands for the Src family kinase Hck. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP), WASP-interacting protein (WIP), and ELMO1. *J Biol Chem* 277, 28238-28246.

Shimazaki, A., Kawamura, Y., Kanazawa, A., Sekine, A., Saito, S., Tsunoda, T., Koya, D., Babazono, T., Tanaka, Y., Matsuda, M., Kawai, K., Iizumi, T., Imanishi, M., Shinosaki, T., Yanagimoto, T., Ikeda, M., Omachi, S., Kashiwagi, A., Kaku, K., Iwamoto, Y., Kawamori, R., Kikkawa, R., Nakajima, M., Nakamura, Y., and Maeda, S. (2005). Genetic variations in the gene encoding ELMO1 are associated with susceptibility to diabetic nephropathy. *Diabetes* 54, 1171-1178.

Sim, R.B., Kishore, U., Villiers, C.L., Marche, P.N., and Mitchell, D.A. (2007). C1q binding and complement activation by prions and amyloids. *Immunobiology* 212, 355-362.

Sim, R.B., and Tsiftoglou, S.A. (2004). Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 32, 21-27.

Spitzer, D., Mitchell, L.M., Atkinson, J.P., and Hourcade, D.E. (2007). Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol* 179, 2600-2608.

Steel, D.M., and Whitehead, A.S. (1994). The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 15, 81-88.

Steinberger, P., Szekeres, A., Wille, S., Stockl, J., Selenko, N., Prager, E., Staffler, G., Madic, O., Stockinger, H., and Knapp, W. (2002). Identification of human CD93 as the phagocytic C1q receptor (C1qRp) by expression cloning. *J Leukoc Biol* 71, 133-140.

Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A.M., Lambiris, J.D., Smith, S.J., John, S.W., and Barres, B.A. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131, 1164-1178.

Stokol, T., O'Donnell, P., Xiao, L., Knight, S., Stavakis, G., Botto, M., von Andrian, U.H., and Mayadas, T.N. (2004). C1q governs deposition of circulating immune complexes and

leukocyte Fcγ receptors mediate subsequent neutrophil recruitment. *J Exp Med* 200, 835-846.

Storrs, S.B., Kolb, W.P., Pinckard, R.N., and Olson, M.S. (1981). Characterization of the binding of purified human C1q to heart mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 256, 10924-10929.

Stuart, L.M., Takahashi, K., Shi, L., Savill, J., and Ezekowitz, R.A. (2005). Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. *J Immunol* 174, 3220-3226.

Su, H.P., Nakada-Tsukui, K., Tosello-Tramont, A.C., Li, Y., Bu, G., Henson, P.M., and Ravichandran, K.S. (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, 11772-11779.

Sugimoto, R., Yae, Y., Akaiwa, M., Kitajima, S., Shibata, Y., Sato, H., Hirata, J., Okochi, K., Izuhara, K., and Hamasaki, N. (1998). Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family. *J Biol Chem* 273, 20721-20727.

Swierzko, A.S., Florczak, K., Cedzynski, M., Szemraj, J., Wydra, D., Bak-Romaniszyn, L., Emerich, J., and Sulowska, Z. (2007). Mannan-binding lectin (MBL) in women with tumours of the reproductive system. *Cancer Immunol Immunother* 56, 959-971.

Szalai, A.J., Agrawal, A., Greenhough, T.J., and Volanakis, J.E. (1999). C-reactive protein: structural biology and host defense function. *Clin Chem Lab Med* 37, 265-270.

Szondy, Z., Sarang, Z., Molnar, P., Nemeth, T., Piacentini, M., Mastroberardino, P.G., Falasca, L., Aeschlimann, D., Kovacs, J., Kiss, I., Szegezdi, E., Lakos, G., Rajnavolgyi, E., Birckbichler, P.J., Melino, G., and Fesus, L. (2003). Transglutaminase 2^{-/-} mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7812-7817.

T

Tack, B.F., Harrison, R.A., Janatova, J., Thomas, M.L., and Prahl, J.W. (1980). Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 5764-5768.

- Tacnet-Delorme, P., Chevallier, S., and Arlaud, G.J. (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*, 6374-6381.
- Takenawa, T., and Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* *114*, 1801-1809.
- Tanio, M., Kondo, S., Sugio, S., and Kohno, T. (2007). Trivalent recognition unit of innate immunity system: crystal structure of trimeric human M-ficolin fibrinogen-like domain. *J Biol Chem* *282*, 3889-3895.
- Tas, S.W., Klickstein, L.B., Barbashov, S.F., and Nicholson-Weller, A. (1999). C1q and C4b bind simultaneously to CR1 and additively support erythrocyte adhesion. *J Immunol* *163*, 5056-5063.
- Teh, C., Le, Y., Lee, S.H., and Lu, J. (2000). M-ficolin is expressed on monocytes and is a lectin binding to N-acetyl-D-glucosamine and mediates monocyte adhesion and phagocytosis of *Escherichia coli*. *Immunology* *101*, 225-232.
- Teillet, F. (2006) *Caractérisation fonctionnelle et structurale de la protease MASP-3 associée à la MBL et aux ficolines*. PhD Thesis. Université Joseph Fourier
- Thielens, N.M., Tacnet-Delorme, P., and Arlaud, G.J. (2002). Interaction of C1q and mannan-binding lectin with viruses. *Immunobiology* *205*, 563-574.
- Thomas, A., Gasque, P., Vaudry, D., Gonzalez, B., and Fontaine, M. (2000). Expression of a complete and functional complement system by human neuronal cells in vitro. *Int Immunol* *12*, 1015-1023.
- Thompson, D., Pepys, M.B., and Wood, S.P. (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* *7*, 169-177.
- Tosello-Trampont, A.C., Kinchen, J.M., Brugnera, E., Haney, L.B., Hengartner, M.O., and Ravichandran, K.S. (2007). Identification of two signaling submodules within the CrkII/ELMO/Dock180 pathway regulating engulfment of apoptotic cells. *Cell Death Differ* *14*, 963-972.
- Tosello-Trampont, A.C., Nakada-Tsukui, K., and Ravichandran, K.S. (2003). Engulfment of apoptotic cells is negatively regulated by Rho-mediated signaling. *J Biol Chem* *278*, 49911-49919.

Trouw, L.A., Bengtsson, A.A., Gelderman, K.A., Dahlback, B., Sturfelt, G., and Blom, A.M. (2007). C4b-binding protein and factor H compensate for the loss of membrane-bound complement inhibitors to protect apoptotic cells against excessive complement attack. *J Biol Chem* 282, 28540-28548.

Tsujimura, M., Miyazaki, T., Kojima, E., Sagara, Y., Shiraki, H., Okochi, K., and Maeda, Y. (2002). Serum concentration of Hakata antigen, a member of the ficolins, is linked with inhibition of *Aerococcus viridans* growth. *Clin Chim Acta* 325, 139-146.

Turner, M.W., and Hamvas, R.M. (2000). Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet* 2, 305-322.

V

van de Wetering, J.K., van Golde, L.M., and Batenburg, J.J. (2004). Collectins: players of the innate immune system. *Eur J Biochem* 271, 1229-1249.

van Nieuwenhuijze, A.E., van Lopik, T., Smeenk, R.J., and Aarden, L.A. (2003). Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 62, 10-14.

van Vliet, S.J., Gringhuis, S.I., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2006). Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with CD45. *Nat Immunol* 7, 1200-1208.

Vander Cruyssen, B., Nuytinck, L., Boullart, L., Elewaut, D., Waegeman, W., Van Thielen, M., De Meester, E., Lebeer, K., Rossau, R., and De Keyser, F. (2007). Polymorphisms in the ficolin 1 gene (FCN1) are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 46, 1792-1795.

Vandivier, R.W., Ogden, C.A., Fadok, V.A., Hoffmann, P.R., Brown, K.K., Botto, M., Walport, M.J., Fisher, J.H., Henson, P.M., and Greene, K.E. (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.

Vaux, D.L., and Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.

Viorritto, I.C., Nikolov, N.P., and Siegel, R.M. (2007). Autoimmunity versus tolerance: can dying cells tip the balance? *Clin Immunol* 122, 125-134.

Volanakis, J.E., and Arlaud, G.J. (1998). Complement Enzymes. In: The Human Complement System in Health and Disease, eds. J.E. Volanakis and M.M. Frank, New York: Marcel Dekker Inc.

Volanakis, J.E., and Narayana, S.V. (1996). Complement factor D, a novel serine protease. *Protein Sci* 5, 553-564.

Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., and Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 350-351.

W

Walport, M.J. (2001a). Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344, 1058-1066.

Walport, M.J. (2001b). Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 344, 1140-1144.

Walport, M.J., Davies, K.A., and Botto, M. (1998). C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology* 199, 265-285.

Wang, X., Rocheleau, T.A., Fuchs, J.F., and Christensen, B.M. (2006). Beta 1, 3-glucan recognition protein from the mosquito, *Armigeres subalbatus*, is involved in the recognition of distinct types of bacteria in innate immune responses. *Cell Microbiol* 8, 1581-1590.

Wang, Y., Onishi, Y., Kakinuma, N., Roy, B.C., Aoyagi, T., and Kiyama, R. (2005). Alternative splicing of the human Kank gene produces two types of Kank protein. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 1247-1253.

Weis, W.I., Drickamer, K., and Hendrickson, W.A. (1992). Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 360, 127-134.

Weis, W.I., Kahn, R., Fourme, R., Drickamer, K., and Hendrickson, W.A. (1991). Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science* 254, 1608-1615.

Wiedmer, T., Zhou, Q., Kwoh, D.Y., and Sims, P.J. (2000). Identification of three new members of the phospholipid scramblase gene family. *Biochim Biophys Acta* 1467, 244-253.

Wlodawer, A., and Hodgson, K.O. (1975). Crystallization and Crystal Data of Monellin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 398-399.

Wragg, S., and Drickamer, K. (1999). Identification of amino acid residues that determine pH dependence of ligand binding to the asialoglycoprotein receptor during endocytosis. *J Biol Chem* 274, 35400-35406.

Wu, Y., Singh, S., Georgescu, M.M., and Birge, R.B. (2005). A role for Mer tyrosine kinase in alphavbeta5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J Cell Sci* 118, 539-553.

Wu, Y.C., and Horvitz, H.R. (1998a). *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature* 392, 501-504.

Wu, Y.C., and Horvitz, H.R. (1998b). The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell* 93, 951-960.

Wu, Y.C., Tsai, M.C., Cheng, L.C., Chou, C.J., and Weng, N.Y. (2001). *C. elegans* CED-12 acts in the conserved *crkII/DOCK180/Rac* pathway to control cell migration and cell corpse engulfment. *Dev Cell* 1, 491-502.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.

X-Y-Z

Xu, H., Wu, J., Cui, N., Abdulkadir, L., Wang, R., Mao, J., Giwa, L.R., Chanchevalap, S., and Jiang, C. (2001). Distinct histidine residues control the acid-induced activation and inhibition of the cloned K(ATP) channel. *J Biol Chem* 276, 38690-38696.

Yajnik, V., Paulding, C., Sordella, R., McClatchey, A.I., Saito, M., Wahrer, D.C., Reynolds, P., Bell, D.W., Lake, R., van den Heuvel, S., Settleman, J., and Haber, D.A. (2003). DOCK4, a GTPase activator, is disrupted during tumorigenesis. *Cell* 112, 673-684.

Yamaki, N., Negishi, M., and Katoh, H. (2007). RhoG regulates anoikis through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Exp Cell Res* 313, 2821-2832.

Yin, J., Haney, L., Walk, S., Zhou, S., Ravichandran, K.S., and Wang, W. (2004). Nuclear localization of the DOCK180/ELMO complex. *Arch Biochem Biophys* 429, 23-29.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.

Yuita, H., Tsuiji, M., Tajika, Y., Matsumoto, Y., Hirano, K., Suzuki, N., and Irimura, T. (2005). Retardation of removal of radiation-induced apoptotic cells in developing neural tubes in macrophage galactose-type C-type lectin-1-deficient mouse embryos. *Glycobiology* *15*, 1368-1375.

Zhou, Z., Caron, E., Hartwig, E., Hall, A., and Horvitz, H.R. (2001a). The *C. elegans* PH domain protein CED-12 regulates cytoskeletal reorganization via a Rho/Rac GTPase signaling pathway. *Dev Cell* *1*, 477-489.

Zhou, Z., Hartwig, E., and Horvitz, H.R. (2001b). CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* *104*, 43-56.

Zutter, M.M., and Edelson, B.T. (2007). The alpha2beta1 integrin: a novel collectin/C1q receptor. *Immunobiology* *212*, 343-353.

PUBLICATIONS

Les résultats décrits dans ce mémoire ont fait l'objet de trois publications attachées à la fin du manuscrit :

Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Garlatti, V., Darnault, C., Ghebrehiwet, B., Gaboriaud, C., Arlaud, G.J., and Frachet, P. (2008).

C1q Binds Phosphatidylserine and Likely Acts as a Multiligand-Bridging Molecule in Apoptotic Cell Recognition. *J Immunol* 180, 2329-2338.

Garlatti, V., Martin, L., Gout, E., Reiser, J.B., Fujita, T., Arlaud, G.J., Thielens, N.M., and Gaboriaud, C. (2007).

Structural basis for innate immune sensing by M-ficolin and its control by a pH-dependent conformational switch. *J Biol Chem* 282, 35814-35820.

Garlatti, V., Belloy, N., Martin, L., Lacroix, M., Matsushita, M., Endo, Y., Fujita, T., Fontecilla-Camps, J.C., Arlaud, G.J., Thielens, N.M., and Gaboriaud, C. (2007).

Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins. *Embo J* 26, 623-633.

C1q Binds Phosphatidylserine and Likely Acts as a Multiligand-Bridging Molecule in Apoptotic Cell Recognition¹

Helena Païdassi,* Pascale Tacnet-Delorme,* Virginie Garlatti,† Claudine Darnault,†
Berhane Ghebrehwet,‡ Christine Gaboriaud,† Gérard J. Arlaud,* and Philippe Frchet^{2*}

Efficient apoptotic cell clearance is critical for maintenance of tissue homeostasis, and to control the immune responses mediated by phagocytes. Little is known about the molecules that contribute “eat me” signals on the apoptotic cell surface. C1q, the recognition unit of the C1 complex of complement, also senses altered structures from self and is a major actor of immune tolerance. HeLa cells were rendered apoptotic by UV-B treatment and a variety of cellular and molecular approaches were used to investigate the nature of the target(s) recognized by C1q. Using surface plasmon resonance, C1q binding was shown to occur at early stages of apoptosis and to involve recognition of a cell membrane component. C1q binding and phosphatidylserine (PS) exposure, as measured by annexin V labeling, proceeded concomitantly, and annexin V inhibited C1q binding in a dose-dependent manner. As shown by cosedimentation, surface plasmon resonance, and x-ray crystallographic analyses, C1q recognized PS specifically and avidly ($K_D = 3.7\text{--}7 \times 10^{-8}$ M), through multiple interactions between its globular domain and the phosphoserine group of PS. Confocal microscopy revealed that the majority of the C1q molecules were distributed in membrane patches where they colocalized with PS. In summary, PS is one of the C1q ligands on apoptotic cells, and C1q-PS interaction takes place at early stages of apoptosis, in newly organized membrane patches. Given its versatile recognition properties, these data suggest that C1q has the unique ability to sense different markers which collectively would provide strong eat me signals, thereby allowing efficient apoptotic cell removal. *The Journal of Immunology*, 2008, 180: 2329–2338.

Proper recognition and clearance of apoptotic cells is critical for many biological processes including development, tissue remodeling, and maintenance of homeostasis. The rapid removal of unwanted self-cells by professional or nonprofessional phagocytes prevents the release of their intracellular contents and is essential to reduce inappropriate inflammation and avoid autoimmune disorders. Nevertheless, apoptotic cell clearance is not neutral in immunological terms. In fact, apoptotic cell recognition critically regulates immune responses, particularly when achieved by professional phagocytes such as macrophages or immature dendritic cells (DCs).³ Thus, macrophages engulfing apoptotic cells secrete anti-inflammatory cytokines (1–3) and DCs that have captured apoptotic cells induce tolerance by silencing autoreactive T cells or by inducing T cell tolerance to self-Ags (4, 5).

The uptake of apoptotic cells involves a wide variety of phagocyte receptors and soluble bridging molecules (6) which bind these cells in response to “eat me” signals. Several receptors have been proposed to mediate recognition and engulfment of apoptotic bodies, but little is known about the molecules or patterns that contribute eat me signals on the apoptotic cell surface. To date, the best characterized molecule known to allow discrimination of apoptotic cells from normal ones and promote their clearance is phosphatidylserine (PS), which becomes exposed on the surface of cells undergoing programmed cell death. A candidate phagocyte receptor for PS (PSR) identified by phage display has been proposed (7, 8), but this hypothesis is challenged by studies using PSR-deficient animals (9–11). More recent studies (12) have demonstrated that calreticulin, a well-characterized protein chaperone, acts as an eat me signal on the surface of apoptotic cells, whereas this signal is overridden on viable cells by other “don’t eat me” signals involving CD47.

The role of the bridging molecules in apoptotic cell recognition also awaits precise characterization. Among these molecules, the implication of C1q, the recognition subunit of the first complement component, is increasingly recognized. Its involvement in apoptotic cell recognition and clearance in vivo has been elegantly demonstrated by knockout experiments (13, 14), and C1q deficiency has been clearly shown to be associated with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases (15, 16). The traditional portrait of C1q as a molecule able to trigger complement activation in an Ab-dependent manner has been largely reconsidered (17) following the discovery that C1q has the ability to recognize altered structures from self such as β -amyloid fibrils (18), the pathological form of the prion protein (19, 20), and apoptotic cells (21). Other recent data reveal a specific role of C1q in the biology of DCs. Thus, immature DCs are an important C1q source, whereas maturation abrogates C1q production (22). In contrast, opsonization with C1q targets apoptotic cells to DCs (23). These

*Laboratoire d’Enzymologie Moléculaire and †Laboratoire de Cristallographie et Cristallogénèse des Protéines, Institut de Biologie Structurale, Jean-Pierre Ebel (Unité Mixte de Recherche 5075), Commissariat à l’Energie Atomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Joseph Fourier, Grenoble, France; and ‡Department of Medicine, Health Sciences Center, State University of New York, Stony Brook, NY 11794

Received for publication January 25, 2007. Accepted for publication December 11, 2007.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ The atomic coordinates presented in this article have been deposited in the Protein Data Bank with the accession codes 2jG8 and 2jG9.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Philippe Frchet, Laboratoire d’Enzymologie Moléculaire, Institut de Biologie Structurale, Jean-Pierre Ebel, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France. E-mail address: philippe.frchet@ibs.fr

³ Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; PS, phosphatidylserine; GR, globular region; PC, phosphatidylcholine; SPR, surface plasmon resonance; FSC, forward scattering; SSC, side scattering; PI, propidium iodide.

findings, together with previous observations, provide strong indication that C1q is a key player in the maintenance of immune tolerance.

C1q is a 460-kDa hexameric protein comprising six heterotrimeric collagen-like triple-helical fibers, each prolonged by a C-terminal globular region (GR) which supports most, if not all, of the C1 recognition activities (17, 24, 25). Using immunofluorescence microscopy, it was shown that the C1q GR specifically binds to the apoptotic cell surface (26). *In vivo* studies have established that apoptotic cell clearance is dependent on C1q in two ways, with or without activation of the classical complement pathway (14), but the mechanisms by which C1q recognizes "unwanted" self-cells remain elusive. The C1q-binding site(s) on the apoptotic cell membrane is (are) still poorly documented, due for a large part to the continuous modifications that take place on the surface of cells undergoing apoptosis. In a recent study (27), it was proposed that C1q senses nucleic acids rapidly exposed on the apoptotic cell surface, thereby triggering complement activation.

In view of the crucial role of C1q-mediated phagocytosis in the maintenance of immune tolerance, we undertook to identify the apoptotic cell component(s) recognized by C1q at the early stages of apoptosis, when efficient engulfment prevents release of intracellular components in the surrounding medium. This was achieved using a variety of molecular and cellular techniques. Altogether, our data demonstrate that PS, a classical marker of apoptosis, is a major ligand recognized by C1q on the apoptotic cell surface. This finding, together with the known binding versatility of C1q, sheds new light on the physiological role of C1q and provides insights into the recognition mechanism of this major actor in the clearance of unwanted self-cells and control of immune tolerance.

Materials and Methods

Proteins and lipids

C1q was purified from human serum and its GR was prepared as described previously (18, 28). Annexin V, PS, and phospho-L-serine were obtained from Sigma-Aldrich. Other phospholipids, including 06:0 PS were obtained from Avanti Polar Lipids. Purified calreticulin was provided by G. Houen (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark). Antiserum against human C1q was obtained in our laboratory (29).

Cell culture and induction of apoptosis

HeLa cells (CCL-2; American Type Culture Collection (ATCC)) were cultivated in Glutamax DMEM medium (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 10% (v/v) FCS, 2.5 U/ml penicillin, and 2.5 μ g/ml streptomycin (Invitrogen Life Technologies). Cells (3×10^6) were grown in sterile dishes overnight to 60–80% confluence and exposed to 1000 mJ/cm² UV-B irradiation at 312 nm in fresh DMEM medium. For some experiments, as indicated in the text, apoptosis was induced using 0.25 μ M staurosporine (Sigma-Aldrich). The conditions for induction of apoptosis by UV-B and staurosporine were designed to yield comparable annexin V-positive cell numbers at each time point (respectively, $25 \pm 4\%$ and $50 \pm 5\%$ at 4 and 20 h posttreatment). Both types of conditions were optimal to render HeLa cells apoptotic as determined by preliminary studies. Cells were then incubated under 5% CO₂ at 37°C for different periods.

Flow cytometry

Cells were harvested using trypsin-EDTA (Invitrogen Life Technologies) at varying times postirradiation. To analyze the whole apoptotic cell population, nonadherent cells present in the culture medium were added to harvested cells. Recognition of apoptotic cells by the C1q GR was assessed from binding of biotinylated GR. Cells (4×10^6 /ml) were suspended in PBS (pH 7.4; Invitrogen Life Technologies) containing 0.3% BSA, incubated for 1 h on ice with 25 μ g/ml GR biotinylated with the ECL protein biotinylation system (Pharmacia Biotech), washed twice, resuspended in PBS, and incubated on ice for 30 min with streptavidin-R-PE (BD Pharmingen/BD Biosciences). Cells were then washed twice, resuspended in PBS, and rapidly analyzed with a FACScan flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences). PS exposure and necrosis were as-

sessed using an apoptosis detection kit (Oncogene VWR International). Briefly, HeLa cells (10^6 cells/ml) were incubated for 15 min with 1.5 μ g/ml Annexin V^{FITC} and then analyzed immediately by flow cytometry in the presence of 0.6 μ g/ml propidium iodide (PI). PI-positive cells were regarded as necrotic permeabilized cells.

Cosedimentation analyses

Liposomes containing PS, phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine, or a 1:1 PC:PS mixture (each 100 μ g in 100 μ l of PBS (pH 7.4)) were obtained by treatment for 20 min in a bath sonicator (30). The GRs (10 μ g in 100 μ l of PBS (pH 7.4)) were incubated with each liposome for 30 min at 22°C. Samples were centrifuged at $300,000 \times g$ for 30 min at 4°C, allowing separation of the supernatant from the lipid-containing pellet. The GR contents of the supernatant and pellet fractions were determined by means of a 10% SDS-PAGE analysis followed by Coomassie blue staining.

Surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy

Analyses were conducted on a BIAcore 3000 or BIAcore X instrument.

Analyses on phospholipid-coated surfaces. To prepare phospholipid micelles, aliquots of PS, PC, and phosphatidylethanolamine dissolved in chloroform were transferred into glass tubes, and a thin phospholipid film was formed on the wall by rotating the tube while evaporating chloroform under a stream of argon. Dried lipids were suspended in PBS (pH 7.4) to give a final concentration of 300 μ g/ml and were then sonicated for 15 min just before preparation of the surface. The lipid layer on the HPA sensor chip (BIAcore) was then formed using the standard procedure recommended by BIAcore. The phospholipid-coated chips were blocked with 0.1 mg/ml BSA for 5 min. The specific binding signal shown was obtained by subtracting the background signal, obtained by injection of the protein sample over a surface saturated with BSA. C1q binding was routinely measured over 1500 resonance units of immobilized phospholipids at a flow rate of 10 μ l/min in the running buffer (PBS (pH 7.4)). Complete analyte dissociation was achieved by injection of 10 μ l of 12 mM EDTA.

Analyses on C1q- or phosphoserine-coated surfaces. The running buffer for C1q and phosphoserine immobilization was 145 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM HEPES (pH 7.4). C1q and phosphoserine were diluted to 40 μ g/ml in 10 mM sodium acetate (pH 4.0) and to 16 mg/ml in 10 mM formate (pH 3.0), respectively, and immobilized onto a CM5 sensor chip (BIAcore) using the BIAcore amine coupling kit. Binding of 06:0 PS to immobilized C1q and of C1q to immobilized phosphoserine was measured at a flow rate of 20 μ l/min in PBS 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 to a 1:1 Langmuir binding model of both the association and 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. The apparent equilibrium dissociation constants (K_D) were calculated from the ratio of the dissociation and association rate constants (k_{off}/k_{on}). Experiments performed in the presence of 1 mM CaCl₂ or 1 mM EDTA provided no evidence for a requirement of Ca²⁺ for the interactions.

Analyses using viable or apoptotic cells. HeLa cells were suspended at 2.5×10^5 cells/ml in 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 25 mM HEPES (pH 7.4), containing 0.005% surfactant P20, and passed over a C1q-coated surface at a flow rate of 10 μ l/min. The surface was regenerated by injection of 10 mM NaOH. The specific binding signal shown was obtained by subtracting the background signal obtained by injection of the cell sample over an activated-deactivated surface. For inhibition experiments, untreated control cells as well as apoptotic cells 2 h postirradiation were incubated with increasing concentrations of annexin V for 20 min at room temperature before injection over immobilized C1q.

Crystallization and data collection

C1q GR crystals suitable for diffraction were obtained as described previously (24). Briefly, the protein was concentrated in 250 mM NaCl, 2% glycerol, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), containing 100 mM nondetergent sulfo-betain 195 as a solubilizing agent. Crystals were obtained by the hanging-drop vapor-diffusion method, with the well solution containing 30–41% PEG 4000, 20 mM CaCl₂, 10 mM 2-ME, 100 mM Tris-HCl (pH 7.0 or 7.4). Microseeding was used to obtain more reproducible native crystals. Cocrystallization trials with 06:0 PS were first conducted under

vapor diffusion conditions close to those used to generate native GR crystals, using C1q GR solutions preincubated overnight with 10 or 20 mM 06:0 PS. Crystals were obtained under these conditions, but they proved to be native upon crystallographic analysis. Cocrystallization trials were also performed using commercial crystallization kits and the robot available at the European Molecular Biology Laboratory Grenoble outstation. The most successful soaking experiments were conducted using prolonged (≥ 2 days) soaking into a solution only containing 42% PEG 4000, 10 mM CaCl_2 , 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), and a phosphoserine concentration of 12.5 mM, slightly above its upper solubility limit in this type of solution. Soaking experiments were not performed using 06:0 PS because of its heavy precipitation under similar conditions.

Diffraction data were collected on the European Synchrotron Radiation Facility beam lines ID14eh2, ID23eh2, and ID29. Reflection data were processed with the XDS package (31). Crystals grew in the monoclinic P1 space group ($a = 48.09 \text{ \AA}$, $b = 48.07 \text{ \AA}$, $c = 84.7 \text{ \AA}$, $\alpha = 91.34^\circ$, $\beta = 93.34^\circ$, $\gamma = 113.68^\circ$), with two C1q GR trimers per asymmetric unit.

Structure determination and refinement

The structure was solved by automated molecular replacement using AMoRe (32) or Phaser (33) using the native C1q trimer structure as a search model. Refinement was done using Refmac5 (34) alternately with inspection of electron density maps and model correction using Coot (35). Five percent of the reflections were not included in the refinement to monitor R_{free} . The additional electron density observed in one trimer was better interpreted as two alternative conformations of the phosphoserine ligand (see Fig. 6B). The extra electron density seen in the second trimer was modeled as two alternative conformations of Arg¹¹¹, likely indicating weak binding of the ligand at this position. The final crystallographic and refinement statistics are listed in Table II.

Confocal laser scanning microscopy

HeLa cells were incubated with Annexin V-FluoProbes Alexa 488 according to the manufacturer's protocol (Interchim) to reveal PS exposure, and with 10 $\mu\text{g/ml}$ C1q in 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2.5 mM CaCl_2 , 1 mg/ml BSA, 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. C1q was detected by indirect immunofluorescence using an anti-C1q polyclonal Ab diluted 1/2000 in the HEPES buffer. Bound Abs were visualized with cyanine 3-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted 1/1000 in the HEPES buffer. DNA was then stained with 1 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst dye (Sigma-Aldrich) and cells were mounted on glass slides with 25 mg/ml DABCO (Sigma-Aldrich) in a PBS:glycerol 1:9 (v/v) solution. Cells were photographed using 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- μm intervals throughout the thickness of all cells examined. The proportion of labeled cells was estimated by counting an average of 150 cells on several observation fields at a 400-fold magnification.

Results

C1q recognizes HeLa cells at early stages of apoptosis

Previous studies based on indirect immunofluorescence experiments have shown that C1q binds to apoptotic cells through its GRs 4–6 h after apoptosis (26). To investigate in more detail the ability of C1q to recognize cells at the early stages of apoptosis, HeLa cells were rendered apoptotic by UV-B irradiation and C1q binding was analyzed by real-time SPR spectroscopy, using immobilized C1q and cells as fluid-phase ligands. A control experiment was performed initially using viable cells, revealing a significant increase in the binding signal (Fig. 1). This indicated that cells were captured to some extent by immobilized C1q, in agreement with previous studies reporting C1q-mediated adhesion of endothelial cells (36). A 2.5-fold increase in the binding was observed when cells were treated with UV-B and then passed over the sensor chip 2 h after irradiation, indicating that apoptosis induced a marked increase in C1q recognition. Increasing the postirradiation period to 4 and 6 h progressively reduced the binding signal to values that nevertheless remained higher than those observed for intact cells. As the SPR signal reflects mass variations at the surface of the sensor chip, a plausible hypothesis is that this decrease was an indirect consequence of a loss of mass occurring

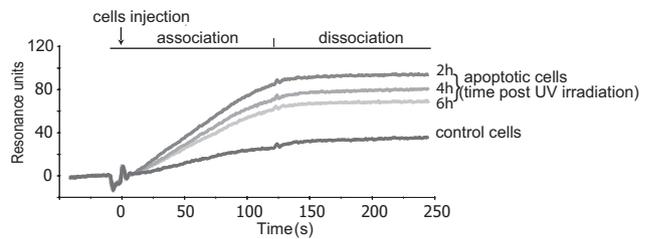


FIGURE 1. SPR analysis of apoptotic cell capture on a C1q-coated surface. Viable or UV-B-irradiated HeLa cells were harvested using trypsin-EDTA, suspended at 2.5×10^5 cells/ml in 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2.5 mM CaCl_2 , and 25 mM HEPES (pH 7.4) containing 0.005% surfactant P20, and then passed over a C1q-coated sensor chip at a flow rate of 10 $\mu\text{l/min}$. Analyses were performed on viable control cells, and on cells harvested 2, 4, and 6 h after UV-B irradiation, as indicated. Association and dissociation were monitored for 120 s, as indicated.

during progression of apoptosis. The binding signal remained remarkably stable during the dissociation phase, indicative of a high-affinity interaction between C1q and apoptotic cells.

Similar experiments were next performed to test capture of apoptotic cells on a C1q GR-coated surface. This provided evidence for interaction (data not shown), but the binding signal was too weak to allow further analysis, likely reflecting the fact that, due to its monomeric character, the isolated GR was less efficient in mediating cell recognition than the whole hexameric C1q protein. Consequently, the ability of the GR to recognize apoptotic cells was investigated by flow cytometry using biotinylated GR and streptavidin-R-PE labeling (Fig. 2). Again, a significant binding to untreated HeLa cells was detected (Fig. 2A), in keeping with our preceding observations with intact C1q (Fig. 1). Nevertheless, compared with untreated cells, UV-B treated cells exhibited more pronounced GR binding as reflected by the increased fluorescence values of the main cell population at 4 h postirradiation (Fig. 2B). In addition, the apoptosis process generated cells with higher fluorescence values, and this population increased progressively up to 20 h. Analysis of forward (FSC) and side scattering (SSC) properties of the cells at 4 h postirradiation showed more spread FSC and SSC values with a low proportion of cells of small size (corresponding to the lower left part of the gated population). At 20 h, the proportion of these cells increased, consistent with the morphological changes known to occur during apoptosis (37).

For comparative purposes, the latter experiment was performed in parallel with cells treated with the widely used apoptosis-inducing agent staurosporine (38). Again, the early apoptotic cell population exhibited a more marked GR binding and this increased when increasing the cell culture period (Fig. 2C). The cell populations, analyzed on FSC and SSC dot plots, were similar to those observed after UV-B treatment.

The apoptotic state of the UV-B-treated cells was also assessed by double Annexin V^{FITC} and PI labeling. As illustrated in Fig. 3, the number of annexin V-reactive cells (i.e., of cells exposing PS) started increasing at 2 h, when cell membranes had not yet undergone permeabilization as indicated by the absence of PI labeling. Permeabilization did not increase significantly before 6 h, indicating that at this time cells had not undergone significant necrosis. Similar results were obtained after treatment with staurosporine (data not shown). At 20 h postinduction, $\sim 50\%$ of the cells were PI positive. Incidentally, this indicated that the higher GR binding observed 20 h after cells treatment was likely due in part to cell permeabilization.

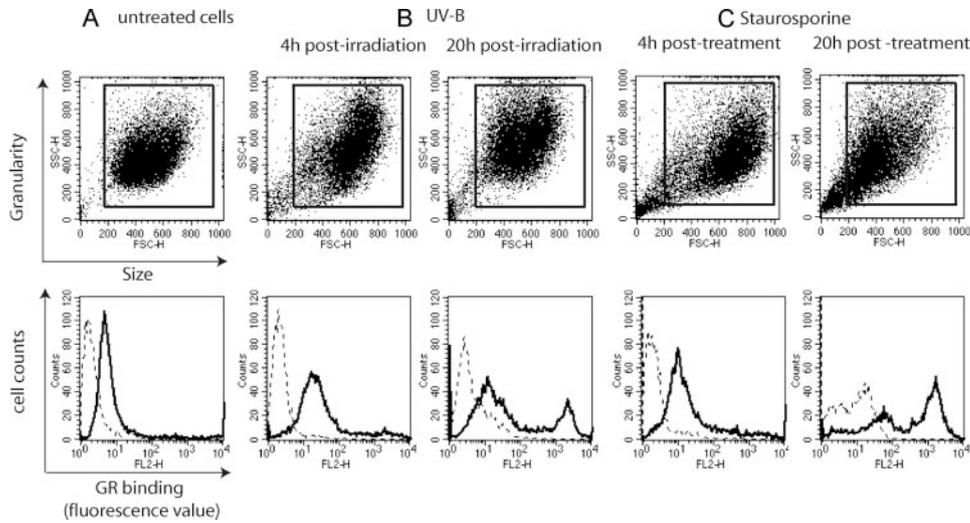


FIGURE 2. Flow cytometry analysis of the interaction between the C1q GR and apoptotic HeLa cells at various periods after UV-B irradiation or treatment with staurosporine. Cells were incubated with biotinylated GR molecules and binding was monitored by flow cytometry after addition of streptavidin-PE. Untreated cells (A), and apoptotic cells 4 and 20 h after treatment with UV-B (B) or staurosporine (C), were analyzed. The *upper five panels* show dot plots of FSC and SSC of the cell populations. The boxes define the population analyzed for GR binding (bold lines) on the *lower five panels*. In these panels, dotted lines represent the fluorescence background determined using streptavidin-PE alone. UV-B and staurosporine induction of apoptosis was designed to yield similar annexin V-positive cell numbers at each time point (see *Materials and Methods*).

To assess the specificity of GR binding to apoptotic cells, untreated and UV-B irradiated cells were double-labeled with biotinylated GR and a fluorescent cell-permeable inhibitor of activated caspases (Poly Caspases Detection kit; Immunochemistry Technologies). Control cells were negative for caspase activation and displayed low GR binding, in keeping with the data shown in Fig. 2. In contrast, at 4 h postirradiation, 88.5% of UV-B irradiated cells bound GR, and ~20% were positive for both caspase activation and GR binding. Relative to untreated cells, caspase-positive cells exhibited a higher increase in the mean fluorescence value compared with the caspase-negative population (data not shown). These observations provided support to the specificity of GR binding to apoptotic cells.

Taken together, these experiments indicated that: 1) C1q was able to recognize apoptotic cells at a very early stage; 2) C1q likely recognized (a) cell membrane component(s), as interaction could be monitored by SPR in a configuration where C1q was immobilized and hence not expected to have access to inner cell components; 3) on the average cell population, as judged from GR binding and annexin V labeling, the increase in C1q binding was concomitant with PS exposure on the cell surface.

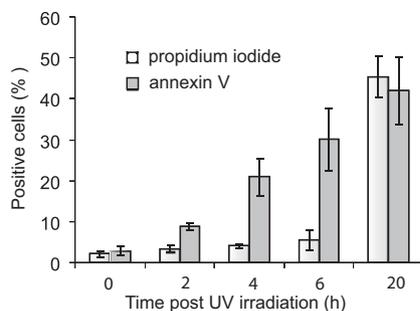


FIGURE 3. C1q GR binding to apoptotic cells is concomitant with PS exposure. Time course analysis of PS exposure and cell permeabilization during apoptosis. PS exposure and cell permeabilization were analyzed by double annexin V/PI labeling as described in *Materials and Methods*. The data shown represent the mean value \pm SD of three independent experiments.

The C1q globular region associates with PS-containing liposomes

The above observations prompted us to investigate the ability of C1q to bind to PS and other membrane phospholipids. For this purpose, the C1q GRs were initially incubated with lipid vesicles composed of PS, phosphatidylethanolamine, or PC, and interaction was assessed by a cosedimentation assay, from the relative amount of GRs associated with the vesicles in the pellet after ultracentrifugation. As shown in Fig. 4, a significant proportion of the GRs was detected in the pellet fraction when incubated with vesicles containing PS alone or a PS/PC mixture. In contrast, no significant binding to PC- or phosphatidylethanolamine-containing vesicles was observed, because in both cases the whole GR population was found in the supernatants. This provided strong evidence for the ability of the C1q GRs to bind specifically to PS.

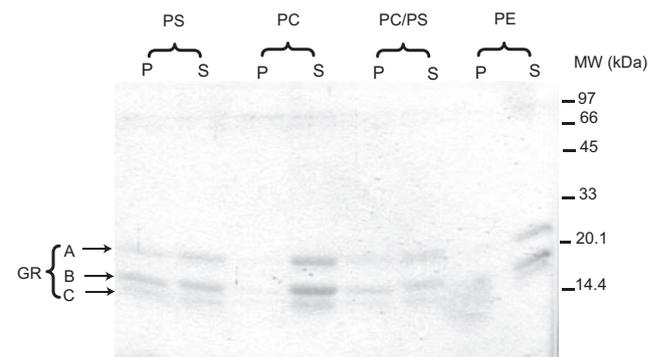


FIGURE 4. Analysis by cosedimentation of the interaction between the C1q GR and PS-containing liposomes. The C1q GR was allowed to interact with liposomes containing PS, PC, phosphatidylethanolamine, or a 1:1 PC:PS mixture. After ultracentrifugation, the pellet and supernatant fractions were separated and their relative GR content was assessed by SDS-PAGE analysis as described in *Materials and Methods*. Molecular mass markers are indicated on the right. P, Pellet; S, supernatant. The data shown are representative of three independent experiments.

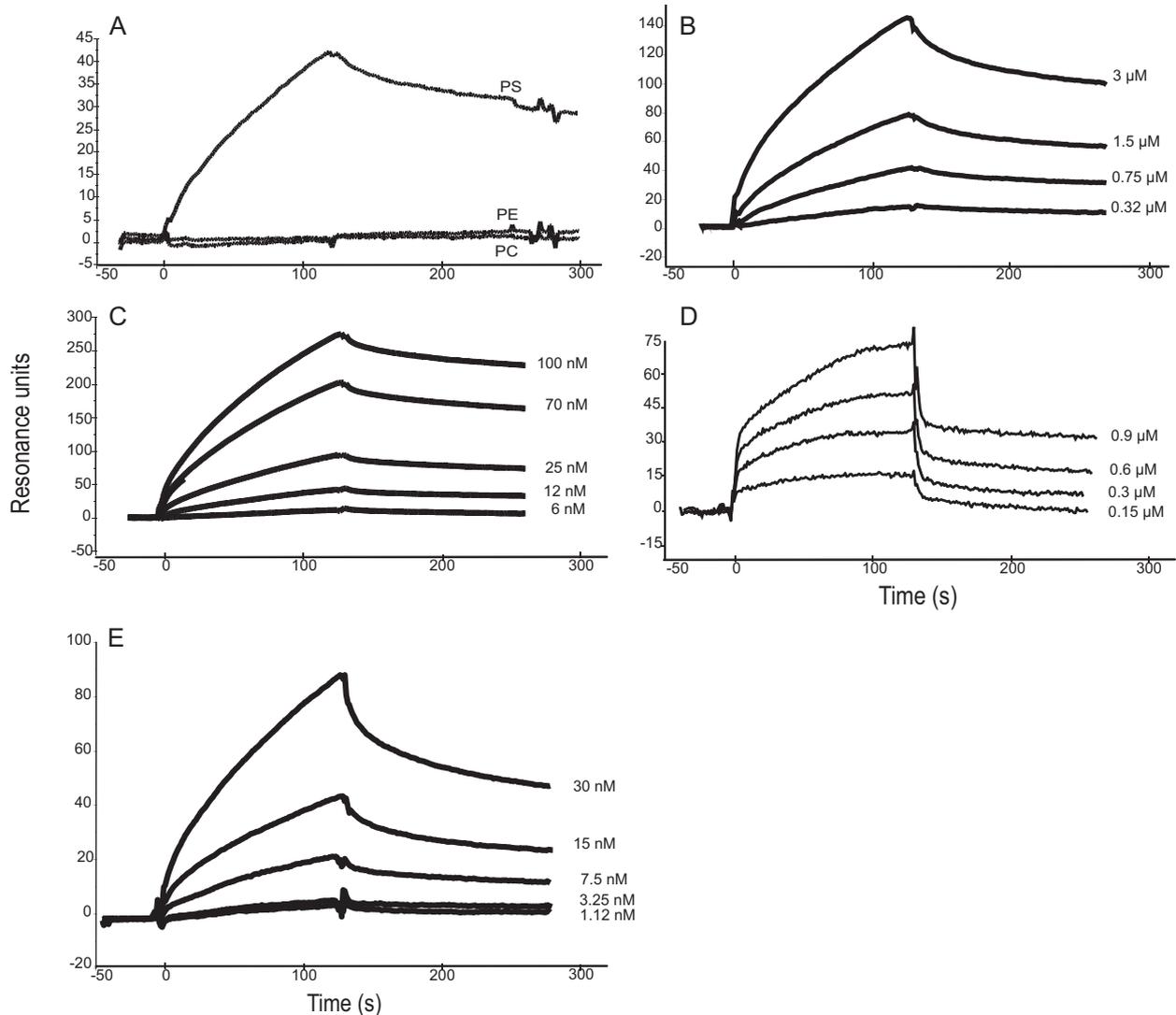


FIGURE 5. SPR analysis of the interaction between C1q or its GR and PS or PS derivatives. *A* and *B*, Binding of the C1q GR to immobilized PS. *C*, Binding of intact C1q to immobilized PS. *D*, Binding of 06:0 PS to immobilized C1q. *E*, Binding of C1q to immobilized phosphoserine. All interactions were measured in the running buffer at a flow rate of 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Association and dissociation curves were each recorded for 120 s. The concentrations of soluble ligands were as follows: GR: 0.75 μM (*A*) and 0.32, 0.75, 1.5, and 3 μM (*B*); C1q: 6, 12, 25, 70, and 100 nM (*C*) and 1.12, 3.25, 7.5, 15, and 30 nM (*E*); 06:0 PS: 0.15, 0.3, 0.6, and 0.9 μM (*D*). All other conditions are described in *Materials and Methods*.

SPR analysis of C1q/PS interaction demonstrates high affinity

Further characterization of the C1q/PS interaction was achieved by SPR, using initially phospholipid surfaces assembled on HPA sensor chips and the intact C1q molecule or its GR as soluble analytes. The use of HPA hydrophobic surfaces allows formation of a flat rigid phospholipid monolayer with the polar groups oriented toward the fluid phase (39, 40). Preliminary control experiments showed that neither C1q nor its GR bound to a significant extent to an unmodified HPA surface saturated with BSA. We next tested the ability of the GRs to interact with phospholipid surfaces containing either PS, PC, or phosphatidylethanolamine. As demonstrated in Fig. 5*A*, the GRs readily bound to PS-containing monolayers, but no significant binding to PC- or phosphatidylethanolamine-coated surfaces was detected, providing further evidence of the C1q-binding specificity for PS. The kinetic parameters of PS recognition were determined by recording sensorgrams at varying GR (Fig. 5*B*) and C1q (Fig. 5*C*) concentrations. The association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) rate constants, and the resulting K_D were determined in both instances (Table I). Whereas k_{off} values were similar in both cases, C1q exhibited a significantly

higher k_{on} value than its GR. As a result, the K_D value of the interaction was ~ 7 -fold higher for the GR compared with intact C1q, again accounting for a decreased binding avidity due to the monomeric structure of the GR.

Further investigations of the C1q-PS interaction were conducted using a commercial water-soluble derivative (06:0 PS) comprising

Table I. Kinetic and dissociation constants for the interaction of C1q or its GR and PS and its derivatives^a

Soluble Analyte/Immobilized Ligand	k_{on} ($\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
C1q/PS ^b	2.9×10^4	2.1×10^{-3}	7×10^{-8}
C1q GR/PS ^b	3.5×10^3	1.8×10^{-3}	5×10^{-7}
06:0 PS/C1q ^c	13.6	2.4×10^{-3}	1.7×10^{-4}
C1q/phosphoserine ^c	8.4×10^4	3.1×10^{-3}	3.7×10^{-8}

^a Interactions were measured on either HPA^b or CMS^c sensorchips, as described in *Materials and Methods*. The data shown correspond to a representative series of binding studies performed on the same sensor chip. In each case, similar results were reproduced from at least three independent experiments, using different phospholipid and protein preparations, and different sensor chips.

Table II. Crystallographic and refinement statistics

	C1q GR ⁻ Phosphoserine Complex				Native C1q GR	
Unit cell (Å)	48.09	48.07	84.70	48.15	48.24	87.79
(°)	91.338	93.340	113.678	92.454	92.646	113.532
European Synchrotron Radiation Facility beamline	ID14-eh2				ID29	
Measured reflections	75,256				107,754	
Unique reflections	38,993				50,005	
Resolution (Å) ^a	2.05 (-2.1)				1.95 (-2.0)	
Completeness (%) ^a	89.7 (77.2)				95 (84.3)	
R _{sym} ^{a,b}	4.2 (9)				4.2 (8.4)	
⟨I⟩/⟨σ(I)⟩ ^a	13.5 (7.9)				16 (9.2)	
Refinement						
Resolution range (Å)	20–2.05				15–1.95	
Reflections	37,012				44,958	
R _{work}	17.7				21.2	
R _{free}	23.8				25.4	
Protein atoms	6,412				6231	
Calcium atoms	2				2	
Solvent atoms	364				193	
Ligand atoms	20				0	
Rmsd bonds (Å)	0.007				0.008	
Rmsd angles (°)	1.02				1.46	

^a Values for the outermost resolution shell are in parentheses.

^b R_{sym} = $\{\sum hkI/\sum iI(i(hkl)) - \langle I(hkl) \rangle / \sum hkI/\sum iI(i(hkl))\} \times 100$, where iI is the i -th measurement of reflection $I(hkl)$.

the polar moiety of PS connected to two six-carbon saturated hydrocarbon chains. In this case, C1q was coated on a CM5 sensor chip and 06:0 PS was used as a soluble ligand. As illustrated in Fig. 5D, SPR analysis at varying 06:0 PS concentrations demonstrated a dose-dependent interaction with immobilized C1q. Interestingly, the K_D of the interaction was ~2400-fold higher than that determined for the interaction between immobilized PS and soluble C1q, due essentially to a dramatic decrease in the k_{on} value (Table I). A plausible explanation for this decrease lies in the fact that C1q was immobilized in the latter case, and hence lost its binding avidity. In addition, it appears likely that C1q was chemically immobilized to the surface in a variety of configurations, not all optimal for ligand binding, further contributing to the marked decrease in k_{on} .

To gain insights into the determinant(s) of the PS molecule involved in C1q recognition, its phosphoserine moiety was immobilized covalently on a CM5 sensor chip, and allowed to bind soluble C1q. As illustrated in Fig. 5E, C1q bound efficiently to phosphoserine, with a K_D of $\sim 3.7 \times 10^{-8}$ M, comparable to the value determined for the interaction with immobilized PS (Table I). It became clear, therefore, that most, if not all, of the C1q/PS interaction occurred through the phosphoserine group.

X-ray structure of a phosphoserine-C1q GR complex

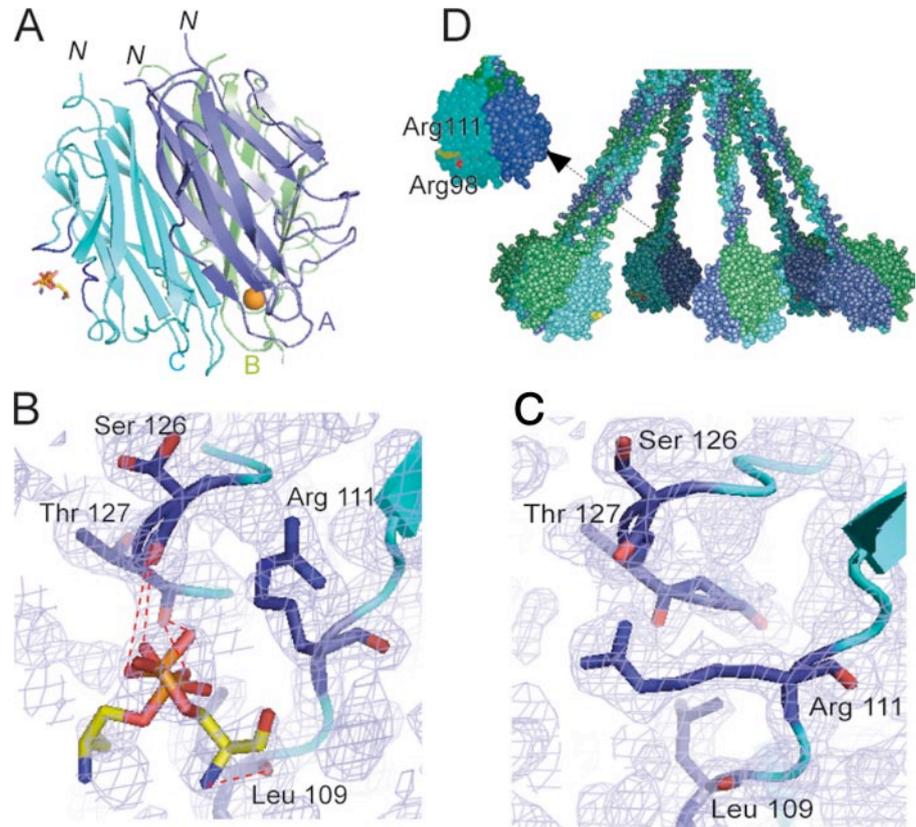
X-ray crystallography analyses were conducted with the aim to observe interaction between the C1q GR and PS-derived ligands at the atomic level. Two main strategies were used for this purpose: cocrystallization of the C1q GR with the ligand and soaking of native C1q GR crystals into ligand-containing solutions. In each case, x-ray diffraction data were collected, and structures were solved and refined to 2-Å resolution (see *Materials and Methods*). The crystallographic statistics are provided in Table II.

Compared with the native GR structure, no additional electron density was observed when the protein was crystallized in the presence of 06:0 PS (Fig. 6C), or after soaking crystals in the presence of phosphoserine for 2 h. In contrast, an extra density corresponding to the ligand was clearly seen after prolonged soaking in a phosphoserine solution (Fig. 6B). Crystals could only be obtained under conditions close to those used initially to crystallize the na-

tive C1q GR (24), and all other attempts using commercial screening kits proved unsuccessful. As depicted in Fig. 6A, phosphoserine is stabilized mainly by residues from two surface loops (108–111 and 126–129) of subunit C of the C1q GR. The ligand is observed in two alternative conformations (Fig. 6B), and in both cases the phosphoester group is stabilized by hydrogen bonds with the main chain carbonyls of Ser¹²⁶ and Thr¹²⁷ and by electrostatic interaction with Arg¹¹¹. In one conformation, the serine nitrogen atom is H-bonded to the carbonyl group of Leu¹⁰⁹. According to our current model of the C1q molecule (17), this site is located at the inner face of the C1q cone and oriented toward the target surface (Fig. 6, A and D). Interestingly, the side chain of Arg¹¹¹, which is involved in crystal contacts in the native structure, is markedly displaced toward the inside of the protein in the phosphoserine-GR complex (Fig. 6, B and C). Thus, phosphoserine is also partly stabilized by interactions with a surface loop (158–162) of subunit A from a neighboring molecule. Although the phosphoserine molecule is clearly attracted toward the observed position in the crystal, its orientation is strongly constrained by the crystal packing and might therefore be slightly different from the one achieved under physiological conditions. This hypothesis is consistent with the observation that, at variance with our SPR-binding experiments, the observed C1q GR-phosphoserine complex involves minimal interaction with the serine moiety of phosphoserine. In this respect, the neighboring area located between Arg¹¹¹ and Arg⁹⁸, which is not accessible in the crystal lattice, appears as a plausible alternative binding site. Accommodation of the phosphoserine group at this position would bring it slightly closer to the underlying target surface (Fig. 6D).

The observed structure clearly excludes a binding of phosphoserine through the Ca²⁺-binding site located at the top of the C1q GR, as the latter is fully accessible in the crystal lattice and shows no extra electron density. Consistent with this finding, similar binding curves were obtained by SPR in the presence of either Ca²⁺ ions or EDTA (data not shown). The binding site determined here is therefore clearly different from other known PS-binding structures such as annexin V (41) and protein kinase C (42), which both involve Ca²⁺-bridging mechanisms.

FIGURE 6. X-ray structure of a phosphoserine-C1q GR complex. *A*, Overall view of the interaction. Subunits A–C are colored blue, green, and cyan, respectively, and are shown in ribbon representation. The ligand is shown in stick representation. The Ca^{2+} ion bound to the GR is represented as a golden sphere. In subunit C, the two surface loops involved in ligand stabilization are colored dark blue. *N* indicates the N-terminal end of the subunits, connecting the GR to the preceding collagen-like triple helix. According to the current C1q model (17), the B subunit marks the external face of each GR in the whole C1q molecule and the target surface is expected to lie roughly at the bottom of the GR structure. *B*, Detailed view of the interactions between subunit C and phosphoserine. The two alternative conformations of phosphoserine are shown. Electron densities ($2mF_o - F_c$) are contoured at the 1σ level. *C*, Comparative detailed view of the phosphoserine-binding region in the native GR structure, illustrating the extended conformation of the side chain of Arg¹¹¹. *D*, Overall model of the C1q molecule (17) illustrating the positioning of the phosphoserine-binding site. Arg¹¹¹ and Arg⁹⁸ are colored yellow and red, respectively. This figure was designed using Pymol and Grasp (62).



Annexin V inhibits apoptotic cell recognition by C1q

Taken together, our previous observations provided strong support for an implication of PS in the recognition of apoptotic cells by C1q. To test the relevance of this hypothesis at the cellular level, we investigated whether annexin V, an established ligand of the PS polar head group (41, 43), had the ability to compete for apoptotic cell recognition by C1q. Due to technical constraints, linked in particular to the fact that annexin V binds reversibly to PS, this could not be monitored using flow cytometry. In contrast, SPR appeared as a method of choice for this purpose, because it allowed us to monitor C1q binding in real time, immediately after incubation of the cells in the presence of annexin V. As illustrated in Fig. 7, both untreated and early apoptotic HeLa cells were allowed in parallel to bind immobilized C1q in the presence of increasing concentrations of soluble annexin V. Whereas annexin V had no significant effect on the capture of viable cells by C1q, it inhibited recognition of apoptotic cells in a dose-dependent manner, with nearly 50% inhibition at a concentration of 1.5 μM . This result provided direct evidence of the implication of PS as a major target for C1q on the apoptotic cell surface.

C1q mostly clusters in patches containing PS on the apoptotic cell surface

Confocal laser microscopy was next used to investigate the distribution of C1q and PS on apoptotic HeLa cells. Double immunofluorescence labeling of normal, early apoptotic (2 h postirradiation), and late apoptotic (20 h postirradiation) unfixed cells was performed using annexin V and a polyclonal anti-C1q antiserum (Fig. 8). Nuclei were visualized by Hoechst labeling. The proportion of cells stained by annexin V and/or by C1q was evaluated by counting an average of 150 cells. Fluorescence images confirmed that $85 \pm 5\%$ of untreated cells displayed a low-level C1q labeling (Fig. 8, *A*, *C*, and *D*). In contrast, as expected, no significant PS

exposure was detected on these cells (Fig. 8*B*). In contrast, within the early apoptotic cell population, $16 \pm 3\%$ displayed a strong PS exposure (Fig. 8, *E* and *F*) and $81 \pm 3\%$ were C1q positive, with a significantly higher average fluorescence intensity compared with control cells (Fig. 8, *E* and *G*). Superimposition of C1q and annexin V labeling (Fig. 8*H*) reveals that the C1q molecules were generally clustered in membrane patches where they colocalized with PS. This was true for all annexin V-positive cells, but reflected somewhat different individual situations, as illustrated in the representative cell samples shown in Fig. 8*M*. On cell 1, PS is

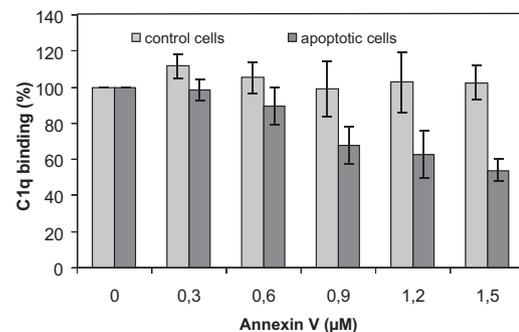


FIGURE 7. Annexin V inhibits apoptotic cell recognition by C1q. Apoptotic HeLa cells were harvested 2 h after UV-B irradiation and incubated at 2.5×10^5 cells/ml in the presence of increasing concentrations of annexin V for 20 min at room temperature in 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2.5 mM CaCl_2 , and 25 mM HEPES (pH 7.4) containing 0.005% surfactant P20. Apoptotic and control cell samples were then passed over a C1q-coated sensor chip as described in *Materials and Methods* and cell capture was measured after association for 2 min as described in the legend to Fig. 1. Results are expressed relative to the capture of either viable cells or apoptotic cells by C1q in the absence of annexin V. The data shown represent the mean value \pm SD of three independent experiments.

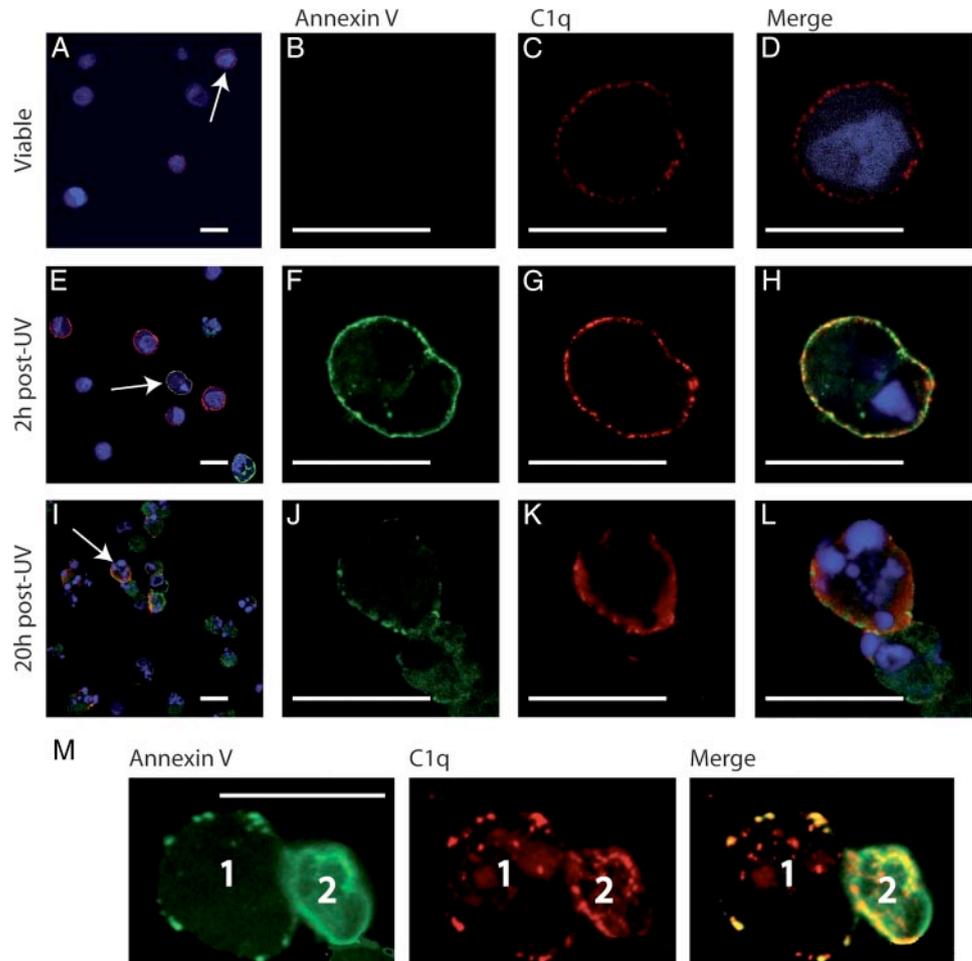


FIGURE 8. PS and C1q colocalize within membrane patches on apoptotic cells. Cells were submitted to a double immunofluorescent labeling for PS (green) and C1q (red) as described in *Materials and Methods*. Nuclei were labeled with Hoechst (blue). In overall views (A, E, and I), white arrows indicate selected cells shown in focused views. A–D, Untreated control HeLa cells. E–H, Early apoptotic cells (2 h post-UV-irradiation). I–L, Late apoptotic cells (20 h post-UV irradiation). M, A group of two cells (1, 2) representative of the whole apoptotic cell population 4 h postirradiation, is shown. Scale bars represent 20 μm . In control experiments, no labeling was detected when cells were stained with primary and secondary Ab without preincubation with C1q.

clustered in discrete patches where C1q colocalizes. Cell 2, likely corresponding to a more advanced apoptosis stage, shows a homogeneous annexin V labeling covering most of the plasma membrane and again most, if not all of the C1q molecules are clustered in patches also containing PS.

The late apoptotic cell population was quite heterogeneous (Fig. 8I), all cells being labeled by C1q and annexin V, but to varying extents (Fig. 8, I–L). As a result of membrane permeabilization, annexin V staining diffused inside the cell. Again, the majority of the C1q molecules colocalized in membrane patches with PS (Fig. 8L). Interestingly, despite membrane permeabilization, very few C1q molecules were detected inside the cells.

These data, together with our previous observation that annexin V inhibits apoptotic cell recognition by C1q, provided clear evidence of a direct C1q-PS interaction occurring in membrane areas likely corresponding to newly organized patches.

Discussion

This study provides the first experimental evidence that C1q, an established recognition protein of the innate immune system, recognizes PS exposed at the surface of apoptotic cells. This conclusion is based on the following concordant observations: 1) C1q binds to apoptotic cells at early stages of apoptosis, well before cell permeabilization, a property that is crucial in terms of maintenance of immune tolerance. 2) C1q binding and PS exposure proceed concomitantly, and annexin V inhibits C1q binding in a dose-dependent manner. 3) As shown by cosedimentation and SPR analyses, C1q recognizes PS specifically and avidly ($K_D = 3.7\text{--}7 \times 10^{-8}$ M), through multiple interactions between its GRs and the

phosphoserine head of PS. 4) The majority of the C1q molecules are remarkably distributed in membrane patches where they colocalize with PS. This latter observation validates the observed C1q/PS interaction at the cellular level.

The ability of C1q to recognize PS is further substantiated at the atomic level by the x-ray crystallographic analysis of a phosphoserine-C1q GR complex, revealing that phosphoserine is bound to subunit C of the C1q GR, through a site located inside the C1q cone and oriented toward the target surface (Fig. 6, A and D). C1q is known for its ability to sense an amazing variety of immune and nonimmune targets (25). Based on the C1q GR structure (24) and on site-directed mutagenesis studies (44), two major recognition sites have been identified, at the apex of the C1q head (C-reactive protein, IgM) and in the equatorial region of subunit B (IgG). The present study indicates that PS binding occurs at a distinct site, and hence has possibly little interference on binding to the above ligands. These findings fully support the current concept that the C1q recognition versatility arises from the existence of multiple binding sites on its heterotrimeric globular domain (24, 44).

A number of studies have now clearly established that PS exposure at the outer leaflet of the cell membrane is a general feature of apoptotic cells that allows their elimination and elicits suppressive pathways that inhibit the inflammatory response induced by phagocytes. PS is critical for the uptake process and is required for phagocyte engulfment (45–48). The view that PS serves as an eat me signal has gained more support following observations that PS-containing vesicles and phospho-L-serine partially block phagocytosis (49) and that annexin V impairs uptake of apoptotic cells by macrophages (50). In addition, engulfment of apoptotic

cells involves the redistribution of membrane PS on both the phagocyte and the target cell (51). A presumptive PSR at the phagocyte surface has been identified by phage display screening (7), but its role has been challenged recently by two independent studies based on PSR gene knockout experiments (9, 11) and by the observation that PSR is a nuclear protein (10, 52). Although disruption of the PSR gene in mice was shown to have different indirect effects on apoptotic cell phagocytosis, it was also demonstrated that this molecule is not generally involved in the specific innate recognition or uptake of apoptotic cells (53). These recent data leave open the question of the recognition mechanism(s) of PS by phagocytes, and particularly of the identity of the bridging molecule(s) and receptor(s) involved in this process.

Although C1q is traditionally viewed as a molecule able to trigger activation of the classical complement pathway in response to direct or indirect pathogen recognition, there is increasing evidence that this multipotent molecule plays a crucial role in the detection of altered self structures, as demonstrated in the case of amyloid fibrils, the pathologic form of the prion protein, and apoptotic cells (18, 19, 21). Unequivocally, C1q deficiency induces major defaults in apoptotic cell uptake and consequently in the control of the inflammatory process (13, 15, 54). The recognized role of C1q in the maintenance of immune tolerance has been recently reinforced by the discovery that it is involved in the biology of dendritic cells (22). These considerations, together with our own finding that C1q binds with high avidity to PS exposed at the surface of early apoptotic cells, strongly support the proposal that C1q may represent a major PS recognition molecule involved in the engulfment of apoptotic cells. C1q possesses a receptor (calreticulin) at the surface of most mammalian cells (55, 56) and may therefore obviously serve as a bridging molecule between PS exposed at the apoptotic cell surface and the phagocyte. The fact that macrophages and dendritic cells synthesize and secrete C1q (57–59) strengthens this hypothesis.

New insights into the nature of the eat me signals exposed at the surface of apoptotic cells arise from the recent finding that, in addition to PS, calreticulin acts as a second general recognition ligand and triggers phagocytosis through binding and activation of LDL-receptor-related protein (or CD91) on the engulfing cell (12). This process involves changes on the apoptotic cell surface that create an environment where don't eat me signals are inactivated, whereas eat me signals, including calreticulin and phosphatidylserine but most probably also other as yet unidentified molecules, congregate together and signal for removal. Calreticulin is a chaperone that is classically known for its ability to act as a receptor for the collagenous tail of C1q (56). It has been shown that ingestion of apoptotic cells via a C1q-dependent mechanism involves stimulation of calreticulin/CD91 (60), and it was proposed that C1q recognizes apoptotic cells via its GRs and is in turn recruited by the phagocyte through interaction between its collagen-like tail and calreticulin. The finding that calreticulin provides a second eat me signal on the apoptotic cell surface (12) leads us to hypothesize that this protein may in fact play a dual role, not only as a receptor for the C1q collagenous tail on the phagocyte, but also as an additional eat me ligand of the C1q GR on the apoptotic cell. The latter proposal appears consistent, because both calreticulin and C1q colocalize with PS on the apoptotic cell surface (12; this study). To test this hypothesis, we have conducted preliminary analyses by SPR, and indeed these indicate that both the GR and the collagenous tail of C1q bind calreticulin immobilized on a sensor chip with high affinity (P. Tacnet-Delorme, G. Houen, H. Païdassi, G. J. Arlaud, and P. Frachet, unpublished data).

Previous studies by Navratil et al. (26) have provided strong evidence that the C1q collagenous tail is not involved in the in-

teraction with apoptotic blebs. In the same way, our own studies demonstrate that the C1q GR alone is able to sense apoptotic cells. It appears unlikely, therefore, that the interaction between C1q and early apoptotic cells investigated in the present study involves a binding of the collagen moiety of C1q to calreticulin, at least to a significant extent. Whether calreticulin, in addition to PS, is indeed a ligand of the C1q GR on the apoptotic cell surface remains to be demonstrated at the cellular level. Nevertheless, there is increasing evidence that identification of apoptotic cells involves sensing of multiple eat me signals, possibly congregated within the same membrane patches. If this hypothesis is correct, then C1q may be expected to play a central role in apoptotic cell recognition, owing to its multimeric structure, and the multipotent character of its recognition properties, which arise for a large part from the heterotrimeric structure of its recognition domain (17, 25). Indeed, to our knowledge, this latter feature is uncommon among innate immunity recognition proteins which, with a few exceptions such as lung surfactant proteins (61), are highly specific molecules recognizing a single type of ligand. Thus, C1q combines particular structural and functional features that make it an ideal candidate to sense and collect different molecular motifs, including PS, on the apoptotic cell surface. Taken individually, these motifs would possibly not be sufficient to trigger efficient recognition and removal, but together would constitute a strong eat me signal. This particular ability of C1q to sense multiple signals, together with the fact that it recognizes apoptotic cells at early stages, provides a basis for its established implication as a major actor of immune tolerance.

Acknowledgments

We are grateful to Françoise Lacroix and Didier Grunwald for their help with confocal microscopy.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Voll, R. E., M. Herrmann, E. A. Roth, C. Stach, J. R. Kalden, and I. Girkontaite. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390: 350–351.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott, and P. M. Henson. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *J. Clin. Invest.* 101: 890–898.
- Savill, J., and V. Fadok. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784–788.
- Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman, and K. Inaba. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 191: 411–416.
- Lutz, M. B., and G. Schuler. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23: 445–449.
- Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory, and C. Haslett. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 965–975.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, D. M. Rose, A. Pearson, R. A. Ezekewitz, and P. M. Henson. 2000. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405: 85–90.
- Hoffmann, P. R., A. M. deCathelineau, C. A. Ogden, Y. Leverrier, D. L. Bratton, D. L. Daleke, A. J. Ridley, V. A. Fadok, and P. M. Henson. 2001. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J. Cell Biol.* 155: 649–659.
- Williamson, P., and R. A. Schlegel. 2004. Hide and seek: the secret identity of the phosphatidylserine receptor. *J. Biol.* 3: 14.
- Cikala, M., O. Alexandrova, C. N. David, M. Proschel, B. Stiening, P. Cramer, and A. Bottger. 2004. The phosphatidylserine receptor from Hydra is a nuclear protein with potential Fe(II) dependent oxygenase activity. *BMC Cell Biol.* 5: 26.
- Bose, J., A. D. Gruber, L. Helming, S. Schiebe, I. Wegener, M. Hafner, M. Beales, F. Kontgen, and A. Lengeling. 2004. The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J. Biol.* 3: 15.
- Gardai, S. J., K. A. McPhillips, S. C. Frasch, W. J. Janssen, A. Starefeldt, J. E. Murphy-Ullrich, D. L. Bratton, P. A. Oldenborg, M. Michalak, and P. M. Henson. 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123: 321–334.

13. Botto, M. 1998. C1q knock-out mice for the study of complement deficiency in autoimmune disease. *Exp. Clin. Immunogenet.* 15: 231–234.
14. Taylor, P. R., A. Carugati, V. A. Fadok, H. T. Cook, M. Andrews, M. C. Carroll, J. S. Savill, P. M. Henson, M. Botto, and M. J. Walport. 2000. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 192: 359–366.
15. Carroll, M. C. 1998. The lupus paradox. *Nat. Genet.* 19: 3–4.
16. Tsao, B. P. 1998. Genetic susceptibility to lupus nephritis. *Lupus* 7: 585–590.
17. Gaboriaud, C., N. M. Thielens, L. A. Gregory, V. Rossi, J. C. Fontecilla-Camps, and G. J. Arlaud. 2004. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol.* 25: 368–373.
18. Tacnet-Delorme, P., S. Chevallier, and G. J. Arlaud. 2001. β -Amyloid fibrils activate the C1 complex of complement under physiological conditions: evidence for a binding site for A β on the C1q globular regions. *J. Immunol.* 167: 6374–6381.
19. Blanquet-Grossard, F., N. M. Thielens, C. Vendrely, M. Jamin, and G. J. Arlaud. 2005. Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry* 44: 4349–4356.
20. Klein, M. A., P. S. Kaeser, P. Schwarz, H. Weyd, I. Xenarios, R. M. Zinkernagel, M. C. Carroll, J. S. Verbeek, M. Botto, M. J. Walport, et al. 2001. Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat. Med.* 7: 488–492.
21. 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: 4525–4528.
22. Castellano, G., A. M. Woltman, A. J. Nauta, A. Roos, L. A. Trouw, M. A. Seelen, F. P. Schena, M. R. Daha, and C. van Kooten. 2004. Maturation of dendritic cells abrogates C1q production in vivo and in vitro. *Blood* 103: 3813–3820.
23. Nauta, A. J., G. Castellano, W. Xu, A. M. Woltman, M. C. Borrias, M. R. Daha, C. van Kooten, and A. Roos. 2004. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J. Immunol.* 173: 3044–3050.
24. Gaboriaud, C., J. Juanhuix, A. Gruez, M. Lacroix, C. Darnault, D. Pignol, D. Verger, J. C. Fontecilla-Camps, and G. J. Arlaud. 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.
25. Kishore, U., C. Gaboriaud, P. Waters, A. K. Shrive, T. J. Greenhough, K. B. Reid, R. B. Sim, and G. J. Arlaud. 2004. C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends Immunol.* 25: 551–561.
26. Navratil, J. S., S. C. Watkins, J. J. Wisnieski, and J. M. Ahearn. 2001. The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. *J. Immunol.* 166: 3231–3239.
27. Elward, K., M. Griffiths, M. Mizuno, C. L. Harris, J. W. Neal, B. P. Morgan, and P. Gasque. 2005. CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *J. Biol. Chem.* 280: 36342–36354.
28. Arlaud, G. J., R. B. Sim, A. M. Duplaa, and M. G. Colomb. 1979. Differential elution of C1q, C1r and C1s from human C1 bound to immune aggregates: use in the rapid purification of C1 subcomponents. *Mol. Immunol.* 16: 445–450.
29. Villiers, M. B., A. Reboul, N. M. Thielens, and M. G. Colomb. 1981. Purification and characterization of C4-binding protein from human serum. *FEBS Lett.* 132: 49–54.
30. Ishii, M., S. Fujita, M. Yamada, Y. Hosaka, and Y. Kurachi. 2005. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Ca^{2+} /calmodulin competitively bind to the regulators of G-protein-signalling (RGS) domain of RGS4 and reciprocally regulate its action. *Biochem. J.* 385: 65–73.
31. Kabsch, W. 1993. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* 26: 795–800.
32. Navaza, J. 2001. Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57: 1367–1372.
33. Read, R. J. 2001. Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57: 1373–1382.
34. Murshudov, G. N., A. A. Vagin, and E. J. Dodson. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53: 240–255.
35. Emsley, P., and K. Cowtan. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst. D60*: 2126–2132.
36. Feng, X., M. G. Tonnesen, E. I. Peerschke, and B. Ghebrehiwet. 2002. Cooperation of C1q receptors and integrins in C1q-mediated endothelial cell adhesion and spreading. *J. Immunol.* 168: 2441–2448.
37. Hagenhofer, M., H. Germaier, C. Hohenedl, P. Rohwer, J. R. Kalden, and M. Herrmann. 1998. UV-B irradiated cell lines execute programmed cell death in various forms. *Apoptosis* 3: 123–132.
38. Couldwell, W. T., D. R. Hinton, S. He, T. C. Chen, I. Sebat, M. H. Weiss, and R. E. Law. 1994. Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines. *FEBS Lett.* 345: 43–46.
39. Kalb, E., S. Frey, and L. K. Tamm. 1992. Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1103: 307–316.
40. Saenko, E., A. Sarafanov, N. Ananyeva, E. Behre, M. Shima, H. Schwinn, and D. Josic. 2001. Comparison of the properties of phospholipid surfaces formed on HPA and L1 biosensor chips for the binding of the coagulation factor VIII. *J. Chromatogr. A* 921: 49–56.
41. Swairjo, M. A., N. O. Concha, M. A. Kaetzel, J. R. Dedman, and B. A. Seaton. 1995. Ca^{2+} -bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat. Struct. Biol.* 2: 968–974.
42. Verdaguer, N., S. Corbalan-Garcia, W. F. Ochoa, I. Fita, and J. C. Gomez-Fernandez. 1999. Ca^{2+} bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase C α directly to phosphatidylserine. *EMBO J.* 18: 6329–6338.
43. Huber, R., J. Romisch, and E. P. Paques. 1990. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J.* 9: 3867–3874.
44. Roumenina, L. T., M. M. Ruseva, A. Zlatarova, R. Ghai, M. Kolev, N. Olova, M. Gadjeva, A. Agrawal, B. Bottazzi, A. Mantovani, et al. 2006. Interaction of C1q with IgG1, C-reactive protein and pentraxin 3: mutational studies using recombinant globular head modules of human C1q A, B, and C chains. *Biochemistry* 45: 4093–4104.
45. Callahan, M. K., P. Williamson, and R. A. Schlegel. 2000. Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death Differ.* 7: 645–653.
46. Fadok, V. A., D. L. Bratton, S. C. Frasch, M. L. Warner, and P. M. Henson. 1998. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 5: 551–562.
47. Fadok, V. A., A. de Cathelineau, D. L. Daleke, P. M. Henson, and D. L. Bratton. 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: 1071–1077.
48. Krahling, S., M. K. Callahan, P. Williamson, and R. A. Schlegel. 1999. Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Cell Death Differ.* 6: 183–189.
49. Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton, and P. M. Henson. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148: 2207–2216.
50. Stach, C. M., X. Turnay, R. E. Voll, P. M. Kern, W. Kolowos, T. D. Beyer, J. R. Kalden, and M. Herrmann. 2000. Treatment with annexin V increases immunogenicity of apoptotic human T-cells in BALB/c mice. *Cell Death Differ.* 7: 911–915.
51. Marguet, D., M. F. Luciani, A. Moynault, P. Williamson, and G. Chimini. 1999. Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey. *Nat. Cell Biol.* 1: 454–456.
52. Cui, P., B. Qin, N. Liu, G. Pan, and D. Pei. 2004. Nuclear localization of the phosphatidylserine receptor protein via multiple nuclear localization signals. *Exp. Cell Res.* 293: 154–163.
53. Mitchell, J. E., M. Cvetanovic, N. Tibrewal, V. Patel, O. R. Colamonici, M. O. Li, R. A. Flavell, J. S. Levine, R. B. Birge, and D. S. Ucker. 2006. The presumptive phosphatidylserine receptor is dispensable for innate anti-inflammatory recognition and clearance of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 281: 5718–5725.
54. Botto, M., and M. J. Walport. 2002. C1q, autoimmunity and apoptosis. *Immunobiology* 205: 395–406.
55. Stuart, G. R., N. J. Lynch, J. Lu, A. Geick, B. E. Moffatt, R. B. Sim, and W. J. Schwaeble. 1996. Localisation of the C1q binding site within C1q receptor/calreticulin. *FEBS Lett.* 397: 245–249.
56. Stuart, G. R., N. J. Lynch, A. J. Day, W. J. Schwaeble, and R. B. Sim. 1997. The C1q and collectin binding site within C1q receptor (cell surface calreticulin). *Immunopharmacology* 38: 73–80.
57. Kaul, M., and M. Loos. 2001. Expression of membrane C1q in human monocyte-derived macrophages is developmentally regulated and enhanced by interferon- γ . *FEBS Lett.* 500: 91–98.
58. Petry, F., M. Botto, R. Holtappels, M. J. Walport, and M. Loos. 2001. Reconstitution of the complement function in C1q-deficient (C1q $^{-/-}$) mice with wild-type bone marrow cells. *J. Immunol.* 167: 4033–4037.
59. Vegh, Z., E. C. Goyarts, K. Rozengarten, A. Mazumder, and B. Ghebrehiwet. 2003. Maturation-dependent expression of C1q binding proteins on the cell surface of human monocyte-derived dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.* 3: 39–51.
60. Ogden, C. A., A. deCathelineau, P. R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V. A. Fadok, and P. M. Henson. 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.
61. Ogasawara, Y., Y. Kuroki, and T. Akino. 1992. Pulmonary surfactant protein D specifically binds to phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* 267: 21244–21249.
62. Nicholls, A., K. A. Sharp, and B. Honig. 1991. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 11: 281–296.

Structural Basis for Innate Immune Sensing by M-ficolin and Its Control by a pH-dependent Conformational Switch*

Received for publication, July 12, 2007, and in revised form, September 21, 2007. Published, JBC Papers in Press, September 26, 2007, DOI 10.1074/jbc.M705741200

Virginie Garlatti[‡], Lydie Martin[‡], Evelyne Gout[§], Jean-Baptiste Reiser[‡], Teizo Fujita[¶], Gérard J. Arlaud[§], Nicole M. Thielens[§], and Christine Gaboriaud^{‡1}

From the [‡]Laboratoire de Cristallographie et Cristallogénèse des Protéines and [§]Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Commissariat à l'Energie Atomique-CNRS-Université Joseph Fourier, 41 Rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France and the [¶]Department of Biochemistry, Fukushima Medical University, Fukushima, Japan

Ficolins are soluble oligomeric proteins with lectin-like activity, assembled from collagen fibers prolonged by fibrinogen-like recognition domains. They act as innate immune sensors by recognizing conserved molecular markers exposed on microbial surfaces and thereby triggering effector mechanisms such as enhanced phagocytosis and inflammation. In humans, L- and H-ficolins have been characterized in plasma, whereas a third species, M-ficolin, is secreted by monocytes and macrophages. To decipher the molecular mechanisms underlying their recognition properties, we previously solved the structures of the recognition domains of L- and H-ficolins, in complex with various model ligands (Garlatti, V., Belloy, N., Martin, L., Lacroix, M., Matsushita, M., Endo, Y., Fujita, T., Fontecilla-Camps, J. C., Arlaud, G. J., Thielens, N. M., and Gaboriaud, C. (2007) *EMBO J.* 24, 623–633). We now report the ligand-bound crystal structures of the recognition domain of M-ficolin, determined at high resolution (1.75–1.8 Å), which provides the first structural insights into its binding properties. Interaction with acetylated carbohydrates differs from the one previously described for L-ficolin. This study also reveals the structural determinants for binding to sialylated compounds, a property restricted to human M-ficolin and its mouse counterpart, ficolin B. Finally, comparison between the ligand-bound structures obtained at neutral pH and nonbinding conformations observed at pH 5.6 reveals how the ligand binding site is dislocated at acidic pH. This means that the binding function of M-ficolin is subject to a pH-sensitive conformational switch. Considering that the homologous ficolin B is found in the lysosomes of activated macrophages (Runza, V. L., Hehlhans, T., Echtenacher, B., Zahringer, U., Schwaeble, W. J., and Mannel, D. N. (2006) *J. Endotoxin Res.* 12, 120–126), we propose that this switch could play a physiological role in such acidic compartments.

* This work was supported by the Commissariat à l'Energie Atomique, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Joseph Fourier, and Agence Nationale de la Recherche Grant ANR-05-MIIM-023-01. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The atomic coordinates and structure factors (code 2jhm, 2jhh, 2jhi, 2jhl, and 2jhh) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-38789599; Fax: 33-4-38785122; E-mail: christine.gaboriaud@ibs.fr.

To protect themselves against infection, multicellular organisms have acquired innate immunity systems that rely upon the ability of a restricted pool of recognition molecules to sense conserved molecular patterns exposed at the surface of microbes and to elicit effector mechanisms designed to provide a first line of defense (1, 2). Among these molecules are the ficolins, a family of proteins found in a variety of animals ranging from invertebrates to mammals (3, 4). Ficolins are oligomers of trimeric subunits, which are made of three identical polypeptide chains, comprising collagen-like triple helices prolonged by a globular recognition domain structurally related to the fibrinogen β and γ chains (5). Three ficolins have been identified in humans: L-ficolin and H-ficolin, which are both serum proteins, and M-ficolin, a secretory protein synthesized in bone marrow, lung, and spleen and by blood monocytes and neutrophils (6). L-ficolin is known to recognize various capsulated bacteria and exhibits binding specificity for diverse ligands, such as lipoteichoic acid (7), 1,3- β -D-glucan (8), and the capsular antigen of type III group B streptococci (9). H-ficolin has only been reported to bind to *Aerococcus viridans* (10). In addition to pathogenic microorganisms, L-ficolin binds specifically to apoptotic HL60, U937, and Jurkat T cells, whereas binding of H-ficolin is restricted to apoptotic Jurkat T cells (11, 12). The structures of the recognition domains of human L- and H-ficolins, alone and in complex with various ligands, have been solved by x-ray crystallography (13), revealing the structural determinants for their binding specificities. In addition to an outer S1 binding site, homologous to a site identified in the invertebrate tachylectin 5A (TL5A)² (14), three additional sites, called S2, S3, and S4, were discovered in L-ficolin. Together, these new sites define a continuous recognition surface able to sense various acetylated and neutral carbohydrate markers in the context of extended polysaccharides, as found on microbial or apoptotic surfaces (13). Recombinant M-ficolin shows a marked preference for acetylated compounds, as also observed for L-ficolin (15) and binds neoglycoproteins bearing GlcNAc, GalNAc, and sialyl-N-acetyllactosamine (16). Binding to the smooth type LT2 strain of *Salmonella typhimurium* and to *Streptococcus aureus* has been reported, but only binding to the latter could be inhibited by GlcNAc (17). The structure of the recognition domain of human M-ficolin was recently reported,

² The abbreviations used are: TL5A, tachylectin 5A; Neu5Ac, N-acetylneuraminic acid; r.m.s., root mean square; Mes, 4-morpholineethanesulfonic acid.

Downloaded from www.jbc.org by on April 30, 2008

TABLE 1
Crystallographic data collection statistics

Protein Data Bank code	ESRF beamline	Resolution range ^a	Sp ^b	Unit cell dimensions	Observed reflections ^a	Unique reflections ^a	Red. ^{a,c}	Comp. ^{a,d}	I/SigI ^a	R _{sym} ^a
		Å		Å				%		%
2jhm	ID14-eh2	1.52–56.8 (1.52–1.60)	H3	$a = b = 73.71, c = 124.61$	98,652 (9529)	36,615 (4482)	2.7 (2.1)	94.3 (94.3)	11.3 (3.0)	7.4 (27.7)
2jhk	ID23-eh2	1.75–23.7 (1.75–1.80)	H3	$a = b = 73.75, c = 124.89$	146,501 (11,878)	25,519 (2072)	5.7 (5.72)	99.3 (98.7)	17.7 (4.2)	6.3 (27.4)
2jhi	ID23-eh2	1.80–28.3 (1.80–1.85)	H3	$a = b = 73.97, c = 126.47$	135,776 (10,669)	23,757 (1862)	5.7 (5.72)	99.3 (97.7)	10.4 (3.0)	9 (36.4)
2jhl	ID14-eh4	1.75–28.0 (1.75–1.80)	H3	$a = b = 73.93, c = 124.83$	137,933 (11,099)	24,703 (1973)	5.6 (5.6)	98.9 (97.6)	23.5 (4.9)	4.6 (24.4)
2jhh	ID23-eh2	1.70–28.0 (1.70–1.75)	P3	$a = b = 69.40, c = 77.63$	258,896 (20,733)	45,425 (3642)	5.7 (5.7)	98.7 (95.5)	14.9 (3.9)	7.3 (36.9)

^a Data corresponding to the last resolution shell are indicated in parentheses.^b Space group.^c Redundancy.^d Completeness.

but this turned out to be in a conformation devoid of ligand binding activity (18). Here we report five novel x-ray structures of this domain, namely a ligand-free and three ligand-bound structures obtained at pH 7.0 plus an inactive form obtained at pH 5.6. For the first time, these provide the structural basis for the recognition function of M-ficolin and reveal how it is subject to a pH-dependent conformational switch.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Recombinant Protein Production and Purification—The DNA segment encoding the C-terminal residues 80–297 of mature human M-ficolin was amplified using Vent_R polymerase and the pMT/Bip/V5-HisA plasmid containing the full-length cDNA (16) as a template, according to established procedures. This segment starts at the first residue following the collagen-like sequence. The DNA was cloned in frame with the melittin signal peptide of the pNT-Bac baculovirus transfer vector (19), and the recombinant baculovirus was generated using the Bac-to-BacTM system (Invitrogen Corp.) and amplified as described previously (20). High Five cells were infected with the recombinant virus for 96 h at 27 °C. The protein was purified from culture supernatants by ion exchange chromatography on a Q-Sepharose Fast Flow column (GE Healthcare) equilibrated in 50 mM triethanolamine-HCl, pH 7.6, using a linear gradient to 250 mM NaCl. Mass spectrometry analysis was performed using the matrix-assisted laser desorption ionization technique under conditions described previously (21).

Crystallization, Structure Determination, and Refinement—The protein was concentrated to 6 mg/ml in 145 mM NaCl, 50 mM triethanolamine-HCl, pH 7.6. Several crystallization hits were obtained using the high throughput crystallization facility at EMBL, Grenoble. Crystals were reproducibly obtained at 20 °C using the hanging drop vapor diffusion method by mixing equal volumes of the protein solution and of a reservoir solution composed either of 11% polyethylene glycol 4000, 5% isopropyl alcohol, 0.1 M Hepes, pH 7.0, or of 23% polyethylene glycol 4000, 0.32 M lithium sulfate, 0.1 M Mes, pH 5.6. M-ficolin-ligand complexes were obtained by soaking crystals obtained at pH 7.0 in a cryoprotecting solution composed of 11–14% polyethylene glycol 4000, 15% polyethylene glycol 400, 0.1 M Hepes, and 500 mM ligand (GlcNAc, GalNAc, or Neu5Ac) just before flash-cooling the crystal in liquid nitrogen. Data collection was performed at different ESRF beamlines (ID23eh2, ID14eh4, or ID14eh2), as stated in Table 1. Diffraction data were processed

using either MOSFLM from CCP4 (22) or XDS (23). Complete crystallographic data statistics are provided in Table 1. The two ligand-free M-ficolin structures obtained at pH 7.0 and 5.6 were solved by molecular replacement, using the L-ficolin structure (Protein Data Bank code 2j1g) as a search model. Model rebuilding was performed using the graphic program Coot (24). Refinements were carried out with Refmac5 (25). The quality of the map allowed construction of all but the first N-terminal residue of the recombinant fragment at pH 7.0. The N-terminal extremity of M-ficolin exhibits various conformations depending on crystal environment. In the structure obtained at pH 5.6, the segment 278–285 looks disordered in each molecule. The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank (accession codes 2jhm, 2jhk, 2jhi, 2jhl, 2jhh; see Tables 1 and 2).

RESULTS

In order to determine the three-dimensional structure of the fibrinogen-like recognition domain of human M-ficolin, the segment corresponding to this domain (residues 80–297 of mature M-ficolin) was expressed in a baculovirus/insect cells system. As assessed by mass spectrometry, a single species with a mass of 24,549 ± 12 Da was purified, accounting for the unmodified polypeptide chain (calculated value 24,553 Da). Selection of the best diffracting crystals among several crystallization hits obtained at two different pH values allowed us to solve to the five x-ray structures presented here (Table 2).

The Ligand-free and Ligand-bound Structures Solved at Neutral pH—The ligand-free structure obtained at pH 7.0 was solved by molecular replacement using L-ficolin (13) as a starting model and refined to 1.5 Å resolution (Table 2). The protein is homotrimeric, with crystallographic 3-fold symmetry (Fig. 1A). As expected from the amino acid sequence conservation of the interprotomer interfaces in ficolins, this assembly is very similar to those previously described for the L- and H-ficolin recognition domains (13). Likewise, homologous Ca²⁺ binding sites are found in the most external part of the trimer, with a distance of 65 Å between the Ca²⁺ ions, as observed in L-ficolin (Fig. 1, A and D). Ca²⁺ coordination in M-ficolin involves two water molecules, both carboxylate oxygens of Asp²³³, one of the side-chain oxygens of Asp²³⁵, and the main-chain carbonyl oxygens of Ser²³⁷ and Ser²³⁹. M-ficolin and L-ficolin have highly similar overall protomer structures, with an r.m.s. deviation value of 0.5 Å for 211 superposed Cα atoms (Fig. 1B). Only

TABLE 2

Information about the structures solved and their crystallographic refinement statistics

PDB code	pH	Ligand	Resolution	$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}^a$	r.m.s. deviation	Mean B factor	Ramachandran
			high/low ^a	%	bond/angle	protein/ligand	FR/AAR/GAR/DR ^{a,b}
			Å	%	Å/degrees	Å ²	%
2jhm	7		1.52–56.79 (1.52–1.56)	18.1/20.7 (21.9/25.6)	0.009/1.19	11.7	84.5/15.5/0.0/0.0
2jhk	7	GlcNAc	1.75–23.71 (1.75–1.81)	17.3/18.6 (20.4/23.9)	0.008/1.17	21.0/42.1	85.0/15.0/0.0/0.0
2jhi	7	GalNAc	1.80–28.35 (1.80–1.86)	19.6/21.4 (23.8/31.7)	0.01/1.23	25.3/36.7	85.0/15.0/0.0/0.0
2jhl	7	Neu5Ac	1.75–27.98 (1.75–1.81)	21.0/23.9 (23.2/23.7)	0.008/1.24	27.4/36.0	84.5/15.5/0.0/0.0
2jhh	5.6		1.70–28.03 (1.70–1.74)	21.9/25.1 (26.0/30.0)	0.009/1.27	22.5	87.3/12.4/0.3/0.0

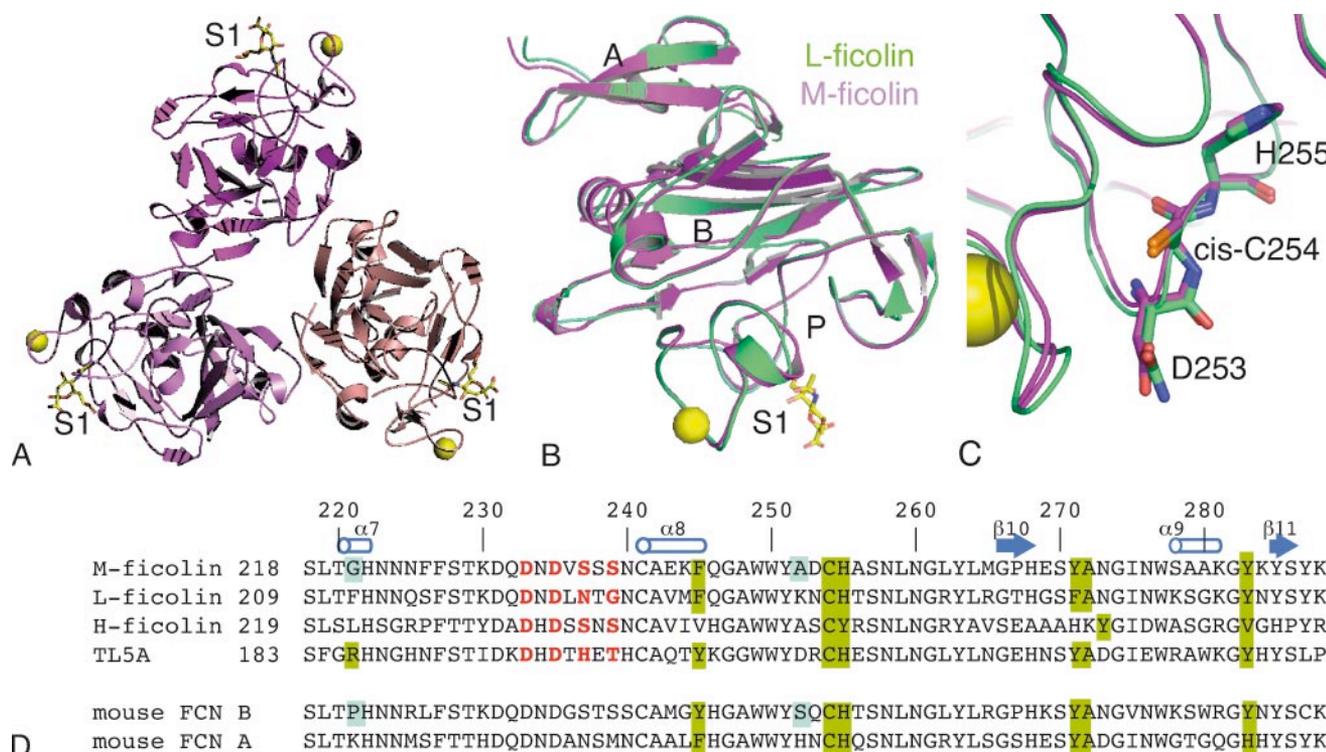
^a Data corresponding to the last resolution shell are indicated in parentheses.^b FR, favored region; AAR, additional allowed region; GAR, generously allowed region; DR, disallowed region.

FIGURE 1. Structure of the recognition domain of M-ficolin and location of its S1 ligand binding site. *A*, bottom view of the homotrimeric structure of M-ficolin solved at neutral pH. Ca^{2+} ions are represented as golden spheres. The sialic acid ligand bound to site S1 is shown in a yellow ball and stick representation. *B*, superposition of the similar fibrinogen-like protomers of M-ficolin (magenta) and L-ficolin (green). Domains A, B, and P are labeled. *C*, detailed superposed views of the structures of M-ficolin (magenta) and L-ficolin (green) highlighting the common *cis*-conformation of their respective Asp²⁵³-Cys²⁵⁴ and Asn²⁴⁴-Cys²⁴⁵ peptide bonds. *D*, sequence alignment of the P domains of human ficolins M, L, and H; mouse ficolins FCN B and FCN A; and TL5A. The residue numbering and the secondary structure elements apply to M-ficolin. Residues involved in the S1 binding site are colored red, and those involved in Ca^{2+} binding are colored blue. Small residues allowing accommodation of sialic acid in site S1 are colored green.

minor structural differences are observed (e.g. for the free N-terminal end and at position 170). A major functionally relevant feature of the structure is the *cis*-conformation of the Asp²⁵³-Cys²⁵⁴ peptide bond, already observed in H- and L-ficolins (Fig. 1C), as well as in the homologous invertebrate lectin TL5A (14). This is in sharp contrast with the *trans*-conformation seen in the M-ficolin structure recently reported by Tanio *et al.* (18), which is devoid of ligand binding activity.

In order to gain structural insights into the binding specificity of M-ficolin, the crystals obtained at neutral pH were soaked into ligand-containing solutions. Three different structures of M-ficolin in complex with GlcNAc, GalNAc, and Neu5Ac were thus solved and refined up to 1.75 Å resolution (Table 2). Each of these three ligands was bound to the S1 site, in the vicinity of the Ca^{2+} binding site. These two sites are located in the P domain (residues 218–288), which forms the external part of the homotrimeric structure (Fig. 1). The ligand-free and ligand-

bound structures obtained at neutral pH are very similar, with a mean overall r.m.s. deviation of 0.2 ± 0.03 Å. This novel M-ficolin structural conformation, endowed with ligand recognition ability, will be referred to as the “binding state.”

An Evolutionarily Conserved N-Acetyl-binding Pocket—The detailed interactions of the three ligands with site S1 observed at pH 7.0 are depicted in Fig. 2 (A–C). A common set of three different interactions stabilizes the ligand acetamido group: (i) its methyl group is in Van der Waals contacts with the surrounding hydrophobic pocket formed by Phe²⁴⁵, His²⁵⁵, Tyr²⁷¹, Ala²⁷², and Tyr²⁸³; (ii) its carbonyl oxygen is hydrogen-bonded to the backbone NH group of Cys²⁵⁴ and His²⁵⁵; (iii) its nitrogen atom is hydrogen-bonded to the hydroxyl group of Tyr²⁷¹. This latter interaction is mediated by a water molecule in the case of GlcNAc, whereas the Tyr²⁷¹ side chain slightly moves toward the ligand to provide a direct hydrogen bond in the case of GalNAc and Neu5Ac. Tyr²⁷¹ is thus the only flexible compo-

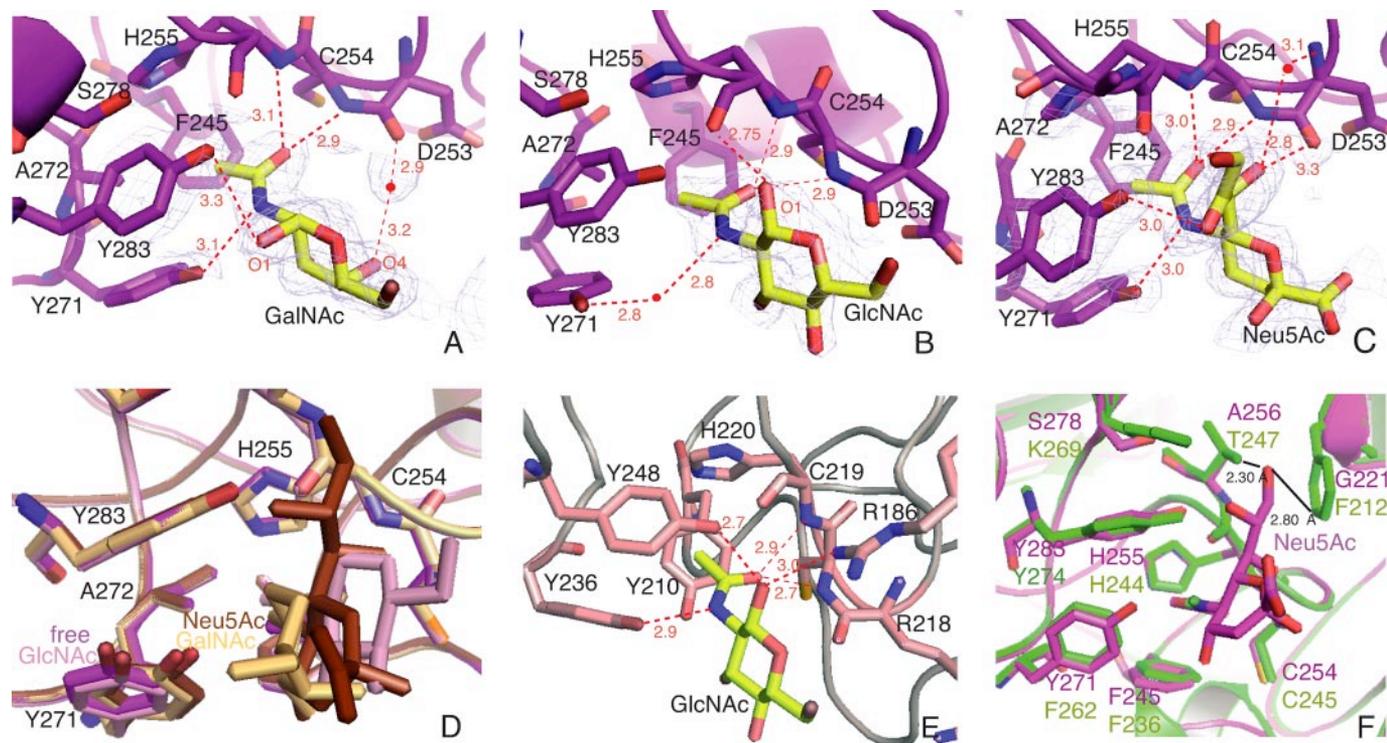


FIGURE 2. The S1 ligand binding site in M-ficolin, TL5A, and L-ficolin. A–C, detailed views of the interactions of GalNAc, GlcNAc, and Neu5Ac in site S1 of M-ficolin. D, superposition of the ligand-free and three ligand-bound structures of M-ficolin showing that Tyr²⁷¹ is the only mobile component in site S1. E, interaction of GlcNAc in the homologous S1 binding site of tachylectin 5A (14). F, superposition of the S1 binding sites of M-ficolin (magenta) and L-ficolin (green). In L-ficolin, steric hindrance (as shown by black lines) prevents accommodation of large ligands such as Neu5Ac.

ment of the binding site (Fig. 2D). As illustrated in Fig. 2E, S1 is highly homologous to the GlcNAc binding site of the distantly related invertebrate lectin TL5A (14). Both the hydrophobic pocket and the unusual *cis*-conformation of the Asp²⁵³-Cys²⁵⁴ peptide bond (Arg²¹⁸-Cys²¹⁹ in TL5A) are conserved, the latter being essential to correctly position the two consecutive backbone NH groups for appropriate interaction with the acetamido oxygen. These characteristics are also highly conserved in mammalian ficolins, except for a slightly different hydrophobic pocket in human H-ficolin (Fig. 1D). Interestingly, the replacement of Tyr²⁷¹ by a phenylalanine in L-ficolin (Fig. 2F) could explain the lack of binding of *N*-acetylated ligands in its S1 site, where an acetate molecule is often bound instead (13).

Recognition of the three *N*-acetylated carbohydrates by M-ficolin also involves additional hydrogen-bonding interactions with their sugar rings, but those supplemental interactions depend on the nature of the ligand. In the case of GlcNAc, the 1-OH oxygen is hydrogen-bonded to the backbone carbonyl group of His²⁵⁵ (Fig. 2B). This differs from the recognition of GlcNAc by TL5A, where the 1-OH oxygen forms hydrogen bonds with the guanidinium nitrogen of Arg¹⁸⁶ and with the hydroxyl group of Tyr²⁴⁸ (Fig. 1E). More distant polar interactions are observed in the case of GalNAc, with a water-mediated hydrogen bond between 4-OH and the backbone oxygen of Asp²⁵³ and a direct interaction between 1-OH and the hydroxyl group of Tyr²⁸³ (Fig. 2A).

Structural Basis of Sialic Acid Recognition—The structure of the M-ficolin-Neu5Ac complex reveals a more extensive network of polar interactions required to recognize this bulkier molecule (Fig. 2C). The neuraminic group is hydrogen-bonded

through the 8-OH oxygen to the hydroxyl group of Tyr²⁸³ (Fig. 2C). Further stabilization is achieved by direct and water-mediated hydrogen bonds between the 7-OH oxygen and the backbone oxygen and nitrogen of Asp²⁵³, respectively. Interestingly, as illustrated by the superposition of the M- and L-ficolin structures (Fig. 2F), steric hindrance may explain why most ficolins do not interact with sialic acids. Indeed, two small residues in the vicinity of the S1 site, Gly²²¹ and Ala²⁵⁶ in M-ficolin, are replaced in L-ficolin by the bulkier residues, phenylalanine and threonine, respectively. These two residues reduce the size of the binding pocket, thereby limiting its access to large carbohydrate molecules such as NeuNAc (Fig. 2F). Sequence alignments of mammalian ficolins show that, except for mouse ficolin B and human M-ficolin, both positions are occupied by bulkier residues (Fig. 1D).

The S1 Binding Site Is Disrupted and Exhibits Increased Flexibility at Acidic pH—It was recently reported that the GlcNAc binding activity of M-ficolin is pH-sensitive, and the structure of its recognition domain, obtained at pH 5.6, was found to exhibit inactive loop conformations around the S1 binding site (18). Such differences might have been either a direct consequence of the acidic pH of the crystallization solution or a possible artifact linked to the introduction of a 23-residue-long C-terminal tag in the recombinant domain (26). To investigate this question, our own construct, corresponding solely to the fibrinogen-like recognition domain of M-ficolin, was crystallized at pH 5.6, and its structure was solved and refined to a resolution of 1.7 Å (Table 2). Although this new crystal form differs from the one reported previously (18), the resulting structure is similar (mean subunit r.m.s. deviation value of 0.7

Structural Basis for Recognition by M-ficolin

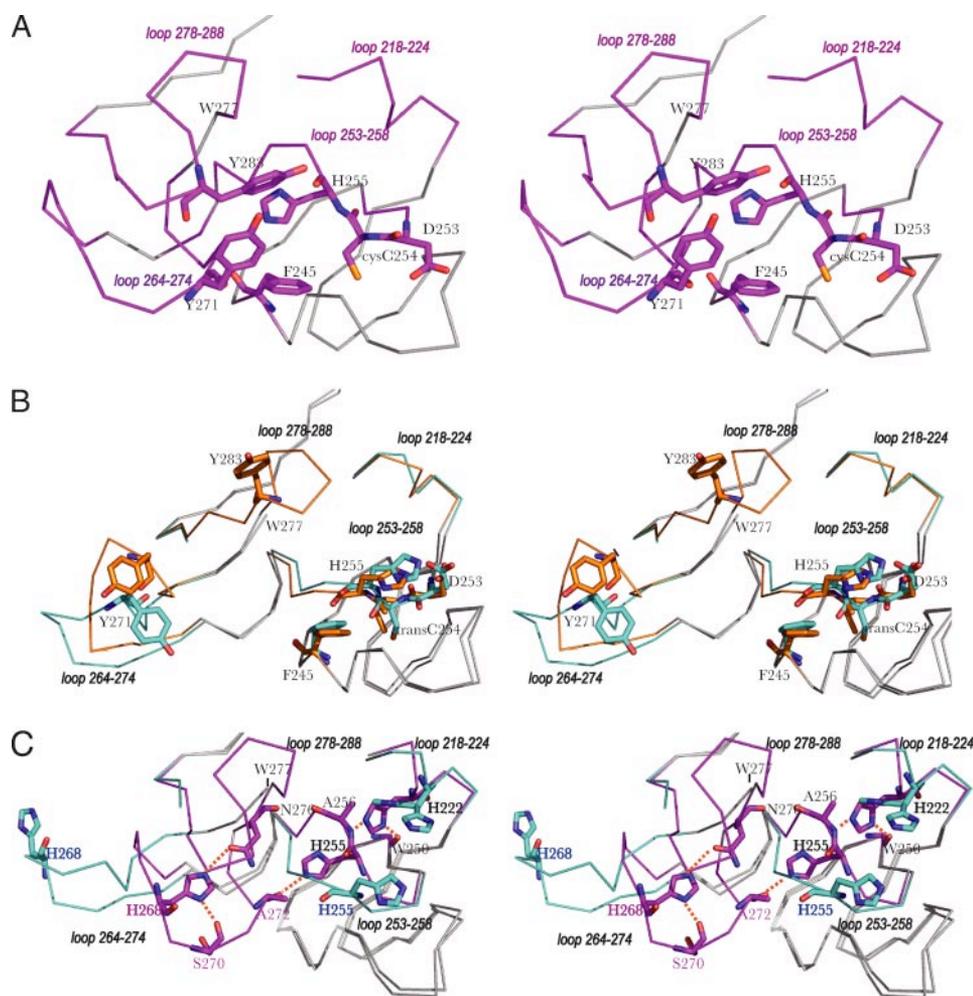


FIGURE 3. The pH-dependent conformational switch observed in M-ficolin. *A*, the active binding conformation of site S1 observed at neutral pH involves residues contributed by four external loops. *B*, nonbinding conformation of site S1 observed at pH 5.6. The structure determined in this study (cyan, lacking the disordered segment 278–285) and subunit C of the structure reported previously by Tanio *et al.* (18) (orange) are superposed. The acidic pH destabilizes the four loops and dislocates the S1 site. *C*, superposition of the binding (magenta) and nonbinding (cyan) conformations determined in this study, illustrating the essential histidine-mediated stabilizations of the binding conformation (magenta) that are lost at acidic pH. The red dashed lines represent hydrogen bonds.

TABLE 3
Gaps corresponding to disordered segments in the structures determined at pH 5.6

Gap	Protein Data Bank code	Subunit	Loop
277–288	2JHH ^a	C	L4
277–286	2JHH ^a	F	L4
262–268 ^b	2D39 ^c	A	L3
79–81 ^b	2D39 ^c	B	
260–268 ^b	2D39 ^c	B	L3
274–281 ^b	2D39 ^c	B	L4
79–82 ^b	2D39 ^c	C	

^a Present study.

^b Residue numbering corresponding to the present study.

^c Tanio *et al.* (18).

Å), with some differences mostly arising from changes in the ligand-binding region, as illustrated in Fig. 3*B*. This additional M-ficolin structure also clearly shows the Asp²⁵³-Cys²⁵⁴ peptide bond in a *trans*-conformation, which drastically modifies the positioning of the His²⁵⁵ side chain (Fig. 3*B*). In addition to this *cis-trans* conformational change, the acidic pH induces large displacements (>10 Å) of Tyr²⁷¹ and Tyr²⁸³, both essen-

tial for ligand binding (Fig. 3, *A* and *B*). Thus, with the exception of Phe²⁴⁵, all residues making up S1 are extensively displaced at acidic pH, resulting in a conformation clearly inappropriate for ligand binding. This acidic conformation is significantly different from the structures obtained at neutral pH, with a mean subunit r.m.s. deviation of 2.14 ± 0.45 Å, a value that increases significantly to 3.36 ± 0.64 Å when only the ligand-binding region is considered. This acidic conformation will be therefore referred to as the “non-binding” state.

The conformational transition from the binding to the nonbinding state involves the concerted displacement of four surface segments or loops, namely L1 (218–224), L2 (253–258), L3 (264–274), and L4 (278–288). Except Phe²⁴⁵, all of the residues defining S1 are included in loops L2–L4, and L1 includes Gly²²¹, which, as stated above, is probably the key determinant for the specificity toward sialic acid. The increased flexibility of these four loops at acidic pH was assessed by analyzing both the gaps in the crystallographic models, which correspond to disordered segments (Table 3), and the mean B factor in these loops according to the experimental context (Tables 4 and 5).

As can be seen in Table 3, several disordered segments are found in loops L3 and L4 in the two structures determined at pH 5.6. This indicates a high flexibility of these loops at this pH, which corroborates the observation that they display the largest displacements when compared with the neutral pH structure (Fig. 3). A detailed analysis of the ratio of the mean B factor of each loop compared with the mean B factor of the corresponding subunit is depicted in Table 4. This ratio is referred to as the “B loop ratio.” Its value is defined for loops L1–L4 in the six M-ficolin structures currently available. A positive value means that the B factor is higher in the loop compared with the averaged value of the corresponding subunit. The highest positive values (97 and 127%) are observed for L1 in the structure determined by Tanio *et al.* (18), indicating a significant increase of L1 flexibility under these conditions. This is in contrast with the negative values observed for L1 at neutral pH in our study, where this loop is greatly stabilized, defining a small $\alpha 7$ helix (Fig. 1*D*). To obtain a more direct assessment of the pH-dependent increase in flexibility occurring in loops L1–L4, Table 5 summarizes the B loop ratio values averaged for each

TABLE 4

Detailed analysis of the mean B factor value in loops L1–L4 of the different structures and its comparison with the overall subunit value

Loop segments are as follows: L1, 218–224; L2, 253–258; L3, 264–274; L4, 278–288.

Protein Data Bank code	Subunit	pH	Ligand	Mean B factor L1	BLR ^a L1	Mean B factor L2	BLR ^a L2	Mean B factor L3	BLR ^a L3	Mean B factor L4	BLR ^a L4	Overall subunit B factor
2JHM ^b	F	7.0	None	11.33	−2.8	8.9	23.3	14.6	25.0	12.4	6.7	11.7
2JHK ^b	F	7.0	GlcNAc	18.89	−10.0	16.7	−20.3	29.4	39.9	25.1	19.6	21.0
2JHI ^b	F	7.0	GalNAc	24.4	−3.6	20.1	20.5	30.4	20.2	27.6	9.1	25.3
2JHL ^b	F	7.0	Neu5Ac	27.18	−0.8	22.1	19.3	32.1	17.2	30.3	10.6	27.4
2JHH ^b	F	5.6	none	24.7	9.3	31.9	41.2	33.6	48.9	27.3	20.7	22.6
2JHH ^b	C	5.6	None	25.3	12.6	31.0	38.2	33.9	50.7	28.5	26.9	22.5
2D39 ^c	A	5.6	None	40.4	127.0	21.2	19.1	29.8	67.8	30.2	69.8	17.8
2D39 ^c	B	5.6	none	41.2	96.8	35.1	67.6	34.3	63.8	28.8	37.5	20.9
2D39 ^c	C	5.6	None	19.4	−12.2	37.6	69.6	32.3	45.6	28.8	29.8	22.2

^a BLR, B loop ratio = (mean B factor loop − overall subunit B)/overall subunit B × 100.^b Present study.^c Tanio *et al.* (18).

TABLE 5

Averaged B loop ratio values for loops L1–L4 depending on pH

Loop segments are as follows: L1, 218–224; L2, 253–258; L3, 264–274; L4, 278–288.

pH	L1	L2	L3	L4
7.0	−4.3	−20.9	25.6	11.5
5.6	46.7	47.1	55.4	36.9

loop depending on the pH value, revealing a significant increase at pH 5.6 compared with 7.0 for all loops.

DISCUSSION

We have previously solved the crystal structure of the fibrinogen-like recognition domains of human L- and H-ficolins (13) and now report the structure of the corresponding domain of M-ficolin. This additional example confirms that this type of domain associates as a three-lobed homotrimeric structure that is intermediate between the compact assembly seen in the globular “head” of complement protein C1q (27) and the open structure of the carbohydrate recognition domain of mannan-binding lectin (28). In contrast to mannan-binding lectin, where trimerization requires a triple-helical “neck” region, the recognition domains of ficolins solely associate through highly conserved interprotomer interfaces and are therefore self-sufficient in terms of assembly.

The structures determined at neutral pH provide precise insights, at the atomic level, into the structural determinants involved in the recognition by M-ficolin of its three known ligands, GlcNAc, GalNAc, and Neu5Ac. Each of these three *N*-acetylated molecules binds to the outer site S1 homologous to that originally described in TL5A, and remarkably, binding involves in each case a common set of interactions with the ligand acetamido group, similar to that previously described for recognition of GlcNAc by TL5A (14). Thus, it appears that M-ficolin has essentially retained during evolution the binding characteristics of TL5A, possibly with a broader specificity for a wider range of *N*-acetylated molecules. This is in contrast with L-ficolin, which lacks the ability to recognize acetylated molecules through its S1 site but has instead acquired additional binding sites (S2 and S3) that bind these compounds in a poorly specific manner (13).

In line with previous observations (16), the structure of the complex between the M-ficolin recognition domain and Neu5Ac (Fig. 2C) demonstrates that M-ficolin specifically recognizes sialic acids. As stated above, this particular property is

probably conditioned by the presence of small residues, Gly²²¹ and Ala²⁵⁶, at strategic positions in the vicinity of site S1, allowing accommodation of the relatively bulky sialic acid molecules. The fact that, among known mammalian ficolins, this structural feature is only shared by human M-ficolin and mouse ficolin B provides a plausible explanation why the ability to recognize sialylated compounds is restricted to these proteins, which are both secreted by the monocyte/macrophage cell lineages (16, 29). This restriction may be related to the fact that, whereas sialic acid is found on some pathogens, such as the surface capsular polysaccharides of group B *Streptococcus* (30), it is also a marker of self cells. Thus, it is tempting to hypothesize that the inability of L- and H-ficolins to recognize sialic acid is designed to prevent inappropriate recognition of self cells by these proteins in serum. In contrast, M-ficolin would retain the ability to sense certain pathogens in peripheral compartments. Since sialic acid is found at high concentrations at the surface of immune cells, with for example a concentration about 100 mM on B cells (31), M-ficolin could also play a role in mediating or modulating immune cellular interactions, a dual role established for other pathogen recognition receptors, such as macrophage galactose-type lectin (32) or DC-SIGN (33).

Structural Basis of the pH-sensitive Switch—A major lesson from this study is that the ligand-binding activity of M-ficolin is subject to a pH-dependent switch. The conformational transition from the binding to the nonbinding state involves the concerted displacement of four surface loops, namely 218–224, 253–258, 264–274, and 278–288, with Trp²⁷⁷ acting as a conserved anchor (Fig. 3C). Because a pK_a of 6.2 was derived from the pH dependence of the GlcNAc binding activity of M-ficolin, it has been suggested that this is possibly related to changes in the charged state of some of its histidine residues (18). Indeed, comparison of the structures of the binding and nonbinding states reveals changes in the stabilizing interactions mediated by the side chains of His²²², His²⁵⁵, and His²⁶⁸ (Fig. 3C). In the binding state, His²²² is hydrogen-bonded to the main chain oxygen of Trp²⁵⁰ and to the main chain nitrogen of Ala²⁵⁶ (*i.e.* to the backbone of the nearby “active loop” comprising the Asp²⁵³-Cys²⁵⁴ *cis*-peptide bond. In this “active loop,” His²⁵⁵ is hydrogen-bonded to the carbonyl group of Ala²⁷². The third histidine residue, His²⁶⁸, also mediates two hydrogen bonds within the same loop (with Ser²⁷⁰ O and Asn²⁷⁶ OD1). These histidine-mediated stabilizations are disrupted at acidic pH (Fig. 3C), with an increased flexibility in these loops; the side

chain of His²²² becomes disordered, and the side chain of His²⁵⁵ flips toward the Asp²⁵³ side chain, where it fills the space occupied by the ligand in the structures of complexes. Finally, the long neighboring loop, including His²⁶⁸, displays the largest displacement (Fig. 3C).

A pH-induced Functional Switch in Lysosomes?—Remarkably, the pH-sensitive conformational switch revealed by this study only affects the loops holding the ligand binding site residues. This strongly suggests, therefore, that this switch supports some functional role. Indeed, considering that the mouse counterpart of M-ficolin (ficolin B) was recently found in the lysosomes of activated macrophages (34), it is tempting to speculate that this mechanism is involved in ligand release. Thus, the M-ficolin secreted upon macrophage activation would bind to its target microorganism and then become internalized as a complex with its ligand. The pH drop in the lysosomes would then be expected to trigger the conformational switch, resulting in the release of the ligand. This intracellular trafficking would be similar to some extent to that described for several receptor-ligand complexes, such as the asialoglycoprotein receptor (35) or the low density lipoprotein receptor family (36, 37). Whether M-ficolin would then be recycled or not remains to be investigated. In future studies, the histidine residues that are likely to play a role in the conformational switch could be modified to further investigate their functional implication.

Acknowledgments—We thank the beamline scientists at ESRF for help in the use of X-ray diffraction equipment.

REFERENCES

- Janeway, C. A. (1992) *Immunol. Today* **13**, 11–16
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. B. (1999) *Science* **284**, 1313–1318
- Fujita, T., Matsushita, M., and Endo, Y. (2004) *Immunol. Rev.* **198**, 185–202
- Endo, Y., Liu, Y., and Fujita, T. (2006) *Adv. Exp. Med. Biol.* **586**, 265–279
- Matsushita, M., and Fujita, T. (2001) *Immunol. Rev.* **180**, 78–85
- Endo, Y., Matsushita, M., and Fujita, T. (2007) *Immunobiology* **212**, 371–379
- Lynch, N. J., Roscher, S., Hartung, T., Morath, S., Matsushita, M., Maenel, D. N., Kuraya, M., Fujita, T., and Schwaible, W. J. (2004) *J. Immunol.* **172**, 1198–1202
- Ma, Y. G., Cho, M. Y., Zhao, M., Park, J. W., Matsushita, M., Fujita, T., and Lee, B. L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 25307–25312
- Aoyagi, Y., Adderson, E. E., Min, J. G., Matsushita, M., Fujita, T., Takahashi, S., Okuwaki, Y., and Bohnsack, J. F. (2005) *J. Immunol.* **174**, 418–425
- Krarup, A., Sørensen, U. B., Matsushita, M., Jensenius, J. C., and Thiel, S. (2005) *Infect. Immun.* **73**, 1052–1060
- Kuraya, M., Ming, Z., Liu, X., Matsushita, M., and Fujita, T. (2005) *Immunobiology* **209**, 689–697
- Honoré, C., Hummelshøj, T., Hansen, B. E., Madsen, H. O., Eggleton, P., and Garred, P. (2007) *Arthritis Rheum.* **56**, 1598–1607
- Garlatti, V., Belloy, N., Martin, L., Lacroix, M., Matsushita, M., Endo, Y., Fujita, T., Fontecilla-Camps, J. C., Arlaud, G. J., Thielens, N. M., and Gaboriaud, C. (2007) *EMBO J.* **24**, 623–633
- Kairies, N., Beisel, H. G., Fuentes-Prior, P., Tsuda, R., Muta, T., Iwanaga, S., Bode, W., Huber, R., and Kawabata, S. I. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13519–13524
- Frederiksen, P. D., Thiel, S., Larsen, C. B., and Jensenius, J. C. (2005) *Scand. J. Immunol.* **62**, 462–473
- Liu, Y., Endo, Y., Iwaki, D., Nakata, M., Matsushita, M., Wada, I., Inoue, K., Munakata, M., and Fujita, T. (2005) *J. Immunol.* **175**, 3150–3156
- Teh, C., Le, Y., Lee, S. H., and Lu, J. (2000) *Immunology* **101**, 225–232
- Tanio, M., Kondo, S., Sugio, S., and Kohno, T. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 3889–3895
- Rossi, V., Bally, I., Thielens, N. M., Esser, A. F., and Arlaud, G. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 1232–1239
- Thielens, N. M., Cseh, S., Thiel, S., Vorup-Jensen, T., Rossi, V., Jensenius, J. C., and Arlaud, G. J. (2001) *J. Immunol.* **166**, 5068–5077
- Teillet, F., Dublet, B., Andrieu, J. P., Gaboriaud, C., Arlaud, G. J., and Thielens, N. M. (2005) *J. Immunol.* **174**, 2870–2877
- Collaborative Computational Project 4 (1994) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763
- Kabsch, W. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **53**, 247–255
- Tanio, M., Kondo, S., Sugio, S., and Kohno, T. (2006) *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Crystalliz. Commun.* **62**, 652–655
- Gaboriaud, C., Juanhuix, J., Gruez, A., Lacroix, M., Darnault, C., Pignol, D., Verger, D., Fontecilla-Camps, J. C., and Arlaud, G. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 46974–46982
- Sheriff, S., Chang, C. Y., and Ezekowitz, A. B. (1994) *Nat. Struct. Biol.* **1**, 789–794
- Endo, Y., Nakazawa, N., Liu, Y., Iwaki, D., Takahashi, M., Fujita, T., Nakata, M., and Matsushita, M. (2005) *Immunogenetics* **57**, 837–844
- Carlin, A. F., Lewis, A. L., Varki, A., and Nizet, V. (2007) *J. Bacteriol.* **189**, 1231–1237
- Collins, B. E., Blixt, O., DeSieno, A. R., Bovin, N., Marth, J. D., and Paulson, J. C. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6104–6109
- van Vliet, S. J., Gringhuis, S. I., Geijtenbeek, T. B., and van Kooyk, Y. (2006) *Nat. Immunol.* **7**, 1200–1208
- Geijtenbeek, T. B., Krooshoop, D. J., Bleijs, D. A., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C. G., and van Kooyk, Y. (2000) *Nat. Immunol.* **1**, 353–357
- Runza, V. L., Hehlgans, T., Echtenacher, B., Zahringer, U., Schwaible, W. J., and Mannel, D. N. (2006) *J. Endotoxin Res.* **12**, 120–126
- Wragg, S., and Drickamer, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 35400–35406
- Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., Ichtchenko, K., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Deisenhofer, J. (2002) *Science* **298**, 2353–2358
- Beglova, N., and Blacklow, S. C. (2005) *Trends Biochem. Sci.* **30**, 309–317

Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins

Virginie Garlatti¹, Nicolas Belloy¹, Lydie Martin¹, Monique Lacroix², Misao Matsushita³, Yuichi Endo⁴, Teizo Fujita⁴, Juan Carlos Fontecilla-Camps¹, Gérard J Arlaud², Nicole M Thielens² and Christine Gaboriaud^{1,*}

¹Laboratoire de Cristallographie et Cristallogénèse des Protéines, Grenoble, France, ²Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, CEA; CNRS; Université Joseph Fourier, Grenoble, France, ³Department of Applied Biochemistry, Institute of Glycotechnology, Tokai University, Hiratsuka, Kanagawa, Japan and ⁴Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima, Japan

Innate immunity relies critically upon the ability of a few pattern recognition molecules to sense molecular markers on pathogens, but little is known about these interactions at the atomic level. Human L- and H-ficolins are soluble oligomeric defence proteins with lectin-like activity, assembled from collagen fibers prolonged by fibrinogen-like recognition domains. The X-ray structures of their trimeric recognition domains, alone and in complex with various ligands, have been solved to resolutions up to 1.95 and 1.7 Å, respectively. Both domains have three-lobed structures with clefts separating the distal parts of the protomers. Ca²⁺ ions are found at sites homologous to those described for tachylectin 5A (TL5A), an invertebrate lectin. Outer binding sites (S1) homologous to the GlcNAc-binding pocket of TL5A are present in the ficolins but show different structures and specificities. In L-ficolin, three additional binding sites (S2–S4) surround the cleft. Together, they define an unpredicted continuous recognition surface able to sense various acetylated and neutral carbohydrate markers in the context of extended polysaccharides such as 1,3-β-D-glucan, as found on microbial or apoptotic surfaces.

The EMBO Journal (2007) 26, 623–633. doi:10.1038/sj.emboj.7601500; Published online 11 January 2007

Subject Categories: immunology; structural biology

Keywords: carbohydrate recognition; fibrinogen-like domain; innate immunity; N-acetyl group; X-ray crystallography

Introduction

The ability to discriminate infectious agents from self is intrinsic to innate immunity (Janeway, 1992). This crucial

task is fulfilled by pattern recognition molecules that sense invariant structures exposed at microbial surfaces, such as lipopolysaccharides, peptidoglycans, lipoteichoic acids, mannans, and 1,3-β-D-glucans. Recognition elicits effector mechanisms designed to provide collectively a frontline defence against infection (Hoffmann *et al*, 1999). With a few exceptions such as peptidoglycan and lipopolysaccharide recognition proteins (Guan *et al*, 2005; Kim *et al*, 2005) and various C-type lectins (mannan-binding lectin (MBL) (Takahashi *et al*, 2005), lung surfactant proteins (Shrive *et al*, 2003), and dectin 1 (Adachi *et al*, 2004)), precise structural information about the mechanisms that allow a restricted number of recognition proteins to sense these danger signals is lacking. For all recognition molecules investigated so far, ligand binding involves highly specific interactions. One of the best documented cases is that of MBL (Weis *et al*, 1992), which through its C-type lectin domain recognizes terminal carbohydrates, provided that their hydroxyl groups at positions C3 and C4 are in the equatorial orientation.

One of the major routes of innate host defence in humans, the lectin pathway of complement activation, is triggered through the action of MBL-associated serine protease-2 in response to recognition of neutral carbohydrates and other motifs present on microbial surfaces (Thiel *et al*, 1997; Fujita, 2002; Holmskov *et al*, 2003). Four different pattern recognition molecules initiate this pathway: MBL, L-ficolin, H-ficolin, and M-ficolin (Matsushita and Fujita, 1992; Matsushita *et al*, 2000, 2002; Liu *et al*, 2005; Frederiksen *et al*, 2005). MBL is an oligomer of trimers, with each subunit consisting of a collagen-like domain, a 'neck' region, and a carbohydrate recognition domain of the C-lectin type (Turner, 1996). Ficolins exhibit a similar oligomeric structure, but their collagen-like stalks are followed by a domain homologous to the fibrinogen β and γ chains (Matsushita and Fujita, 2001). L-ficolin/P35 (or ficolin 2) and H-ficolin (or ficolin 3) are serum proteins, whereas M-ficolin (or ficolin 1) is a secretory protein produced by lung and blood cells (Matsushita *et al*, 1996; Sugimoto *et al*, 1998; Liu *et al*, 2005).

L-ficolin was shown to activate the lectin pathway after binding to various capsulated bacteria (Matsushita *et al*, 1996; Lynch *et al*, 2004; Aoyagi *et al*, 2005). A binding specificity for GlcNAc was initially characterized (Matsushita *et al*, 1996, 2000; Le *et al*, 1998), in agreement with the finding that L-ficolin recognizes lipoteichoic acid, a GlcNAc-containing cell wall component characteristic of Gram-positive bacteria (Lynch *et al*, 2004). Binding to a fungal 1,3-β-D-glucan preparation was later reported (Ma *et al*, 2004), whereas further investigations have revealed specificity for N-acetylated carbohydrates and other non-carbohydrate acetylated compounds such as acetylcholine (Krurup *et al*, 2004).

M-ficolin is highly homologous to L-ficolin at the amino-acid sequence level and also shows a marked preference for acetylated compounds (Frederiksen *et al*, 2005; Liu *et al*, 2005). H-ficolin, in contrast, is less closely related to L-ficolin and shows no binding affinity for acetylated derivatives. So

*Corresponding author. Laboratoire de Cristallographie et Cristallogénèse des Protéines, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41, rue Jules Horowitz, Grenoble cedex 1, 38041, France. Tel.: +33 4 38 78 95 99; Fax: +33 4 38 78 51 22; E-mail: christine.gaboriaud@ibs.fr

Received: 2 August 2006; accepted: 31 October 2006; published online: 11 January 2007

far, it has been only reported to bind to *Aerococcus viridans* (Tsujimura *et al*, 2001; Krarup *et al*, 2005).

The above observations indicate that ficolins are not classical lectins and raise questions about their mechanism of action. To answer these questions at the molecular level, we have produced the recombinant recognition domains of L- and H-ficolins and solved their structures by X-ray crystallography, alone and in complex with different ligands. Both proteins are homotrimers of protomers homologous to tachylectin 5A (TL5A), a fibrinogen-like lectin from the invertebrate *Tachypleus tridentatus* (Kairies *et al*, 2001). The structures reveal that L-ficolin has evolved to be a versatile recognition protein able to recognize a variety of acetylated and carbohydrate targets through three different sites, suggesting that ficolins represent novel types of pattern recognition proteins.

Results and discussion

We have determined the three-dimensional structure of the fibrinogen-like recognition domains of human L- and H-ficolins. The segments corresponding to these domains (residues 70–288 and 58–276 of mature L- and H-ficolins, respectively) were expressed in a baculovirus/insect cells system. A single H-ficolin species was produced, with a

mass ranging from 25 932 to 26 231 ± 12 Da, as determined by mass spectrometry, accounting for the polypeptide chain (calculated mass: 25 078 Da) plus a heterogeneous N-linked oligosaccharide (854–1153 ± 12 Da). Two different species were recovered in the case of L-ficolin, a minor species with a mass of 24 906 ± 12 Da corresponding to the unglycosylated form (calculated mass: 24 916.6 Da), and a major one resolved into four peaks ranging from 25 805 to 26 311 ± 12 Da, consistent with the presence of a heterogeneous oligosaccharide with a mass of 888–1394 ± 12 Da. Analysis of the glycosylated L-ficolin species by sedimentation velocity yielded a sedimentation coefficient ($s_{20,w}$) of 5.1 and a molecular mass calculated from s and D (diffusion coefficient) of 68 ± 7 kDa, consistent with a trimer.

Overall structures

Four different crystal forms were generated using the native, glycosylated L-ficolin fragment alone or in the presence of various ligands, and one form was obtained for H-ficolin (Table I). The L-ficolin structure was initially solved by molecular replacement using TL5A (Kairies *et al*, 2001) as a search model and subsequently refined to a resolution up to 1.95 Å. The H-ficolin structure was then solved using L-ficolin as a model and refined at 1.7 Å resolution (see Materials and methods). Crystallographic data collection and refinement

Table I Characteristics of the crystals used in this study^a

Ficolin crystal (form)	Resolution (Å)	R_{work} R_{free} (%)	Ligand ^b concentration (mM)	Site	PDB code ^c
H-1 ^d	2.2	20.1 26.5	None	None	2j64
H-2 ^d	2.35	21.2 25.8	D-Fucose 50 (C)	S1	2j60
H-3 ^d	1.75	22.2 25.9	L-Fucose 50 (C)	S1 ^e	
H-4 ^d	1.7	20.1 23.2	Galactose 25 (C)	S1	2j5z
L-1 (A) ^f	2.5	20.2 25.9	None	S1 ^g	2j3g
L-2 (A) ^f	1.95	17.6 21.0	CysNAc 0.25 (C)	S2	2j1g
L-3 (A) ^f	2.15	18.8 23.7	Galactose 150 (S)	S2 (S3, S4)	2j3u
L-4 (A) ^f	2.35	20.8 24.8	β-Glucan 150 (S)	S3–S4	2j0y
L-5 (A) ^f	2.85	19.6 24.8	ManNAc 10 (S)	S1 ^g S3	2j0g
L-6 (A) ^f	2.85	20.8 27.4	Acetylcholine 1 (C)	S3	2j0h
L-7 (A) ^f	2.8	22.1 27.6	GalNAc 50 (S)	S3	2j3f
L-8 (B) ^h	2.65	22.7 28.2	GlcNAc 10 (C)	S2	2j3o
L-9 (C) ⁱ	2.7	20.6 29.1	GlcNAc 10 (C)	S2	2j61
L-10 (A) ^f	2.8	19.7 26.9	CysNAc 150 (S)	S1 ^g , S2, S3, others	2j2p

^aThe nature of the ligand, its concentration, the protocol used, and the site location of the ligand are detailed, as well as the resolution and $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ refinement statistics. Complete crystallographic statistics are provided in Supplementary Table II.

^bCo-crystallization (C) or soaking (S) experiments.

^cID code in the Protein Data Bank (www.rcsb.org).

^dH-ficolin crystals: P4₁2₁2 $a = b = 62$ Å, $c = 347$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.

^eGlycerol (used for cryoprotection).

^fL-ficolin crystal form A: P3₂, $a = b = 99$ Å, $c = 142$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$.

^gMannose from a neighboring molecule in the crystal (see text and Figure 3C).

^hL-ficolin crystal form B: C2 $a = 200.9$ Å, $b = 84.3$ Å, $c = 144.9$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 124.5^\circ$, $\gamma = 90^\circ$.

ⁱL-ficolin crystal form C: P6₃ $a = 79.5$ Å, $b = 79.5$ Å, $c = 172$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$.

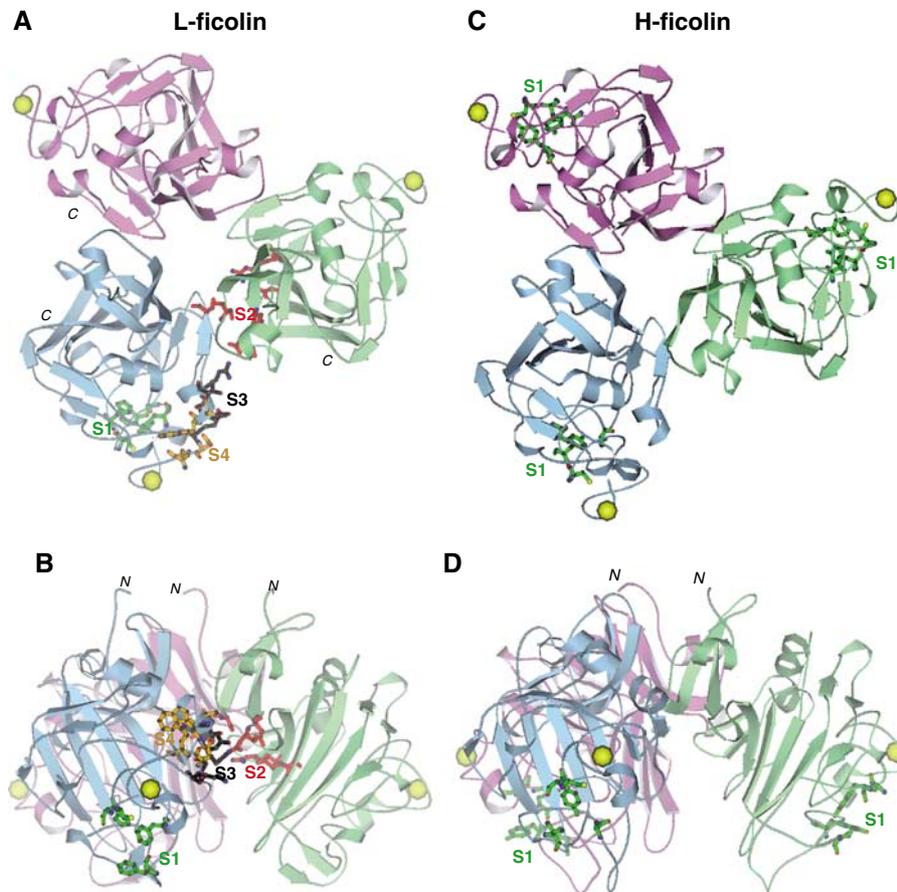


Figure 1 Homotrimeric structure of the recognition domains of human L- and H-ficolins and location of their binding site(s). **(A, B)** L-ficolin structure seen from the target binding surface (bottom view) and on a perpendicular side view. **(C, D)** Corresponding bottom and side views of the H-ficolin structure. The side chains of the binding site residues are displayed as ball and sticks and colored green (S1), red (S2), black (S3), and orange (S4). To enhance clarity of the side view, only one of each representative binding sites is shown on the L-ficolin trimer. N and C indicate the N- and C-terminal ends of each protomer. Ca^{2+} ions are represented as golden spheres. Figure generated using MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

statistics are listed in Supplementary Table II. As expected from the trimeric nature of ficolins (Matsushita and Fujita, 2001) and in agreement with our ultracentrifugation analysis of L-ficolin, both recognition domains formed homotrimers in all crystal forms. The protomers associate as a three-lobed clover-like structure with pseudo-three-fold symmetry (Figure 1). The assemblies have a small central cavity and are rather open, with clefts separating the upper parts of the protomers. Their overall dimensions are 50–55 Å in height and 80 Å in maximum diameter. The N-termini of the three protomers emerge at the base of the trimers (Figure 1B), consistent with the fact that they are connected to a collagen-like triple helix in the intact molecules.

In both proteins, a Ca^{2+} -binding site is found in each protomer, at a position homologous to that of TL5A (Kairies *et al*, 2001), that is, in a loop region that represents the most external part of the trimers. The distances between the Ca^{2+} ions are approximately 65 Å for L-ficolin and 67 Å for H-ficolin (Figure 1A and C). In agreement with mass spectrometry analyses, of the two potential N-glycosylation sites of L-ficolin (Asn215 and Asn275), only the former is occupied by an oligosaccharide chain. In the most favorable case, a segment comprising two *N*-acetyl-glucosamines with a fucose bound to the proximal one and two additional mannoses

could be built into well-defined electron density. The single N-glycosylation site of H-ficolin at Asn166 is clearly also linked to an oligosaccharide, but this could not be defined owing to ill-defined electron density. In both proteins, the carbohydrates are located at the periphery of the trimers.

Protomer topology

The L- and H-ficolin protomers have an ellipsoidal structure similar to that of TL5A and are subdivided into the same three domains (Kairies *et al*, 2001) (Figure 2). In the N-terminal A domain (residues Pro70–Gly116 in L-ficolin), a major difference with TL5A is that the loop connecting strands β 1 and β 2 is shorter and does not exhibit an α -helical conformation (Figure 2A–C). Additionally, this loop is anchored to the N-terminal segment of the domain through a disulfide bond (Cys73–Cys101 in L-ficolin, Cys63–Cys87 in H-ficolin) that is not present in TL5A. The other two disulfide bonds seen in the ficolin structures (Cys80–Cys108 and Cys232–Cys245 in L-ficolin) are homologous to those observed in TL5A (Figure 2).

The larger domain B (residues Trp117–Ala206 and Lys279–Ala288 in L-ficolin) is clamped between domains A and P (Figure 2A and B) and comprises the seven-stranded anti-parallel β -sheet and the two helices (α 4 and α 5) already

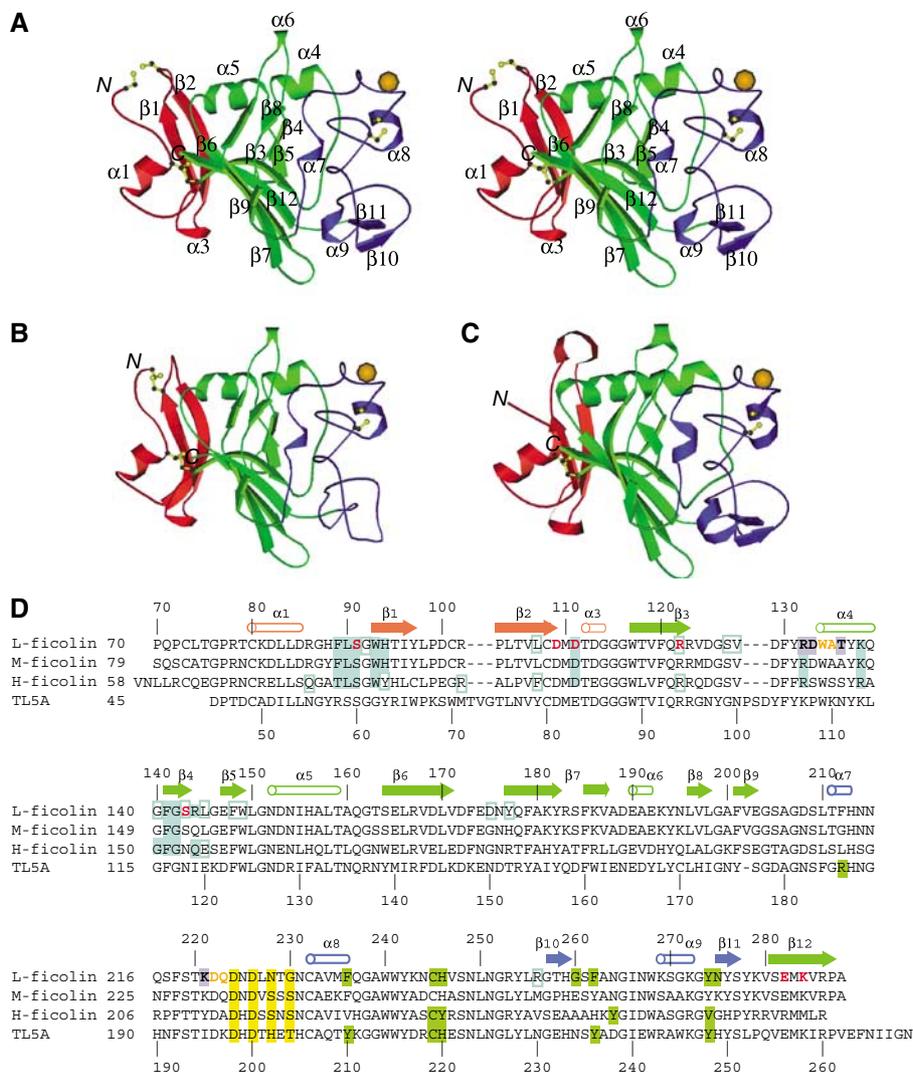


Figure 2 Structure of the fibrinogen-like protomers. (A) Stereo view of the L-ficolin protomer. (B, C) Comparative views of the H-ficolin and TL5A protomers in the same orientation. Domains A, B, and P are colored red, green, and blue, respectively. Disulfide bonds are shown in yellow. N and C indicate the N- and C-terminal ends. Figure generated using MOLSCRIPT. (D) Sequence alignment of the fibrinogen-like domains of L-ficolin, M-ficolin, H-ficolin, and TL5A. Numbers on top and below refer to the L-ficolin and TL5A sequences, respectively. Secondary structure elements are shown in red (A domain), green (B domain), and blue (P domain). The binding site residues are colored using the same code as in Figure 1: green (S1), bold red (S2), black (S3), and bold orange (S4). Residues involved in the inter-subunit interfaces are colored cyan, variable ones being boxed. Residues involved in Ca^{2+} binding in L-ficolin, H-ficolin, and TL5A are displayed in a yellow box.

described in TL5A (Kairies *et al*, 2001). Comparison of L- and H-ficolins with TL5A reveals, however, several significant differences, notably in the loop connecting strand $\beta 3$ to helix $\alpha 4$ (Figure 2A–C). The C-terminal segment following strand $\beta 12$ is also much shorter in the ficolins than in TL5A (Figure 2D).

Domain P of L-ficolin (residues Gly207–Tyr278) comprises three short α -helices ($\alpha 7$ – $\alpha 9$) and a short antiparallel two-stranded β -sheet (strands $\beta 10$, $\beta 11$) similar to those observed in TL5A. In H-ficolin, in contrast, the region corresponding to $\beta 10$, $\alpha 9$, and $\beta 11$ has a strikingly different sequence and shows no defined secondary structure. In this region, the maximal displacement between the polypeptide chains of L- and H-ficolins (about 8 Å) occurs at residues Ser250 (H-ficolin) and Ser260 (L-ficolin). In both proteins, a Ca^{2+} ion is bound to the large loop connecting helices $\alpha 7$ and $\alpha 8$. Coordination in L-ficolin involves two water molecules, both carboxylate oxygens of Asp224, one of the

side-chain oxygens of Asp226, and the main-chain carbonyl oxygens of Asn228 and Gly230. Similarly, the Ca^{2+} coordination in H-ficolin is mediated by two water molecules and residues Asp214, Asp216, Ser218, and Ser220, which contribute ligands in the same way as in L-ficolin. The average bond distance is 2.4 Å, a characteristic value for known Ca^{2+} -binding sites in proteins (Harding, 1999). These sites are very similar to the one described in TL5A, which involves homologous residues (Asp198, Asp200, His202, and Thr204, respectively) (Figure 2D; Kairies *et al*, 2001).

Compared to TL5A, domain A of the ficolins is slightly rotated with respect to the remainder of the structures, with a rotation of approximately 6° about the loop connecting helix $\alpha 3$ to strand $\beta 3$ (Figure 2A). The root mean square deviation (r.m.s.d.) between the two ficolins is 0.74 Å, based on 201 C α atoms, and of about 0.6 Å when domains A, B, and P are superimposed individually. For comparison, the r.m.s.d.

between L-ficolin and the fibrinogen γ fragment (Yee *et al*, 1997) is 1.0 Å, based on 204 C α atoms.

Analysis of inter-subunit interfaces reveals structural plasticity

In both ficolins, the inter-protomer interfaces mainly involve homologous residues located before or within strand β 1 on one side and residues contributed by helix α 4 and strands β 4 on the other. These residues provide a framework common to all interfaces in both proteins, consisting of two hydrogen bonds between the main chain of Ser91 and the main chain of Gly142 and Arg144, a salt bridge between Asp111 and Arg132, and van der Waals contacts between Phe89 and Gln139, and between Leu90 and the main chain of Phe141 and/or Gly142 (L-ficolin numbering). There are several other hydrophobic contacts, such as the one between the side chains of Leu90 and Trp93 of L-ficolin (Leu80 and Trp83 in H-ficolin), which is variable in the former case, but conserved in the latter. H-ficolin also features one additional hydrogen bond between the side chain of Thr79 and the main chain of Ala129. In both proteins, the total buried surface at the three interfaces is approximately 2900 Å². Most of the interface residues of L- and H-ficolins are conserved in M-ficolin, whereas more significant differences are found in TL5A, notably in the regions corresponding to segments Phe89–His94 and Arg144–Gly146 of L-ficolin (Figure 2D).

A striking characteristic of the L-ficolin trimer is the variability of the angle between the A, B, and C protomers. Of the various structures investigated, a single one (L-9) has a true three-fold symmetry axis, with angles of 120° between the protomers. In all other cases, the interfaces, particularly A/B and A/C, are stabilized by a variable number of van der Waals contacts. As a result, the inter-protomer angles vary from 117 to 122°, with maximum rotation amplitudes for protomer A of L-1 and L-6, which diverge from each other by 14°. Interestingly, these rotations do not disrupt the common interaction framework described above, underlying the remarkable plasticity of the inter-protomer interfaces.

Location of the major ligand-binding sites observed in L- and H-ficolins

Several ligands were allowed to bind to the recognition domains of L- and H-ficolins in order to locate their binding site(s) and investigate their mode of interaction. This was

achieved by co-crystallization and/or by soaking crystals into ligand-containing solutions. The refined structure obtained in each case was then compared with the native one, and ligand location was determined from additional electron density.

In the case of H-ficolin, binding was observed only when using galactose and D-fucose, and both carbohydrates were found to bind to site S1. This site lies on the outer side of the trimer, in the vicinity of the Ca²⁺-binding site, and is homologous to the GlcNAc-binding site identified in TL5A (Figures 1 and 2). This external site involves hydrophobic and aromatic residues, namely Cys235, Tyr236, Tyr254, and Val264.

A more extensive structural study using various carbohydrate and non-carbohydrate ligands was performed on L-ficolin (Table I), allowing us to identify three additional binding sites, S2–S4, which together define a new recognition surface, extending on both sides of the cleft in between the upper parts of the protomers (Figure 1). Most of the ligands tested bound at the major sites S2 and/or S3, mainly involving polar and charged residues. The inner site S2 is located close to the inter-protomer interface, and comprises residues Ser91, Asp109, Asp111, Arg122, Glu282, and Lys284 from one protomer and Ser143 from the adjacent protomer. S3 lies on the opposite side of the cleft, at a position intermediate between S2 and the Ca²⁺-binding site, and involves residues Arg132, Asp133, Thr136, and Lys221. S4 is located between S3 and the Ca²⁺-binding site (Figure 1) and comprises both hydrophobic (Trp135, Ala136) and polar (Asp222, Gln223) residues. In our study, it appears to be a minor binding site, as only two different carbohydrate residues were observed at this location.

The external S1 binding site in TL5A and the ficolins

S1 is homologous to both the polymerization pocket of the fibrinogen γ fragment and the GlcNAc-binding pocket of TL5A (Kairies *et al*, 2001). Consequently, it was expected to be involved in ligand recognition in the ficolins. However, comparative analysis of the structures of S1 in TL5A and ficolins L and H reveals some common features but also significant variations in the nature and orientation of the side chains (Figures 2 and 3); thus, these sites differ in ligand specificity. In TL5A, a funnel is delineated by the aromatic residues Tyr210, Tyr236, Tyr248, and His220, the methyl side chain of Ala237 being located at the base (Kairies *et al*, 2001; Figure 3B). This funnel is essentially conserved in L-ficolin

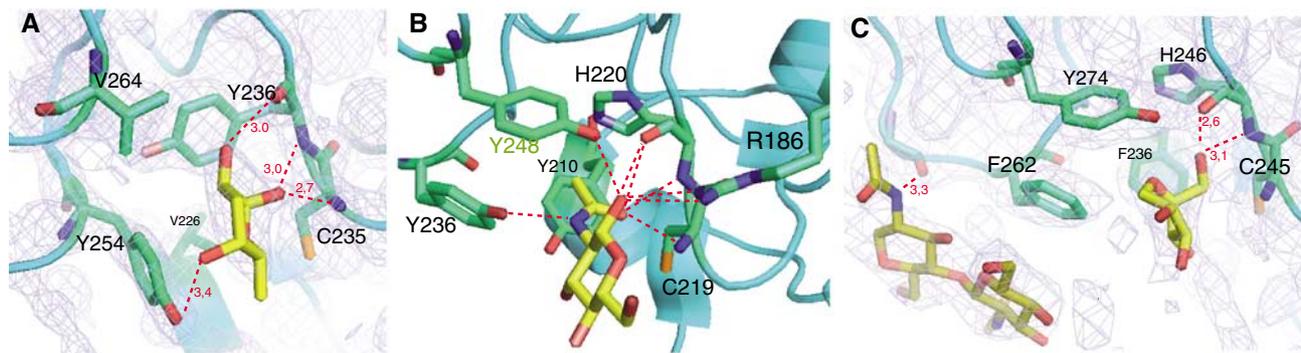


Figure 3 Comparative views of the S1 binding site in H-ficolin, L-ficolin, and TL5A. The side chains of the residues defining S1 are colored green and the ligands are displayed in yellow. (A) D-Fucose bound to H-ficolin. (B) GlcNAc bound to TL5A. (C) The terminal mannose of the oligosaccharide chain from a neighboring molecule positioned in site S1 of L-ficolin. On the left, the two proximal GlcNAc residues of the chain interacting on the edge of the binding site.

(Figure 3C), but it is deeper and reorganized on one side in H-ficolin (Figure 3A). The unusual *cis* conformation of Cys219 seen in TL5A is also found in the homologous residues Cys245 and Cys235 of ficolins L and H. Thus, in each case, the backbone NH group of this Cys residue and the backbone atoms of the following amino acid are properly oriented to provide tight hydrogen bonds to a ligand introduced into the funnel. Nevertheless, whereas in TL5A S1 appears specifically designed to bind GlcNAc, this is not true in the ficolins. Two major structural differences account for this: (i) Tyr236, which in TL5A stabilizes the acetamido nitrogen of GlcNAc through its hydroxyl group, is not conserved in the ficolins; (ii) similarly, the side chains of Arg186 and Tyr210, which participate in the recognition of the sugar ring in TL5A, are not present in the ficolins (Figure 3).

In the case of H-ficolin, the best defined electron density in site S1 was observed using D-fucose as a ligand (Figure 3A). The interaction mainly involves three H-bonds between the conserved backbone atoms of the Cys235–Tyr236 segment mentioned above, and two consecutive hydroxyl groups (1-OH and 2-OH) of the sugar ring. Another interaction, involving also the Cys235–Tyr236 segment, was observed for galactose. In contrast, no interaction could be detected using L-fucose, in full agreement with previous competition experiments (Sugimoto *et al*, 1998).

In the case of L-ficolin, none of the tested ligands was observed in S1. In contrast, the edge of site S1 was consistently involved in the packing of crystal form A by binding the two proximal GlcNAc residues of the oligosaccharide chain of a neighboring molecule (Figure 3C), through hydrogen bonds and van der Waals contacts with residues Gly260 and Phe262. Very well-defined electron density was always observed for these interacting carbohydrate residues. In some cases, an additional electron density, interpretable as a terminal mannose residue from this chain, was observed inside the S1 funnel (Figure 3C). Again, the interaction involved two H-bonds between the backbone atoms of His246 and the 6-OH group of the mannose ring. These packing interactions with carbohydrates in form A of L-ficolin likely reflect a significant affinity for oligosaccharides in this area. Further investigations will be required to establish its physiological significance.

L-ficolin recognizes galactose and 1,3- β -D-glucan in a highly specific manner

Very well-defined electron densities were observed in the other sites for two neutral carbohydrates ligands, galactose and the linear oligosaccharide 1,3- β -D-glucan, likely reflecting a single, highly specific recognition mode for each ligand. Galactose was tested as a ligand for L-ficolin after analyses by surface plasmon resonance spectroscopy indicated that both recombinant human L-ficolin (Hummelshoj *et al*, 2007) and purified human L-ficolin (NM Thielens, unpublished data) bind to immobilized galactose–BSA with high affinity ($K_D = 0.8$ nM). Galactose mostly binds to S2, although minor binding to S4 as part of crystal packing interactions was also observed (Table I). All the oxygen atoms of the carbohydrate ring are stabilized in site S2 through one or two hydrogen bonds (Figure 4A). These bonds involve the carboxyl groups of Glu282 and Asp109 (2-OH, 3-OH, and 4-OH), the hydroxyl groups of Ser91 (4-OH) and Ser143 (O5), and the carboxyl group of Asp111 (6-OH). The 1-OH group interacts

with a water molecule that is oriented toward the solvent channel, in a position that mimics a link to a carbohydrate chain (Figure 4A). Consequently, it is tempting to postulate that site 2 provides a recognition pocket for the terminal galactose residue of a linear oligosaccharide chain.

Another nicely defined electron density was obtained for the linear oligosaccharide β -D-glucan (Figure 4G and H), composed of four glucose units linked through covalent β -1-3 bonds. L-ficolin was shown to be the only serum protein able to bind specifically to 1,3- β -D-glucan, a molecular marker of yeast and fungal cell walls (Ma *et al*, 2004). It should be emphasized that this is the first experimental description of the interface between a 1-3- β -D-glucan and a recognition protein. The first three glucose units of the molecule are roughly arranged in a linear fashion, and bind to L-ficolin through interactions spanning sites S3 and S4, forming a network of direct and water-mediated hydrogen bonds tightly stabilizing each of their 2-OH groups (Figure 4G). A curvature in the molecule then allows Glc4 to bind to site S4 through a stacking interaction with the side chain of Trp134 (Figure 4H). Further stabilization of the 4-OH group of Glc4 is provided by a network of hydrogen bonds involving the side-chain carbonyl group of Gln223 and a Ca^{2+} ion, mainly coordinated by water molecules, bound at the edge of site S4 (Figure 4H).

L-ficolin binds to a wide range of small acetylated ligands in a variety of orientations

Various acetylated compounds were also tested as ligands of L-ficolin (Table I). GlcNAc binding was initially described for L-ficolin (Matsushita *et al*, 1996, 2000; Le *et al*, 1998), and K_D values in the low nanomolar range were determined for both recombinant and purified human L-ficolin using GlcNAc–BSA (Hummelshoj *et al*, 2007; NM Thielens, unpublished data). In addition, a variety of N-acetylated carbohydrates (GlcNAc, GalNAc, ManNAc) and other non-carbohydrate acetylated compounds (GlyNAc, CysNAc, acetylcholine) were shown to inhibit efficiently the binding of L-ficolin to GlcNAc–Sepharose beads and to *Streptococcus pneumoniae* (Krarup *et al*, 2004).

Binding of only two acetylated compounds, N-acetylcysteine (CysNAc) and GlcNAc, was observed in site S2 (Figure 4B and C) and the acetyl group was not recognized the same way in the two cases. Moreover, different orientations could be modelled for the same ligand on different protomers or in different crystal forms. Indeed, the particular topology of site S2, with charged or polar side chains arranged in a ring-like fashion (Figure 4B and C), provides alternative interaction sites for the N-acetyl group, resulting in the observed binding versatility of these small ligands. Moreover, the shape of the S2 cavity can be very slightly modulated by the above-mentioned plasticity at the inter-protomer interfaces.

Most of the acetylated ligands tested bind to site S3 (Figure 4D–F). As the acetyl group is the only common feature of these molecules, its binding would be expected to be similar in all cases. However, although the acetyl moiety of all these ligands binds to the backbone nitrogen of Asp133, indicating some sort of specificity, the interaction is not strictly conserved (Figure 4F). Thus, the different molecules are observed in a variety of orientations, these small ligands lacking any other common mode of interaction. Acetylcholine is an exception to this pattern because a well-defined electron

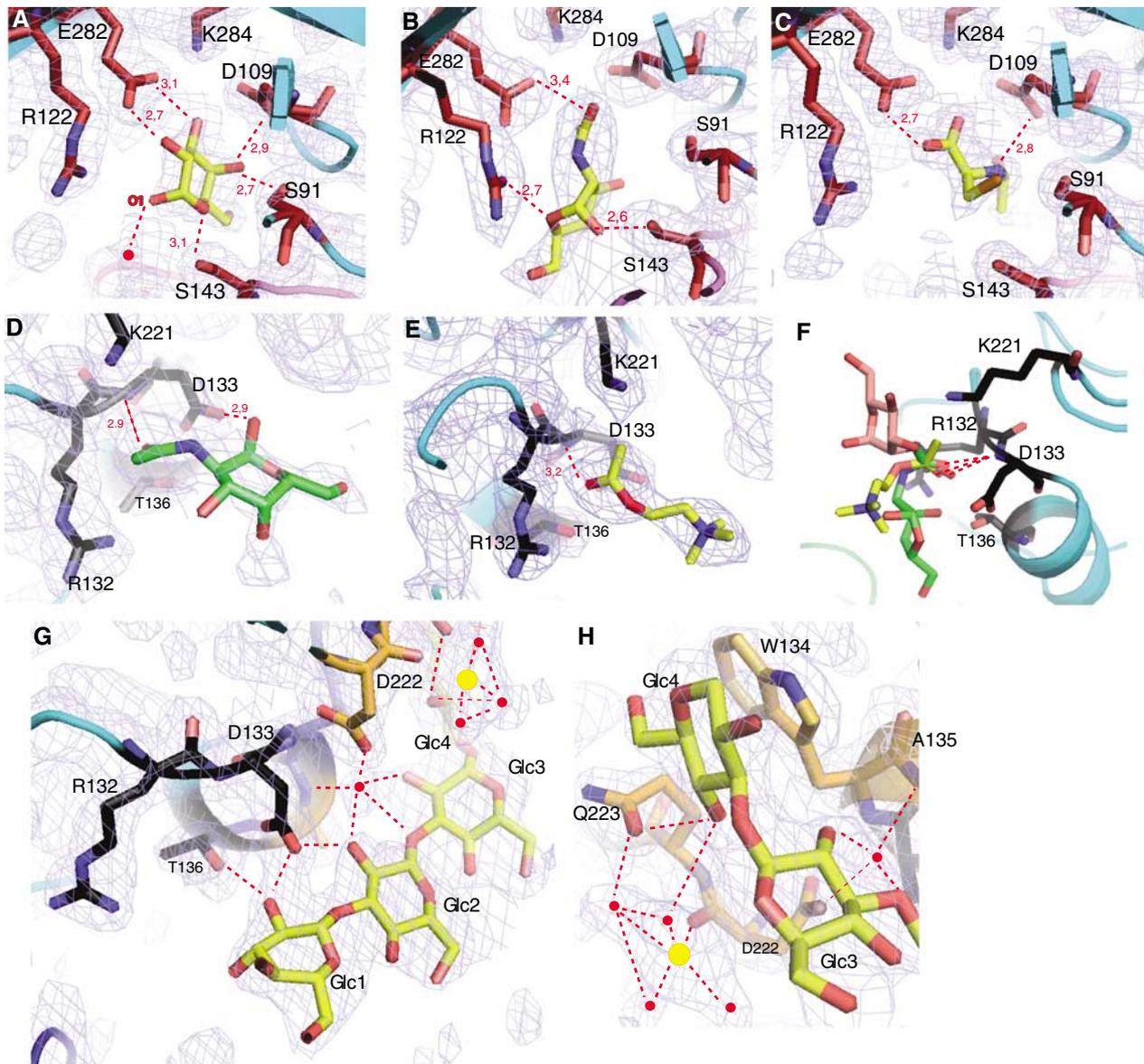


Figure 4 The novel binding sites identified in L-ficolin. (A–C) Interaction of galactose, GlcNAc, and N-acetylcysteine (CysNAc) in site S2. The interaction of galactose O6 with D111, at the back of the binding pocket, is not visible on this orientation. (D) Detailed view of the interaction of GalNAc in S3. (E) Binding of acetylcholine to site S3. (F) Superimposition of different acetylated ligands bound to site S3. Three molecules have been selected for clarity purposes, showing both medium and extreme orientations. The common acetyl group interaction is highlighted with dashed lines. Acetylcholine, GalNAc, and ManNAc are shown in yellow, green, and pink, respectively. A more extensive superimposition of the different acetylated molecules bound to site S3 is provided as Supplementary data. (G) Interaction of the first three glucose units of 1,3-β-D-glucan with residues from sites S3 (black) and S4 (orange). (H) A different view of the binding of 1,3-β-D-glucan, showing interaction of Glc3 and Glc4 with residues from sites S3 (black) and S4 (orange). Polar interactions are represented by dashed red lines. Water molecules are shown as red dots and the calcium ion is represented by a yellow sphere.

density, defining a single orientation, was observed at low ligand concentrations (Figure 4E). This is most likely due to the relative rigidity of this molecule compared to acetylated carbohydrates such as GalNAc (Figure 4D).

Thus, in sharp contrast with the highly specific GlcNAc recognition observed in TL5A (Kairies *et al*, 2001), the established specificity of L-ficolin for acetylated compounds is not explained by a single mode of interaction at the atomic level. Instead, recognition of these molecules appears to involve minimal structural requirements for the acetyl group, and virtually no requirement for the remainder of the molecule. Nevertheless, this seems consistent with the ability of L-ficolin to accommodate a wide range of small

acetylated compounds (Krarup *et al*, 2004). This is also likely to reflect the ability of L-ficolin to accommodate, through different subsites, acetylated markers (units) within larger physiological ligands. In this regard, it is interesting to note that the first glucose residue of the elongated β-glucan molecule binds to the edge of site S3, a position that could also accommodate a GlcNAc residue with its acetyl group stabilized into this site (Figure 4G and D).

Ficolins as novel types of pattern recognition molecules

After C1q and MBL, L- and H-ficolins provide additional examples of multivalent recognition molecules that sense molecular patterns on microbial or apoptotic surfaces by

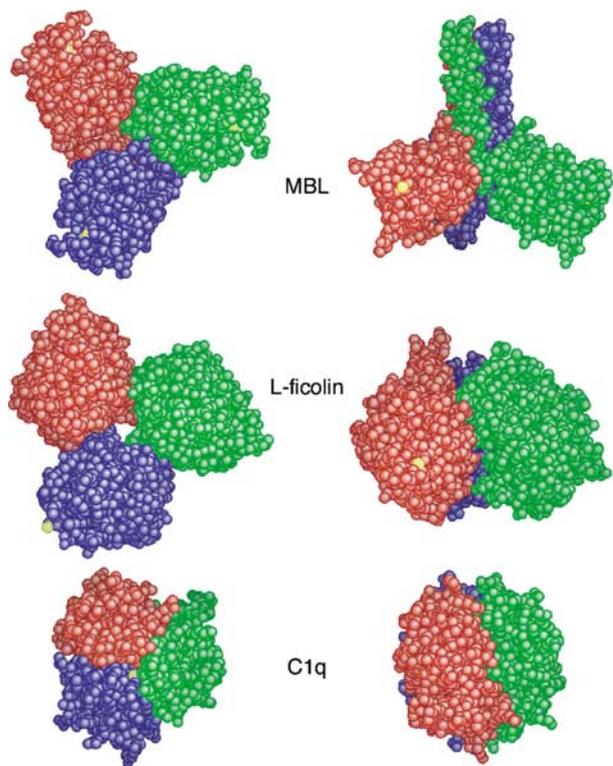


Figure 5 Comparative views of the trimeric recognition domains of MBL, L-ficolin, and C1q. Space-filling bottom views (left) and side views (right) are shown. Ca^{2+} ions are represented as yellow spheres. Figure generated using GRASP (Nicholls *et al*, 1991).

means of a trimeric ligand-binding domain. As illustrated in Figure 5, the semi-open ficolin structure is intermediate between the compact assembly seen in the complement protein C1q (Gaboriaud *et al*, 2003), where subunits associate through an extensive interface (total buried surface = 5490 \AA^2), and the widely open structure of the MBL carbohydrate recognition domain (Sheriff *et al*, 1994; Weis and Drickamer, 1994), which trimerizes through a triple α -helical neck region, with minimal interaction between the carbohydrate recognition domains (buried surface = 426 \AA^2). In this respect, it is noteworthy that, contrary to what was generally believed based on amino-acid sequence analyses (Fujita, 2002), L- and H-ficolins do not contain a neck region. This likely also applies to M-ficolin, which, as judged from conservation of the residues involved in inter-subunit interfaces (Figure 2), is expected to retain the trimeric structure observed in L- and H-ficolins.

Whereas the recognition properties of MBL involve highly specific hydrogen bonding interactions with only the hydroxyl groups at positions C3 and C4 of a terminal carbohydrate residue (Weis *et al*, 1992), a pronounced plasticity of recognition is observed in the case of L-ficolin. By investigating the structural basis for this unusual recognition versatility, we have identified a novel extended recognition area, located around the cleft between the ficolin subunits. This area can be subdivided into different contiguous subsites (S2–S3–S4). The resulting binding groove is reminiscent of the one observed in the peptidoglycan recognition proteins (Chang *et al*, 2006; Lim *et al*, 2006), and thus seems appropriately shaped to bind extended polysaccharides. This is illustrated

by the structure of the complex between L-ficolin and 1,3- β -D-glucan, which reveals how the tetrasaccharide is coordinated by a series of interactions involving residues contributed by both S3 and S4.

Interestingly, each of these recognition proteins seems to complement the recognition spectrum of the others. For example, the external S1 site in H-ficolin will bind galactose or D-fucose, which are not recognized by MBL. On the other hand, GlcNAc is a marker that can be recognized by both MBL and L-ficolin, but in different contexts, namely at the tip or inside elongated oligosaccharide molecules, respectively.

Implications for the recognition of microbial and apoptotic surfaces by ficolins

Although the precise molecular nature of the physiological ligands of ficolins remains poorly characterized, especially in the case of H-ficolin, the present study brings new insights into the molecular markers they can recognize. Obviously, if these markers are exposed onto the target surfaces, they will contribute to the recognition process. Conversely, their absence will prevent or reduce binding. In this respect, it is noteworthy that D-fucose was recently identified in a bacterial surface layer glycan (Kählig *et al*, 2005). Thus, the very narrow spectrum of microbial targets identified for H-ficolin (Krarup *et al*, 2005) may be related to its restricted specificity toward galactose and D-fucose, and not to L-fucose or to acetylated carbohydrates, which are frequent microbial markers.

L-ficolin has been clearly implicated in the opsonophagocytosis of type III group B streptococci (Aoyagi *et al*, 2005). The polysaccharide capsular antigen of the latter shows an elongated structure, comprising GlcNAc residues not in a terminal position, but also various β -1-3 and β -1-4 links between glucose and galactose rings (Kadirvelraj *et al*, 2006). The present study strongly suggests that L-ficolin is designed to bind such elongated carbohydrates, presenting a number of acetylated and neutral residues. Another example arises from the known specific binding of L-ficolin to lipoteichoic acid, a cell wall component found in all Gram-positive bacteria (Lynch *et al*, 2004), which is also an elongated GlcNAc-containing molecule. Like other 1,3- β -D-glucan-recognizing proteins, L-ficolin is likely to bind to the surfaces of yeast or other fungal cells, but also to some bacterial surfaces (Wang *et al*, 2006). Moreover, as the interaction between L-ficolin and 1,3- β -D-glucan does not involve the C4 hydroxyl groups of the latter, a similar interaction could also be extrapolated to poly-1,3- β -D-galactosyl polysaccharide determinants, which are for instance virulence factors on *Leishmania major* parasites (Pelletier *et al*, 2003). In the same way, it would be interesting to investigate whether L-ficolin is able to bind to plasmodium surface glycoproteins, which expose a terminal galactose (Ramasamy and Reese, 1986).

As for the recognition of apoptotic cells by ficolins (Kuraya *et al*, 2005), it is interesting to note that recent studies have described the specific exposure at the apoptotic cell surface of phagocytic markers such as galactose (Bilyy *et al*, 2004; Yuita *et al*, 2005) or GlcNAc (Orlando and Pittman, 2006), which are shown here to be ligands of H- or L-ficolins.

In conclusion, the present study reveals how L- and H-ficolins have evolved different binding sites, explaining their very different recognition spectra. We have discovered an

extended binding surface area on L-ficolin and shown the recognition plasticity of some of its subsites. Based on the nature of its known physiological ligands, we conclude that L-ficolin functions as a sensor of acetylated and neutral carbohydrate markers within extended polysaccharide structures.

Materials and methods

Protein expression and purification

The DNA segments encoding residues 70–288 and 58–276 of mature human L- and H-ficolins were amplified using Vent_R polymerase and the PCR-Bac-P35 and pGEM-T easy plasmids containing the full-length cDNAs (Matsushita *et al*, 1996) as templates, according to established procedures. Both segments start at the first residue following the collagen-like sequence and end at the C-terminus of the protein. The amplified DNAs were cloned in-frame with the melittin signal peptide of the pNT-Bac baculovirus transfer vector (Rossi *et al*, 1998), and the recombinant baculoviruses were generated using the Bac-to-BacTM system (Invitrogen Corp.), amplified, and titrated as described previously (Thielens *et al*, 2001). High Five cells were infected with the recombinant viruses for 96 h at 27°C. L-ficolin was purified from the culture supernatant by ion-exchange chromatography on a Q-Sepharose Fast Flow column (Amersham Biosciences) equilibrated in 50 mM triethanolamine-HCl, pH 8.0, using a linear gradient to 250 mM NaCl. H-ficolin was passed through a DEAE-cellulose DE52 column (Whatman) equilibrated in 5 mM CaCl₂ and 50 mM triethanolamine-HCl, pH 8.0. The flow-through fraction was dialyzed against 5 mM CaCl₂ and 50 mM MES, pH 5.8, and further purified by ion-exchange chromatography on an S-Sepharose Fast Flow column (Amersham Biosciences) equilibrated in the same buffer, using a linear NaCl gradient as described above.

Ultracentrifugation and mass spectrometry analyses

Sedimentation velocity analysis was performed at 42 000 r.p.m. and 20°C using a Beckman XL-I analytical ultracentrifuge as described previously (Zundel *et al*, 2004). The sedimentation (*s*) and diffusion (*D*) coefficients were estimated using the SEDFIT program (<http://www.analyticalcentrifugation.com>) as described by Lacroix *et al* (2001). The partial specific volume was estimated from the amino-acid composition at 0.714 ml/g using the SEDNTERP program (<http://www.rasmb.bbri.org>), which was also used for calculation of the corrected *s*_{20,w} value. Mass spectrometry analysis was performed using the matrix-assisted laser desorption ionization technique on a voyager Elite XL instrument (PerSeptive Biosystems, Cambridge, MA) under conditions described previously (Lacroix *et al*, 1997).

Crystallization and data collection

Recombinant L-ficolin was concentrated to 5.7 mg/ml in 145 mM NaCl and 50 mM triethanolamine-HCl, pH 7.4. Native crystals (form A) suitable for X-ray data collection were obtained at 20°C by the hanging drop vapor diffusion method by mixing equal volumes (2 µl) of the protein solution and of a reservoir solution composed of 15% (w/v) PEG 8000, 200 mM Ca acetate, and 0.1 M Hepes, pH 7.0. Cryoprotection was achieved by adding 1 µl of PEG 400 to the drop, just before flash-cooling the crystal in liquid nitrogen.

Most of the L-ficolin–ligand complexes listed in Table I were obtained in the A crystal form, by either co-crystallization and/or soaking experiments. The best diffracting crystals (L-2, 1.95 Å resolution) were obtained by co-crystallization with CysNAc. Micro-seeding experiments were then performed using these crystals to generate native crystals of higher and more reproducible quality. These native crystals were then soaked overnight in 150 mM ligand-containing solutions to obtain the galactose (L-3), β-glucan (L-4), and CysNAc (L-10) complexes X-ray data sets. L-ficolin–GlcNAc complexes were obtained in two other crystal forms. These were prepared by adding 10 mM GlcNAc and 1 mM CaCl₂ to the concentrated protein solution. The reservoir solution contained 0.9–0.95 M sodium succinate, pH 6.5 (form C) or pH 7.0 (form B),

and 1 mM phosphoglycerate in the case of form C. Cryoprotection solutions were 1.05 M Na succinate, pH 7.0, 10 mM GlcNAc, 10 mM Ca acetate, 24% glycerol (form B) and 1 M Na succinate, pH 6.5, 1 mM phosphoglycerate, 22% glycerol (form C). Several L-ficolin crystals were obtained in a fourth crystal form D, of space group P222₁ (*a* = 109 Å, *b* = 130 Å, *c* = 268 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) with four trimers per asymmetric unit.

H-ficolin was concentrated to 3 mg/ml in the presence of 100 mM non-detergent sulfobetain 195. The hanging drop vapor diffusion method was used with a reservoir containing 21–26% PEG 6000, 0.1 M Tris-HCl pH 8 or 8.5, and 20 mM CaCl₂. The ligands were introduced also in the reservoir solution in increasing concentrations up to 25 mM for galactose and 50 mM for fucose. Cryoprotection was achieved using paratone oil (crystal form H-4) or by adding 20% glycerol (H-1 to H-3).

Measurements were performed at ESRF beamlines ID14, ID23, ID29, BM16, and BM30 (see Supplementary Table II). Diffraction images were processed using the program XDS (Kabsch, 1993). Complete crystallographic data statistics are listed in Supplementary Table II. The different cell parameters and space groups are also provided in Table I.

Structure determination and refinement

The structures of L-ficolin and H-ficolin were solved by molecular replacement with AMoRe (Navaza, 2001), first using the TL5A structure (PDB code 1JC9) as a search model to solve the L-ficolin structure and then using the latter. Model rebuilding was performed using the graphics programs O (Jones *et al*, 1991) and Coot (Emsley and Cowtan, 2004). Initial refinement of the first L-ficolin models was carried out with CNS (Brünger *et al*, 1998). The last refinement steps were carried out with Refmac5 (Murshudov *et al*, 1997), using the Arp procedure (Lamzin and Wilson, 1997) to introduce the water molecules. The quality of the map allowed construction of at least 213 residues (segment 76–288) out of the 219 residues of the recombinant fragment (70–288). The N-terminal extremity of the H-ficolin fragment 58–276 is disordered, the model starting at residues 63–66. The N-terminal extremity exhibits different conformations depending on the crystal environment, and was only fully defined in molecule A of the L-ficolin B crystal form. Residue Cys245 and Cys235 are in the *cis* configuration in L- and H-ficolin, respectively. TLS refinement was used for most of the L-ficolin models, and non-crystallographic symmetry constraints were introduced for data sets at a resolution lower than 2.5 Å. Molecule A in crystal form A was often partially ill-defined in its most external part because of its subtle rotational freedom in the trimer (see text about the structural plasticity of the trimeric interface). The diffraction data sets obtained with the D crystal form were used to check qualitatively the position and content of the binding sites in a different crystal packing environment but the corresponding models were not extensively refined. Consequently, they have not been included in Table I.

Data deposition

The atomic coordinates for crystal nos. H-1, H-2, H-3, and L-1 to L-10 have been deposited in the Protein Data Bank (www.rcsb.org), as listed in Table I.

Supplementary data

Supplementary information is available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

Acknowledgements

We thank Jordi Juanhuix for his contribution to the initial stages of this work, Christine Ebel and Bernard Dublet for their help with ultracentrifugation and mass spectrometry analyses, Jean-Baptiste Reiser for scientific and computing advices, Stéphanie Combe for generating recombinant baculoviruses, and the beamline scientists at the ESRF for their help with the use of X-ray diffraction equipment. This work was supported by the Commissariat à l'Énergie Atomique, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Joseph Fourier, Grenoble, and the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-05-MIIM-023-01).

References

- Adachi Y, Ishii T, Ikeda Y, Hoshino A, Tamura H, Aketagawa J, Tanaka S, Ohno N (2004) Characterization of beta-glucan recognition site on C-type lectin, dectin 1. *Infect Immun* **72**: 4159–4171
- Aoyagi Y, Adderson EE, Min JG, Matsushita M, Fujita T, Takahashi S, Okuwaki Y, Bohnsack JF (2005) Role of L-ficolin/mannose-binding lectin associated serine protease complexes in the opsonophagocytosis of type III group B streptococci. *J Immunol* **174**: 418–425
- Bilyy RO, Antonyuk VO, Stoika RS (2004) Cytochemical study of role of α -D-mannose- and β -D-galactose-containing glycoproteins in apoptosis. *J Mol Histol* **35**: 829–838
- Brünger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL (1998) Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D* **54**: 905–921
- Chang CI, Chelliah Y, Borek D, Mengin-Lecreux D, Deisenhofer J (2006) Structure of tracheal cytotoxin in complex with a heterodimeric pattern-recognition receptor. *Science* **311**: 1761–1764
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D* **60**: 2126–2132
- Frederiksen PD, Thiel S, Larsen CB, Jensenius JC (2005) M-ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement. *Scand J Immunol* **62**: 462–473
- Fujita T (2002) Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **2**: 346–353
- Gaboriaud C, Juanhuix J, Gruez A, Lacroix M, Darnault C, Pignol D, Verger D, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ (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
- Guan R, Roychowdury A, Ember B, Kumar S, Boons GJ, Mariuzza RA (2005) Crystal structure of a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in complex with a muramyl tripeptide from Gram-positive bacteria. *J Endotoxin Res* **11**: 41–46
- Harding M (1999) The geometry of metal-ligand interactions relevant to proteins. *Acta Crystallogr D* **55**: 1432–1443
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313–1318
- Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC (2003) Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol* **21**: 547–578
- Hummelshoj T, Thielens NM, Madsen HO, Arlaud GJ, Sim RB, Garred P (2007) Molecular organization of human ficolin-2. *Mol Immunol* **44**: 401–411
- Janeway CA (1992) The immune system evolved to discriminate infectious nonself from non-infectious self. *Immunol Today* **13**: 11–16
- Jones TA, Zou JY, Cowan SW, Kjeldgaard M (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A* **47**: 110–119
- Kabsch W (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Crystallogr* **26**: 795–800
- Kadirvelraj R, Gonzalez-Outerino J, Foley BL, Beckham ML, Jennings HJ, Foote S, Ford MG, Woods RJ (2006) Understanding the bacterial polysaccharide antigenicity of *Streptococcus agalactiae* versus *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 8149–8154
- Kählig H, Kolarich D, Zayni S, Scheberl A, Kosma P, Schaffer C, Messner P (2005) N-acetylmuramic acid as capping element of alpha-D-fucose-containing S-layer glycoprotein glycans from *Geobacillus tepidamans* GS5-97 T. *J Biol Chem* **280**: 20292–20299
- Kairies N, Beisel HG, Fuentes-Prior P, Tsuda R, Muta T, Iwanaga S, Bode W, Huber R, Kawabata SI (2001) The 2.0-Å crystal structure of tachylectin 5A provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 13519–13524
- Kim J-I, Lee CJ, Jin MS, Lee C-H, Paik S-G, Lee H, Lee J-O (2005) Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signalling. *J Biol Chem* **280**: 11347–11351
- Krurup A, Sorensen UB, Matsushita M, Jensenius JC, Thiel S (2005) Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-Ficolin and H-Ficolin. *Infect Immun* **73**: 1052–1060
- Krurup A, Thiel S, Hansen A, Fujita T, Jensenius JC (2004) L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. *J Biol Chem* **279**: 47513–47519
- Kraulis PJ (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Crystallogr* **24**: 946–950
- Kuraya M, Ming Z, Liu X, Matsushita M, Fujita T (2005) Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. *Immunobiology* **209**: 689–697
- Lacroix M, Ebel C, Kardos J, Dobo J, Gal P, Zavodszky P, Arlaud GJ, Thielens NM (2001) Assembly and enzymatic properties of the catalytic domain of human complement protease C1r. *J Biol Chem* **276**: 36233–36240
- Lacroix M, Rossi V, Gaboriaud C, Chevallier S, Jaquinod M, Thielens NM, Gagnon J, Arlaud GJ (1997) Structure and assembly of the catalytic region of human complement protease C1r: a three-dimensional model based on chemical cross-linking and homology modelling. *Biochemistry* **36**: 6270–6282
- Lamzin VS, Wilson KS (1997) Automated refinement for protein crystallography. *Methods Enzymol* **277**: 269–305
- Le Y, Lee SH, Kon OL, Lu J (1998) Human-L-ficolin: plasma levels, sugar specificity, and assignment of its lectin activity to the fibrinogen-like (FBG) domain. *FEBS Lett* **425**: 367–370
- Lim JH, Kim MS, Kim HE, Yano T, Oshima Y, Aggarwal K, Goldman WE, Silverman N, Kurata S, Oh BH (2006) Structural basis for the preferential recognition of diaminopimelic acid-type peptidoglycan by a subset of peptidoglycan recognition proteins. *J Biol Chem* **281**: 8286–8295
- Liu Y, Endo Y, Iwaki D, Nakata M, Matsushita M, Wada I, Inoue K, Munakata M, Fujita T (2005) Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. *J Immunol* **175**: 3150–3156
- Lynch NJ, Roscher S, Hartung T, Morath S, Matsushita M, Maennel DN, Kuraya M, Fujita T, Schwaebler WJ (2004) L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of Gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement. *J Immunol* **172**: 1198–1202
- Ma YG, Cho MH, Zhao M, Park JW, Matsushita M, Fujita M, Lee B (2004) Human mannan-binding lectin and L-ficolin function as specific pattern recognition proteins in the lectin pathway of complement. *J Biol Chem* **279**: 25307–25312
- Matsushita M, Endo Y, Fujita T (2000) Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannan-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* **164**: 2281–2284
- Matsushita M, Endo Y, Taira S, Sato Y, Fujita T, Ichikawa N, Nakata M, Mizuochi T (1996) A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J Biol Chem* **271**: 2448–2454
- Matsushita M, Fujita T (1992) Activation of the classical complement pathway by mannan-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* **176**: 1497–1502
- Matsushita M, Fujita T (2001) Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol Rev* **180**: 78–85
- Matsushita M, Kuraya M, Hamasaki N, Tsujimura M, Shiraki H, Fujita T (2002) Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen). *J Immunol* **168**: 3502–3506
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D* **53**: 247–255
- Navaza J (2001) Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr D* **57**: 1367–1372
- Nicholls A, Sharp KA, Honig B (1991) Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11**: 281–296
- Orlando KA, Pittman RN (2006) Rho kinase regulates phagocytosis, surface expression of GlcNAc, and Golgi fragmentation of apoptotic PC12 cells. *Exp Cell Res* **312**: 3298–32311
- Pelletier I, Hashidate T, Urashima T, Nishi N, Nakamura T, Futai M, Arata Y, Kasai K, Hirashima M, Hirabayashi J, Sato S (2003) Specific recognition of *Leishmania major* poly-beta-galactosyl epitopes by galectin-9: possible implication of galectin-9 in interaction between *L. major* and host cells. *J Biol Chem* **278**: 22223–22230

- Ramasamy R, Reese RT (1986) Terminal galactose residues and the antigenicity of *Plasmodium falciparum* glycoproteins. *Mol Biochem Parasitol* **19**: 91–101
- Rossi V, Bally I, Thielens NM, Esser AF, Arlaud GJ (1998) Baculovirus-mediated expression of truncated modular fragments from the catalytic region of human complement serine protease C1s. Evidence for the involvement of both complement control protein modules in the recognition of the C4 protein substrate. *J Biol Chem* **273**: 1232–1239
- Sheriff S, Chang CY, Ezekowitz AB (1994) Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple α -helical coiled-coil. *Nat Struct Biol* **1**: 789–794
- Shrive AK, Tharia HA, Strong P, Kishore U, Burns I, Rizkallah PJ, Reid KB, Greenhough TJ (2003) High-resolution structural insights into ligand binding and immune cell recognition by human lung surfactant protein D. *J Mol Biol* **331**: 509–523
- Sugimoto R, Yae Y, Akaiwa M, Kitajima S, Shibata Y, Sato H, Hirata J, Okochi K, Izuhara K, Hamasaki N (1998) Cloning and characterization of the hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family. *J Biol Chem* **273**: 20721–20727
- Takahashi K, Ip WKE, Michelow IC, Ezekowitz RAB (2005) The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Curr Opin Immunol* **17**: 1–8
- Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaeble W, Laursen SB, Poulsen K, Willis AC, Eggleton P, Hansen S, Holmskov U, Reid KBM, Jensenius JC (1997) A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* **386**: 506–510
- Thielens NM, Cseh S, Thiel S, Vorup-Jensen T, Rossi V, Jensenius JC, Arlaud GJ (2001) Interaction properties of human mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases-1 and -2, MBL-associated protein 19, and MBL. *J Immunol* **166**: 5068–5077
- Tsujimura M, Ishida C, Sagara Y, Miyazaki T, Murakami K, Shiraki H, Okochi K, Maeda Y (2001) Detection of a serum thermolabile β -2 macroglycoprotein (hakata antigen) by enzyme-linked immunosorbent assay using polysaccharide produced by *Aerococcus viridans*. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**: 454–459
- Turner MW (1996) Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* **17**: 532–540
- Wang X, Rocheleau TA, Fuchs JF, Christensen BM (2006) Beta 1, 3-glucan recognition protein from the mosquito, *Armigeres subalbatus*, is involved in the recognition of distinct types of bacteria in innate immune responses. *Cell Microbiol* **8**: 1581–1590
- Weis WI, Drickamer K (1994) Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure* **2**: 1227–1240
- Weis WI, Drickamer K, Hendrickson WA (1992) Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* **360**: 127–134
- Yee VC, Pratt KP, Cote HC, Trong IL, Chung DW, Davie EW, Stenkamp RE, Teller DC (1997) Crystal structure of a 30 kDa C-terminal fragment from the gamma chain of human fibrinogen. *Structure* **15**: 125–138
- Yuita H, Tsuiji M, Tajika Y, Matsumoto Y, Hirano K, Suzuki N, Irimura T (2005) Retardation of removal of radiation-induced apoptotic cells in developing neural tubes in macrophages galactose-type C-type lectin-1-deficient mouse embryos. *Glycobiology* **15**: 1368–1375
- Zundel S, Cseh S, Lacroix M, Dahl MR, Matsushita M, Andrieu JP, Schwaeble WJ, Fujita T, Arlaud GJ, Thielens NM (2004) Characterization of recombinant mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-3 suggests an activation mechanism different from that of MASP-1 and MASP-2. *J Immunol* **172**: 4342–4350

Abstract

The innate immune system triggers inflammatory defences against pathogens or dangerous cells but is also involved in the tolerogenic removal of apoptotic cells. Target recognition is mediated by a wide range of soluble or membrane proteins. Among them are the essential complement recognition proteins: mannose-binding lectin, C1q and ficolins. Whereas the structural recognition properties of mannose-binding lectin BL have been extensively studied, the corresponding properties of ficolins and C1q with their ligands had to be deciphered at the atomic level. This was thus the aim of the first part of the project presented here. This was experimentally studied through the X-ray structural analysis of the corresponding ficolins and C1q recognition domains, alone or in complex with several cognate ligands. We have shown that H- and M- ficolins possess only one binding site, conserved among fibrinogen-like domains. This conserved site does not seem to be active in L-ficolin, but new binding sites were discovered instead, defining a larger surface of recognition more suitable to the binding of elongated polymers. Interestingly, we also found a new binding site for phosphoserine in C1q. We also provided evidence for two unique properties of M-ficolin: the binding of Neu5Ac, a classical self-marker, and a pH-dependent conformational switch of the binding site. As recognition properties of a few recognition proteins do not explain the different behaviour of immune cells with altered-self debris, we initiated a new project to understand signalling pathways in phagocytes during apoptotic cells removal. Many data suggest that a GEF complex: ELMO/DOCK is common to many pathways activated by apoptotic cells recognition and is also a point of regulation. My work in this second project was to initiate the setup of cellular tools to study the behaviour of this complex in different model cell lines. I developed quantitative phagocytic tests and also tools for detection and surexpression of ELMO1 in different cells lines. We also observed the re-localisation of cellular ELMO1 in the phagocytic cup.

Keywords: *innate immunity, complement, phagocytosis, apoptosis, ficolins, C1q, ELMO.*

Résumé

Le système immunitaire inné génère des réponses inflammatoires contre les pathogènes ou les cellules dangereuses mais est aussi impliqué dans l'élimination tolérigène des cellules apoptotiques. La reconnaissance des cibles est médiée par un grand nombre de protéines membranaires et solubles. Parmi celles-ci, on trouve les protéines de reconnaissance du complément : C1q, MBL (« mannose-binding lectin) et ficolines. Bien que les propriétés structurales de reconnaissances de la MBL aient été extensivement étudiées, celles des ficolines et du C1q restent à établir. Ceci était l'objectif de la première partie du projet présenté ici. Nous avons analysé par cristallographie aux rayons X la structure des domaines de reconnaissance de ces protéines en présence ou en absence de plusieurs ligands connus. Nous avons montré que les ficolines H et M possédaient un seul site de fixation, conservé au sein des domaines de type fibrinogène. Ce site conservé ne semble pas actif dans la ficoline L, mais de nouveaux sites ont été mis en évidence, créant une surface de reconnaissance étendue favorable à la fixation de larges polymères. Nous avons également trouvé un nouveau site de fixation de la phosphosérine sur C1q. Des propriétés particulières de la ficoline M ont été mises en évidence : la fixation de Neu5Ac, un marqueur du soi, et un changement conformationnel dépendant du pH. Comme l'étude des propriétés de reconnaissance de quelques récepteurs isolés ne lève pas le voile sur le comportement particulier des phagocytes en présence de débris cellulaires, nous avons commencé un nouveau projet afin de comprendre les voies de signalisations activées dans le phagocyte en réponse aux cellules apoptotiques. De nombreuses données suggèrent que le complexe GEF : DOCK/ELMO est commun à de nombreuses voies de signalisation mais aussi un point de régulation. Mon travail dans ce second projet était d'initier la mise en place d'outils cellulaires afin d'étudier le comportement de ce complexe dans différentes lignées cellulaires modèles. J'ai développé un test quantitatif de phagocytose ainsi que des outils pour détecter et sur-exprimer ELMO1. Nous avons également observé la re-localisation de cette protéine dans les coupes phagocytiques.

Mots-clefs: *immunité innée, complement, phagocytose, apoptose, ficoline, C1q, ELMO*