



HAL
open science

Caractérisation des ligands de C1q impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques

Helena Païdassi

► **To cite this version:**

Helena Païdassi. Caractérisation des ligands de C1q impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques. Immunologie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00430174

HAL Id: tel-00430174

<https://theses.hal.science/tel-00430174>

Submitted on 5 Nov 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée par
Helena Païdassi

pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble I

Spécialité : « Biologie Cellulaire »

**Caractérisation des ligands de C1q impliqués
dans la reconnaissance des cellules apoptotiques**

soutenue publiquement le 18 juin 2008 devant un jury composé de :

Président du jury
Rapporteurs

Examineurs

Michel Robert-Nicoud
Berhane Ghebrehiwet
Véronique Witko-Sarsat
Gérard Arlaud
Régis Daniel
Philippe Frachet

Thèse préparée au Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire
Institut de Biologie Structurale – Grenoble

Remerciements

Je tiens à remercier Gérard Arlaud pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour avoir suivi avec attention l'évolution de mon travail. Je le remercie également pour sa rigueur et ses conseils avisés.

Je remercie Michel Robert-Nicoud pour avoir bien voulu accepter la présidence de ce jury. A Véronique Witko-Sarsat j'exprime ma gratitude pour l'examen critique et attentif de mes travaux. Je remercie également Régis Daniel d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie chaleureusement Berhane Ghebrehiwet pour son accueil, sa disponibilité et nos longues discussions lors de mon séjour dans son laboratoire à l'Université de Stony Brook. Je le remercie également d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit et d'avoir fait le voyage depuis les Etats-Unis pour assister à ma soutenance.

Je remercie tout particulièrement Philippe Frachet, qui m'a accueillie avec enthousiasme au sein de son équipe, pour son attention, son soutien et sa grande disponibilité. Je lui suis extrêmement reconnaissante pour la patience dont il a fait preuve, ainsi que pour l'indépendance et la confiance qu'il m'a accordées pour conduire ces travaux. Je le remercie aussi pour la liberté dont j'ai bénéficié pour mes activités d'enseignements et pour les nombreuses formations que j'ai suivies.

Je remercie également Pascale Tacnet pour son aide considérable dans la réalisation de ce travail, ses encouragements et sa gentillesse. Je tiens à remercier également Nicole Thielens pour sa disponibilité et son aide précieuse, en particulier pour les études par résonance plasmonique de surface. J'exprime ma reconnaissance à Christine Gaboriaud et Virginie Garlatti pour leur efficacité et leur expertise en cristallographie.

Je soulignerai aussi la collaboration avec Gunnar Houen, du Statens Serum Institut de Copenhague, qui nous a fourni la construction nous permettant d'exprimer la calréticuline, ainsi que de nombreux anticorps.

Sans oublier, Jean-Pierre Andrieu pour le séquençage, Bernard Dublet pour la spectrométrie de masse et Pierre Gans pour la RMN, ainsi que Françoise Lacroix du LPC et Didier Grunwald de l'IRTSV pour leur aide précieuse en microscopie confocale.

Enfin, je souhaite remercier toutes les personnes qui ont de près ou de loin contribué à la réussite de cette aventure. De manière générale, merci à tous les membres du laboratoire et de l'IBS que j'ai côtoyés au cours de ces quatre années, tous très chaleureux, accueillants et disponibles. Plus précisément et par ordre discrétionnaire d'apparition, je veux dire merci à Florence, ma grande sœur de thèse avec qui j'ai partagé cette expérience et je veux lui souhaiter bonne chance et beaucoup de courage pour la suite. A Pascale, merci pour ton soutien, pour les heures passées ensemble devant ce maudit BIAcore et pour m'avoir si souvent aidée à relativiser. Merci à Thomas, conseiller *es* démontage de colonne et à son ombre maléfique, Ben, *el ventilator*. Vous m'aurez bien fait rire. Je vous souhaite bonne chance à tous les deux et je suis sûre qu'au final on arrivera bien un jour à faire quelque chose de vous. Merci à Monique pour sa solidarité face aux performances bruyantes et non moins mal intentionnées des deux affreux lors de leurs fameux « connard's day ». Merci à Véronique, pour nos discussions sur l'avenir, le métier d'enseignant-chercheur et tant d'autres sujets qui m'ont permis de faire des pauses salvatrices aux moments où j'en avais besoin. Isabelle, merci pour tes conseils toujours avisés, ton franc parler et ta confiance. Merci Evelyne pour ta gentillesse et tes conseils. Nicole, merci pour ton dynamisme et ta disponibilité. Merci à Philippe pour ta confiance et ton « positivisme ». Gérard, merci pour ta confiance, ta disponibilité et bien sûr pour tes leçons de grammaire, d'orthographe et d'« explicisme » (je ne suis pas à un néologisme près) !

Pour faire court, je voudrais aussi dire merci à tous les autres membres du LEM passés ou présents : Jean-Pierre, Marie-Claire, Adrienn, Hugues, Pascal, Elodie, Stéphane, Romain, Rabia, Pierrette, Louise,...

Merci également aux membres du LPC, où tout a commencé, pour leur disponibilité et leur gentillesse : Jean-Philippe, Rose-Laure et plus particulièrement Françoise qui m'a initiée à la microscopie confocale et à la cytométrie en flux.

Enfin, merci à toutes les personnes qui ont participé à la relecture et à la correction orthographique de ce manuscrit.

De manière plus personnelle, je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont été autour de moi pendant ces quatre années, et qui sont indirectement impliquées dans leur aboutissement : (i) mes colocos avec qui

j'ai découvert la vie de « Greloux », (ii) tous ceux qui ont eux aussi eu à charge de distraire mes WE et mes soirées, que ce soit en montagne, au bout du monde, autour d'un bon petit plat ou d'une bière au Yassou. (iii) Hélène, un merci tout particulier pour m'avoir aidée pour les dessins. (iv) Merci aussi à tous ceux qui aux quatre coins de France et de Navarre, et au delà, m'ont permis le temps d'un WE, d'un coup de fil ou d'un mail de penser à autre chose.

Je pense aussi bien entendu à ma famille, qui est toujours là pour moi. Merci, à Serge, qui suit depuis longtemps mes études avec attention et qui s'est toujours rendu disponible et de bon conseil. Merci à mes frères et sœur, Alexis, Solenne et Boris, qui sont tous exceptionnels, chacun à leur façon. Merci enfin à mes parents qui, tout au long de mes études, m'ont entourée de leur amour, m'ont soutenue, m'ont écoutée, m'ont encouragée et ont su me remonter le moral dans les moments les plus désespérés. Qui sait j'aurais pu finir doreuse sur bois. Franchement, ça n'a pas du être facile tous les jours.

J'ai gardé le meilleur pour la fin, merci Guillaume, pour m'avoir bravement supportée pendant ces derniers mois presque sans broncher et pour avoir su désamorcer avec humour mes « petites » déprimés. Merci pour ton soutien et ta confiance qui me donnent des ailes.

Table des matières

REMERCIEMENTS	i
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xiii
LISTE DES NOTATIONS ET DES SYMBOLES	xv
AVANT-PROPOS	1
1 Introduction	3
1.1 Présentation générale de l'immunité	3
1.2 C1q, un détecteur du soi altéré	5
1.2.1 C1q, protéine de reconnaissance de la voie classique du complément	5
1.2.2 Les partenaires de C1q et leurs rôles dans la réponse immunitaire	11
1.2.3 C1q, protéine impliquée dans la reconnaissance des cel- lules apoptotiques	14
1.3 Présentation générale de l'apoptose	16
1.3.1 Terminologie	16
1.3.2 Caractéristiques générales	16
1.3.3 Fonctions physiologiques de l'apoptose	20
1.4 L'élimination des cellules apoptotiques	22
1.4.1 Présentation générale	22
1.4.2 Exposition de signaux « eat-me » à la surface des cel- lules apoptotiques	23
1.4.3 Mécanismes de reconnaissance des cellules apoptotiques	32
1.4.4 Phagocytose et réponse inflammatoire	37
1.5 A la recherche des motifs reconnus par C1q à la surface des cellules apoptotiques	43

2	Matériel et méthodes	45
2.1	Purification de protéines plasmatiques	45
2.1.1	Purification des sous-composants du complexe C1	45
2.2	Expression de protéines dans un système bactérien	46
2.2.1	Vecteur utilisé pour l'expression	46
2.2.2	Souche bactérienne employée	47
2.2.3	Transformation de bactéries par le plasmide recombinant	48
2.2.4	Production de protéines recombinantes	48
2.3	Purification de protéines recombinantes	48
2.3.1	Purification de HAT-CRT	48
2.3.2	Purification de HAT-domaine P	49
2.3.3	Obtention du domaine N/C de la CRT	50
2.4	Préparation de protéines cellulaires	51
2.4.1	Préparation de lysats cellulaires	51
2.4.2	Préparation de protéines membranaires	51
2.5	Méthodes d'analyse des protéines	52
2.5.1	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS	52
2.5.2	Techniques de transfert sur membrane	53
2.5.3	Détermination des séquences N-terminales	54
2.5.4	Détermination de la concentration des protéines purifiées	55
2.5.5	Quantification relative des protéines sur gel	56
2.5.6	Détermination de la masse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)	56
2.5.7	Analyse par spectroscopie en dichroïsme circulaire	56
2.6	Méthodes d'analyse fonctionnelle	57
2.6.1	Analyse de l'interaction GR/phospholipides par co- sédimentation	57
2.6.2	Analyse de l'interaction C1q ou GR/ADN par gel retard	57
2.6.3	Détermination des propriétés d'interaction par SPR	58
2.7	Cristallogénèse et cristallographie	61
2.7.1	Cristallisation des protéines	61
2.7.2	Structure du complexe phosphosérine-GR	64
2.8	Biologie moléculaire	65
2.8.1	Méthodes de génétique moléculaire	65
2.8.2	Mutagenèse dirigée	65
2.9	Biologie cellulaire	69
2.9.1	Lignées et cultures cellulaires	69
2.9.2	Induction de l'apoptose	69
2.10	Méthodes d'analyse cytochimiques	70
2.10.1	Principe du marquage par affinité	71
2.10.2	Principe du marquage par immunofluorescence indirecte	72
2.10.3	Méthode de marquage des cellules	72
2.10.4	Analyse par cytométrie en flux	74

2.10.5	Analyse par microscopie confocale	76
2.11	Analyse en temps réel par SPR de la capture des cellules par C1q	77
2.11.1	Méthode d'analyse par SPR	77
2.11.2	Inhibition de la capture des cellules par C1q	78
3	C1q reconnaît les cellules apoptotiques précoces	79
3.1	Présentation du modèle cellulaire	79
3.1.1	Induction et détection de l'apoptose	80
3.1.2	Fixation de C1q à la surface cellulaire	80
3.2	Développement d'un test par résonance plasmonique de surface	84
3.3	Conclusion	86
4	Identification de la PS comme ligand de C1q	87
4.1	Etude <i>in vitro</i> de l'interaction entre C1q et la phosphatidylsérine	87
4.1.1	Analyse de l'interaction par des expériences de co-sédimentation	87
4.1.2	Analyse par SPR de l'interaction entre C1q et PS	88
4.1.3	Analyse cristallographique de l'interaction entre les têtes globulaires de C1q et la phosphosérine	93
4.2	Recherche de l'interaction phosphatidylsérine-C1q à la surface des cellules apoptotiques	93
4.2.1	Inhibition par l'annexine V de la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q	94
4.2.2	Localisation de l'interaction à la surface cellulaire	96
4.3	Conclusion et Discussion	96
5	Etude de l'implication de p33	99
5.1	Etude du profil d'expression de p33 au cours de l'apoptose	99
5.1.1	Analyse de l'expression de p33 au niveau de la membrane plasmique	100
5.1.2	Analyse de l'expression de p33 à la surface cellulaire	100
5.2	Discussion	105
6	Caractérisation de l'interaction calréticuline-C1q	109
6.1	Etude de l'interaction CRT-C1q	110
6.1.1	Caractérisation des régions de C1q interagissant avec la CRT	110
6.1.2	Analyse cinétique de l'interaction C1q-CRT	110
6.2	Obtention de CRT recombinante fonctionnelle	113
6.2.1	Production et purification de la CRT humaine recombinante	116
6.2.2	Analyse fonctionnelle de HAT-CRT	118
6.3	Purification de fragments recombinants de la CRT	120

6.3.1	Obtention du domaine P de la CRT	120
6.3.2	Production du domaine globulaire de la CRT	124
6.4	Etude de l'expression de la CRT à la surface cellulaire	128
6.5	Discussion	129
6.5.1	La CRT pourrait être impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q	129
6.5.2	Etudes structurales de la CRT	130
7	Implication de l'activité lectine de C1q	131
7.1	Etude de la capacité de C1q à reconnaître les sucres	132
7.1.1	Analyse de l'interaction C1q-glycoconjugués par SPR	132
7.1.2	Des hexoses et des pentoses inhibent l'interaction C1q- glycoconjugués	132
7.2	Etude de l'interaction entre GR et ADN	134
7.3	Analyse par SPR de l'implication de l'ADN dans la capture des cellules apoptotiques par C1q	136
7.4	Variation du profil de glycosylation à la surface cellulaire au cours de l'apoptose	138
7.4.1	Analyse par cytométrie en flux	138
7.4.2	Analyse par électrophorèse sur gel	138
7.5	Discussion	142
8	Conclusions et perspectives	143
8.1	Conclusions	143
8.2	Perspectives	144
8.2.1	Caractériser l'ensemble des structures reconnues par C1q	144
8.2.2	Comprendre la complexité de la reconnaissance des cel- lules apoptotiques	147
8.2.3	C1q, un acteur majeur de la tolérance immune	152
8.3	Le mot de la fin.	157
A	Principe de la résonance plasmonique de surface	159
B	Publications et travaux	163
B.1	Publications	163
B.2	Travaux présentés en meetings	163

Liste des figures

1.1	Représentation schématique de la cascade protéolytique du complément.	7
1.2	Modèle structural de C1q [Gaboriaud et al., 2004].	9
1.3	Représentation schématique de la structure oligomérique de C1q, des collectines (MBL, SP-A et SP-D) et des ficolines L et H.	10
1.4	Représentation schématique des modifications morphologiques observées au cours de l'apoptose.	17
1.5	Représentation schématique des voies d'induction de l'apoptose. D'après [Youle and Strasser, 2008].	19
1.6	L'asymétrie membranaire. D'après [Gardai et al., 2006].	25
1.7	N-glycosylation des protéines.	27
1.8	Exposition de chaînes oligosaccharidiques asialylées au cours de l'apoptose.	29
1.9	Mécanisme de relargage des nucléosomes au cours de l'apoptose. D'après http://biologyof-cells.blogspot.com/2007/12/apoptosis.html	31
1.10	Les interactions entre la cellule apoptotique et le phagocyte.	34
1.11	Les produits des gènes impliqués dans la phagocytose chez le nématode <i>C. elegans</i> et leurs homologues chez les mammifères.	39
2.1	Représentation schématique de pHF _X -CRT. Ori, origine de réplication, Origine f1 ; origine de réplication du phage f1 ; <i>lacI</i> , gène codant pour le répresseur de l'opéron lac.	47
2.2	Diagramme de phase typique d'une macromolécule biologique. D'après [Teillet, 2006].	62
2.3	Dispositif de la goutte suspendue. D'après [Teillet, 2006]	63
2.4	Schéma général du kit « QuikChange XL site-directed mutagenesis » de Stratagene d'après le manuel du kit.	66
2.5	Stratégie pour le clonage du domaine P.	68
2.6	Principe du marquage par affinité à l'aide (A.) de sondes biotinylées ou (B.) de sondes directement couplées à un fluorochrome	71
2.7	Principe du marquage par immunofluorescence indirecte	72

3.1	Analyse cinétique en cytométrie en flux de l'exposition de la PS et de la perméabilisation cellulaire au cours de l'apoptose	81
3.2	Analyse par cytométrie en flux de la fixation des GR à la surface des cellules apoptotiques.	82
3.3	Analyse de la spécificité de fixation des GR à la surface des cellules apoptotiques.	83
3.4	Analyse par SPR de la capture des cellules apoptotiques par C1q.	85
4.1	Analyse par co-sédimentation de l'interaction entre GR et des liposomes contenant la PS.	88
4.2	Analyse par SPR de l'interaction entre C1q et ses GR avec la PS et ses dérivés.	89
4.3	Structure cristallographique du complexe phosphosérine-GR.	92
4.4	Inhibition par l'annexine V de la capture des cellules apoptotiques par C1q.	95
4.5	Etude par microscopie confocale de la localisation de C1q et de la PS à la surface cellulaire.	97
5.1	Analyse du profil d'expression de p33 dans des lysats cellulaires.	101
5.2	Analyse par cytométrie en flux du profil d'expression de p33 à la surface des cellules Raji au cours de l'apoptose induite par irradiation.	103
5.3	Analyse par cytométrie en flux du profil d'expression de p33 à la surface des cellules HeLa à différents temps après induction de l'apoptose par irradiation.	104
5.4	Structure de p33. D'après [Jiang et al., 1999].	106
5.5	Distribution des charges à la surface de p33. D'après [Jiang et al., 1999].	107
6.1	Analyse par SPR de l'interaction de la calréticuline avec C1q	111
6.2	Analyse cinétique de l'interaction calréticuline-C1q.	112
6.3	Représentation schématique de la CRT présentant les différents domaines de la protéine.	113
6.4	Similarité structurale globale entre CNX et CRT. D'après [Schrag et al., 2001].	115
6.5	Production et purification de HAT-CRT.	117
6.6	Analyse de HAT-CRT par spectroscopie de dichroïsme circulaire.	119
6.7	Analyse fonctionnelle de HAT-CRT par SPR.	119
6.8	Séquence peptidique de HAT-domaine P (résidus 189 à 288).	121
6.9	Production et purification de HAT-domaine P.	123
6.10	Analyse par SDS-PAGE de la protéolyse ménagée de la CRT.	125
6.11	Effet du calcium sur la protéolyse de HAT-CRT par la plasmine.	125

6.12	Analyse par SDS-PAGE de la cinétique de protéolyse de HAT-CRT par la plasmine.	126
6.13	Localisation des séquences N-terminales des fragments issus de la digestion par la plasmine de HAT-CRT sur sa séquence peptidique.	127
6.14	Etude par microscopie confocale de la localisation de la CRT à la surface cellulaire.	128
6.15	Etude par microscopie confocale de la localisation des GR et de la CRT à la surface cellulaire.	129
7.1	Analyse de l'interaction entre C1q et les sucres par SPR.	133
7.2	Analyse par SPR de la compétition des hexoses et des pentoses pour l'interaction C1q-glycoconjugués.	134
7.3	Analyse par gel retard de la fixation de C1q à l'ADN.	135
7.4	Inhibition par traitement à la DNase de la capture des cellules apoptotiques par C1q.	137
7.5	Observation par microscopie confocale des sites reconnus par les lectines.	139
7.6	Modification du profil de glycosylation après irradiation des cellules HeLa, 3 h après irradiation.	139
7.7	Analyse du profil de glycosylation des protéines membranaires.	141
8.1	Rôles de la CRT lors de la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques.	145
8.2	Rôle de CD47 dans la protection des cellules apoptotiques et importance de son inactivation au cours de l'apoptose.	149
8.3	Rôle de C1q dans la collection et l'intégration des signaux de reconnaissance à la surface des cellules apoptotiques.	153
8.4	Rôle central de C1q pour la reconnaissance des cellules apoptotiques par le phagocyte.	155
A.1	Principe de la résonance plasmonique de surface.	160
A.2	Principe de la détection d'une interaction par SPR.	161
A.3	Sensorgramme représentant un cycle d'analyse	161

Liste des tableaux

1.1	Substances activatrices des différentes voies d'activation du complément (modifié d'après [Arlaud G, 2001, Walport, 2001].)	6
2.1	Temps d'incubation à 37°C des enzymes utilisées pour la protéolyse ménagée de la calréticuline.	50
2.2	Coefficients d'extinction molaire et masses molaires des protéines purifiées.	55
2.3	Conditions d'immobilisation des ligands sur la sensor chip CM5 lors des expériences de Biacore	59
2.4	Concentrations d'analytes utilisées en fonction des interactions étudiées	61
2.5	Amorces utilisées pour la construction du domaine P de la calréticuline	68
2.6	Conditions d'induction de l'apoptose pour les cellules HeLa et Raji	70
2.7	Anticorps utilisés et leurs dilutions	73
2.8	Conditions d'utilisation des sondes pour le marquage par affinité	74
2.9	Configuration du FACScan	75
2.10	Conditions d'utilisation des inhibiteurs de la capture des cellules par C1q	78
4.1	Constantes cinétiques et de dissociation de l'interaction de C1q et de ses GR avec la PS ou ses dérivés.	91
6.1	Constantes cinétiques et de dissociation de l'interaction des GR et CLF avec la CRT immobilisée.	111
6.2	Données cinétiques de l'interaction de C1q avec la CRT immobilisée. $1/K = \frac{k_{d1}}{k_{a1}} \times \frac{k_{d2}}{k_{a2}}$	113
6.3	Données cinétiques de l'interaction de C1q avec la CRT placentaire ou recombinante immobilisée.	120
6.4	Caractéristiques principales des protéines recombinantes.	121
6.5	Masses molaires des deux fragments issus de la digestion de HAT-CRT par la plasmine.	127

7.1	Constantes cinétiques de la fixation de C1q et de sa région globulaire sur les glycoconjugués immobilisés.	133
7.2	Tableau de spécificité des lectines utilisées	139

Liste des notations et des symboles

AcSial	Acide sialique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire (copie d'ADN à partir d'un ARN)
BSA	Bovine Serum Albumin
CAPS	Acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique
cC1qR	Receptor of the C1q collagenous domain
CD	Cluster de différenciation
CED	<i>C. elegans</i> cell death
CNX	Calnéxine
CR1	Complement receptor 1
CRP	C-reactive protein
CRT	Calréticuline
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Da	Dalton
DFP	Di-isopropylfluorophosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNase	Désoxyribonucléase
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
Del-1	developmental endothelial locus-1
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propylcarbodiimide
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
ELMO	engulfment and motility protein
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-acétyl-galactosamine
GAS6	growth arrest-specific gene 6

gC1qR	Receptor of the C1q globular region
GlcNAc	N-acétyl-glucosamine
GPI	glycosyl-phosphatidylinositol (ancre)
GR	Région globulaire de C1q
HBS	Hepes-buffered Saline
Hepes	Acide N-2-hydroxyéthylpiperazine-N-2-éthanesulfanique
HRP	Horse radish peroxidase
IBS	Institut de Biologie Structurale
IgG	Immunoglobuline
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyrannoside
LB	Luria Broth base
K_D	Constante de dissociation d'un complexe AB. Elle exprime la force de l'interaction entre un ligand A et son récepteur B. $K_D = \frac{[A][B]}{[AB]}$
LDL	low-density lipoprotein
LRP	LDL-receptor related protein
MAC	Complexe d'attaque membranaire
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight
Man	Mannose
MASP	MBL-associated serine protease
MBL	Mannan binding lectin
MFG-E8	milk fat globule-EGF-factor 8
NHS	N-hydroxy-succinimide
oxLDL	LDL oxydé
pb	Paire de base
PC	Phosphatodylecholine
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phosphatidyléthanolamine
pI	Point isoélectrique
PS	Phosphatidylsérine
PVDF	Polyvinylidène difluoride
P/S	Pénicilline/Streptomycine
p/v	poids/volume
RE	Réticulum endoplasmique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RU	Unité de résonance
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
SIGLECS	sialic acid-binding Ig-like lectins
SLE	Lupus systémique érythémateux
SP-A	Surfactant protein A
SP-D	Surfactant protein D

SPR	Résonance plasmonique de surface
SR	Scavenger receptor
SVF	Sérum de veau fœtal
Temed	NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine
T _m	Température de fusion
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-amino-méthane
v/v	volume/volume

Avant-propos

J'ai commencé ma thèse en octobre 2004 à l'Institut de Biologie Structurale (IBS) dans le laboratoire des protéines du cytosquelette (LPC) sous la direction du Dr. Rati Fotedar sur l'étude de nouveaux régulateurs de p21. En janvier 2005, j'ai rejoint le laboratoire d'enzymologie moléculaire (LEM) de l'IBS, dirigé par le Dr. Gérard Arlaud et j'y ai débuté un nouveau projet visant à caractériser les ligands de C1q impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques, sous la direction du Dr. Philippe Frchet.

A l'époque, il était admis que C1q, protéine de reconnaissance du système du complément joue un rôle important dans le maintien de la tolérance immune, de par son implication dans l'élimination des cellules apoptotiques et la modulation de la réponse inflammatoire. Cependant, les modalités de la reconnaissance spécifique des cellules apoptotiques par C1q n'avaient pas encore été caractérisées.

Le projet a donc consisté à identifier les signaux exposés au cours de l'apoptose au niveau de la surface cellulaire et reconnus par C1q, puis à caractériser l'interaction entre C1q et ces ligands. Les multiples approches, tant de biologies cellulaire que de biochimie ou de biophysique, utilisées au laboratoire et en collaboration avec le laboratoire de cristallogénèse et de cristallographie des protéines (LCCP) de l'IBS, ont permis d'identifier plusieurs ligands de C1q à la surface des cellules apoptotiques. Par ailleurs, afin d'explorer la piste d'un partenaire connu de C1q (p33), une collaboration a été entreprise avec le Pr. Berhane Ghebrehiwet de l'Université de Stony Brook (NY, USA). Dans ce cadre, un séjour de 6 mois dans son laboratoire m'a permis de mieux définir le rôle joué par cette protéine dans la reconnaissance des cellules apoptotiques. A mon retour en France, en septembre 2006, ce projet a été poursuivi au laboratoire. En parallèle, la caractérisation de l'interaction entre C1q et la calréticuline, un autre de ses partenaires possibles, a été amorcée grâce à une collaboration avec le Pr. Gunnar Houen du « Statens Serum Institut » (Copenhague, Danemark).

Le travail présenté ici a été co-financé par un contrat de formation par la recherche attribué par le Commissariat à l'énergie atomique (CEA) pendant 3 ans et par un contrat d'attaché temporaire d'enseignement et de recherche aloué par l'Université Joseph Fourier (UJF) pour la dernière année.

Chapitre 1

Introduction

1.1 Présentation générale de l'immunité

Historiquement, l'**immunité** a été décrite comme étant l'ensemble des mécanismes biologiques permettant à un organisme pluricellulaire de développer des moyens de défense naturels ou acquis contre un agent extérieur étranger dit du « non-soi », par opposition au « soi », c'est-à-dire l'ensemble des cellules et des molécules qui composent l'organisme (pour revue, [Abbas Abul K., 2005]). Cet élément du non-soi peut être un agent pathogène (virus, bactérie, parasite, champignon) ou un corps étranger (greffon, cellule étrangère). La définition a depuis été élargie et inclut maintenant également les mécanismes biologiques responsables de l'élimination des éléments modifiés de l'organisme et potentiellement dangereux dits du « soi altéré » telle que les cellules en train de mourir ou les cellules tumorales. L'immunité permet ainsi d'assurer l'intégrité de l'organisme.

L'ensemble des tissus, des cellules et des molécules qui concoure à la protection de l'organisme est appelé **système immunitaire**. La réaction coordonnée de ces cellules et de ces molécules porte le nom de **réponse immunitaire**. Lorsqu'il fonctionne correctement, le système immunitaire protège l'organisme des infections virales et bactériennes et prévient le développement de maladies en détruisant les substances pathogènes et les cellules endommagées ou cancéreuses. Une réaction inflammatoire peut dans certains cas être associée à cette réponse immunitaire. L'inflammation se caractérise par des rougeurs, un gonflement local, une sensation de chaleur et des douleurs, dûs à la vasodilatation induite des vaisseaux. Cette vasodilatation locale apporte les éléments nécessaires à la résolution de l'infection, mais favorise également l'élimination des déchets cellulaires et des toxines. Le déclenchement de cette réponse est finement contrôlé.

Les mécanismes de défense se composent, chez les mammifères, de l'immunité naturelle ou innée et de l'immunité adaptative. L'immunité innée est responsable de la protection initiale et rapide de l'organisme grâce à des mécanismes stéréotypés, pré-existants avant l'apparition d'un élément dangereux. L'immunité innée est à spécificité large : elle reconnaît sans ambiguïté le soi du non-soi et du soi-altéré, mais elle ne peut pas distinguer précisément différents antigènes.

L'immunité adaptative est une réponse plus tardive, déclenchée par les lymphocytes. Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative est caractérisée par une spécificité fine pour des macromolécules distinctes et par une « mémoire » qui lui confère la capacité à répondre plus fortement à des expositions répétées au même stimulus.

Le système immunitaire inné comprend les barrières épithéliales, les cellules phagocytaires (neutrophiles, macrophages), les cellules « natural killer », le **système du complément** et les cytokines, qui contrôlent et coordonnent un grand nombre des activités des cellules de l'immunité innée. L'apparition d'un élément dangereux (micro-organisme, cellule endommagée, corps étranger) dans un organisme déclenche l'activation des constituants de l'immunité innée, dont le rôle premier est de reconnaître et d'éliminer le plus précocement possible cet intrus, tout en protégeant les cellules du soi. La deuxième mission de l'immunité innée est d'informer l'organisme de la nécessité d'une défense plus efficace contre cet élément. Cette réponse se manifeste par la libération de cytokines, responsables de l'activation des lymphocytes B (producteurs d'anticorps) et des lymphocytes T (instigateurs de la réponse cellulaire), et de chimiokines qui par leur potentiel chimio-attractant attirent les cellules effectrices sur le lieu de l'inflammation.

L'immunité innée fait intervenir des molécules de reconnaissance ou PRMs (« pattern recognition molecules »). Ce sont des récepteurs membranaires ou des protéines solubles présents de façon constitutive et capables de reconnaître des motifs spécifiques, répétés à la surface d'une cible. Ces motifs conservés à la surface des agents pathogènes (PAMPs, « pathogen-associated molecular patterns ») et des cellules du soi endommagées ou apoptotiques (ACAMPs, « apoptotic cell-associated molecular patterns ») constituent donc les signaux de danger.

Certaines de ces protéines de reconnaissance solubles forment, en association avec des protéases, des complexes protéolytiques dont l'activation déclenche des réactions de défense visant à la destruction du pathogène initialement reconnu. C'est le cas du complexe C1 et des complexes associant une protéine de reconnaissance de type lectine et une protéase, qui sont, respectivement, à l'origine des voies classique et lectine du complément. Ces protéines de reconnaissance participent également au recouvrement de la surface de leur cible et ainsi favorisent son élimination par phagocytose : ce sont des opsonines.

1.2 C1q, un détecteur du soi altéré

1.2.1 C1q, protéine de reconnaissance de la voie classique du complément

Le système du complément

Le système du complément comprend une trentaine de protéines plasmatiques et tissulaires. Ces protéines sont inactives dans le plasma et leur activité est en général révélée par une succession de clivages enzymatiques en cascade. Cette cascade de réactions génère des fragments qui sont des effecteurs importants des réponses immunitaires innée et adaptative et qui participent à la réponse inflammatoire (figure 1.1) [Abbas Abul K., 2005].

Les trois voies d'activation du complément, classique, lectine et alterne, diffèrent par la manière dont elles sont initiées (tableau 1.1). Chacune de ces voies d'activation est composée d'une cascade d'enzymes protéolytiques qui produit des médiateurs inflammatoires et des opsonines. Les protéines de la voie classique et du complexe lytique, découvertes en premier sont désignées de C1 à C9, les protéines de la voie alterne par des lettres capitales (B, D). Les éléments de la voie lectine ont été nommés selon leurs caractéristiques : MBL (« mannan-binding lectin »), MASP (« MBL-associated serine protease »), ficolines (protéines possédant un domaine fibrinogène et un domaine collagène).

Les phases initiales de la cascade du complément sont différentes selon la voie utilisée mais conduisent toutes à la formation d'une C3-convertase. Cette C3-convertase est capable de cliver la protéine C3 en un petit fragment C3a qui se fixe et active les mastocytes, et en un fragment C3b qui adhère à la particule-cible. Ainsi recouverte, celle-ci peut alors être reconnue par les cellules dotées d'un récepteur de ce fragment C3b (tels que les macrophages), ce qui facilite la phagocytose de la particule-cible : c'est le phénomène d'opsonisation. Cette activation de C3 conduit à la formation d'une C5-convertase capable d'activer C5 en le clivant en deux fragments : un petit fragment C5a qui se fixe et active les mastocytes, tout en étant un très puissant facteur chimiotactique, et un fragment C5b qui adhère à la particule-cible et permet l'activation successive des facteurs C6, C7 et C8. Le complexe C5b-C8 ainsi formé catalyse la polymérisation du facteur C9 dans la membrane de la cible : ce complexe lytique forme un pore qui permet l'entrée de molécules d'eau et d'ions sodium, responsable de la lyse de la particule-cible (figure 1.1).

Voie	Inducteurs
Classique	Complexes antigène-anticorps (IgM ou IgG) Bactéries gram- (<i>E.coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Klebsiella</i>) Mycoplasmes Virus (SindBis, Epstein-Barr) et rétrovirus (HIV) Parasites (<i>Schistosoma mansoni</i> , <i>Trypanosoma brucei</i>) Protéines (protéine C-réactive, myéline, peptide β -amyloïde) Oligosaccharides, polysaccharides Lipides (lipide A, cardiolipide) Polyanions (héparine, ADN) Cellules apoptotiques
Lectine	Oligosaccharides à la surface des pathogènes Cellules apoptotiques
Alterne	Bactéries Champignons Virus Cellules tumorales

TAB. 1.1 – Substances activatrices des différentes voies d’activation du complément (modifié d’après [Arlaud G, 2001, Walport, 2001].)

Le complément a ainsi trois grandes fonctions :

- l’opsonisation : des fragments du complément se fixent à la surface des cellules cibles. Reconnues par des récepteurs à la surface des neutrophiles et des macrophages, ces opsonines facilitent la phagocytose de la cellule cible,
- l’inflammation : les fragments C5a, C4a et C3a produits au cours de l’activation du complément sont des anaphylatoxines. La liaison de ces anaphylatoxines à des récepteurs cellulaires déclenche une inflammation aiguë en stimulant le chimiotactisme des neutrophiles et en activant les mastocytes,
- la lyse : les fragments finaux de la cascade du complément C6-C9 forment le complexe d’attaque membranaire (MAC, « membrane attack complex ») qui perce la membrane des cellules cibles sur lesquelles le complément est activé. Les changements ioniques et osmotiques induits provoquent la lyse de la cellule.

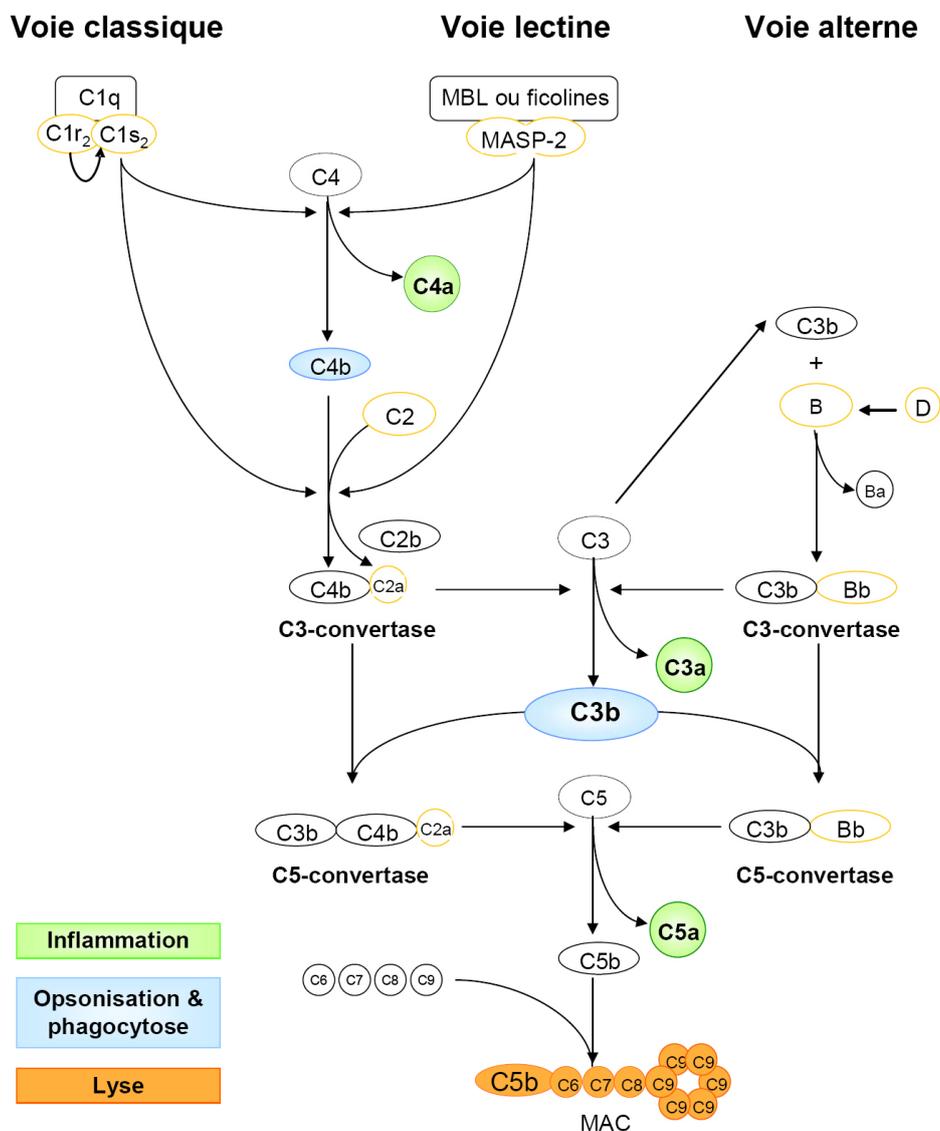


FIG. 1.1 – Représentation schématique de la cascade protéolytique du complément. Les protéases à sérine sont entourées en jaune, les anaphylatoxines sont en vert et le complexe d'attaque membranaire en orange; l'élément central des 3 voies du complément C3b, ainsi que C4b, impliqués dans l'opsonisation sont représentés en bleu. D'après [Teillet, 2006]

Les voies d'activation du complément

L'activation du complément par les voies classique et lectine met en jeu des protéines de reconnaissance : respectivement, C1q, et MBL ou ficolines. Quant à la voie alterne, elle ne fait pas intervenir de protéines de reconnaissance et servirait de boucle d'amplification.

La voie classique. Le complexe initiateur de la voie classique est appelé C1 ; il comprend une protéine de reconnaissance, C1q, ainsi que deux protéases à sérine, C1r et C1s, associées en un tétramère (C1s-C1r-C1r-C1s). La voie classique peut être déclenchée par la liaison directe de C1q à des « signaux de danger » présents à la surface des pathogènes ou des cellules infectées (PAMPs) ou apoptotiques (ACAMPs) (*cf.* tableau 1.1). Cette voie est également mise en jeu lors de la réponse adaptative par la liaison de C1q aux complexes antigène-anticorps (IgM et IgG). Dans les deux cas de figure, la fixation de C1q entraîne, au sein du complexe C1, l'auto-activation de C1r puis l'activation de C1s par C1r activé. La protéase effectrice, C1s activé, clive C4 en C4a et C4b, qui se fixe à la membrane du pathogène, puis C2 en C2a et C2b. Le complexe formé par C4b et C2a [C4b2a], appelé C3-convertase, clive C3 en C3a et C3b permettant la formation d'une C5-convertase, C4b2a3b. A la surface des pathogènes, ce complexe coupe la protéine C5 et initie les étapes ultimes de l'activation du complément par la formation du MAC (Figure 1.1).

La voie lectine. La voie lectine a été découverte plus récemment [Matsushita and Fujita, 1992] et diffère de la voie classique uniquement par ses complexes d'activation (Figure 1.1) qui mettent en jeu :

- des protéines de reconnaissance apparentées à C1q, la MBL et les ficolines,
- des protéases à sérine homologues de C1r et C1s, appelées MASPs.

MASP-2 est capable de couper C4 et C2 et donc de déclencher la voie lectine du complément. La MBL, comme son nom l'indique, fixe le mannose et également les résidus N-acétyl-glucosamine (GlcNAc), N-acétyl-mannosamine, fucose et glucose.

La voie alterne. La protéine C3 s'hydrolyse spontanément dans le plasma mais les produits générés sont instables et donc dégradés rapidement. La voie alterne est déclenchée lorsque l'un des produits de dégradation, C3b, est déposé à la surface d'un agent pathogène (Tableau 1.1). Une fois activée, la voie alterne est accélérée par une boucle d'amplification : C3b lié est capable d'interagir avec le facteur B, qui est alors clivé par le facteur D en deux fragments Ba et Bb. Le complexe C3bBb, appelé « C3-convertase alterne », clive C3 ce qui permet la formation d'une nouvelle « C3-convertase » ou d'un complexe C3b2Bb, appelé « C5-convertase alterne », dont le rôle est identique à la C5-convertase des voies classique et lectine (Figure 1.1).

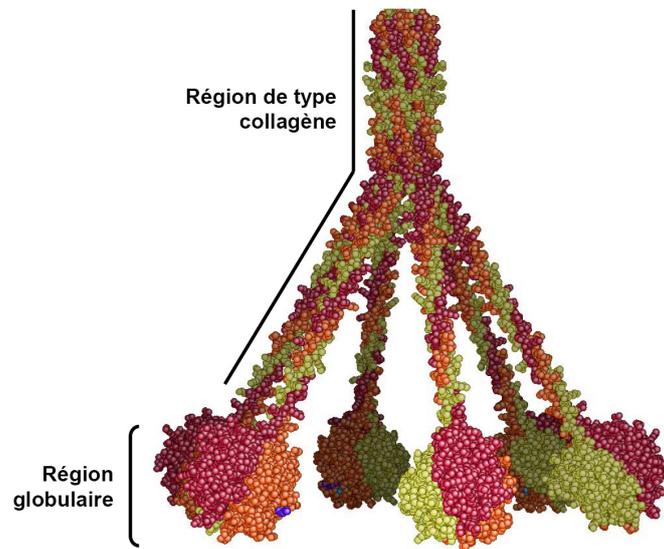


FIG. 1.2 – Modèle structural de C1q [Gaboriaud et al., 2004]. Les sous-unités A, B et C sont représentées respectivement en jaune, rouge et orange. L'ion Ca^{2+} fixé aux GR est représenté par une sphère violette.

Organisation générale de C1q

C1q est une protéine de haut poids moléculaire (459.300 Da) principalement synthétisée localement par les macrophages et les cellules dendritiques immatures, à la différence des autres facteurs du complément principalement synthétisés dans le foie par les hépatocytes [Loos et al., 1989].

C1q est formé de 18 chaînes polypeptidiques : six chaînes de C1qA, six chaînes de C1qB, six chaînes de C1qC [Arlaud et al., 2002]. Les chaînes A, B et C s'associent en six hétérotrimères pour former la molécule de C1q mature fonctionnelle (figure 1.2). Chaque chaîne contient un domaine N-terminal de type collagène et un domaine C-terminal globulaire. Les six régions globulaires (GR) de C1q (chacune formée d'une chaîne de C1qA, de C1qB et de C1qC) sont disposées comme un « bouquet de tulipes » à l'extrémité de tiges collagènes émergeant d'une queue formée des six triples hélices de type collagène.

La structure cristalline de la région globulaire a été résolue à une résolution de 1,9 Å et a permis de donner une meilleure idée des mécanismes moléculaires impliqués dans les fonctions de reconnaissance de C1q [Gaboriaud et al., 2003].

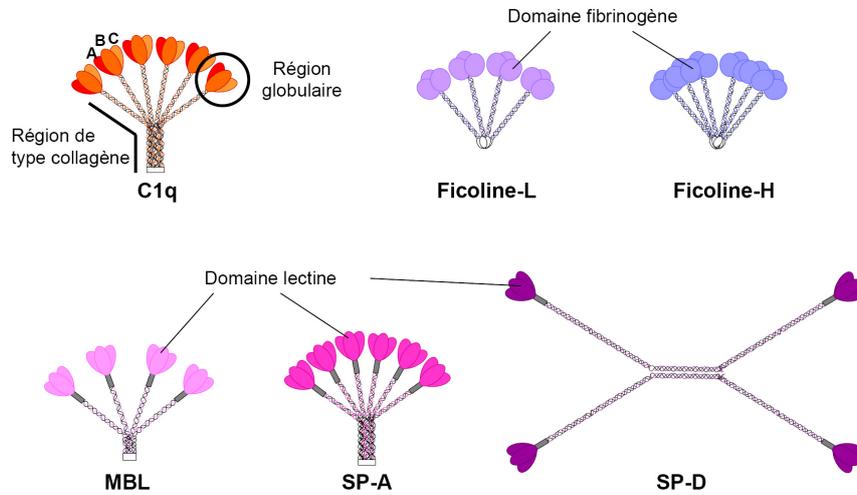


FIG. 1.3 – Représentation schématique de la structure oligomérique de C1q, des collectines (MBL, SP-A et SP-D) et des ficolines L et H.

Homologies structurales et fonctionnelles des collagènes de défense

De même que C1q, les collectines (MBL et protéines du surfactant SP-A et SP-D) et les ficolines sont des oligomères de haut poids moléculaire (>200.000 Da) composés de sous-unités trimériques. Elles sont constituées d'une région N-terminale de type collagène et d'une région globulaire C-terminale (figure 1.3). Contrairement à C1q, les collectines et les ficolines ne sont constituées que d'un seul type de chaîne. Ces collagènes de défenses diffèrent par leur domaine globulaire C-terminal. Les collectines possèdent un domaine de type lectine qui leur permet de fixer les oligosaccharides (figure 1.3). Les ficolines possèdent quant à elles un domaine C-terminal de type fibrinogène leur conférant des propriétés de reconnaissance des structures acétylées (figure 1.3). Du point de vue structural, SP-A possède une structure hexamérique très proche de celle de C1q, alors que la MBL et les ficolines sont présentes sous forme trimérique et/ou tétramérique. SP-D est organisé en une structure plus flexible de type « araignée » (figure 1.3).

En plus de leurs similarités structurales, certaines de ces lectines partagent des fonctions communes avec C1q : reconnaissance des PAMPs et des ACAMPs, induction de la phagocytose, . . . Enfin, la récente découverte de l'activité lectine de la protéine analogue de C1q chez le vertébré le plus primitif, la lamproie, suggère que cette protéine de reconnaissance aurait une origine commune avec la MBL ou les ficolines [Matsushita et al., 2004]. De plus, il a été rapporté que la fixation et l'activation de C1q peuvent être réalisées par certains sucres [Schultz and Arnold, 1981, Rhodes, 2002, Rhodes, 2006].

1.2.2 Les partenaires de C1q et leurs rôles dans la réponse immunitaire

Rôle de C1q dans la réponse immunitaire

Les déficiences en C1q entraînent une susceptibilité accrue aux infections [Warren et al., 2002, Taylor et al., 2001, Celik et al., 2001] et aux maladies auto-immunes [Bowness et al., 1994].

Dans le sang, une fraction de C1q forme le complexe C1 (C1q/C1s-C1r-C1r-C1s). Le rôle classique de C1q est d'activer C1r et C1s, puis le système du complément, après fixation aux complexes immuns *via* les fragments constants des anticorps. Les GR de C1q portent les sites de reconnaissance des fragments constants des immunoglobulines IgG et IgM présentes dans les complexes immuns. La fixation de C1q sur les complexes immuns induit l'activation des protéases à sérine C1r et C1s qui s'associent normalement de façon calcium-dépendante avec les domaines de type collagène de C1q. C1r et C1s activés permettent la formation d'un complexe enzymatique actif capable de cliver C4 et d'induire ainsi l'activation de la voie classique du complément (*cf.* figure 1.1). L'activation du complément aboutit à la fixation covalente d'un produit d'activation C3b sur les complexes immuns. Les complexes immuns ainsi opsonisés sont alors plus facilement éliminés.

Mais C1q est également un récepteur capable de reconnaître des profils particuliers (PRR, « pattern recognition receptor »). La fixation de C1q par l'intermédiaire de ses GR à des structures polyanioniques (comme par exemple des polysaccharides sulfatés) à la surface de bactéries, de virus, de parasites ou de cellules cibles aboutit, suite à l'activation du complément, à la libération de médiateurs inflammatoires ainsi qu'à l'opsonisation et éventuellement la lyse de la cellule cible ou du pathogène.

Enfin C1q a la capacité de se fixer à de nombreux agents de phase aiguë dont la CRP (« C-reactive protein »), l'amyloïde P et la PTX3 (pentraxine 3). Ces agents induisent l'activation du complément lorsqu'ils sont préalablement immobilisés sur des ligands polyanioniques à la surface des pathogènes.

Ainsi la fixation de C1q aux complexes immuns et sur ses cibles (pathogènes, micro-organismes, cellules cibles), directement ou indirectement, initie l'activation de la voie classique du système du complément. C1q est donc un acteur clé de la réponse immunitaire qui de plus relie les immunités innée et adaptative de par sa capacité de fixation aux complexes immuns.

Les récepteurs de C1q et leurs fonctions régulatrices

En plus de son rôle dans l'activation du complément, C1q peut également 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].

Ces réponses particulières doivent mettre en jeu des récepteurs à la surface cellulaire. A ce jour, quatre protéines présentes à la surface cellulaire et capables d'interagir avec C1q ont été décrites (pour revue, [Tenner, 1998, Eggleton et al., 2000, Ghiran et al., 2002]).

C1qR_p/CD93 est une glycoprotéine transmembranaire de 126 kDa dont l'expression est restreinte aux cellules d'origine myéloïde, aux plaquettes et aux cellules endothéliales [Nepomuceno and Tenner, 1998]. Des expériences d'inhibition utilisant des anticorps dirigés contre C1qR_p ont permis d'identifier ce récepteur de C1q capable d'induire la phagocytose [Nepomuceno et al., 1999]. Cependant lors de cette étude, l'interaction directe entre C1q et C1qR_p n'a pas été formellement démontrée. Depuis, McGreal et collaborateurs ont montré que C1q et C1qR_p n'interagissent pas [McGreal et al., 2002]. Plus récemment, la génération de souris déficientes en C1qR_p a montré que cette protéine n'est pas impliquée dans la phagocytose induite par C1q [Norsworthy et al., 2004]. Cependant les souris C1qR_p^{-/-} présentent une accumulation de cellules apoptotiques *in vivo*, indiquant que ce récepteur doit être impliqué dans l'élimination des cellules apoptotiques.

gC1qR/p33 (« receptor of the C1q globular region ») est une protéine multi-fonctionnelle de 33 kDa capable de fixer les GR de C1q [Ghebrehiwet et al., 1994]. Initialement décrite comme un récepteur de C1q à la surface cellulaire, gC1qR/p33 est en réalité capable d'interagir avec de multiples ligands tels que la thrombine, la vitronectine ou le kininogène de haut poids moléculaire (HK, « high molecular weight kininogen ») [Ghebrehiwet and Peerschke, 1998, Ghebrehiwet et al., 2001]. Il a également été montré que gC1qR/p33 est identique au facteur de transcription SF2 ou encore à la protéine de fixation de l'acide hyaluronique HABP1 (« hyaluronic acid binding protein »).

Bien que décrite comme un récepteur, gC1qR/p33 ne possède ni de domaine transmembranaire, ni d'ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) et son mode d'association à la membrane n'est pas connu. En plus de son expression à la membrane, gC1qR/p33 peut être détectée dans différents compartiments cellulaires et son expression peut être induite par des cytokines

inflammatoires telles que l'interferon γ (IFN- γ), le TNF- α (« tumor necrosis factor α) ou le LPS (lipopolysaccharide) [Ghebrehiwet et al., 2001]. Une autre étude a enfin montré que p33 peut être libérée *in vitro* dans le milieu par les cellules Raji [Peterson et al., 1997].

p33 est une protéine très acide qui est la cible d'interactions de charge avec ses partenaires. A cet égard, de nombreux rôles extra-cellulaires lui ont été attribués en tant que régulateur de la réponse induite par de nombreuses protéines plasmatiques dont C1q [Ghebrehiwet et al., 1994, Peerschke et al., 1994, Ghebrehiwet et al., 1995, Kuna et al., 1996, Leigh et al., 1998, Ghebrehiwet et al., 2001].

Enfin, il a été montré que gC1qR/p33 sert de site de fixation pour plusieurs pathogènes : la protéine A de *Staphylococcus aureus*, l'internaline B de *Listeria monocytogenes* ou la « core protein » du virus de l'hépatite C, permettant respectivement l'adhérence de *S. aureus* à la surface des plaquettes, l'entrée de *L. monocytogenes* dans la cellule hôte et la limitation de l'activation des lymphocytes T [Nguyen et al., 2000, Braun et al., 2000, Yao et al., 2004].

cC1qR/calréticuline (« receptor of the C1q collagenous domain ») est un récepteur de C1q isolé par chromatographie d'affinité à l'aide de C1q et ayant la capacité d'interagir avec le domaine de type collagène de C1q [Ghebrehiwet et al., 1984]. Ce récepteur interagit également avec la MBL et les protéines du surfactant SP-A et SP-D, protéines de la famille des collectines. Ces protéines présentent la particularité de posséder comme C1q un domaine de type collagène (*cf.* figure 1.3). Du fait de cette homologie structurale, ce récepteur est également communément appelé le récepteur des collectines. Le séquence N-terminale de ce récepteur a révélé un haut degré d'homologie avec la calréticuline (CRT) [Malhotra et al., 1993]. Il est maintenant accepté que la CRT et cC1qR sont une seule et même protéine.

La CRT est une protéine soluble et très chargée de 46 kDa qui fixe le calcium. Elle a été initialement localisée dans le réticulum endoplasmique (RE) de la plupart des cellules eucaryotes où elle participe à l'homéostasie du calcium et au contrôle de la qualité des glycoprotéines qui y sont formées. Elle assure ce rôle de chaperon avec la calnexine, autre protéine résidente du RE (CNX) [Alberts B., 2002].

La CRT a également été détectée dans le milieu extra-cellulaire et à la surface cellulaire sous certaines conditions de stress, lors de l'inflammation, d'un choc thermique ou d'une infection virale [Eggleton et al., 1997]. Cela en fait donc un bon candidat comme partenaire de C1q lors de l'activation cellulaire, même si, comme gC1qR/p33, la CRT ne possède ni domaine transmembranaire, ni ancre GPI.

Même si son mode d'attachement à la membrane n'est pas connu, la CRT peut, 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 avec C1q et la MBL [Ogden et al., 2001].

En conclusion, même si la CRT n'est pas un récepteur classique, elle doit probablement jouer un rôle important dans la modulation des fonctions de C1q lors de l'activation du complément dans certaines conditions inflammatoires.

CR1/CD35, le récepteur du complément de type 1 est capable de reconnaître les opsonines du complément : C1q, C3b et C4b [Klickstein et al., 1997]. CR1, présent à la surface des leucocytes et des érythrocytes, reconnaît 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'importance de ce récepteur dans les événements impliquant C1q reste à élucider.

1.2.3 C1q, protéine impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques

Déficiences en C1q et auto-immunité

L'auto-immunité est une réponse du système immunitaire adaptatif aux antigènes du soi, qui survient en cas de défaillance des mécanismes de tolérance. Cette réponse déclenche des lésions cellulaires et tissulaires, responsables de la pathologie des maladies auto-immunes induites.

Dans des conditions auto-immunes, quand le taux de complexes immuns est supposé élevé, on s'attendrait à observer une activation accrue du complément qui contribuerait à l'augmentation de l'inflammation et aux dommages tissulaires. Or, chez les patients qui développent une maladie auto-immune comme le lupus érythémateux disséminé (SLE, « systemic lupus erythematosus »), on observe une consommation accrue de C1q et les déficiences des éléments précoces du complément et en particulier de C1q et de C4 sont associées à ces maladies auto-immunes [Kölble and Reid, 1993]. Ainsi, la voie classique du complément semble participer à la réduction des conditions déclenchant l'auto-immunité. A l'inverse, les déficiences en C5-C9 n'ont pas été associées à des maladies auto-immunes [Kölble and Reid, 1993]. C1q a donc un rôle important dans le contrôle de l'auto-immunité.

L'inflammation est une réaction complexe du système immunitaire dans les tissus vascularisés, en réponse à un stimulus nocif. Elle comporte une

accumulation et une activation des leucocytes et des protéines plasmatiques au niveau du site d'une infection, d'exposition à une toxine ou à des lésions cellulaires. L'inflammation est initiée par des changements affectant les vaisseaux sanguins qui favorisent le recrutement des leucocytes. Alors que l'inflammation constitue une fonction protectrice en contrôlant les infections et en favorisant la cicatrisation des tissus, elle peut également être à l'origine de lésions tissulaires et de pathologies en cas de fonctionnement incontrôlé.

Déficiences en C1q et défaut de l'élimination des cellules apoptotiques

Les déficiences en C1q sont donc associées à une inflammation excessive et à des maladies auto-immunes comme le SLE et la glomérulonéphrite chez l'homme. Plus de 95% des individus déficients en C1q développent une maladie auto-immune de type SLE [Bowness et al., 1994]. De même, des souris déficientes en C1q présentent aussi un phénotype de type SLE et sont caractérisées par l'accumulation de corps apoptotiques dans les tissus [Botto et al., 1998].

Or, l'excès de cellules apoptotiques, source d'auto-antigènes, induit le développement de maladies auto-immunes [Mevorach et al., 1998b]. Ainsi, le défaut d'élimination des cellules apoptotiques étant associé aussi bien chez la souris que chez l'homme aux maladies auto-immunes en cas de déficience en C1q, cela suggère fortement que cette protéine a une grande importance dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques [Taylor et al., 2000].

Reconnaissance des cellules apoptotiques par les régions globulaires de C1q

In vitro, il a été rapporté que C1q se fixe à la surface des kératinocytes apoptotiques [Korb and Ahearn, 1997]. C1q a aussi la capacité de se fixer à la surface de cellules endothéliales ou de cellules mononucléées circulantes (PBMC, « peripheral blood mononuclear cell ») apoptotiques, cellules qui subissent régulièrement l'apoptose *in vivo* et qui sont exposées aux protéines circulantes de la voie classique du complément [Navratil et al., 2001].

Par des expériences de compétition à l'aide d'anticorps dirigés contre les régions globulaires (GR) de C1q ou de GR purifiées, Navratil et collaborateurs ont également montré que la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q se faisait *via* ses GR [Navratil et al., 2001].

1.3 Présentation générale de l'apoptose

1.3.1 Terminologie

La mort cellulaire normale a d'abord été observée durant la métamorphose des amphibiens, puis dans plusieurs tissus en développement tant chez les invertébrés que chez les vertébrés. Le terme apoptose, du grec : *apo* - au loin et *ptosis* - chute (faisant référence à la chute des feuilles en automne) a été utilisé pour la première fois en 1972 pour décrire un certain mode de mort cellulaire responsable de la perte de cellules dans des tissus sains [Kerr et al., 1972]. Ces cellules mourantes démontrent des caractéristiques morphologiques communes, et distinctes de celles observées dans les cellules mourant accidentellement par nécrose. L'existence d'un programme endogène sous-jacent de mort cellulaire a ainsi été suggéré.

Ainsi l'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus actif par lequel les cellules indésirables ou inutiles prennent part à leur propre destruction. On parle également de « suicide cellulaire ». Cette mort physiologique, génétiquement programmée, est nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires [Wyllie et al., 1980].

1.3.2 Caractéristiques générales

Aspects morphologiques

Selon la nature ou le degré des altérations causées à la cellule par différents stress ou dommages toxiques, la mort cellulaire peut être soit nécrotique, soit apoptotique. Ces deux mécanismes diffèrent radicalement [Alberts B., 2002].

La nécrose a généralement lieu lorsque la cellule est exposée à des conditions extrêmes, éloignées des conditions physiologiques, en cas par exemple d'hypoxie ou d'hypothermie. La perte de l'intégrité cellulaire qui y est associée a pour conséquence le relargage du contenu cellulaire dans l'interstitium. La nécrose peut également être induite en conditions physiologiques lorsque la membrane plasmique est directement lésée par des virus lytiques ou le complexe d'attaque membranaire du complément. Ainsi, la nécrose est souvent associée aux dommages des tissus environnants et à une réponse inflammatoire intense.

A l'inverse, l'apoptose est une mort cellulaire qui a généralement lieu en conditions physiologiques, et la cellule elle-même participe à son auto-destruction qui se traduit par la rétraction progressive de la cellule (figure 1.4) [Ferguson and Anderson, 1981]. Morphologiquement, l'agrégation de la

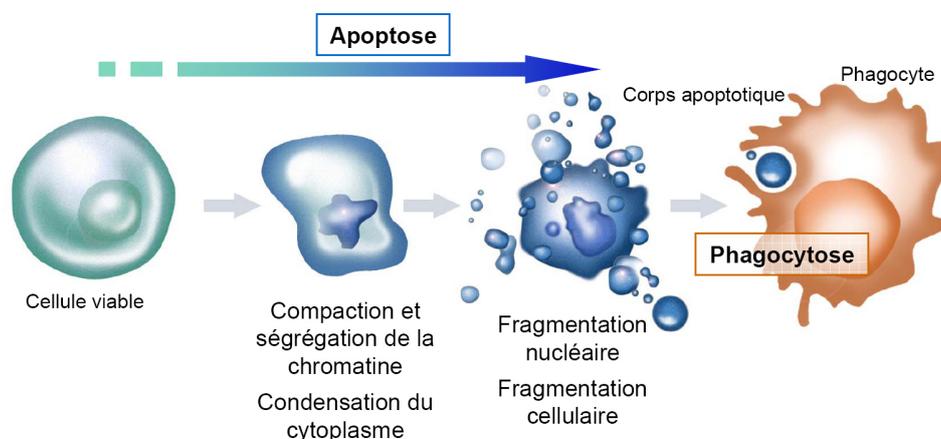


FIG. 1.4 – Représentation schématique des modifications morphologiques observées au cours de l'apoptose.

chromatine, la condensation du cytoplasme, la fragmentation caractéristique du matériel génétique conduisent à la formation de fragments cellulaires ou corps apoptotiques contenant du matériel nucléaire et des organelles souvent intactes. *In vivo*, ces corps apoptotiques sont reconnus de façon concomitante à la progression de l'apoptose et sont phagocytés par les phagocytes professionnels ou les cellules épithéliales adjacentes. Grâce à ce mécanisme efficace d'élimination des cellules apoptotiques, aucune réaction inflammatoire n'est induite. *In vitro*, les corps apoptotiques gonflent et sont finalement lysés. Cette phase terminale de mort cellulaire *in vitro* est appelée « nécrose secondaire ».

Ainsi, en conditions normales, la formation de corps apoptotiques, ayant conservé une membrane plasmique intacte, prévient le relargage des constituants intra-cellulaires et limite donc la réaction inflammatoire des tissus environnants.

Voies d'induction

Ces dernières années, de grands progrès ont été faits pour la compréhension des mécanismes élémentaires de l'apoptose ainsi que des acteurs moléculaires impliqués.

L'apoptose peut être induite par deux voies d'activation, synthétisées et présentées de façon générale dans la figure 1.5 [Youle and Strasser, 2008]. Ces voies d'induction convergent vers l'activation de caspases (« cysteinyl-aspartate-cleaving protease ») qui, comme leur nom l'indique sont des protéases à cystéine qui clivent leurs substrats au niveau des résidus aspartiques.

Les caspases sont synthétisées sous la forme de zymogènes inactifs. Leur clivage (auto-lytique pour les caspases initiatrices ou catalysé par des caspases en amont pour les caspases effectrices) va entraîner leur activation successive et va induire une cascade protéolytique, conduisant irrémédiablement à la mort de la cellule.

La voie intrinsèque, aussi appelée voie mitochondriale en référence au rôle joué par cet organite, est activée par divers signaux développementaux ou stress cytotoxiques, tels que des dommages de l'ADN, une infection virale, une privation de facteurs de croissance ou la présence d'agents génotoxiques. Cette voie est strictement contrôlée par les membres de la famille de protéines BCL-2 (« B-cell lymphoma-2 ») qui régulent le relargage dans le cytosol du cytochrome c contenu dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. Cette famille comprend des protéines pro- (BAX, BAK, BID) ou anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-XL, BCL-W). Le cytochrome c relargué par la mitochondrie s'assemble avec APAF1 (« apoptotic protease-activating factor-1 ») pour former l'apoptosome, ce qui conduit à l'activation de la caspase-3.

La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort est déclenchée par l'activation de « récepteurs de mort » (membres de la famille du récepteur TNF « Tumor necrosis factor », tels que Fas ou TNFR1) [Ashkenazi and Dixit, 1998]. Ces récepteurs de mort détectent les signaux extra-cellulaires indiquant que l'environnement n'est pas favorable. S'ils fixent leur ligand, ces récepteurs initient une cascade de transduction aboutissant à la mort cellulaire. En effet, ces récepteurs contiennent un domaine de mort intra-cellulaire qui peut recruter et activer la caspase-8 *via* la protéine adaptatrice FADD ou « Fas-associated death domain » à la surface cellulaire. Le recrutement de la caspase-8 initiatrice cause l'activation de caspases effectrices en aval, telles que les caspases-3, -6 ou -7. Dans certains cas, la voie extrinsèque peut s'entrecroiser avec la voie intrinsèque *via* le clivage de la protéine pro-apoptotique BID (BH3-interacting domain) par la caspase-8 et induire ainsi l'apoptose *via* la voie intrinsèque.

Ces deux voies d'induction de l'apoptose aboutissent à l'activation des caspases. Ces caspases clivent un ensemble de substrats, activent des DNases et orchestrent le démantèlement de la cellule.

La mitochondrie joue donc un rôle crucial dans le déclenchement et l'exécution de l'apoptose. Elle est responsable [Green and Reed, 1998] :

1. du relargage de cytochrome c qui induit l'activation des caspases,
2. de l'altération du potentiel redox de la cellule,
3. de la production et la libération d'espèces réactives de l'oxygène.

Cela conduit entre autres à la formation de structures cellulaires oxydées.

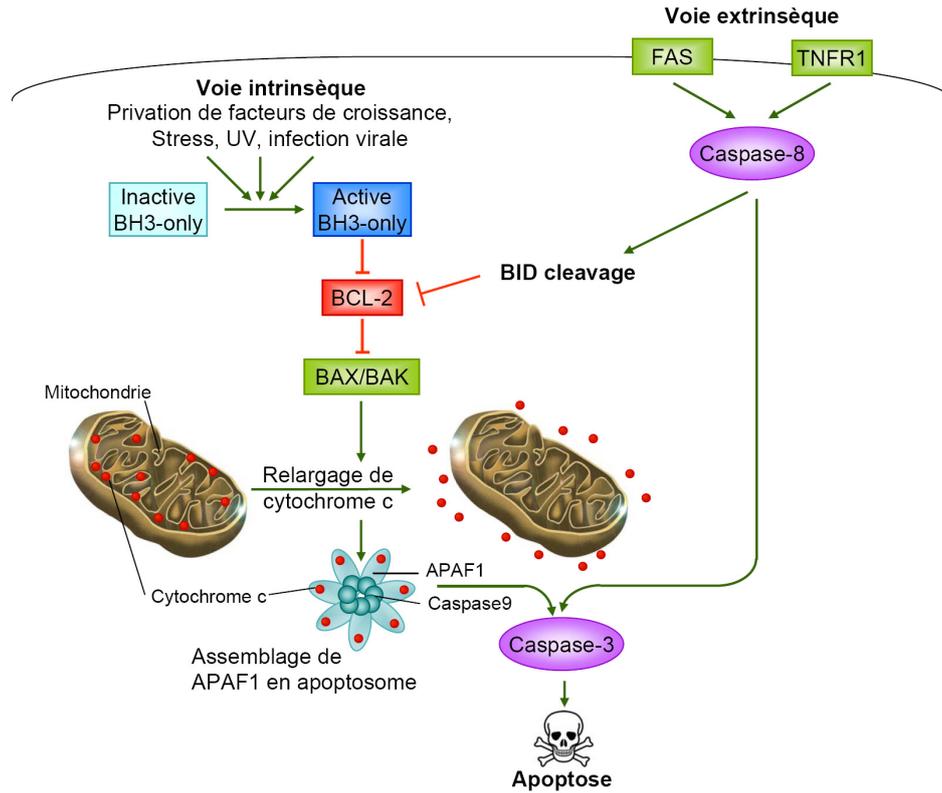


FIG. 1.5 – Représentation schématique des voies d'induction de l'apoptose. L'apoptose peut être induite par des récepteurs présents à la surface cellulaire (voie extrinsèque, panneau de droite) ou par un ensemble de stimuli génotoxiques, de stress métaboliques ou d'alertes intra-cellulaires (voie intrinsèque, panneau de gauche). Les deux voies aboutissent à l'activation de caspases effectrices et au démantèlement de la cellule. D'après [Youle and Strasser, 2008]

1.3.3 Fonctions physiologiques de l'apoptose

L'apoptose est couramment utilisée pour éliminer les cellules indésirables, superflues ou potentiellement nocives au cours du développement, et tout au long de la vie de l'organisme, pour le maintien normal de l'homéostasie tissulaire et l'élimination de cellules potentiellement nocives. A la différence de la mort cellulaire accidentelle, l'apoptose aboutit à l'élimination efficace des cellules mortes par phagocytose. Ainsi, leurs composants intra-cellulaires potentiellement dangereux ne sont donc pas dispersés dans le milieu environnant.

Au cours du développement

L'apoptose fait partie intégrante du programme de développement des tissus animaux ou végétaux (pour revue [Vaux and Korsmeyer, 1999]). Ce processus est fondamental pour le développement des organismes pluricellulaires au cours duquel de nombreuses cellules embryonnaires sont amenées à mourir. Le développement d'un organe est généralement précédé par une phase de division extensive suivie d'une phase de différenciation d'un type cellulaire particulier. La masse cellulaire restante est ensuite supprimée par apoptose.

Des exemples classiques sont la mise en place des systèmes nerveux et immunitaire et la morphogenèse des doigts chez les vertébrés, processus qui font appel massivement à la mort cellulaire programmée.

Pour l'élimination des cellules dangereuses ou inutiles

L'apoptose peut se déclencher lorsqu'une cellule a subi des dommages irréversibles ou qui requièrent trop d'énergie pour être réparés. C'est le cas par exemple d'une cellule infectée par un virus, soumise à un stress, ou bien encore lorsque son ADN est endommagé. L'apoptose permet ainsi d'éliminer la cellule abîmée et dangereuse et/ou de limiter la dispersion de l'infection virale.

De nombreux stimuli physiologiques ou développementaux induisent l'apoptose et des altérations de ce processus essentiel semblent impliquées dans un grand nombre de pathologies cancéreuses [Reed, 1999]. Dans de nombreux cas, le processus de carcinogenèse semble dépendre d'un déficit sélectif d'apoptose qui permet la survie de cellules ayant subi des mutations de l'ADN. Le blocage anormal du suicide cellulaire, constitue une étape décisive dans la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse.

Pour le maintien de l'homéostasie cellulaire

Dans un organisme adulte, le nombre de cellules est maintenu constant grâce à la division cellulaire et à l'apoptose. Lorsque les cellules deviennent moins efficaces et perdent leur capacité à remplir leurs fonctions spécialisées, le programme de mort cellulaire est enclenché. Ainsi, les cellules âgées, sénescents ou ne fonctionnant pas correctement sont éliminées et remplacées par de nouvelles cellules. La prolifération est compensée par l'apoptose [Raff, 1992].

Au sein du système immunitaire

L'apoptose est impliquée dans le développement des lymphocytes, la régulation des réponses des lymphocytes contre les antigènes étrangers et le maintien de la tolérance envers les antigènes du soi.

Au cours de la maturation des lymphocytes dans le thymus et dans la moëlle osseuse, la sélection clonale permet d'éliminer les lymphocytes auto-réactifs qui pourraient s'attaquer aux cellules de l'organisme. Cette sélection négative est effectuée par déclenchement de l'apoptose (pour revue [Charles A Janeway, 2001]). De même, les lymphocytes T auto-réactifs circulants, ayant échappé à la sélection négative, sont réprimés et peuvent être induits à mourir par apoptose par les cellules dendritiques : ce mécanisme permet le maintien de la tolérance périphérique.

Le système immunitaire permet de répondre à l'invasion de pathogènes. La réaction immunitaire aboutit normalement à l'élimination du pathogène et des cellules infectées. Lorsque toutes les traces de pathogènes ont été éliminées, les cellules ayant servi à la résolution de l'infection deviennent inutiles. Une fois l'infection résolue, les millions de lymphocytes T cytotoxiques qui circulent toujours à la recherche de cellules infectées sont éliminés par apoptose. L'apoptose permet donc d'assurer le caractère transitoire de la réponse immunitaire. L'importance de ce mécanisme est soulignée par le fait que des déficiences dans cette voie d'induction de l'apoptose sont à l'origine d'une maladie auto-immune, le syndrome lymphoprolifératif [Watanabe-Fukunaga et al., 1992].

1.4 L'élimination des cellules apoptotiques

Des cellules libres en train de mourir sont rarement observées dans les tissus. Pourtant chaque jour des millions de cellules meurent par apoptose, mais ce processus passe inaperçu du fait de l'élimination rapide des corps apoptotiques. Cette élimination rapide et efficace explique en partie le fait que l'apoptose n'ait été que tardivement identifiée comme un événement physiologique fréquent.

Les changements morphologiques et biochimiques de l'apoptose ont été le sujet d'études très approfondies : les acteurs moléculaires, les voies de signalisation et les mécanismes de résistance du programme de mort cellulaire sont de mieux en mieux compris. A l'inverse, les mécanismes impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques n'ont été étudiés que plus récemment et sont encore loin d'être bien compris.

1.4.1 Présentation générale

Importance physiologique

Les déficiences dans le processus d'élimination des cellules apoptotiques sont souvent associées à des pathologies inflammatoires et auto-immunes, comme le lupus érythémateux disséminé ou SLE [Fadok et al., 2001a, Henson et al., 2001, Savill et al., 2002, Franc, 2002].

En condition normale, les cellules mourantes sont reconnues, ingérées et dégradées par les phagocytes de façon très précoce, limitant ainsi l'exposition inappropriée des constituants intra-cellulaires aux tissus adjacents [Savill, 1997]. En exposant des marqueurs de reconnaissance dès l'initiation du programme de mort, les cellules apoptotiques facilitent leur élimination précoce de façon inoffensive sans perte de l'intégrité membranaire et donc sans libération de contenu cellulaire, ce qui permet de limiter le développement de l'inflammation et de l'auto-immunité.

Les acteurs de la reconnaissance

Les cellules apoptotiques sont éliminées par phagocytose, préférentiellement par les phagocytes professionnels, tels que les macrophages et les cellules dendritiques immatures, qui présentent une forte capacité de phagocytose et une grande mobilité. Bien que la plupart des cellules apoptotiques soient éliminées par les macrophages et les cellules dendritiques, il est maintenant bien établi que des phagocytes de types cellulaires très variés peuvent prendre en charge une cellule voisine en train de mou-

rir [Parnaik et al., 2000, Franc, 2002]. Par exemple, chaque jour au niveau de la rétine, les cellules épithéliales éliminent les cellules en bâtonnet usées [Finnemann et al., 1997], alors qu'au cours du développement les cellules mésenchymateuses phagocytent les cellules devenues inutiles [Wood et al., 2000].

Les phagocytes professionnels peuvent ingérer des cibles très différentes : des cellules apoptotiques, des bactéries ou des pathogènes opsonisés. Bien que le terme générique de phagocytose soit utilisé pour la prise en charge de ces particules, des différences bien établies existent pour les mécanismes impliqués en fonction du type de cible : les ligands et les récepteurs utilisés, la morphologie et les voies de signalisation associées [Aderem and Underhill, 1999]. Par exemple, la reconnaissance directe des organismes pathogènes, éléments du « non-soi », par les cellules dendritiques et les macrophages implique souvent la reconnaissance de PAMPs par les membres de la famille des récepteurs de type Toll à la surface des phagocytes. Les pathogènes opsonisés sont quant à eux éliminés *via* les récepteurs du complément ou des fragments constants (Fc) des immunoglobulines. La reconnaissance des cellules apoptotiques implique quant à elle des signaux appelés « eat-me », exposés au cours de l'apoptose et permettant de les distinguer des cellules normales. Par homologie aux PAMPs, ces déterminants du « soi altéré » ont été appelés ACAMPs ou « apoptotic cell-associated molecular patterns ». Ces signaux sont reconnus par des récepteurs exprimés par les phagocytes [Savill and Fadok, 2000].

Mais la différence majeure entre la phagocytose des pathogènes et celle des cellules apoptotiques est la réponse immune induite en aval. Tandis que l'élimination des pathogènes provoque souvent une réponse pro-inflammatoire, l'ingestion des cellules apoptotiques est généralement anti-inflammatoire ou au moins neutre du point de vue immunologique [Henson, 2005].

Ainsi les mécanismes et les conséquences de l'élimination des cellules apoptotiques sont particuliers et peuvent être divisés en plusieurs étapes : la perception des cellules apoptotiques, leur reconnaissance par les phagocytes, l'internalisation de la cible, sa dégradation et l'induction d'une réponse par les phagocytes.

1.4.2 Exposition de signaux « eat-me » à la surface des cellules apoptotiques

La discrimination entre cellules apoptotiques et cellules viables par les phagocytes a lieu avant la perméabilisation et la lyse de la cellule mourante, ce qui sous-entend l'implication de modifications précoces à la surface cellulaire.

Exposition de la phosphatidylsérine

Le changement le mieux caractérisé de la membrane plasmique qui a lieu de façon précoce au cours de l'apoptose est la perte de l'asymétrie membranaire et l'exposition de la phosphatidylsérine (PS) (figure 1.6 A) [Fadok et al., 1992, Martin et al., 1995, Fadok et al., 1998a, Fadok et al., 2001b, Hoffmann et al., 2001, Schlegel and Williamson, 2001].

La membrane plasmique est naturellement asymétrique, c'est-à-dire que chaque feuillet de la membrane a une composition particulière. En ce qui concerne les lipides, la PS et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont plutôt confinées sur le feuillet interne, tandis que la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SM) sont majoritairement présentes sur le feuillet externe (figure 1.6 A).

L'asymétrie de la membrane plasmique des cellules viables et le maintien de la PS sur le feuillet interne sont normalement assurés par l'activité d'une aminophospholipide translocase dépendante de l'ATP (pour revue [Bever et al., 1999, Daleke and Lyles, 2000]). Cette flippase ramène vers le feuillet interne de la membrane plasmique toute molécule de PS (et aussi, dans une moindre mesure, la PE) qui aurait atteint le feuillet externe (figure 1.6 B, gauche).

Bien que le mécanisme précis qui permet l'exposition de la PS au cours de l'apoptose sur le feuillet externe ne soit pas encore complètement élucidé, il semble que cela implique de façon concomitante au moins deux facteurs (figure 1.6 B, droite) :

- l'activation d'une scramblase bi-directionnelle non spécifique. Cette scramblase membranaire non spécifique met en mouvement les phospholipides de façon bi-directionnelle à travers la membrane, augmentant ainsi l'exposition de la PS à la surface (pour revue [Sims and Wiedmer, 2001]).
- l'inhibition de la flippase qui assure normalement le confinement de la PS sur le feuillet interne.

Des expériences d'inhibition de l'ingestion de cellules apoptotiques, soit par des liposomes contenant de la PS, soit par de la phosphosérine soluble suggèrent que la PS est utilisée comme signal de phagocytose [Fadok et al., 1992]. Il a été montré depuis que l'exposition précoce de la PS est quasi-universellement requise pour l'élimination des cellules apoptotiques [Fadok et al., 1992, Fadok et al., 1998a, Fadok et al., 2001b, Hoffmann et al., 2001, Schlegel and Williamson, 2001].

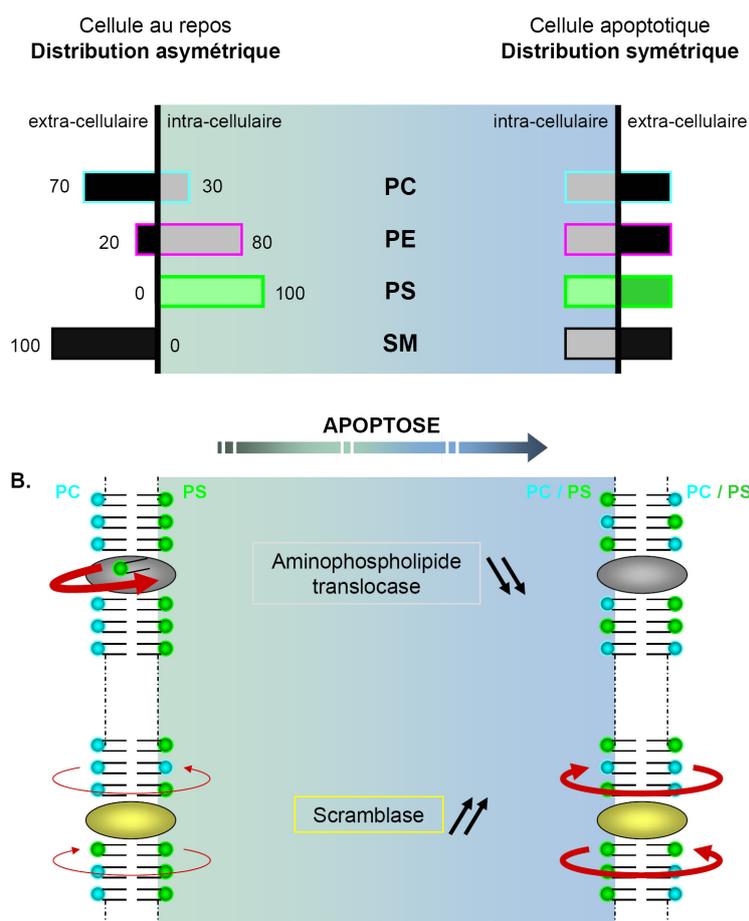


FIG. 1.6 – L'asymétrie membranaire (A.) Représentation schématique de la distribution des lipides membranaires pour une cellule au repos (panneau de gauche) et pour une cellule apoptotique (panneau de droite). (B.) Mécanismes d'exposition de la PS au cours de l'apoptose. PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidyléthanolamine; SM, sphingomyéline. D'après [Gardai et al., 2006].

Modification du profil de glycosylation

D'autres modifications de la surface cellulaire interviennent au cours de l'apoptose et permettent la reconnaissance des cellules apoptotiques. C'est le cas du profil de glycosylation qui est modifié à la surface des cellules apoptotiques, ce qui constitue un signe d'apoptose [Morris et al., 1984]. Les chaînes oligosaccharidiques à la surface cellulaire sont altérées et ces modifications sont reconnues par les phagocytes [Duvall et al., 1985, Dini et al., 1992, Falasca et al., 1996, Azuma et al., 2000, Azuma et al., 2002].

La plupart des protéines destinées à l'appareil de Golgi, aux lysosomes, à la membrane plasmique ou à l'espace extra-cellulaire sont des glycoprotéines. Ces protéines sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) où débute leur glycosylation. Un oligosaccharide précurseur, riche en mannose (Man) et en glucose (Glc) (figure 1.7 A, panneau de gauche) est transféré en bloc au groupement NH_2 de la chaîne latérale d'un résidu asparagine (Asn) de la protéine : cet oligosaccharide est dit N-lié.

La structure de ce précurseur originel est ensuite considérablement modifiée au cours de la maturation de la protéine dans le RE puis dans l'appareil de Golgi (figure 1.7 A). Dans le RE, trois résidus Glc et un résidu Man sont rapidement éliminés des oligosaccharides de la majorité des glycoprotéines (figure 1.7 A). Cet « élagage » de l'oligosaccharide se poursuit dans l'appareil de Golgi, accompagné d'additions de résidus supplémentaires : N-acétyl-glucosamine (GlcNAc), galactose (Gal) et acide sialique (AcSial). Au final, on retrouve sur les glycoprotéines de mammifères deux grandes classes d'oligosaccharides N-liés : les oligosaccharides complexes (figure 1.7 D) et les oligosaccharides riches en Man (figure 1.7 C).

Les oligosaccharides riches en Man contiennent deux GlcNAc et de nombreux résidus de Man. Les oligosaccharides complexes, au contraire, peuvent contenir un nombre variable de résidus GlcNAc, Gal et AcSial et dans certains cas, du fucose (Fuc) branché sur la GlcNAc la plus proche de l'Asn. L'AcSial a une importance particulière, car il est le seul résidu glucidique des glycoprotéines portant une charge négative nette. Les AcSial sont présents de façon ubiquitaire à l'extrémité non réduite des chaînes oligosaccharidiques et sont importants pour de nombreux événements biologiques : interactions intermoléculaires et inter-cellulaires, protection des cellules du soi des attaques du système immunitaire, . . . [Varki, 1997, Schauer, 2004, Crocker et al., 2007, Lehmann et al., 2006].

Au cours de ces vingt dernières années, de nombreuses études ont analysé les sucres exposés à la surface de divers types de cellules apoptotiques. La désialylation semble être un phénomène universel [Hart et al., 2000, Azuma et al., 2000, Azuma et al., 2002, Franz et al., 2007]. A l'inverse, le

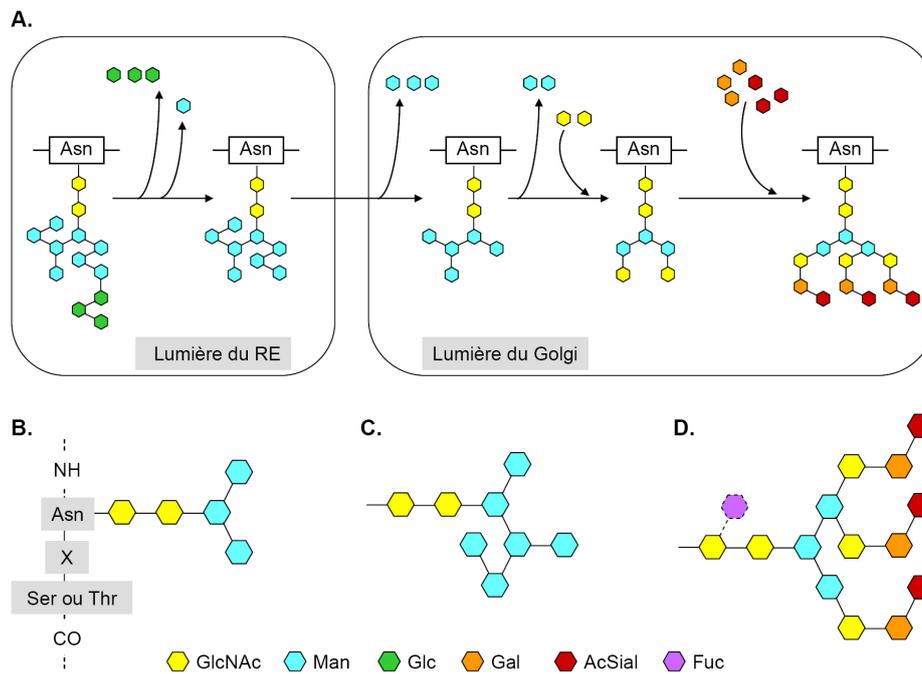


FIG. 1.7 – N-glycosylation des protéines. (A.) Transformation des glycoprotéines dans le RE et l'appareil de Golgi. Chaque oligosaccharide est constitué d'une région centrale (B.) dérivée de l'oligosaccharide N-lié dans le RE. Représentation d'un oligosaccharide des deux principales classes d'oligosaccharides N-liés trouvées dans les glycoprotéines matures : un oligosaccharide riche en mannose (C.) et un oligosaccharide complexe (D.).

fucose, le galactose, la N-acétyl-glucosamine, la N-acétyl-galactosamine et le mannose deviennent accessibles à la surface cellulaire au cours de l'apoptose [Dini et al., 1992, Falasca et al., 1996, Russell et al., 1998, Rapoport and Pendu, 1999, Hart et al., 2000, Azuma et al., 2002, Bilyy et al., 2004, Franz et al., 2006, Franz et al., 2007].

Il a été supposé que la perte des AcSial était due à la libération de sialidases par les cellules apoptotiques. En effet, à la surface des cellules Jurkat traitées à l'étoposide, un inducteur de l'apoptose, l'activité sialidase augmente [Azuma et al., 2000].

Cependant, l'inhibition des sialidases ne permet pas de bloquer significativement la désialylation de la surface des cellules apoptotiques [Sarter et al., 2007]. Les sialidases ne contribuent ainsi que partiellement à la modification du profil de glycosylation de la surface cellulaire au cours de l'apoptose. Il est à noter que les sucres exposés à la surface des cellules apoptotiques se rencontrent en position terminale des oligosaccharides chacun à leur tour au cours de la synthèse des glycoprotéines (figure 1.7 A). La fusion avec la membrane plasmique, de membranes du RE et de l'appareil de Golgi contenant des glycoprotéines dont la synthèse des oligosaccharides est inachevée pourrait ainsi aboutir à l'exposition de glycoconjugués immatures asialylés (figure 1.8) [Franz et al., 2007].

Ainsi, une façon d'expliquer les modifications des glycosylations au cours de l'apoptose est que les AcSial sont éliminés permettant l'exposition de résidus préalablement masqués, tandis que des oligosaccharides immatures issus du trafic intra-cellulaire sont exposés (figure 1.8). Ces modifications aboutissent à l'exposition de glycoconjugués asialylés.

Or, la perte des acides sialiques est associée à une adhésion accrue et à une diminution de la charge négative à la surface cellulaire [Gallin, 1980]. La désialylation de la membrane plasmique des cellules apoptotiques facilite donc leur reconnaissance et leur élimination par les phagocytes. Il a par ailleurs été montré que des sucres exogènes (Gal, Glc, Fuc, GlcNAc, GalNAc) peuvent inhiber la phagocytose des cellules apoptotiques [Duvall et al., 1985, Savill et al., 1989, Dini et al., 1992, Hall et al., 1994, Falasca et al., 1996, Azuma et al., 2002, Rapoport et al., 2003]. Ainsi, la réduction du nombre des acides sialiques permettrait de diminuer les forces électro-statiques répulsives entre les cellules et les phagocytes, tandis que les oligosaccharides asialylés, démasqués par les sialidases ou nouvellement exposés seraient impliqués dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques.

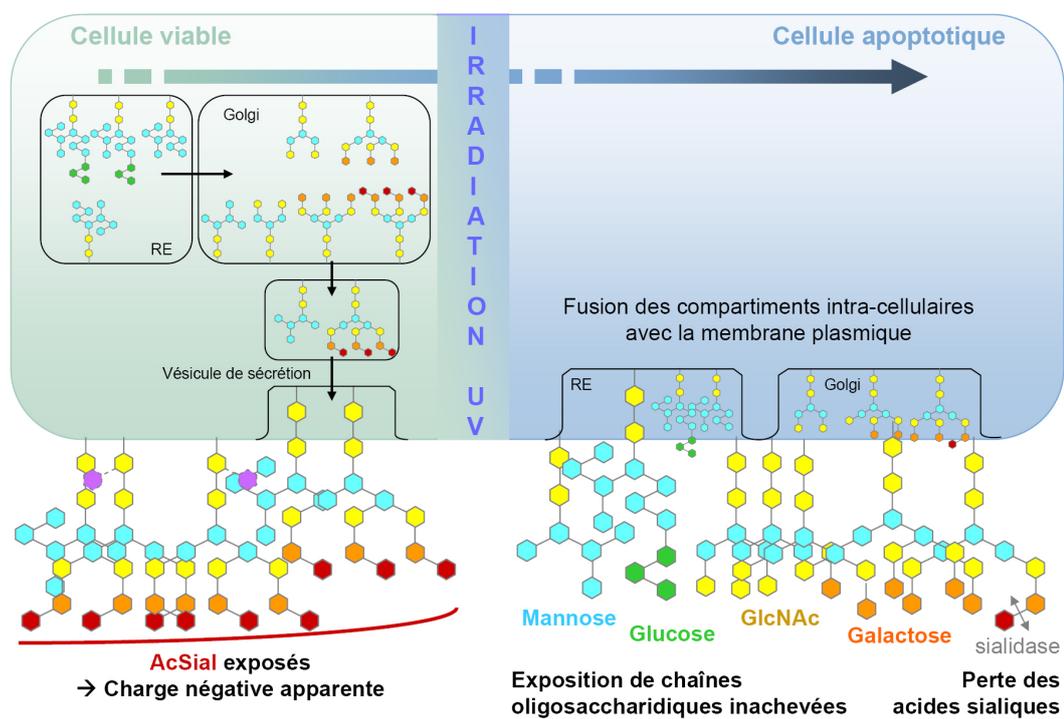


FIG. 1.8 – Exposition de chaînes oligosaccharidiques asialylées au cours de l'apoptose.

Modification de l'oxydation des macromolécules

Différents stimuli apoptotiques, dont les UV, induisent un stress oxydant ; les cellules en cours d'apoptose génèrent ainsi des espèces réactives de l'oxygène menant entre autre à la peroxydation des lipides membranaires [Buttke and Sandstrom, 1994].

Il a été montré que les lipoprotéines de basse densité (LDL, « low-density lipoprotein ») oxydées (oxLDL) et les cellules apoptotiques partagent un grand nombre de récepteurs phagocytaires [Ramprasad et al., 1995, Platt et al., 1996, Fukasawa et al., 1996, Oka et al., 1998]. Les oxLDL peuvent également inhiber de façon compétitive la fixation des cellules apoptotiques sur les macrophages [Sambrano and Steinberg, 1995, Bird et al., 1999]. Par ailleurs, des anticorps dirigés contre les phospholipides oxydés des oxLDL ont la capacité de se fixer à la surface des cellules apoptotiques et d'inhiber leur phagocytose par les macrophages [Chang et al., 1999].

Ces données montrent que les cellules apoptotiques expriment à leur surface des épitopes spécifiques de l'oxydation, dont des phospholipides oxydés, qui servent de ligands pour la reconnaissance et la phagocytose par les macrophages. La nature de ces épitopes est toujours en cours d'étude.

Par ailleurs il a été montré que l'oxydation de la PS est également essentielle pour induire une phagocytose efficace des cellules apoptotiques [Kagan et al., 2002, Matsura et al., 2002].

Exposition d'éléments d'origine nucléaire

La désintégration du noyau et la fragmentation de l'ADN sont des traits particuliers de la mort cellulaire par apoptose.

Il semble de plus en plus évident que l'accumulation de cellules apoptotiques soit responsable de l'induction de maladies auto-immunes, comme c'est le cas pour le SLE, maladie auto-immune multifactorielle (voir section 1.4.1). L'une des caractéristiques de ces pathologies est la génération d'auto-anticorps dirigés contre les composants de la chromatine : ADN, histones et leurs complexes [Shoenfeld et al., 1987]. Chez ces patients, des taux élevés d'ADN extra-cellulaire sont détectés [Sidransky, 2000]. Or, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, les cellules apoptotiques relarguent de l'ADN dans le milieu extra-cellulaire [Choi et al., 2004, Choi et al., 2005, Pisetsky and Fairhurst, 2007].

Par ailleurs, 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 [Alberts B., 2002]. Un

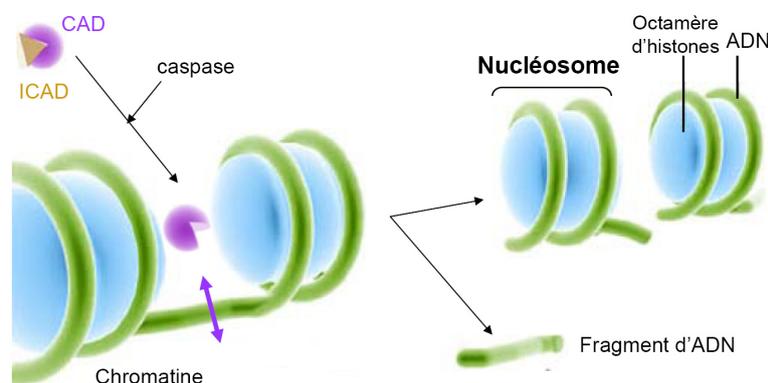


FIG. 1.9 – Mécanisme de relargage des nucléosomes au cours de l'apoptose. D'après <http://biologyofcells.blogspot.com/2007/12/apoptosis.html>

nucléosome est constitué d'ADN et d'un octamère d'histones (figure 1.9). Ces nucléosomes permettent l'empaquetage de l'ADN en chromatine dans le noyau et le contrôle de l'expression des gènes. Au cours de l'apoptose, l'ADN est clivé par une endonucléase, CAD (« caspase-activated DNase »). CAD pré-existe dans les cellules normales sous forme d'un complexe inactif avec une sous-unité régulatrice ICAD (inhibiteur de CAD) (figure 1.9). Lors de l'apoptose, les voies d'induction aboutissent à l'activation de la caspase-3 qui clive ICAD. Ce clivage a pour conséquence de libérer CAD qui peut alors dégrader l'ADN. La conséquence de cette dégradation de l'ADN par l'endonucléase CAD est le relargage de nucléosomes dans le cytoplasme (figure 1.9).

Il a été montré que la PS interagit avec les histones de la chromatine [Manzoli et al., 1987, Maraldi et al., 1987] et que cette interaction induit le déroulement du nucléosome, augmentant l'accessibilité à l'ADN [Cocco et al., 1984]. Par ailleurs, les histones se fixent à la PS [Fürnrohr et al., 2007]. L'hypothèse peut être émise que des complexes histone-PS soient transloqués du cytoplasme vers la membrane plasmique, ce qui permettrait ensuite l'exposition des histones et donc des nucléosomes à la surface cellulaire. La PS, site d'attachement des nucléosomes, serait donc responsable de l'exposition de l'ADN au cours de l'apoptose.

Redistribution de la calréticuline

La calréticuline (CRT) est une protéine chaperon de 46 kDa, hautement conservée, également identifiée comme récepteur de C1q (*cf.* section 1.2.2). Du fait de ses fonctions dans le contrôle des glycoprotéines

nouvellement synthétisées et l'homéostasie du calcium, il a été longtemps pensé qu'elle était séquestrée dans le RE ([Ostwald and MacLennan, 1974, Michalak et al., 1999, Bedard et al., 2005, Williams, 2006]). Cependant, la CRT a également été localisée, hors du RE, dans différents compartiments cellulaires [Burns et al., 1994], mais également à la surface de la plupart des cellules de mammifères et dans le plasma [Arosa et al., 1999, Sadasivan et al., 1996, White et al., 1995, Johnson et al., 2001]. Cependant la CRT ne possède ni domaine transmembranaire, ni site de fixation pour une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Actuellement, les mécanismes par lesquels la CRT accède à la surface cellulaire ne sont toujours pas connus.

Divers types de stress cellulaires, comme l'apoptose, induisent l'expression de nombreuses protéines, dont la CRT [Heal and McGivan, 1998]. Jethmalani et collaborateurs ont proposé que cette élévation de l'expression de la CRT pourrait entraîner une augmentation du taux de CRT à la surface cellulaire [Jethmalani et al., 1997]. En 2005, Gardai et collaborateurs ont montré qu'au cours de l'apoptose, la CRT à la surface cellulaire non seulement voit son taux global augmenter mais est également redistribuée [Gardai et al., 2005].

Le caractère ubiquitaire de la protéine et les modulations de sa distribution à la surface cellulaire en font un bon candidat comme ligand de reconnaissance des cellules apoptotiques.

Enfin, il a été montré que l'induction de l'apoptose par les anthracyclines induit l'exposition de la CRT à la surface de cellules issues de lignées cancéreuses. De plus, le blocage de la CRT par des anticorps spécifiques et la réduction de son expression par interférence ARN suppriment la phagocytose de ces cellules apoptotiques par les cellules dendritiques [Obeid et al., 2007].

1.4.3 Mécanismes de reconnaissance des cellules apoptotiques

Reconnaissance de la PS

La reconnaissance de la PS exposée au cours de l'apoptose est le système impliqué dans l'élimination des cellules apoptotiques le mieux caractérisé jusqu'ici [Fadok et al., 1998a].

Des protéines solubles telles que GAS6 (« growth arrest-specific gene 6 ») et la protéine S peuvent fixer la PS et sont à leur tour reconnues par des membres de la famille des récepteurs à tyrosine kinase Mer, exprimés à la surface des phagocytes [Nagata et al., 1996, Nakano et al., 1997, Ishimoto et al., 2000, Anderson et al., 2003, Hall et al., 2005] (figure 1.10). Les souris exprimant la protéine Mer dont le domaine cytoplasmique est tron-

qué, présentent une déficience dans l'élimination des cellules apoptotiques et un taux élevé d'auto-anticorps nucléaires [Scott et al., 2001]. Cependant, la fixation des cellules apoptotiques sur les phagocytes est préservée chez ces souris mutantes, suggérant que seul la phagocytose est dépendante de la portion cytoplasmique de Mer. Ainsi Mer permet non seulement de fixer les cellules apoptotiques *via* la molécule de pontage GAS6 qui reconnaît la PS, mais également d'induire leur phagocytose.

MFG-E8 (« milk fat globule-EGF-factor 8 ») est une autre de ces molécules de pontage sécrétées par les macrophages activés. Les cellules apoptotiques recouvertes de MFG-E8 sont reconnues par le récepteur de la vitronectine, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, et phagocytées par les macrophages (figure 1.10) [Hanayama et al., 2002]. Le couple MFG-E8 - $\alpha_v\beta_3$ a également été impliqué dans la phagocytose des cellules apoptotiques par les cellules dendritiques [Akakura et al., 2004]. Les souris déficientes en MFG-E8 montrent des signes de réactions auto-immunes dues à un défaut spécifique de l'élimination des corps tingibles des macrophages dans les centres germinaux [Hanayama et al., 2004b]. Le besoin de MFG-E8 dans cette situation si particulière laisse supposer que d'autres membres de la famille de MFG-E8 sont impliqués dans les autres tissus. A ce propos, Del1 (« developmental endothelial locus-1 »), protéine structurellement et fonctionnellement homologue de MFG-E8, a également la capacité de se fixer à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et participe aussi à l'élimination des cellules apoptotiques [Hanayama et al., 2004a].

D'autres molécules de pontage fixant la PS mais ayant des rôles moins bien définis ont également été décrites, comme par exemple la β 2-glycoprotéine 1 (β 2-GP1) (figure 1.10) [Balasubramanian et al., 1997].

Il y a quelques années, PSR (« PS receptor »), un récepteur spécifique de la PS à la surface des phagocytes a été décrit comme étant capable non seulement de reconnaître la PS, mais également de transduire les signaux intracellulaires nécessaires à la phagocytose [Fadok et al., 2000]. Le PSR a été identifié grâce à un anticorps monoclonal Mab217 qui bloquait la phagocytose des cellules apoptotiques dépendante de la PS [Fadok et al., 2000]. Cette découverte en apparence majeure a été depuis récusée. Il s'est avéré que le PSR n'est en fait pas la protéine reconnue par le Mab217 [Böse et al., 2004]. De plus, le PSR ne semble pas être une protéine de surface, mais plutôt une protéine nucléaire, ayant un rôle dans la régulation transcriptionnelle [Böse et al., 2004, Cikala et al., 2004, Mitchell et al., 2006]. Enfin, les études utilisant des souris déficientes en PSR ont donné des résultats contradictoires concernant les effets sur l'élimination des cellules apoptotiques [Li et al., 2003, Böse et al., 2004]. Ainsi la question de la protéine reconnue par Mab217 reste ouverte et l'identification de la cible de cet anticorps pourrait permettre la découverte d'un récepteur clé impliqué dans la reconnaissance de la PS exposée à la surface des cellules apoptotiques.

De façon intéressante, très récemment, plusieurs équipes ont iden-

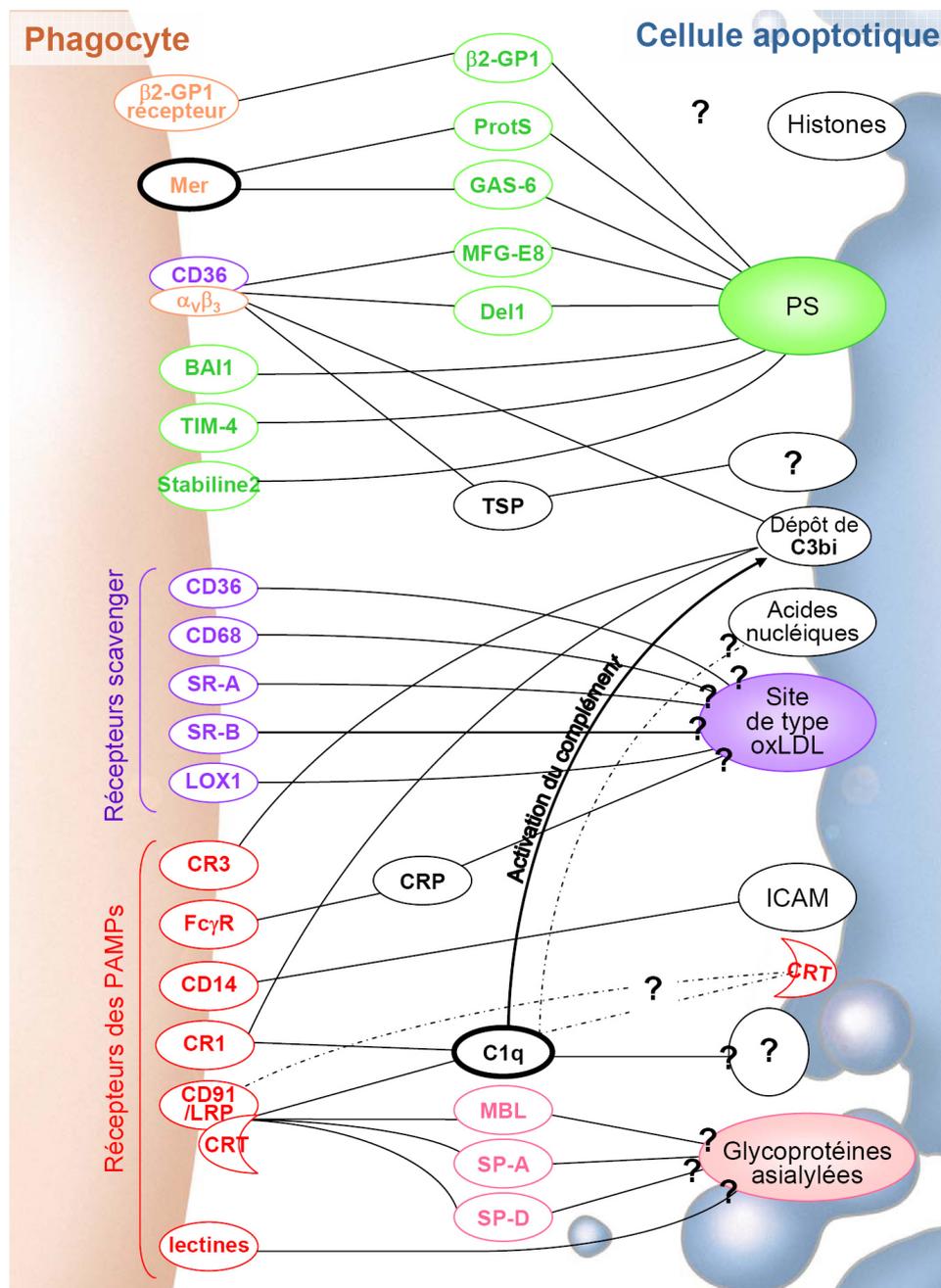


FIG. 1.10 – Les interactions entre la cellule apoptotique et le phagocyte. Les récepteurs phagocytaires et les molécules de pontage impliqués dans la reconnaissance directe de la PS sont cerclés de vert. Les récepteurs scavenger, les récepteurs des PAMPs et les collectines sont en violet, rouge et rose, respectivement. Les autres récepteurs phagocytaires sont cerclés en orangé. Les traits noirs représentent les interactions avec les différents acteurs, tandis que la flèche noire indique l'activation du complément. Les points d'interrogation signifient que le motif exact reconnu n'est pas formellement identifié. Les traits pointillés indiquent des interactions qui ont été mises en évidence *in vitro*, mais dont l'implication pour la reconnaissance des cellules apoptotiques n'a pas été démontrée.

tifié des récepteurs capables non seulement de reconnaître directement la PS, mais également d'induire la phagocytose des cellules apoptotiques ainsi fixées : BAI₁ (« brain-specific angiogenesis factor »), TIM-4 (« T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 4 ») et la stabiline-2 (figure 1.10) [Park et al., 2007, Miyanishi et al., 2007, Park et al., 2008b, Park et al., 2008a]. L'implication relative de ces trois récepteurs dans le maintien de la tolérance doit maintenant être testée.

Molécules de reconnaissance solubles et récepteurs phagocytaires

Les mécanismes impliqués dans la reconnaissance de la PS ont donc été abondamment étudiés. De nombreux autres récepteurs phagocytaires et molécules de pontage ont été mis en évidence, sans que la nature précise des ligands qu'ils reconnaissent à la surface cellulaire ne soit forcément connue.

A cet égard, un certain nombre de collagènes de défense solubles, tels que C1q et les collectines MBL, SP-A et SP-D, ont été impliqués dans ce processus.

Comme cela a été présenté dans la section 1.2.3, C1q a la capacité de se fixer directement et spécifiquement aux cellules apoptotiques [Korb and Ahearn, 1997, Navratil et al., 2001]. Cependant les sites reconnus par C1q n'ont pas encore été caractérisés (figure 1.10).

Il a été montré que la fixation de C1q induit l'activation du complément, au moins jusqu'à l'activation de C3 [Mevorach et al., 1998a, Nauta et al., 2002]. L'activation de C3 sur une surface cellulaire aboutit à la fixation de façon covalente de C3b, qui est ensuite clivé pour former un fragment très stable : iC3b. Le récepteur du complément CR3, ou intègre $\alpha_m\beta_2$, impliqué dans l'élimination des cibles opsonisées par iC3b, joue un rôle dans la phagocytose des cellules apoptotiques [Mevorach et al., 1998a] ; Il a été confirmé que cela n'avait pas de conséquences pro-inflammatoires [Aderem and Underhill, 1999].

La MBL (« mannan-binding lectin »), protéine initiatrice de la voie lectine du complément, et les protéines du surfactant SP-A et SP-D sont des membres de la famille des collectines possédant un domaine C-terminal de type lectine (*cf.* figure 1.3). Leur capacité à reconnaître le mannose, le GlcNAc et le fucose, sucres exposés au cours de l'apoptose, est responsable de leur implication dans l'élimination des cellules apoptotiques (figure 1.10) [Ogden et al., 2001, Nauta et al., 2004, Schagat et al., 2001, Vandivier et al., 2002].

SP-A, SP-D, MBL et C1q fixés à la surface des cellules apoptotiques sont

ensuite reconnus par l'intermédiaire de leurs fragments de type collagène par la CRT et son co-récepteur CD91/LRP (« LDL-receptor-related protein ») [Vandivier et al., 2002].

Enfin, les petites pentraxines CRP (« C-reactive protein ») et SAP (« serum amyloid P component »), protéines de phase aiguë produites dans le foie en réponse à une inflammation [Steel and Whitehead, 1994] sont impliquées. Des souris déficientes en SAP développent une maladie auto-immune et CRP et SAP ont la capacité de fixer les cellules apoptotiques et d'induire leur phagocytose par les macrophages [Gershov et al., 2000]. La CRP est une protéine synthétisée par le foie qui reconnaît les phospholipides oxydés présents aussi bien à la surface des cellules apoptotiques que des oxLDL [Chang et al., 2002]. Cette protéine de pontage est ensuite reconnue par les récepteurs des fragments constants (Fc γ R) présents à la surface des phagocytes et augmente donc la phagocytose des cellules apoptotiques.

Il est intéressant de noter ici que l'ensemble des acteurs décrits ci-dessus intervient également dans la reconnaissance des pathogènes et/ou dans la réponse inflammatoire induite en réponse à l'infection.

Reconnaissance directe par des récepteurs membranaires

Plusieurs récepteurs de l'immunité innée se fixant directement aux pathogènes sont également impliqués dans la phagocytose et l'élimination des cellules apoptotiques : CD14 (le récepteur du lipopolysaccharides (LPS) bactérien) et SR-A (« scavenger receptor » de classe A) (pour revue, [Savill et al., 2002]).

Au cours de l'apoptose, la charge apparente de la membrane change et devient donc une cible pour les membres de la famille des récepteurs « scavenger » (SR) connus pour reconnaître les charges poly-anioniques que l'on retrouve dans les oxLDL. SR-A (SR de classe A), LOX1 (« lectin-like oxLDL-receptor 1»), CD68 et CD36 ont été impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages (figure 1.10) [Platt et al., 1998, Lauber et al., 2004]. Ce résultat suggère que des épitopes non encore caractérisés spécifiques de l'oxydation et présents à la surface des cellules apoptotiques sont reconnus par les macrophages, et ce directement par les récepteurs de type scavenger.

En plus de fixer les sites de type oxLDL, le récepteur scavenger CD36 en coopération avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ fixe la glycoprotéine thrombospondine (TSP) qui fait le pont entre la cellule apoptotique et le macrophage [Savill et al., 1992]. Le ou les ligand(s) de la TSP reconnu(s) à la surface des cellules apoptotiques n'a(ont) pas encore été caractérisé(s) (figure 1.10).

Le double jeu de la CRT

La CRT a été impliquée comme co-récepteur des régions de type collagène des collectines et de C1q à la surface des phagocytes, en collaboration avec LRP/CD91 (*cf.* section 1.4.2) [Ogden et al., 2001, Vandivier et al., 2002].

Cependant la CRT est présente à la surface d'un grand nombre de types cellulaires (*cf.* section 1.4.2) et il a été montré récemment que, d'une part, elle pouvait servir de signal de reconnaissance à la surface des cellules apoptotiques, et que d'autre part, elle était impliquée dans leur élimination par les macrophages [Gardai et al., 2005].

Ainsi l'élimination des cellules apoptotiques implique un système redondant de molécules solubles et de récepteurs phagocytaires facilitant leur élimination (figure 1.10). On remarque cependant que les structures reconnues à la surface cellulaire ne sont pas encore entièrement caractérisées et qu'un grand nombre de ces protéines sont normalement impliquées dans la réponse immune et l'induction de l'inflammation.

1.4.4 Phagocytose et réponse inflammatoire

Acteurs et fonctions générales de la phagocytose

Bien qu'il soit maintenant admis que la plupart des cellules sont capables de phagocytose, les cellules dendritiques, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles constituent les phagocytes professionnels de part leur capacité à capturer et à ingérer leur cible de façon très efficace.

Alors que les cellules dendritiques sont présentes en périphérie dans les tissus, les neutrophiles et les macrophages, étant quant à eux des cellules sanguines, sont recrutés sur lors d'un épisode inflammatoire. Les neutrophiles sont les premières cellules parvenant sur le site de l'inflammation. Les monocytes sont eux recrutés ultérieurement au foyer inflammatoire où ils se différencient en macrophages. La phagocytose comporte trois étapes : la reconnaissance de la cible, son internalisation et sa destruction (pour revue, *cf.* [Charles A Janeway, 2001]). La reconnaissance de la cible déclenche des voies de signalisation cellulaire qui, *via* la modification du cytosquelette, aboutissent au recouvrement de la cible par des prolongements cytoplasmiques ou pseudopodes. La fusion membranaire des pseudopodes aboutit à la formation d'une nouvelle vacuole intracellulaire contenant la particule phagocytée, le « phagosome ». C'est dans le phagolysosome, issu de la fusion du phagosome et d'un lysosome que va se dérouler la lyse. La destruction de la cible au sein d'un compartiment cellulaire permet de limiter le relar-

gage de substances hautement toxiques ou immunogènes dans le milieu. De plus, alors que la phagocytose de la cible entraîne la mort du neutrophile par épuisement, les macrophages et les cellules dendritiques acquièrent alors la capacité de présenter les antigènes issus de la cible à d'autres cellules du système immunitaire, notamment les lymphocytes. Les capacités importantes de reconnaissance, de phagocytose, et d'activation des lymphocytes expliquent l'appellation de « cellule présentatrice d'antigènes professionnelle » donnée aux macrophages et aux cellules dendritiques. Ces capacités leur confèrent ainsi un rôle central dans le système immunitaire.

Mécanismes de la phagocytose des cellules apoptotiques

Les mécanismes de la phagocytose des cellules apoptotiques ont été étudiés chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans* est un petit ver transparent d'environ un millimètre de long. C'est un organisme modèle de compréhension de l'élaboration d'un organisme pluricellulaire. Le nématode possède un nombre fixe de cellules et au cours de son développement, 131 de ses cellules meurent par apoptose. Il a donc servi de modèle pour l'étude de ces mécanismes.

Chez le nématode, au moins sept gènes ont été impliqués dans l'élimination des cellules apoptotiques [Ellis et al., 1991]. Les protéines codées par ces gènes fonctionnent selon deux voies de signalisation partiellement redondantes (figure 1.11) (pour revue [Grimsley and Ravichandran, 2003, Lauber et al., 2004]).

Les gènes *ced-1*, *ced-6* et *ced-7* (*ced*, « *C. elegans* cell death »), qui sont homologues aux gènes de mammifères codant respectivement pour LRP/CD91, la protéine adaptatrice GULP (« engulfment protein ») et la protéine transporteur ABCA1 (« ATP-binding cassette transporter ») forment la première voie de signalisation (figure 1.11).

CED-1 est un récepteur transmembranaire qui se concentre au niveau de la membrane du phagocyte autour des corps apoptotiques en réponse à un ligand inconnu et qui initierait la voie de signalisation par des motifs dans son domaine intra-cellulaire [Zhou et al., 2001]. Il est fortement probable que ces signaux soient transduits par CED-6. Cette protéine adaptatrice contient de nombreux domaines d'interaction protéine-protéine et son homologue chez les mammifères, GULP, interagit physiquement avec CED-1 et LRP [Su et al., 2002]. CED-7 semble lui participer au rassemblement de CED-1 à la surface du phagocyte. Les mécanismes précis de leurs interactions doivent être clarifiés.

Il est intéressant de noter que LRP/CD91 est, avec la CRT, un co-

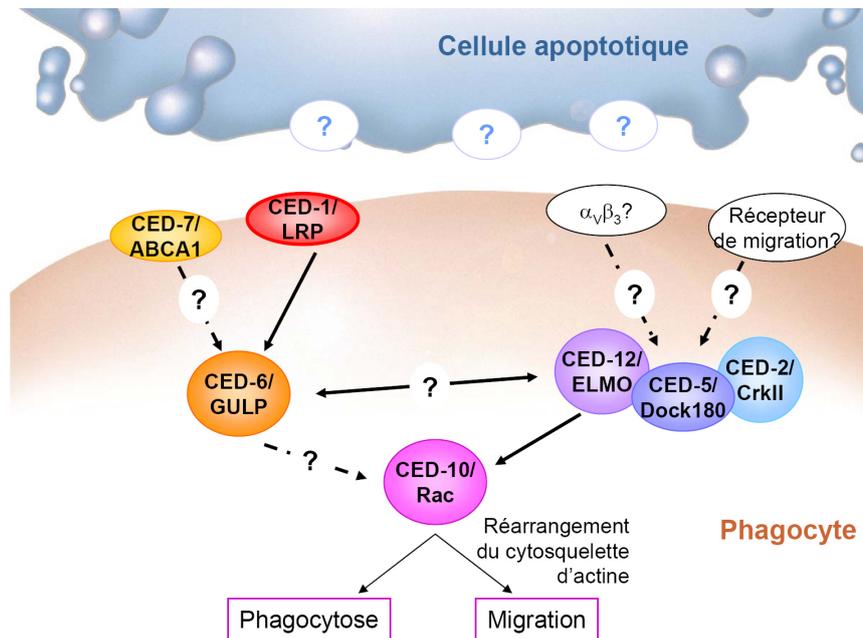


FIG. 1.11 – Les produits des gènes impliqués dans la phagocytose chez le nématode *C. elegans* et leurs homologues chez les mammifères. Les protéines impliquées dans la phagocytose des cellules apoptotiques sont réparties en deux voies de signalisation redondantes : [CED-1/LRP, CED-6/GULP et CED-7/ABCA1] et [CED-2/CrkII, CED-5/Dock180, CED-10/Rac et CED-12/ELMO]. Bien que cela n'ait pas été démontré formellement, il semble que ces deux voies de signalisation soient connectées.

récepteur de C1q et des collectines, impliqué dans la reconnaissance des cellules apoptotiques [Vandivier et al., 2002]. La fixation de ces opsonines de la cellule apoptotique à la surface des phagocytes *via* la CRT et LRP/CD91 pourrait être responsable de l'activation de cette voie d'induction de la phagocytose.

Les gènes *ced-2*, *ced-5*, *ced-10* et *ced-12*, homologues aux gènes codant pour les protéines CrkII, Dock180, Rac et ELMO (« engulfment and motility protein ») forment la deuxième voie de signalisation (figure 1.11). Ces protéines promeuvent la réorganisation du cytosquelette lors de l'élimination des cellules apoptotiques.

Des études génétiques ont montré que la sur-expression de CED-10 peut compenser les déficiences en CED-2, CED-5 et CED-12, suggérant que CED-10 fonctionne en aval de CED-2, CED-5 et CED-12.

Rac, l'homologue de CED-10, est une GTPase membre de la famille des petites protéines G. Ces petites GTPases oscillent entre deux états, une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. Leur activation est induite par des facteurs d'échange GEF (« guanine-nucleotide-exchange factors »).

Dock180 et ELMO forment un complexe fonctionnant comme un facteur d'échange GEF spécifique de Rac. Le rôle de CED-2 et de son homologue CrkII n'est pas encore bien déterminé, mais il semble qu'il recruterait le complexe Dock180-ELMO à la membrane au niveau de complexes contenant des intégrines. Cependant, que ce soit chez le nématode ou les mammifères, aucun récepteur, présent à la surface cellulaire, et capable d'induire cette voie, n'a été identifié.

Très récemment, BAI1 a été identifié comme un récepteur de la PS capable de recruter directement ELMO, puis Dock180 au cours de la phagocytose [Park et al., 2007].

De façon intéressante, cette voie de signalisation est également associée à la migration cellulaire et pourrait jouer un rôle clé dans la migration des phagocytes en présence de cellules apoptotiques [Lauber et al., 2004].

Enfin, il a été montré que les deux voies de signalisation présentées ici convergent vers CED-10/Rac, sans que les mécanismes impliqués ne soient décrits [Kinchen et al., 2005].

Fonctions de la phagocytose des cellules apoptotiques

Élimination contrôlée des cellules inflammatoires. Au cours de la phase aiguë de la réponse inflammatoire, de nombreux neutrophiles sont recrutés dans les tissus, où ils survivent pour une courte période avant de mourir par apoptose. Les neutrophiles apoptotiques deviennent peu susceptibles et réactifs aux stimuli externes, mais conservent l'intégrité de leur membrane plasmique ce qui permet de limiter la libération de contenu intra-cellulaire nocif [Dransfield et al., 1995]. Les neutrophiles apoptotiques sont reconnus et ingérés par les macrophages, ce qui semble être une étape clé pour prévenir la libération de granules cytotoxiques et de facteurs chimiotactiques dans le fluide extra-cellulaire, limitant ainsi la survenue de lésions supplémentaires et permettant la résolution de l'inflammation [Savill et al., 1989]. De plus, la reconnaissance et l'élimination précoce des cellules apoptotiques par les macrophages induisent une réponse anti-inflammatoire, comme cela est décrit dans le paragraphe suivant. Ainsi, en réprimant les fonctions des neutrophiles et en induisant leur phagocytose non-inflammatoire par les macrophages, l'apoptose assure l'élimination sécurisée de cellules inflammatoires potentiellement dangereuses, ce qui permet la résolution de l'inflammation.

Contrôle de la réponse inflammatoire. À l'inverse de la phagocytose des pathogènes, la phagocytose des cellules apoptotiques ne conduit pas à la production de cytokines pro-inflammatoires. Il a été montré *in vitro* que les macrophages ayant ingéré des cellules apoptotiques sécrètent des cytokines anti-inflammatoires, telles que le TGF- β (TGF, « transforming growth factor ») et l'interleukine 10 (IL-10) qui pourraient atténuer l'inflammation [Voll et al., 1997, Fadok et al., 1998b]. Mieux encore, la présence de cellules apoptotiques inhibe *in vitro* la production de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 et IL-12) induite par le LPS [Voll et al., 1997]. L'une des caractéristiques essentielles de la phagocytose des cellules apoptotiques est donc sa nature non-inflammatoire et non-immunogénique.

Par ailleurs, des souris déficientes pour les récepteurs impliqués dans l'élimination des cellules apoptotiques tels que Mer, ou déficientes pour les molécules responsables de l'opsonisation de la cible, telles que C1q ou MFG-E8, présentent un défaut de l'élimination de ces cellules conduisant au développement de maladies auto-immunes [Botto et al., 1998, Scott et al., 2001, Hanayama et al., 2004b]. L'incapacité à éliminer rapidement les cellules apoptotiques pourrait conduire à une nécrose secondaire et ainsi à l'exposition d'auto-antigènes dans un contexte immunogénique, pouvant potentiellement mener à la rupture de la tolérance du soi.

Cependant, cela n'explique pas totalement les observations faites ces dernières années. En effet, chez la souris, l'inactivation de certains gènes impli-

qués dans l'élimination des cellules apoptotiques et codant pour les récepteurs phagocytaires CD14, CD36, les intégrines β_3 et β_5 ou la molécule de pontage MBL mène à une accumulation de cellules apoptotiques mais pas au déclenchement de l'auto-immunité [Devitt et al., 2004, Stuart et al., 2005, Lucas et al., 2006].

De façon intéressante, il semble que l'ingestion de cellules apoptotiques ne soit pas nécessaire à l'induction de la production de cytokines anti-inflammatoires. La seule présence de membranes de cellules apoptotiques suffit à supprimer la production d'IL-12 induite par le LPS, et des vésicules de PS stimulent la production de TGF- β [Huynh et al., 2002, Kim et al., 2004]. Ainsi, les cellules apoptotiques seraient capables de supprimer la réponse immunitaire de façon indirectement reliée à leur phagocytose.

Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que la production de cytokines anti-inflammatoires par les macrophages après la reconnaissance des cellules apoptotiques contribuerait à l'élimination silencieuse de ces cellules. Il est à noter que les récepteurs et les molécules responsables de la signalisation intra-cellulaire qui régulent la production des cytokines anti-inflammatoires ne sont pas encore précisément connus.

1.5 A la recherche des motifs reconnus par C1q à la surface des cellules apoptotiques

L'élimination efficace des cellules apoptotiques et la modulation des fonctions phagocytaires sont donc essentielles pour la prévention de l'auto-immunité et le maintien de la tolérance au soi.

L'élimination des cellules apoptotiques implique un grand nombre de récepteurs et d'opsonines qui fixent les ligands cellulaires exposés au cours de l'apoptose. Cependant, tous les acteurs ne sont pas impliqués de la même façon dans la modulation des fonctions phagocytaires. Pour preuve, les déficiences de certains récepteurs ou molécules de pontage entraînent une déficience de la phagocytose des cellules apoptotiques sans pour autant conduire au développement de maladies auto-immunes (*cf.* section 1.4.4). C'est le cas par exemple de la MBL.

A l'inverse, les porteurs de déficiences des éléments précoces de la voie classique d'activation du complément (C1q, C2, C3, C4) présentent une accumulation de cellules apoptotiques et sont de plus susceptibles de développer des maladies auto-immunes systémiques.

Comme nous venons de le voir, C1q intervient non seulement directement dans l'opsonisation de la cellule cible par fixation au niveau de sites non encore identifiés, mais également indirectement par l'induction de la voie classique du complément et la fixation covalente subséquente de C3b à la surface cellulaire.

Ainsi C1q, protéine de reconnaissance du système du complément joue un rôle important dans le maintien de la tolérance immune. D'une part, C1q participe à l'opsonisation des cellules apoptotiques et est donc impliqué dans leur reconnaissance et leur phagocytose *via* le complexe CRT-CD91/LRP. D'autre part, C1q semble jouer un rôle de modulateur de la réponse inflammatoire déclenchée par le phagocyte.

Lorsque j'ai commencé ce projet, aucun des ligands de C1q exposés à la surface cellulaire au cours de l'apoptose et responsables de la reconnaissance spécifique des cellules apoptotiques n'avait encore été caractérisé.

Le premier volet des travaux présentés ici a consisté au développement d'un test permettant de suivre en temps réel la capture des cellules apoptotiques par C1q par résonance plasmonique de surface sur un appareil BIAcore (chapitre 3). La mise au point de cette méthode performante a permis de tester l'implication de ligands potentiels dans la fixation de C1q (chapitres 4 et 7).

L'objectif central de ce travail était d'identifier les signaux de reconnaissance exposés à la surface des cellules apoptotiques responsables de la fixation de C1q. Plusieurs pistes ont été suivies. La première que nous avons privilégiée est celle de la PS, marqueur ubiquitaire de l'apoptose (chapitre 4). Nous nous sommes également, et logiquement, intéressés aux protéines connues pour être des partenaires de C1q sans que leurs fonctions aient été à ce jour totalement élucidées (chapitre 5 et 6). Enfin, C1q présentant une activité lectine, nous avons travaillé sur l'hypothèse que cette fonction pourrait être impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques (chapitre 7).

Les travaux présentés dans ce mémoire ont conduit à l'identification de deux ligands de C1q à la surface des cellules apoptotiques et à une meilleure compréhension des rôles joués par les récepteurs connus de C1q. L'ensemble de ces résultats et les perspectives de ce travail sont résumés dans le chapitre 8.

Au total, les travaux réalisés au cours de ces études ont donné lieu à la publication de deux articles originaux :

Païdassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehiwet B, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Frachet P (2008). « C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition ». *J Immunol.* 2008 Feb 15 ;180(4) :2329-38.

Gaboriaud C, Païdassi H, Frachet P, Tacnet-Delorme P, Thielens N and Arlaud GJ (2007). « C1q : a versatile pattern recognition molecule and sensor of altered self ». *Collagen-related lectins in innate immunity, chapter 6 - Research signpost.*

Un autre article a également été soumis :

Païdassi H, Tacnet-Delorme P, Arlaud GJ, Thielens N, Frachet P. « The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition ». Soumis à *FEBS letters.*

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2.1 Purification de protéines plasmatiques

2.1.1 Purification des sous-composants du complexe C1

Purification de C1q

La protéine C1q est purifiée à partir de sérum humain selon la méthode décrite par Arlaud et collaborateurs [Arlaud et al., 1979] et qui utilise l'affinité spécifique de C1q pour les complexes immuns. Elle comprend une étape de fixation du complexe C1 sur des complexes immuns IgG-ovalbumine, la solubilisation de C1r et C1s par l'EDTA qui laisse C1q fixé aux complexes immuns, une extraction de C1q par une solution de NaCl 0,7 M, Tris-Hcl 50 mM, pH 10,0 et enfin une séparation sur colonne échangeuse d'ions de CarboxyMéthyl-Cellulose (CM52).

Purification des régions globulaires de C1q

Les régions globulaires de C1q (GR) sont purifiées selon la méthode décrite par Tacnet-Delorme et collaborateurs [Tacnet-Delorme et al., 2001]. Elle comprend un traitement de C1q à la collagénase et une filtration sur gel à haute pression (TSK-G2000 SW, LKB). Les régions globulaires purifiées sont quantifiées grâce à la lecture de l'absorbance à 280 nm. L'homogénéité des protéines purifiées et des fragments est vérifiée par SDS-PAGE en conditions réductrices.

Purification des fragments de type collagène de C1q

La méthode utilisée est dérivée de celle décrite par Sasaki et Yonemasu [Sasaki and Yonemasu, 1983]. La pepsine digère les régions globulaires de C1q en peptides courts et libère les fragments de type collagène. Le mélange de protéolyse est déposé sur une colonne de Sephacryl S300. Les fragments de type collagène sont ensuite séparés des molécules de C1q non digérées résiduelles par chromatographie d'affinité sur une colonne de Sepharose-Con A. La concanavine A (ConA) est une lectine spécifique des résidus α -D-mannose qui sont présents seulement dans les régions globulaires de C1q. Par conséquent, les fragments de type collagène ne sont pas retenus sur la colonne, à l'inverse des molécules de C1q qui se fixent.

2.2 Expression de protéines dans un système bactérien

2.2.1 Vecteur utilisé pour l'expression

L'ADNc codant pour la calréticuline humaine a été fourni par Gunnar Houen du Department of Autoimmunology, Statens Serum Institut, Copenhague, Danemark. Il est cloné dans le plasmide pHFX-CRT, représenté schématiquement dans la figure 2.1.

Ce vecteur contient le promoteur T7 reconnu spécifiquement par l'ARN polymérase du phage T7, le site de terminaison T7, le gène *lacI* codant pour le répresseur de l'opéron lac, une origine de réplication et l'origine de réplication du phage f1.

Il présente également une étiquette HAT (poly-histidine Affinity Tag) qui permet l'expression de protéines en fusion avec une séquence poly-histidine N-terminale. Cette étiquette contient six histidines réparties de façon irrégulière dans la séquence [Chaga et al., 1999]. L'ADN codant pour la calréticuline est inséré en aval de l'étiquette HAT.

Sont également présents, un site de clivage par le facteur Xa entre les séquences codant pour la calréticuline et l'étiquette HAT-tag, ainsi que les sites de restriction Nco I et Xho I, respectivement en amont et en aval de la séquence codante.

Enfin, le vecteur possède un gène de résistance à la kanamycine.

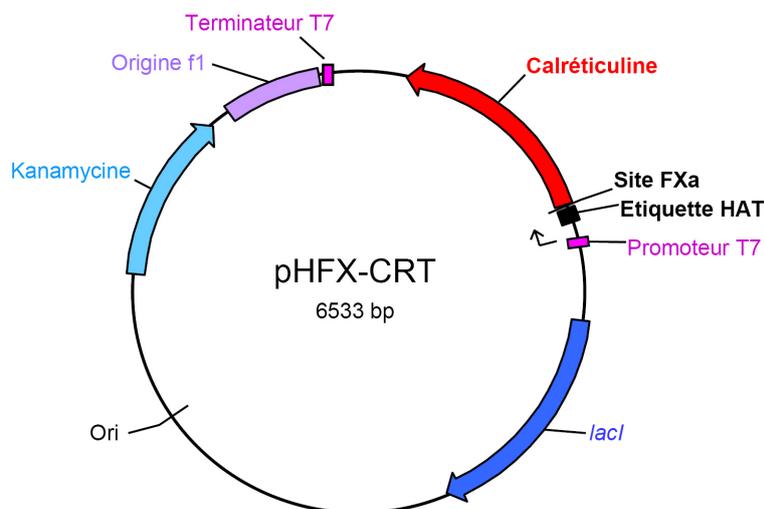


FIG. 2.1 – Représentation schématique de pHFX-CRT. Ori, origine de répliation, Origine f1 ; origine de répliation du phage f1 ; *lacI*, gène codant pour le répresseur de l'opéron lac.

2.2.2 Souche bactérienne employée

La souche BL21(DE3)pLysS d'*E.coli* est utilisée pour l'expression de la CRT humaine recombinante et de son domaine P. L'utilisation de cette souche en combinaison avec le plasmide pHFX permet de dissocier les étapes de clonage et de production.

En effet, le gène d'intérêt est sous contrôle du promoteur T7. L'ARN polymérase de *E.Coli* ne reconnaissant pas le promoteur T7, le gène d'intérêt n'est donc pas transcrit en absence d'ARN polymérase T7. Cependant, les bactéries BL21(DE3)pLysS contiennent une copie chromosomale du gène codant pour l'ARN polymérase du phage T7 (souche lysogène DE3), sous contrôle du promoteur lacUV5 inductible à l'isopropyl- β -D-thiogalactopyrannoside (IPTG).

En présence de l'inducteur, les bactéries synthétisent l'ARN polymérase T7. Le gène d'intérêt est alors transcrit fortement. Le plasmide pLysS code pour le lysozyme du phage T7, un inhibiteur naturel de l'ARN polymérase de ce phage. La présence de cet inhibiteur prévient toute expression basale en absence d'induction. Quand il y a induction par l'IPTG, l'inhibition est levée du fait de l'action du promoteur fort du phage. Ce système de production permet de limiter considérablement les fuites d'expression et de produire les protéines recombinantes de façon contrôlée.

2.2.3 Transformation de bactéries par le plasmide recombinant

Les bactéries compétentes One Shot BL21(DE3)pLysS proviennent de chez Invitrogen. Une fraction aliquote de bactéries (50 μ l) est incubée en présence de 120 ng du plasmide à transformer pendant 30 min dans la glace. Les cellules sont soumises à un choc thermique par incubation à 42°C pendant 30 secondes, puis dans la glace pendant 2 min. Après addition de 900 μ l de milieu LB préalablement chauffé à 42°C, les bactéries sont incubées pendant 1 heure à 37°C, sous agitation. La suspension bactérienne est ensuite étalée à différentes concentrations sur milieu LB-agar complété par la kanamycine, antibiotique dont le gène de résistance est porté par le plasmide pHFX. Les boîtes sont incubées durant une nuit à 37°C.

2.2.4 Production de protéines recombinantes

Un litre de milieu LB contenant 30 μ g/ml de kanamycine estensemencé par 9 ml d'une préculture inoculée la veille, soit par une unique colonie fraîchement transformée et prélevée sur une boîte de Pétri, soit à partir d'une fraction aliquote d'une culture précédente conservée à -80°C en présence de glycérol.

La culture bactérienne est alors placée à 37°C, sous agitation, jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm atteigne une valeur comprise entre 0,45 et 0,6. La production est alors induite par l'ITPG 1 mM pendant 3 h 30 à 37°C sous agitation. Les bactéries sont ensuite collectées par centrifugation à 10.000 g pendant 20 min à 4°C. Le culot bactérien est congelé à -20°C.

2.3 Purification de protéines recombinantes

2.3.1 Purification de HAT-CRT

La purification de la calréticuline portant une étiquette histidine à l'extrémité N-terminale (HAT-CRT) comprend deux étapes successives : une chromatographie d'affinité à l'aide d'une colonne de Cobalt-Sépharose (TALON Metal Affinity Resins, Clontech) puis une chromatographie échangeuse d'ions (MonoQ 5/50 GL, Amersham Biosciences).

Chromatographie d'affinité

La résine TALON (10 ml) est coulée dans une colonne Econo-Pack (Bio-Rad) et équilibrée à l'aide du tampon Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0 à un débit de 1 ml/min.

Le culot bactérien (cf. paragraphe 2.2.4) est remis en suspension dans le tampon d'équilibration contenant du DFP 1 mM, lysé par sonication (2 x 120s avec 50% de cycle actif, dans la glace), puis la suspension est centrifugée à 20.000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est filtré puis injecté sur la colonne à un débit de 1 ml/min. Après lavage par le tampon d'équilibration, la colonne est lavée par 2 volumes de tampon d'équilibration contenant 10 mM d'imidazole. L'élution est réalisée par 5 volumes de tampon Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 150 mM, pH 7,0. Les différentes fractions récoltées (perfusat, lavages et éluions) sont analysées par SDS-PAGE (cf. paragraphe 2.5.1).

La résine est ensuite régénérée à l'aide d'un tampon MES 20 mM, NaCl 100 mM, pH 5,0, puis rincée à l'eau distillée et conservée dans de l'éthanol 20% (v/v) contenant de l'azide de sodium 0,1% (p/v).

Chromatographie échangeuse d'ions

Les fractions contenant la protéine recombinante sont rassemblées et dialysées contre du tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 350 mM, pH 7,5. L'échantillon est ensuite déposé sur une colonne MonoQ 5 (MonoQ 5/50 GL, Amersham Biosciences) équilibrée dans le tampon de dialyse à un débit de 1 ml/min et élué par un gradient de NaCl 350 - 740 mM à l'aide du tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 1M, pH 7,5 (0-60%). L'élution est contrôlée par l'absorbance à 280 nm et par SDS-PAGE.

Les fractions contenant HAT-CRT sont rassemblées et concentrées sur membrane Amicon (seuil de rétention : 10 K) jusqu'à 2 mg/ml et conservées à 4°C pour une courte période ou congelées à -20°C.

2.3.2 Purification de HAT-domaine P

La purification de HAT-domaine P comprend comme pour celle de HAT-CRT, deux étapes (chromatographie d'affinité et chromatographie échangeuse d'ions), comme décrit dans le paragraphe précédent.

Par rapport au protocole décrit pour la purification de HAT-CRT, deux modifications ont été introduites :

1. Au niveau de la chromatographie échangeuse d'ions, les fractions issues

de la chromatographie d'affinité sont dialysées contre le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 (au lieu de Tris-HCl 20 mM, NaCl 350 mM, pH 7,5), tampon qui sert également à l'équilibration de la colonne et à l'établissement du gradient de NaCl 0 - 500 mM (au lieu de 340 - 740 mM) à l'aide du tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5.

2. A la fin de la purification, HAT-domaine P est concentré jusqu'à 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (au lieu de 2 mg/ml) avant d'être conservé à 4°C pour une courte période ou congelé à -20°C.

2.3.3 Obtention du domaine N/C de la CRT

Protéolyse ménagée de la CRT

La CRT humaine recombinante purifiée (HAT-CRT) est dialysée contre le tampon Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. HAT-CRT à une concentration de 1 mg/ml est digérée dans le même tampon à 37°C par différentes enzymes protéolytiques pendant les temps indiqués dans le tableau 2.1.

Le produit de la réaction est ensuite analysé par SDS-PAGE en conditions réduites ou non.

Digestion de la CRT par la plasmine

HAT-CRT à une concentration de 1 mg/ml est digérée pendant 3 h à 37°C dans le même tampon, en présence de CaCl_2 2 mM, par la plasmine 1 : 20 ou 1 : 10, CRT/plasmine, p/p.

Enzyme	Temps d'incubation
Chymase	2 h
Kallicréine	2 h
Papaïne	3 h
Plasmine	1 h 30
Thermolysine	1 h
Thrombine	3 h

TAB. 2.1 – Temps d'incubation à 37°C des enzymes utilisées pour la protéolyse ménagée de la calréticuline.

2.4 Préparation de protéines cellulaires

2.4.1 Préparation de lysats cellulaires

Pour chaque condition, les cellules en suspension contenues dans le surnageant sont récoltées et lavées au PBS. Après lavage au PBS, les cellules adhérentes sont à leur tour récoltées par grattage sur la glace en présence du tampon de lyse (Triton 1%, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 1mM en PBS) contenant des inhibiteurs de protéases (Roche) et transférées sur le culot des cellules en suspension. Les cellules sont lysées pendant 1 h sur la glace.

Après centrifugation à 20.000 g pendant 30 min à 4°C, les surnageants sont aliquotés et conservés à -20°C.

2.4.2 Préparation de protéines membranaires

Pour chaque condition, 4 boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre sont préparées. Après incubation, les cellules du surnageant sont récoltées, lavées 2 fois au PBS, resuspendues dans le tampon hypotonique (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases (Roche)) et incubées 20 min sur la glace. Les cellules adhérentes sont lavées 2 fois au PBS, incubées 20 min sur la glace en présence de tampon hypotonique, puis récoltées par grattage. Toutes les cellules (grattées et récoltées) sont ensuite homogénéisées par broyage mécanique à l'aide d'un système de mortier et de pilon de type Potter.

Les homogénats sont centrifugés à 3.000 g pendant 10 min, ce qui permet d'éliminer les cellules non cassées et les noyaux qui sédimentent dans le culot. Le surnageant contenant les membranes et les organites cellulaires est alors ultra-centrifugé à 220.000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot contenant les membranes est incubé pendant 30 min sur la glace dans le tampon de solubilisation (PBS, Triton X-100 1%, contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases). Les protéines membranaires solubilisées sont alors purifiées par ultra-centrifugation à 220.000 g pendant 30 min à 4°C.

Les protéines du surnageant sont dosées par microBCA, puis aliquotées et congelées à -20°C.

2.5 Méthodes d'analyse des protéines

2.5.1 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Préparation des échantillons

Les échantillons protéiques sont dénaturés et réduits par incubation à 95°C pendant 5 min dans un tampon de charge contenant du « NuPAGE Sample Buffer 1X » (Invitrogen) et du « NuPAGE Sample Reducing Agent 1X » (Invitrogen). Lorsque le volume de l'échantillon est trop important pour être déposé sur gel, les protéines sont précipitées par un volume équivalent d'acide trichloroacétique (TCA) 50% (v/v) et laissées une nuit à 4°C. Le culot protéique, obtenu après centrifugation (30 min, 13200 rpm, 4°C) et lavage à l'acétone, est repris par le même tampon de charge.

Un mélange protéique coloré prêt à l'emploi (Precision Plus Protein Standards, Dual Color, BioRad), contenant des protéines de masses molaires connues [10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 37 kDa, 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 150 kDa et 250 kDa], est utilisé comme standard de masse molaire.

Préparation du gel d'électrophorèse

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970] permet de séparer les protéines en fonction de leur masse molaire.

Les échantillons protéiques sont déposés sur un gel de polyacrylamide constitué d'un gel de concentration [acrylamide 3% (p/v), Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 0,1% (p/v), persulfate d'ammonium 0,04% (p/v), NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine (temed) 0,4% (v/v)] et d'un gel de séparation dont le pourcentage d'acrylamide est fonction de la masse molaire des protéines à séparer [acrylamide 10-14% (p/v), Tris-HCl 375 mM, 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 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1% (p/v). La migration des échantillons protéiques s'effectue sous une tension constante de 200 Volts, à l'aide d'un appareil d'électrophorèse C.B.S Scientific Co. (Dual Vertical Mini-Gel unit).

Une fois la migration terminée, et selon le type d'expérience à réaliser, le gel est ensuite :

- soit coloré pendant 1 h dans une solution « Simply Blue Safe Stain » (Invitrogen). L'excès de colorant est ensuite éliminé par plusieurs bains d'eau distillée,
- soit utilisé pour le transfert des protéines sur membrane.

2.5.2 Techniques de transfert sur membrane

Deux types de transferts ont été employés, selon la nature de l'analyse à réaliser par la suite :

- le transfert sur membrane de nitrocellulose en vue d'une immunorévélation,
- le transfert sur membrane de PVDF en vue d'un séquençage N-terminal.

Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose

Après migration sur gel, les protéines sont électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose (Whatman) à l'aide d'un appareil de transfert BioRad (Mini Transfert Blott), dans un tampon Tris-base 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20% (v/v). Le transfert est réalisé à 4°C pendant 1 h à 100 Volts ou durant une nuit à 12 Volts.

A la fin du transfert, la membrane est colorée de façon réversible à l'aide d'une solution de rouge Ponceau 0,2% (Sigma), afin de visualiser les protéines transférées et de repérer sur la membrane la position de migration des marqueurs de poids moléculaire. La membrane est ensuite rincée par un tampon NaCl 200 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,2 (TBS) puis immergée dans une solution de blocage (TBS contenant 5% (p/v) de lait écrémé en poudre) durant 1 h à température ambiante ou à 4°C durant une nuit.

Ensuite, elle est :

- soit mise en présence de l'anticorps primaire, dilué dans la solution de blocage pendant 2 h à température ambiante ou à 4°C durant une nuit. Après trois lavages de 10 min dans du tampon TBS contenant du Tween 20 0,05% (p/v) (TBS-T), la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de blocage. L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps anti-anticorps de lapin, de poule ou de souris (Sigma), couplé à la peroxydase de raifort (HRP).
- soit mise en présence de protéines biotinylées diluées dans du tampon TBS-T pendant 1h à température ambiante. Après trois lavages dans du tampon TBS-T, la membrane est incubée avec la streptavidine couplée à la peroxydase de raifort (Amersham Biosciences) diluée au 1/1600.

Après 3 lavages, la révélation s'effectue par chimioluminescence à l'aide du système ECL (Amersham Biosciences).

Electrotransfert sur membrane de PVDF

Après migration sur gel, les protéines sont électrotransférées sur une membrane de PVDF (Problott), préalablement immergée dans du méthanol pur. Le transfert est réalisé à 4°C pendant 1h à 100 Volts, ou durant une nuit à 12 Volts, à l'aide d'un appareil de transfert BioRad (Mini Transfert Blott), dans un tampon d'acide 3-Cyclohexylamino-1-propanesulfonique (CAPS) 10 mM, pH 11,0 contenant du méthanol 10% (v/v).

Après transfert, la membrane est colorée à l'aide d'une solution contenant du bleu de Coomassie R250 0,1% (p/v), du méthanol 40% (v/v) et de l'acide acétique 1% (v/v). Elle est ensuite immergée dans une solution décolorante constituée de méthanol 50% (v/v), jusqu'à l'apparition des bandes de protéines. Une fois séchée, la membrane peut être utilisée pour une analyse de séquence N-terminale.

2.5.3 Détermination des séquences N-terminales

Les séquences N-terminales des protéines ont été déterminées par la technique d'Edman, à l'aide d'un séquenceur en phase gazeuse Applied Biosystems 492A. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec J.P. Andrieu, au Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, IBS.

La dégradation d'Edman permet de libérer de façon séquentielle, à partir de l'extrémité N-terminale, les acides aminés d'un peptide ou d'une protéine en utilisant l'isothiocyanate de phényle (PITC) comme réactif. A pH alcalin, l'amine primaire N-terminale de la protéine réagit avec le PITC pour former un complexe phénylthiocarbamyl-protéine (PTC-protéine). A la suite d'un traitement acide, l'acide aminé N-terminal est libéré sous forme de thiazolinone, convertie ensuite en dérivé phénylthiohydantoïne-acide aminé (PTH-AA), tout en laissant le reste de la chaîne polypeptidique intact. La chaîne résiduelle, avec son nouvel acide aminé N-terminal, peut alors être soumise à un nouveau cycle de dégradation afin d'identifier l'acide aminé suivant, et ainsi de suite.

A chaque cycle, les dérivés PTH-AA libérés sont séparés par chromatographie HPLC (modèle 120A, Applied Biosystems) sur une colonne C18 (Sphéri-5 PTH, 5 μ M) de type phase inverse (22 x 0,21 cm) et détectés à 269 nm. La comparaison avec le profil chromatographique d'un mélange standard de dérivés PTH-AA permet l'identification et la quantification des acides aminés.

La quantité minimale de peptides et de protéines pouvant être séquencée est de l'ordre de 10 pmoles.

Protéine	ϵ_{280nm} ($l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Masse molaire (Da)	E 0.1%
CRT HAT-tag	81.735	49.431 ¹	1,65
domaine P HAT-tag	37.470	14.756 ¹	2,54
C1q	312.324	459.300 ²	0,68
GR	33.600	48.000 ³	0,70
CLF	39.690	189.900 ⁴	0,21

TAB. 2.2 – Coefficients d’extinction molaire et masses molaires des protéines purifiées.

¹ déterminées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

² [Arlaud et al., 1979]

³ [Reid and Edmondson, 1984]

⁴ [Thielens et al., 1993]

2.5.4 Détermination de la concentration des protéines purifiées

La concentration d’une protéine purifiée est déterminée à 280 nm selon la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon C l$ où ϵ est le coefficient d’extinction molaire en $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$, C la concentration en $mol \cdot l^{-1}$ et l la longueur du trajet optique, par convention $l = 1$ cm.

Le coefficient d’extinction molaire ϵ est calculé selon la formule d’Edelhoc [Edelhoc, 1967] mais les coefficients utilisés pour les acides aminés pris en compte sont ceux déterminés par Pace et collaborateurs [Pace et al., 1995] ce qui donne la formule suivante :

$$\epsilon_{280nm} (l \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}) = 5500 * (N \text{ Trp}) + 1490 * (N \text{ Tyr}) + 120 * (N \text{ Cys})$$

où (N Trp), (N Tyr) et (N Cys) correspondent, respectivement, au nombre de tryptophanes, de tyrosines et de cystines présents dans la structure primaire de la protéine. La concentration d’une protéine peut être déterminée directement à partir de l’absorbance à 280 nm en utilisant le coefficient d’extinction spécifique $E_{(0,1\%,1cm)}$ calculé selon la formule suivante :

$$E_{(0,1\%,1cm)} = \epsilon_{280nm} / M$$

où M est la masse molaire de la protéine. Les coefficients d’extinction molaire et les masses molaires expérimentales (cf. 2.5.6) des protéines sont rassemblés dans le tableau 2.2.

2.5.5 Quantification relative des protéines sur gel

Afin d'évaluer la quantité relative des protéines sur gel, il est possible de mesurer l'absorbance de chacune des bandes ayant fixé le bleu de Coomassie. Pour cela, les gels sont scannés à l'aide d'un densitomètre de type Shimadzu CS-900 à une longueur d'onde de 520 nm. Pour chacun des échantillons déposés, le densitomètre calcule l'aire de chaque pic d'absorbance en fonction de la distance de migration ainsi que le pourcentage relatif de chacune des bandes.

2.5.6 Détermination de la masse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Les analyses de masse ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF voyager Elite XI par Bernard Dublet au laboratoire de Spectrométrie de Masse des protéines, IBS.

Cette méthode est basée sur la désorption par un tir laser de courte durée (1-10 ns) de protéines co-cristallisées avec une matrice. L'intérêt de cette technique est basé sur l'ionisation de molécules volatiles et permet de mesurer des rapports masse sur charge (m/z). Un spectre de masse peut ainsi présenter un ou plusieurs rapports (m/z) pour une même protéine selon ses différents niveaux d'ionisation. Cette méthode permet également la mesure de masses molaires élevées. La calibration externe a été réalisée avec la BSA (masse/charge = 66 431).

Les valeurs de masse molaire des protéines produites dans ce travail sont répertoriées dans le Tableau 2.2.

2.5.7 Analyse par spectroscopie en dichroïsme circulaire

Les analyses de spectroscopie en dichroïsme circulaire ont été réalisées sur un spectro-dichrographe CD6 Jobin-Yvon par Pierre Gans, du laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire, IBS. Cette méthode est basée sur l'absorption différentielle de la lumière par toute molécule optiquement active résultant en une polarisation circulaire droite ou gauche de la lumière.

La structure secondaire des protéines et en particulier les structures en hélice alpha et feuillet bêta présentent des spectres de dichroïsme circulaire caractéristique. La répartition spectrale du dichroïsme circulaire dans le domaine des ultraviolets donne des informations importantes sur la structure secondaire des protéines.

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés à 25°C entre 190

et 260 nm, à l'aide d'une cellule en quartz de 1 mm de trajet optique, avec un temps d'intégration de 2 s, entre 2 nm. Les spectres sont corrigés par le bruit de fond enregistré avec le tampon. Pour chaque échantillon, la moyenne de 2 spectres a été réalisée.

2.6 Méthodes d'analyse fonctionnelle

2.6.1 Analyse de l'interaction GR/phospholipides par co-sédimentation

Les phospholipides utilisés proviennent de Avanti Polar Lipids, Inc. (Coger, Paris). Des liposomes contenant :

- la phosphatidylsérine (PS) pure,
- la phosphatidylcholine (PC) pure,
- la phosphatidyléthanolamine (PE) pure,
- ou un mélange 1 : 1 PC : PS,

sont obtenus par sonication pendant 20 min de 100 μg de phospholipides dans 100 μl de PBS pH 7,4 [Ishii et al., 2005]. 10 μg de régions globulaires de C1q (GR) dans 100 μl de PBS sont incubés avec chaque échantillon de liposome pendant 30 min à 22°C. Les échantillons sont centrifugés à 300.000g pendant 30 min à 4°C afin de séparer le surnageant du culot contenant les liposomes. La présence des GR dans le surnageant et le culot est analysée par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie.

2.6.2 Analyse de l'interaction C1q ou GR/ADN par gel retard

Les complexes ADN/protéines sont préparés comme décrit par Palaniyar et collaborateurs avec quelques modifications [Palaniyar et al., 2004]. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasmide pBlueScript digéré par EcoR1 (2950 pb) sont incubés 60 min à 37°C en présence de C1q 32 nM ou de GR 6,5 ou 13 μM en tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4. Les complexes ADN/protéine sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (p/v) en tampon Tris-acétate 40 mM, pH 8 et visualisés aux UV en présence du colorant SYBR safe (Invitrogen).

Pour les expériences de compétition, les GR 13 μM sont pré-incubées 15 min en présence de désoxy-D-ribose 100 mM, avant l'incubation avec le plasmide.

2.6.3 Détermination des propriétés d'interaction par SPR

Les différents systèmes BIA (Biospecific Interaction Analysis) développés par Biacore AB permettent de mesurer en temps réel la formation de complexes moléculaires sur une interface biospécifique et d'obtenir des informations sur la cinétique de ces interactions. La technique repose sur un système de détection utilisant la résonance plasmonique de surface (SPR) associé à un système microfluidique de transfert de liquide. Le principe de la SPR est détaillé dans l'Annexe A. Les constantes cinétiques des interactions de C1q et de ses dérivés avec ses ligands potentiels ont été évaluées à l'aide de deux appareils : le Biacore X et le Biacore 3000.

Principe du Biacore

Les appareils de la gamme BIA sont conçus pour visualiser en temps réel des interactions entre deux biomolécules non marquées, dans un débit continu de tampon. L'un des réactifs, le ligand, est immobilisé sur une surface appelée sensor chip. Le partenaire soluble de l'interaction, ou analyte, est injecté à un débit constant au contact de l'interface par un flux microfluidique. Après interaction entre les deux partenaires, la sensor chip peut être régénérée : l'analyte est séparé du ligand, qui reste à la surface. L'intérêt de la régénération est qu'il est alors possible de faire de nombreuses mesures avec la même protéine immobilisée.

Les études d'interaction ont été réalisées sur un appareil Biacore 3000. Sur celui-ci, 4 canaux de mesure sont disponibles permettant l'acquisition simultanée de données d'une piste de référence et de 3 autres surfaces portant les protéines d'intérêt. La piste de référence est généralement activée/désactivée dans des conditions comparables à celles utilisées pour les autres pistes, mais aucune protéine n'y est fixée. Son signal est soustrait automatiquement de celui obtenu sur les autres pistes.

Immobilisation des ligands sur la sensor chip

Plusieurs types de sensor chip ont été utilisées selon les ligands immobilisés :

Immobilisation covalente sur une sensor chip CM5

La sensor chip CM5 (Biacore AB) est constituée d'un support de verre recouvert d'une fine couche d'or sur laquelle est greffée une couche de dextran de 100 nm d'épaisseur, chargée négativement et constituée d'un réseau lâche et flexible de polymères de dextran carboxylés. Ces caractéristiques favorisent la diffusion des protéines qui, pour pouvoir pénétrer dans le dextran,

doivent être chargées positivement. Le ligand doit donc être solubilisé dans un tampon dont le pH est inférieur au point isoélectrique de la protéine.

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

1. **Activation de la matrice** : les groupements carboxyles du dextran sont activés sous forme d'ester de succinimide par injection sur la sensor chip de 80 μl d'une solution contenant du 1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propyl)carbodiimide (EDC) 200 mM et du N-hydroxy-succinimide (NHS) 50 mM en proportion 1 : 1.
2. **Immobilisation des molécules** : les ligands sont dilués dans un tampon acétate de sodium 10 mM, pH 4,0 (pour C1q ou les GR) ou formate 10 mM, pH 3,0 (pour la calréticuline et ses différents domaines), puis injectés sur la matrice activée.
3. **Désactivation** : les fonctions carboxyles du dextran n'ayant pas réagi avec les groupements amines du ligand sont neutralisées par injection sur la matrice de 80 μl d'une solution d'éthanolamine-HCl 1 M, pH 8,5.

Le tableau 2.3 présente les conditions d'immobilisation employées pour chacun des ligands.

Immobilisation par adsorption sur une sensor chip HPA

La sensor chip HPA (BIAcore AB) est constituée d'un support de verre recouvert d'une fine couche d'or sur laquelle est directement greffée une couche d'alcanethiol à longues chaînes. Cette surface hydrophobe favorise l'adsorption spontanée de liposomes, formant ainsi une monocouche lipidique présentant les têtes polaires hydrophiles dirigées vers la solution.

Type d'interaction	Ligands immobilisés	Concentrations utilisées	Quantités de ligands immobilisés (RU)
CRT/C1q	CRT	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	5500
	domaine P	15 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1650
	domaine P	15 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1650
Phosphosérine/C1q	phosphosérine	16 mg/ml	500
C1q/phosphatidylsérine	C1q	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	16000

TAB. 2.3 – Conditions d'immobilisation des ligands sur la sensor chip CM5 lors des expériences de Biacore

L'immobilisation des lipides est réalisée en trois étapes successives, effectuées à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans un flux continu de tampon phosphate (Na_2HPO_4 20 mM, pH 6,8) selon le protocole suivant :

1. **Préparation de la suspension de lipides** : les phospholipides (PS, PC ou PE) dissous dans du chloroforme sont transférés dans des tubes en verre. L'agitation du tube pendant l'évaporation du chloroforme sous argon permet la formation d'une fine couche de phospholipides à la surface du tube. Les lipides sont alors resuspendus en PBS, pH 7,4 à une concentration finale de 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puis soniqués pendant 15 min juste avant la préparation de la surface.
2. **Immobilisation des phospholipides** : la surface est nettoyée 5 minutes par 40 mM de N-octyl β -D-glucopyranoside. 30 μl de suspension de lipide sont injectés à un débit de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$.
3. **Perturbation des structures multilamellaires** : 30 μl de PBS sont injectés à un débit de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$.
4. **Arrêt de l'immobilisation** : la surface recouverte de phospholipides est bloquée par de la BSA 0,1 mg/ml pendant 5 min.

Ce protocole permet l'immobilisation de 1500 RU de phospholipides.

Conditions expérimentales des interactions

Les interactions sont mesurées dans le tampon de course qui est :

- soit du PBS, pH 7,4, à un débit de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ pour les interactions sur les phospholipides immobilisés.
- soit un tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 2 mM, pH 7,4 contenant 0,005% de surfactant P20 (Biacore), à un débit de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, pour les interactions du C1q et de ses dérivés sur la calréticuline et ses domaines.
- soit du PBS, pH 7,4 contenant 0,005% de surfactant P20, à un débit de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, pour toutes les autres interactions.

La régénération des surfaces entre deux analyses est effectuée par une injection de 10 μl de solution d'EDTA 20 mM (phospholipides immobilisés) ou de 10 μl de solution de NaOH 20 mM (toutes les autres études).

Analyses cinétiques des interactions

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

Type d'interaction	Analyte	Gamme de concentration de l'analyte
GR/PS	GR	0,32 à 3 μM
C1q/PS	C1q	6 à 100 nM
dérivé soluble de la PS(06 :0 PS)/C1q	06 :0 PS	150 à 900 nM
C1q/phosphosérine	C1q	1 à 30 nM
Dérivés de C1q/CRT	C1q	50 à 800 nM
	GR	0,2 à 2 μM
	CLF	0,2 à 2 μM

TAB. 2.4 – Concentrations d'analytes utilisées en fonction des interactions étudiées

Pour déterminer les constantes cinétiques d'interaction, différentes concentrations d'analytes sont injectées sur la surface biospécifique. Ces concentrations sont fonctions des interactions étudiées (cf. table 2.4). Le « sensorgramme » témoin obtenu en injectant du tampon sur les ligands est soustrait des autres sensorgrammes, qui sont ensuite analysés par le logiciel BIAevaluation 3.1 (BIAcore AB), selon un modèle simple d'interaction 1 : 1 entre le ligand et l'analyte (modèle de Langmuir) ou un modèle faisant intervenir un changement de conformation lors de l'interaction.

Ce logiciel permet de déterminer les paramètres cinétiques (k_{on} et k_{off}) et les constantes d'affinité (KD) de l'interaction par une évaluation globale des différents sensorgrammes grâce à des méthodes d'intégration numérique. Pour un bon ajustement à un modèle d'interaction donné, le paramètre χ^2 doit être du même ordre de grandeur que le bruit de fond en RU, soit typiquement inférieur à 2.

2.7 Cristallogenèse et cristallographie

2.7.1 Cristallisation des protéines

Principe

La cristallisation est un processus au cours duquel les molécules interagissent entre elles et s'ordonnent dans un réseau périodique : elles passent donc d'un état soluble à un état solide ordonné. Les protéines et macromolécules biologiques cristallisent en solution. Les cristaux formés correspondent à des états d'équilibre du système protéine-solvant. La solubilité de la molécule dépend de la concentration du solvant en sels et autres constituants additionnels.

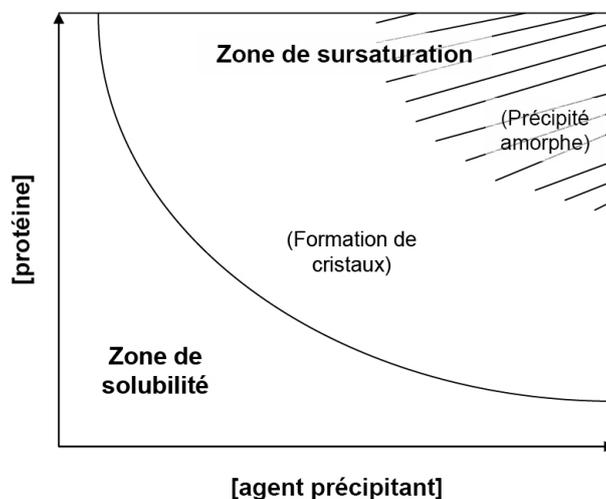


FIG. 2.2 – Diagramme de phase typique d'une macromolécule biologique avec courbe limite de solubilité, indiquant les domaines correspondant aux différents états d'équilibre du système protéine-solvant. D'après [Teillet, 2006].

La cristallisation des protéines consiste à conduire lentement la solution de protéines vers la limite de la solubilité et au-delà, c'est-à-dire à atteindre un degré de 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 2.2, qui représente un extrait de diagramme de phase protéine-solvant, en fonction de la concentration du solvant.

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

- 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 (PEG 400-20.000) ou des solvants organiques (alcools tels que méthylpentanediol). Leur rôle est de rompre la couche d'hydratation des molécules protéiques soit par liaison des molécules d'eau, soit par structuration du solvant, ce qui favorise les interactions protéine-protéine.
- le pH, qui permet de jouer sur la charge nette de la protéine.
- la température.
- des additifs mineurs jouent un rôle dans la formation des cristaux, en particulier dans leur qualité cristalline (glycérol, CaCl_2 , PEG 400).

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

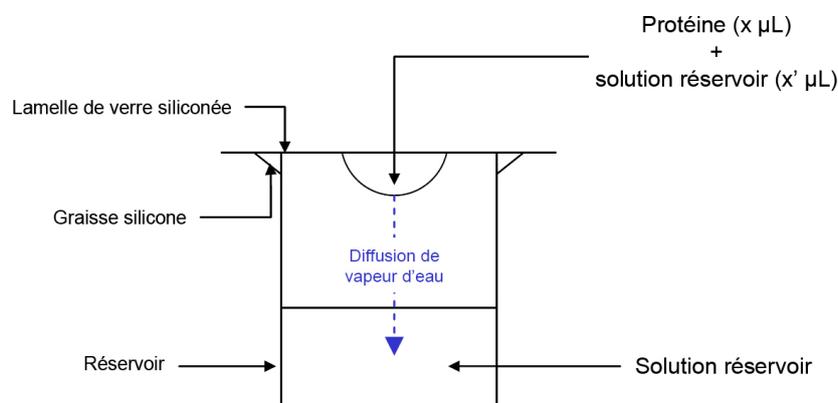


FIG. 2.3 – Dispositif de la goutte suspendue. D'après [Teillet, 2006]

Technique de la goutte suspendue

La technique de la diffusion en phase vapeur est une méthode courante, qui est utilisée à la fois pour la recherche des conditions de cristallisation d'une protéine donnée et pour la production de cristaux car elle permet l'utilisation de micro-quantités de matériel protéique [Wlodawer and Hodgson, 1975]. Son principe repose sur la mise en équilibre par diffusion de vapeur d'une goutte (quelques μl) de solution protéique contenant un précipitant à concentration initiale sous-critique et des additifs dans un tampon au pH désiré, avec une solution réservoir de volume très supérieur à celui de la goutte (1 mL), contenant le même précipitant à la concentration de sursaturation désirée et des additifs dans le tampon au pH désiré. Des échanges de vapeur d'eau ont alors lieu de la goutte vers la solution réservoir. Progressivement la concentration en protéine de la goutte augmente jusqu'à l'état de sursaturation.

La technique de la goutte suspendue consiste à déposer 1 μl de solution protéique et 1 μl de solution de cristallisation sur une lamelle de verre préalablement siliconée et suspendue au-dessus d'un réservoir contenant 1 ml de solution de cristallisation. L'étanchéité de l'ensemble est assurée par de la graisse silicone (figure 2.3).

2.7.2 Structure du complexe phosphosérine-GR

Obtention de cristaux du complexe phosphosérine-GR

Le protocole de cristallisation a été mis au point par Claudine Darnault au laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines, IBS.

Des cristaux de GR analysables par diffraction aux rayons X sont obtenus comme décrit précédemment [Gaboriaud et al., 2003]. Brièvement, la protéine est concentrée en NaCl 250 mM, glycérol 2%, Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, contenant de la sulfo-bétaïne 100 mM non détergente comme agent de solubilisation. Les cristaux sont obtenus par la méthode de diffusion de vapeur (technique de la goutte suspendue) avec la solution réservoir contenant du PEG 4000 30-41%, CaCl₂ 20 mM, 2-ME 10 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 7,0 ou 7,4.

Des essais de co-cristallisation, effectués à l'aide de kits de co-cristallisation et du robot disponible à l'EMBL (« European Molecular Biology Laboratory Grenoble Outstation ») ont permis de définir les conditions d'obtention des cristaux du complexe.

Les cristaux du complexe phosphosérine-GR sont obtenus par long trempage (plus de 2 jours) des cristaux de GR dans une solution contenant PEG 4000 42%, CaCl₂ 10 mM, Tris-HCl 100 mM pH 7,4 et de la phosphosérine à une concentration de 12,5 mM, légèrement supérieure à sa limite de solubilité dans ce type de solution.

Résolution de la structure du complexe phosphosérine-GR

La collecte des données et leur exploitation ont été réalisées par Christine Gaboriaud et Virginie Garlatti à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) et au laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines, IBS.

Les coordonnées atomiques ont été déposées au « Protein Data Bank » sous les numéros d'accèsion 2jG8 et 2jG9.

2.8 Biologie moléculaire

2.8.1 Méthodes de génétique moléculaire

Matériel

Les milieux de culture (LB et LB-Agar) et l'agarose proviennent d'Invitrogen, le tampon d'électrophorèse (TAE) d'Euromedex. Les enzymes de restriction proviennent de New England Biolabs. La kanamycine est fournie par Sigma. Le bromure d'éthidium et les marqueurs de masse molaire proviennent respectivement de Genaxis et New England Biolabs.

Techniques de biologie moléculaire

Les principales expériences de génétique moléculaire ont été réalisées d'après Maniatis et collaborateurs [Maniatis et al., 1989].

Les suspensions bactériennes ont été congelées dans une solution de glycérol 32,5% (p/v), MgSO₄ 50 mM, Tris-HCl 12,5 mM, pH 8,0.

L'introduction de mutations ponctuelles dans l'ADNc codant pour les protéines d'intérêt a été réalisée selon le « QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit » de Stratagene.

Les kits de purification de plasmides à petite (« QIAprep Spin Miniprep Kit ») et grande échelle (« HiSpeed Plasmid Midi kit ») proviennent de QiaGen.

Synthèse d'oligonucléotides et séquençage d'ADN

Les amorces oligonucléotidiques ont été synthétisées par Eurogentec SA. Le séquençage des constructions plasmidiques a été effectué par Génome Express.

2.8.2 Mutagenèse dirigée

L'obtention du domaine P de la calréticuline recombinante est réalisée par délétion des régions N- et C-terminale au niveau de l'ADNc codant pour la protéine native, par mutagenèse dirigée sur la base des instructions du kit « QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis ».

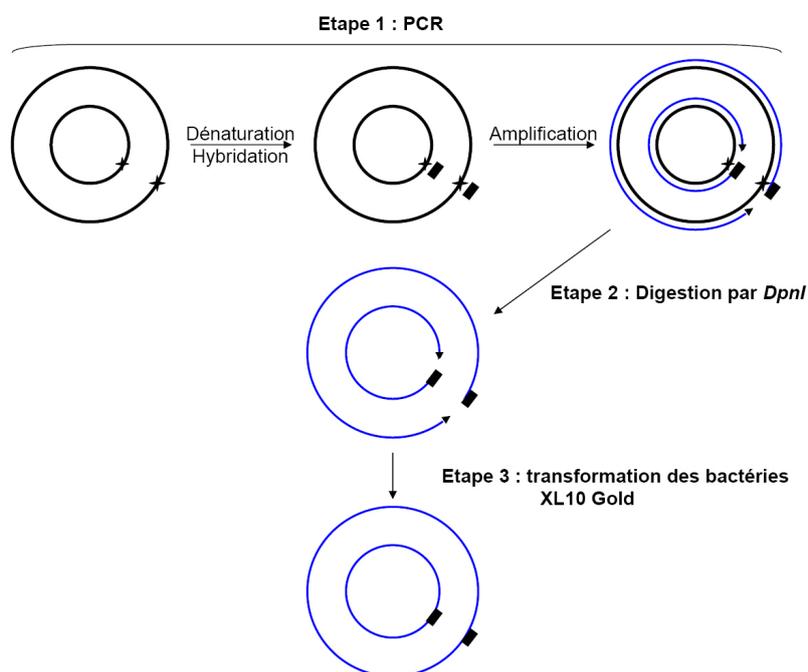


FIG. 2.4 – Schéma général du kit « QuikChange XL site-directed mutagenesis » de Stratagene d’après le manuel du kit. Les plasmides parentaux sont représentés en traits épais, les plasmides mutés en traits fins bleus, la mutation souhaitée est symbolisée par une croix et les amorces contenant la mutation par un carré noir.

Principe du kit de mutagenèse dirigée

Ce système permet d’introduire rapidement des mutations ponctuelles (dans notre cas, des délétions) par mutagenèse dirigée en 3 étapes (figure 2.4). La première étape consiste en une PCR utilisant l’ADN matriciel et deux amorces complémentaires portant la mutation désirée. La deuxième étape permet l’élimination de l’ADN parental méthylé par digestion par *DpnI*. La dernière étape consiste en l’amplification de l’ADN plasmidique muté par transformation de bactéries ultracompétentes, XL10 Gold.

Par la suite, le plasmide est extrait des bactéries résistantes à la kanamycine, cartographié grâce aux sites de restriction présents dans le plasmide, et séquencé.

Modification du protocole

Deux modifications ont été introduites :

1. Au niveau de l'étape PCR : 100 ng d'ADN matriciel (au lieu de 10 ng) et 150 ng de chaque amorce (au lieu de 125 ng) sont ajoutés à 5 μ L de tampon de réaction et 5 μ L de QuickSolution, puis incubés pendant 10 min à 95°C. Le mélange de dNTP (0,5 mM par dNTP) et la DNA polymérase PfuTurbo (2,5 U) sont ensuite ajoutés au mélange avant de démarrer le programme de PCR recommandé par le fournisseur.
2. L'ADN parental est digéré par deux fois 10 U de l'enzyme de restriction DpnI (au lieu d'une fois).

Caractéristiques des amorces

Les amorces oligonucléotidiques (2 par mutant) ont été conçues selon les recommandations du kit « QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis ». Pour chaque mutant, les deux amorces sont complémentaires et s'hybrident donc au niveau de la même séquence sur les brins opposés du plasmide, la mutation désirée se trouvant au centre des amorces. La température de fusion est calculée selon la formule ci-dessous :

$$T_m (\text{°C}) = 81,5 + 0,41 (\%GC) - 675/N - \%m$$

où %GC est le pourcentage de guanine et cytosine dans l'amorce, N le nombre total de bases et %m est le pourcentage de bases mutées dans l'amorce. Dans le cas de délétions, le %m n'est pas pris en compte.

Amorces utilisées pour l'obtention du domaine P de la calréticuline

Le clonage du domaine P de la calréticuline a été réalisé selon le principe présenté dans la figure 2.5.

Deux mutations successives ont été effectuées dans l'ADNc codant pour la CRT à l'aide d'amorces conçues selon les recommandations ci-dessus et répertoriées dans le tableau 2.5. Une seule amorce par mutant est présentée, la seconde étant complémentaire de la première. L'amorce Pdom Δ 1 permet de déléter le domaine N-terminal et ainsi de relier le domaine P à l'étiquette HAT, tandis que l'amorce Pdom Δ 2 permet de déléter le domaine C-terminal.

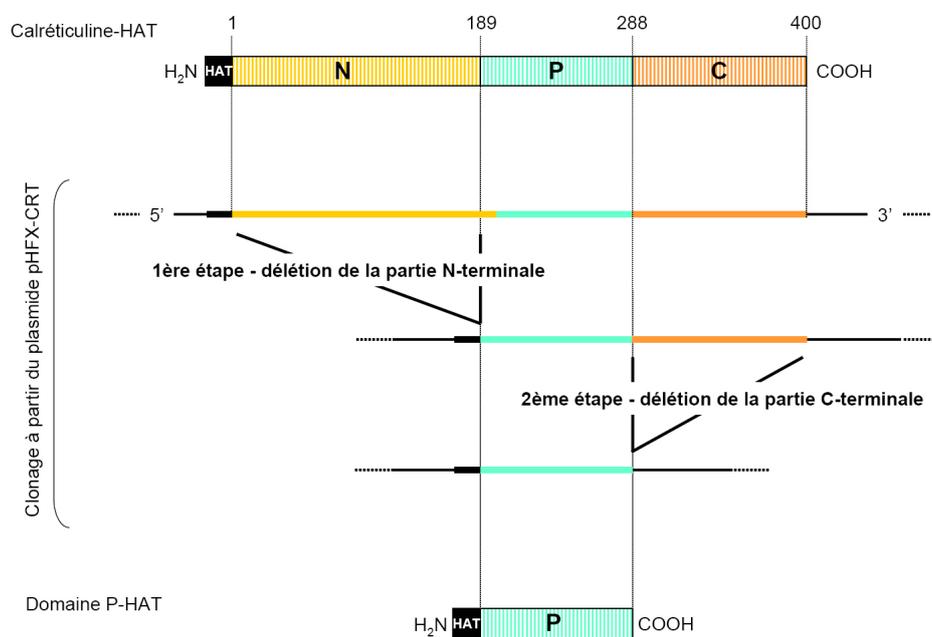


FIG. 2.5 – Stratégie pour le clonage du domaine P. L'étiquette HAT (en noir), les domaines N (en jaune), P (en cyan) et C (en orange) de la CRT-HAT et du domaine P-HAT sont représentés sous forme de blocs. Les séquences nucléotidiques codant pour ces domaines sont représentées avec le même code couleur sous forme de traits épais. Deux délétions successives sont réalisées par mutagenèse dirigée à partir du plasmide pHFX-CRT.

CRT	Séquence des amorces en 5'→3'	Tm (°C)
PdomΔ1	caacaagggttccatcgagggtaga aagaagataaaggatcctgatg	85,6
PdomΔ2	gtattctcccgatcccagtatc taagcttgccgcccactcgagc	90,3

TAB. 2.5 – Amorces utilisées pour la construction du domaine P de la cal-réticuline. En bleu, la séquence codant pour le domaine P ; en gras, celle codant pour l'étiquette HAT.

Vérification par digestion par des enzymes de restriction

Afin d'analyser l'ADN plasmidique, des colonies isolées sont incubées pendant la nuit à 37°C sous agitation dans 5 ml de milieu LB contenant 30 µg/ml de kanamycine. Après purification, 1µg d'ADN plasmidique de ces différents clones est digéré 1 h à 37°C par 10 unités de chaque enzyme de restriction NcoI et XhoI dans le tampon NEBuffer 2 (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.9) contenant 100 µg/ml BSA. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v).

2.9 Biologie cellulaire

2.9.1 Lignées et cultures cellulaires

L'ensemble des cultures cellulaires a été réalisé à 37°C, sous 80% d'humidité et en présence de 5% de CO₂.

Les cellules HeLa (ATCC # CCL-2) sont cultivées en monocouches dans des flasques traitées pour la culture cellulaire (Falcon). Le milieu de culture est du D-MEM contenant du glutamax (Invitrogen), un mélange pénicilline (2,5 U/ml)/streptomycine (2,5 g/ml) (Invitrogen) et supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau foetal (Dominique Dutcher) préalablement « décomplémenté » par la chaleur (56°C pendant 30 min). Les cellules sont cultivées jusqu'à 80% de confluence, lavées par du PBS (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KCl 0,02%, KH₂PO₄ 0,02%, pH 7,4) puis détachées à l'aide d'un tampon PBS contenant 1 mM d'EDTA et 0,05% (p/v) de trypsine. L'action de la trypsine est bloquée par l'ajout de milieu de culture avec sérum. Les cellules recueillies par centrifugation (5 min à 500 g) sont ensuite mises en suspension dans du milieu, à la concentration adéquate.

Les cellules Raji (ATCC # CCL-86) sont cultivées en suspension dans le milieu RPMI contenant du glutamax (Invitrogen), un mélange pénicilline (2,5 U/ml)/streptomycine (2,5 g/ml) (Invitrogen), supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau foetal décomplémenté et par 10% (v/v) de « OPI (Oxaloacétate-Pyruvate-Insuline) Media Supplement Hybri-Max » (Sigma).

2.9.2 Induction de l'apoptose

Modes d'induction de l'apoptose

La veille, 3 x 10⁶ ou 4,5 x 10⁵ cellules sont distribuées par boîte de Pétri, respectivement de 100 ou 35 mm de diamètre. Le jour même, elles sont

Agent inducteur	Dose utilisée	
	Cellules HeLa	Cellules Raji
Irradiation UV (312 nm)	1000 mJ/cm ²	1000 mJ/cm ²
Staurosporine	500 nM	
Etoposide	250 µg/ml	
Camptothécine	5 µg/ml	5 µg/ml

TAB. 2.6 – Conditions d'induction de l'apoptose pour les cellules HeLa et Raji

soit exposées à une irradiation d'ultraviolets B à 312 nm, soit traitées chimiquement. Les différentes conditions utilisées en fonction du type cellulaire sont indiquées dans le tableau 2.6. Ces conditions optimales pour rendre les cellules apoptotiques ont été déterminées par des études préliminaires. Les cellules sont ensuite remises en culture pendant différentes périodes.

Analyse de l'induction de l'apoptose

La détection des cellules apoptotiques a été réalisée sur la base des instructions :

- soit du « human Annexin V-FITC Kit » (AbCys). L'annexin V fixe la phosphatidylsérine et le marquage par le FITC permet la détection directe par l'analyse en cytométrie en flux. Le marquage en parallèle par l'iodure de propidium permet de discriminer les cellules apoptotiques, des cellules nécrotiques.
- soit du « poly-caspases FLICA (FAM-VAD-FMK) kit » (Immunocytochemistry Technologies, LLC, AbCys). Le VAD-FMK est un peptide inhibiteur des caspases. Ce peptide perméant se fixe aux caspases activées, et la carboxyfluorescéine (FAM) qui lui est couplée permet la détection directe en cytométrie en flux.

2.10 Méthodes d'analyse cytochimiques

La détection de marqueurs membranaires présents à la surface des cellules est effectuée par marquages immunofluorescents ou d'affinité. Ces deux types de marquage reposent sur le même principe général : une première étape de marquage à proprement parler et une seconde étape de révélation, ce qui permet l'amplification du signal.

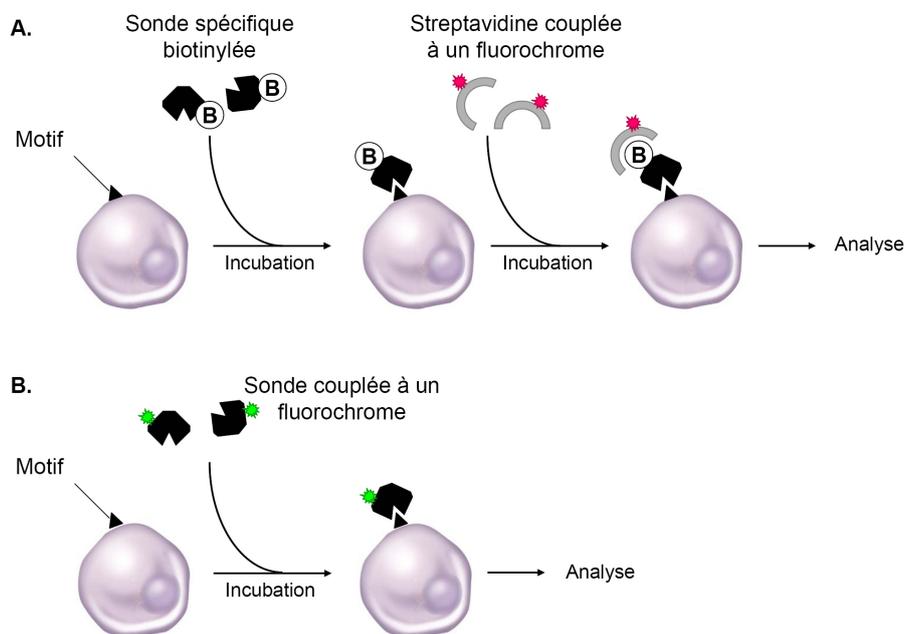


FIG. 2.6 – Principe du marquage par affinité à l'aide (A.) de sondes biotiny-lées ou (B.) de sondes directement couplées à un fluorochrome

2.10.1 Principe du marquage par affinité

Le marquage par affinité utilise des sondes, spécifiques du motif ou de la macromolécule que l'on souhaite marquer (figure 2.6). La détection de ces sondes est rendue possible :

- soit par un couplage direct de la sonde avec un fluorochrome,
- soit par couplage avec le système streptavidine/biotine.

Le système streptavidine/biotine utilise la très haute affinité de deux ligands : la biotine fixée sur la sonde et la streptavidine, molécule très affine pour la biotine. La streptavidine est marquée par un fluorophore et permet ainsi la détection du marquage.

La biotinylation des sondes protéiques a été réalisée à l'aide du « ECL protein biotinylation system » (Pharmacia Biotech), selon le protocole indiqué par le fournisseur.

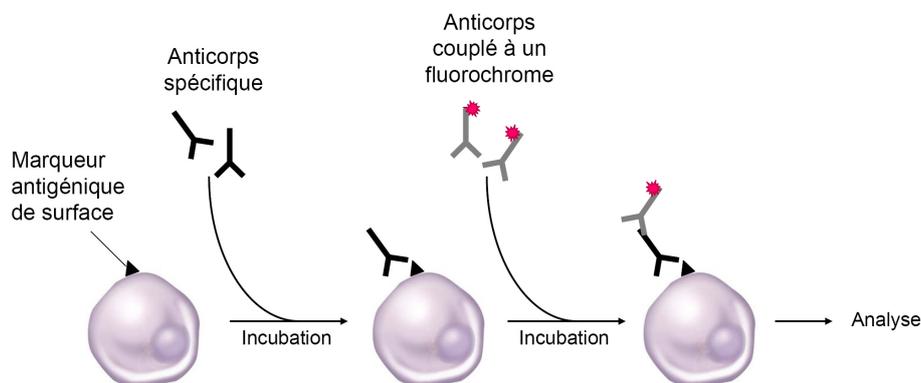


FIG. 2.7 – Principe du marquage par immunofluorescence indirecte

2.10.2 Principe du marquage par immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence permet de mettre en évidence une ou plusieurs cibles antigéniques (simple ou double marquage) présentes à la surface cellulaire par l'utilisation d'un fluorochrome porté par un anticorps (figure 2.7). Dans le cas de l'immunofluorescence indirecte, l'anticorps dirigé contre l'antigène est dit anticorps primaire. Un deuxième anticorps dit secondaire spécifique de l'isotype de l'anticorps primaire et couplé au fluorochrome est utilisé.

2.10.3 Méthode de marquage des cellules

Les cellules sont récoltées à différents temps après induction de l'apoptose, comme décrit dans le paragraphe 2.9.1 puis lavées au PBS, pH 7,4 (Invitrogen). Pour les cellules HeLa, afin d'analyser l'ensemble de la population cellulaire, les cellules adhérentes ainsi que les cellules présentes dans le surnageant de culture sont collectées.

4×10^5 cellules HeLa ou 6×10^5 cellules Raji sont distribuées dans des microtubes. Par la suite, tous les marquages sont effectués dans un volume de $100 \mu\text{l}$, à 4°C . Lors des lavages, les cellules sont centrifugées 5 min à 500 g.

Par immunofluorescence indirecte

Les anticorps utilisés sont : anti-calréticuline, polyclonal de poule (PA1-902A, Affinity BioReagents) ; anti-calréticuline, polyclonal de lapin (06-661,

Anticorps dirigé contre	Isotype	Dilution
Calréticuline	polyclonal de poule	10 $\mu\text{g/ml}$
	polyclonal de lapin	10 $\mu\text{g/ml}$
p33	monoclonal 74.5.2	1/10
	monoclonal 60.11	1/10
	monoclonal 25	1/10
C1q	polyclonal de lapin	1/2000
IgY de poule	polyclonal d'âne couplé Cy3	1/200
	polyclonal d'âne couplé FP488	1/200
IgG de lapin	polyclonal de chèvre couplé Cy3	1/100
	polyclonal de chèvre couplé FITC	1/200
IgG de souris	polyclonal d'âne couplé Cy3	1/200
	polyclonal de chèvre couplé FITC	1/200

TAB. 2.7 – Anticorps utilisés et leurs dilutions

upstate); anti-IgY de poule, polyclonal d'âne couplé à la Cyanine3 (Cy3) (703-165-155, Jackson Immunoresearch); anti-IgY de poule, polyclonal d'âne couplé FluoProbe 488 (FP488) (FT-FN138, FluoProbes); anti-IgG de lapin, polyclonal de chèvre couplé à la Cy3 (111-165-144, Jackson Immunoresearch); anti-IgG de lapin, polyclonal de chèvre couplé au FITC (111-095-045, Jackson Immunoresearch); anti-IgG de souris, polyclonal d'âne couplé à la Cy3 (715-165-150, Jackson Immunoresearch); anti-IgG de souris, polyclonal de chèvre couplé au FITC (115-095-146, Jackson Immunoresearch).

Pour chaque condition, les cellules sont incubées sur la glace pendant 45 min en parallèle avec l'anticorps primaire aux concentrations indiquées dans le tableau 2.7. Les cellules sont lavées 2 fois par 1 ml de PBS et marquées 30 min avec l'anticorps secondaire approprié.

Par affinité

Les agglutinines de *Maackia amurensis* (MAA), de *Phaseolus vulgaris* (PHA-E), de *Pseudomonas aeruginosa* (PA-I) et de *Triticum vulgaris* (WGA) proviennent de chez Sigma. La lectine de *Pisum sativum* (PSL) provient de chez Sigma.

Dans le cas de l'utilisation de sondes biotinylées, les cellules sont incubées en PBS, 1% BSA pendant 30 min avec la protéine biotinylée dans les conditions indiquées dans le tableau 2.8. Après 2 lavages par 1ml de PBS, les cellules sont marquées pendant 15 min avec la streptavidine-phycoérythrine (Pharmingen) diluée au 1/1000 en PBS, 1% BSA, sauf dans le cas du mar-

Motif	Sonde	Concentration utilisée en CF	Concentration utilisée en MF
Acide sialique	MAA-biotinylée	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Oligosaccharides	PHA-E-biotinylée	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
α -mannose	PSL-biotinylée	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
β -galactose	PA-I-biotinylée	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
N-acétylglucosamine	WGA-biotinylée	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Site de fixation des GR	GR-biotinylée	25 $\mu\text{g/ml}$	n.d.
PS	AnnexinV-FP 488	1,25 $\mu\text{g/ml}$	-

Tab. 2.8 – Conditions d'utilisation des sondes pour le marquage par affinité. n.d. non déterminé ; CF, cytométrie en flux ; MF, microscopie à fluorescence

quage à l'aide des GR biotinylées où la streptavidine a été utilisée au 1/100. Pour chaque condition, une réaction contrôle est effectuée en absence de protéine biotinylée.

Le marquage de la phosphatidylsérine (PS) par l'Annexin V-FP488 (Interchim) a été effectué selon les recommandations du fournisseur.

Préparation pour l'analyse

A la fin des marquages, les cellules sont lavées en PBS et sont, selon l'analyse envisagée :

- soit reprises dans 400 μl de PBS, conservées à 4°C et rapidement analysées en cytométrie en flux.
- soit fixées 5 min à température ambiante par 4% de paraformaldéhyde en PBS contenant 1 $\mu\text{g/ml}$ de bisbenzimidazole Hoechst 33258 (Sigma), lavées en PBS, resuspendues dans 100 μl de PBS, 1% paraformaldéhyde et conservées à 4°C jusqu'à la préparation des lames microscopiques.

2.10.4 Analyse par cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de caractériser des cellules de façon individuelle, quantitative et qualitative.

λ excitation (nm)	Détecteur	Fluorochrome	Filtre d'émission /bande passante (nm)
488	FSC	-	-
488	SSC	-	488/10
488	FL-1	FITC, FP 488	530/30
488	FL-2	PE, PI, Cy3	585/42
488	FL-3	PI	>670

TAB. 2.9 – Configuration du FACScan

Principe de la cytométrie en flux

Cette technique repose sur un système microfluidique et un système de détection optique (*cf.* Annexe 2.10.4). Les cellules en suspension monodispersée sont entraînées à grande vitesse. Par focalisation hydrodynamique, chaque cellule fluorescente défile une à une devant une source laser à 488 nm et génère différents signaux optiques (réflexion, réfraction, diffraction, fluorescence). Ceux-ci sont sélectionnés à l'aide de miroirs et de filtres appropriés avant d'être recueillis par des détecteurs, les photo-multiplicateurs, puis convertis en impulsions électriques. Après enregistrement, les données sont restituées par combinaison des paramètres (granularité relative, taille relative et intensité de fluorescence relative) sous la forme de distribution mono (histogramme) ou bi-paramétriques (cytogramme).

Collecte et analyse des données

Les analyses ont été réalisées sur un cytofluorimètre de flux FACScan (Becton Dickinson) à l'aide du logiciel Cell Quest (Becton Dickinson).

Après marquage, les cellules ont été analysées selon plusieurs paramètres (tableau 2.9) :

- la taille des cellules - FSC (forward scatter),
- la granularité - SSC (side scatter),
- la fluorescence émise par les fluorochromes - FL-1, FL-2, FL-3.

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

2.10.5 Analyse par microscopie confocale

Préparation des lames microscopiques

Les cellules, préalablement marquées et fixées au paraformaldéhyde, sont déposées sur des lamelles de verre par centrifugation (5 min à 500 g).

Les lamelles sont déposées sur des lames, cellules contre le verre, sur une goutte de DABCO à 25 mg/ml en PBS pH 8,6 : glycérol 1 : 9 (v/v). Le DABCO est un anti-oxydant qui atténue la perte de fluorescence. Les lamelles sont ensuite scellées avec du vernis à ongle et peuvent être conservées à 4°C à l'abri de la lumière.

Principe et méthode d'observation

Les observations ont été réalisées sur la plateforme de microscopie confocale de l'IRTSV au CEA de Grenoble sur un microscope confocal à balayage laser TCS-SP2 (Leica) fonctionnant en fluorescence à l'aide du logiciel Leica Confocal.

Un microscope confocal à balayage laser est un microscope optique qui a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ appelées « sections optiques ».

Afin d'évaluer la localisation spatiale des marquages à la surface cellulaire, des sections optiques en séries ont été effectuées par intervalles de 0,7 μm à travers l'épaisseur des cellules examinées. Une section représentative de l'ensemble a été choisie et les marquages ont été superposés.

Protocole de marquage des cellules pour la microscopie

A l'exception des expériences de co-localisation décrites ci-dessous, les conditions de marquage sont celles décrites dans le paragraphe 2.10.3.

La co-localisation des sites de fixation du C1q et de la phosphatidylsérine est effectué par un co-marquage, respectivement, à l'aide de C1q immunorévélé par des anticorps polyclonaux de lapin et d'annexine V couplée au FluoProbes488.

Après avoir été récoltées et lavées, les cellules sont co-incubées en NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2,5 mM, BSA 1 mg/ml, Hepes 25 mM, pH 7,4 (tampon Hepes) pendant 1 h à 4°C avec 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'annexine V-FluoProbes488 (Interchim) et 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de C1q. Les cellules sont ensuite lavées en tampon Hepes et fixées 5 min avec 4% de paraformaldéhyde. Les

cellules sont rincées, puis C1q est détecté par immunofluorescence indirecte en utilisant un anticorps polyclonal de lapin et un anticorps secondaire couplé à la cyanine 3 dans les conditions indiquées dans le tableau 2.7 et le paragraphe 2.10.3.

La co-localisation des sites de fixation des GR et de la CRT est effectué par un co-marquage, respectivement, à l'aide de GR immunorévélées par des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre C1q et d'anticorps de poule dirigés contre la CRT.

Après avoir été récoltées et lavées, les cellules sont co-incubées en NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2,5 mM, BSA 1 mg/ml, Hepes 25 mM, pH 7,4 (tampon Hepes) pendant 1 h à 4°C avec 100 µg/ml de GR. Les cellules sont ensuite lavées en tampon Hepes et fixées 5 min avec 4% de paraformaldéhyde. Les cellules sont rincées, puis les GR fixées et la CRT sont détectées par immunofluorescence indirecte en utilisant, respectivement, un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre C1q et anticorps polyclonal de poule dirigés contre la CRT. Les marquages sont révélés à l'aide des anticorps secondaires respectifs couplés respectivement au FITC et à la Cy3. Les conditions d'utilisation de ces anticorps sont indiquées dans le tableau 2.7 et le paragraphe 2.10.3.

2.11 Analyse en temps réel par SPR de la capture des cellules par C1q

2.11.1 Méthode d'analyse par SPR

Les analyses sont réalisées sur un Biacore X, qui présente 2 canaux de mesure.

Les données sont acquises à partir de la piste d'une sensor chip CM5 sur laquelle C1q est immobilisé, comme cela est décrit dans le paragraphe 2.6.3. Le signal de la piste de référence activée/désactivée est soustrait de celui de la piste C1q.

Après récolte, les cellules sont resuspendues à une concentration de $2,5 \times 10^6$ cellules/ml en tampon Hepes (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2,5 mM, Hepes 25 mM, pH 7,4) contenant 0,005% de P20 et sont passées à une débit de 10 µl/min sur C1q immobilisé. La surface est régénérée par injection de 5 µl de NaOH 10 mM.

2.11.2 Inhibition de la capture des cellules par C1q

Pour les expériences d'inhibition, les cellules sont incubées à température ambiante avec différents agents inhibiteurs aux conditions indiquées dans le tableau 2.10 avant injection sur C1q immobilisé.

Pour chaque condition, les cellules traitées ou non par l'agent inhibiteur sont injectées l'une à la suite de l'autre au cours d'un même cycle d'acquisition.

Inhibiteur	Gamme de concentrations	Temps d'incubation
Annexine V	0 à 1,5 μ M	20 min
DNase	0 à 400 Kunitz/ml	30 min

TAB. 2.10 – Conditions d'utilisation des inhibiteurs de la capture des cellules par C1q

Chapitre 3

C1q reconnaît les cellules apoptotiques précoces¹

La fixation de C1q et son rôle dans l'élimination des cellules apoptotiques ont été mis en évidence par différentes études (*cf.* le chapitre d'introduction). Pour autant, lorsque ce projet a débuté, aucun des sites reconnus par C1q à la surface des cellules apoptotiques n'avait été caractérisé. Afin de rechercher les motifs exposés à la surface cellulaire au cours de l'apoptose responsables de la fixation de C1q, nous avons développé un test cellulaire à l'aide de la technologie Biacore.

3.1 Présentation du modèle cellulaire

Il a été montré qu'après irradiation aux ultraviolets B (UV-B), C1q se fixe de façon spécifique à la surface des kératinocytes, des cellules endothéliales, des cellules épithéliales (HeLa) et des lymphocytes T (Jurkat) *via* ses régions globulaires (GR), rapidement après induction de l'apoptose [Korb and Ahearn, 1997, Navratil et al., 2001]. Tirant parti de ces observations, nous avons utilisé comme modèle cellulaire les cellules HeLa et comme inducteur de l'apoptose, les UV-B.

¹ Les chapitres 3 et 4 ont fait l'objet d'une publication : Païdassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehiwet B, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Frachet P (2008). « C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition ». *J Immunol.* 2008 Feb 15;180(4):2329-38.

3.1.1 Induction et détection de l'apoptose

A quelques rares exceptions près, l'asymétrie membranaire est perdue au cours de l'apoptose ; les seules exceptions connues concernent des lignées cellulaires tumorales [Fadeel et al., 1999, Fadok et al., 2001b]. L'exposition de la phosphatidylsérine (PS) est donc communément employée comme marqueur de l'apoptose [Zhang et al., 1997].

Les cellules HeLa ont été irradiées par des UV-B, à une longueur d'onde de 312 nm puis remises en culture pendant différentes périodes. L'induction de l'apoptose a été analysée par double marquage par l'annexine V couplée au FITC (annexine V-FITC) et par l'iodure de propidium (PI). L'annexine V est un ligand connu des têtes polaires de la PS [Swairjo et al., 1995]. Le PI est un colorant de l'ADN ne pouvant pas traverser les membranes et est ici utilisé comme un indicateur de la perméabilisation membranaire.

Le marquage a été analysé par cytométrie en flux. D'après la figure 3.1, le nombre de cellules positives pour l'annexine V, c'est-à-dire le nombre de cellules exposant la PS, commence à augmenter dès 2 h après irradiation, alors que les membranes cellulaires ne sont pas encore perméabilisées comme le montre l'absence de marquage significatif par le PI. Les histogrammes caractéristiques obtenus avec les cellules viables ou apoptotiques (4 h post-irradiation) sont présentés (figure 3.1 B et C, respectivement). Le pourcentage de cellules perméabilisées reste faible au moins jusqu'à 6 h après induction de l'apoptose (figure 3.1 A). 20 h après irradiation, environ 50 % des cellules sont positives pour le PI. A ce stade tardif, les cellules subissent donc une nécrose secondaire.

Dans notre modèle, le traitement des cellules HeLa par les UV-B induit bien la mort cellulaire par apoptose.

3.1.2 Fixation de C1q à la surface cellulaire

Nous avons ensuite testé par cytométrie en flux à l'aide de GR biotinylées la capacité de C1q à reconnaître les cellules HeLa apoptotiques. Les cellules HeLa témoins ou apoptotiques 4 h et 20 h après irradiation ont été incubées avec des GR biotinylées. La fixation des GR a été révélée à l'aide de streptavidine couplée à la phycoérythrine (streptavidine-PE). L'analyse des paramètres de taille (FSC) et de granularité (SSC) des cellules montre que les cellules 4 h après irradiation, comparativement aux cellules témoins, ont une distribution plus étendue (cytogrammes de la figure 3.2). 20 h après irradiation, le nombre de cellules de petite taille augmente, en accord avec les changements morphologiques associés à l'apoptose qui ont été décrits dans la littérature [Hagenhofer et al., 1998].

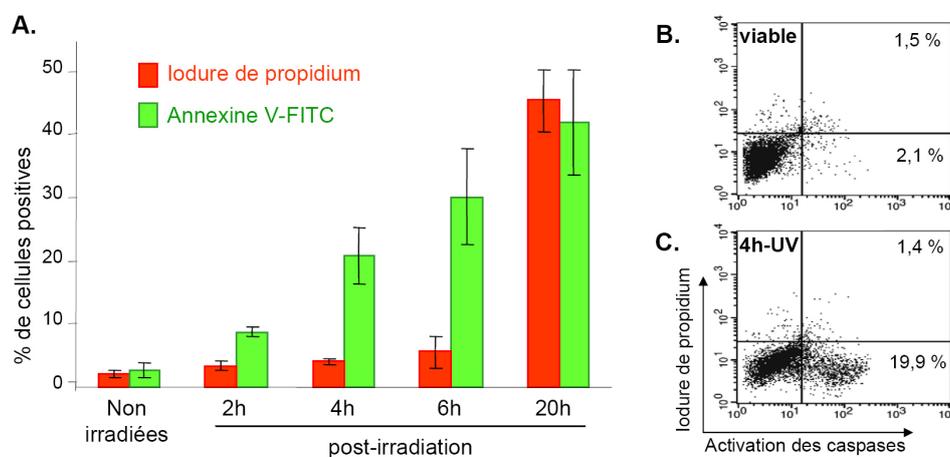


FIG. 3.1 – Analyse cinétique en cytométrie en flux de l'exposition de la PS et de la perméabilisation cellulaire au cours de l'apoptose (A.). Les cellules HeLa viables (B.) ou apoptotiques (C.) après irradiation sont doublement marquées à l'aide de l'annexine V et de l'iodure de propidium. Les pourcentages de cellules doublement positives (quadrant supérieur droit) ou positives uniquement pour l'annexine V (quadrant inférieur droit) sont indiqués.

Comme le montre la figure 3.2 A, les GR se fixent légèrement mais significativement à la surface des cellules HeLa viables. 4 h après induction de l'apoptose, la valeur moyenne de fluorescence de la population principale augmente (figure 3.2 B). Comparées aux cellules non irradiées, les cellules apoptotiques fixent donc de façon plus prononcée les GR. De plus, au cours de l'apoptose, certaines cellules présentent des moyennes de fluorescence plus élevées et cette population cellulaire augmente jusqu'au temps 20 h (figure 3.2 B). Nous avons montré dans la section précédente qu'à ce temps tardif d'apoptose (20 h), de nombreuses cellules sont perméabilisées (figure 3.1 A). C1q étant capable de reconnaître des composants intra-cellulaires (CRT, p33, ADN), la forte valeur de fluorescence observée avec les GR biotinylés est donc probablement due à la perméabilisation cellulaire.

A titre de comparaison, la même expérience a été réalisée en parallèle avec des cellules traitées par la staurosporine, un agent inducteur de l'apoptose [Couldwell et al., 1994]. De la même façon, la fixation des GR à la surface des cellules apoptotiques précoces augmente significativement par rapport aux cellules viables et le phénomène est amplifié au cours du temps (figure 3.2 C).

Afin d'apprécier la spécificité de la fixation des GR aux cellules apoptotiques, nous avons suivi la fixation des GR en même temps que l'induction de l'apoptose. Des cellules non traitées et irradiées ont été co-marquées à l'aide

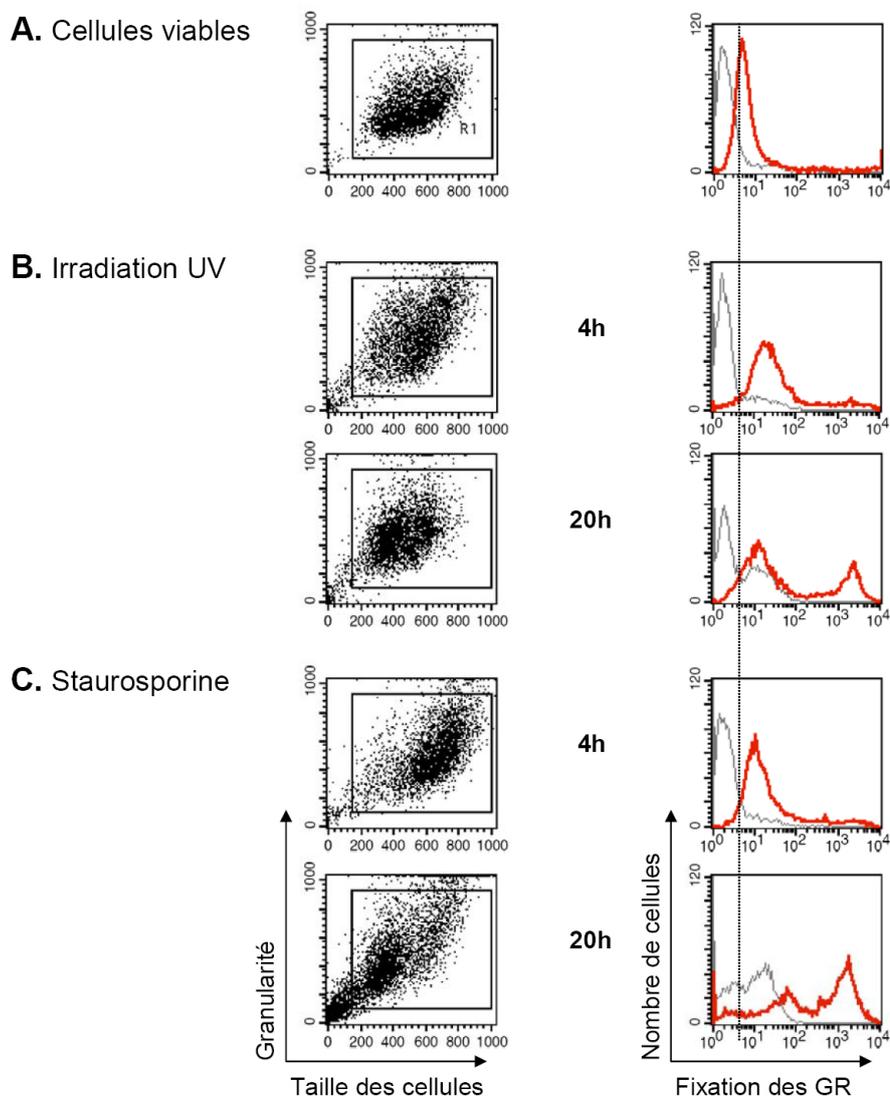


FIG. 3.2 – Analyse par cytométrie en flux de la fixation des GR à la surface des cellules apoptotiques. Les cellules HeLa non traitées (A.), 4 h ou 20 h après irradiation (B.) ou traitées à la staurosporine (C.) sont incubées avec des GR biotinylés. Le marquage est analysé à l'aide de la streptavidine-PE. A partir des cytogrammes FSC/SSC est défini un filtre (région encadrée) pour l'analyse de la fixation des GR présentée dans les histogrammes de droite. En gris, le signal obtenu avec la streptavidine-PE seule. En rouge, la fluorescence émise après incubation avec les GR biotinylés.

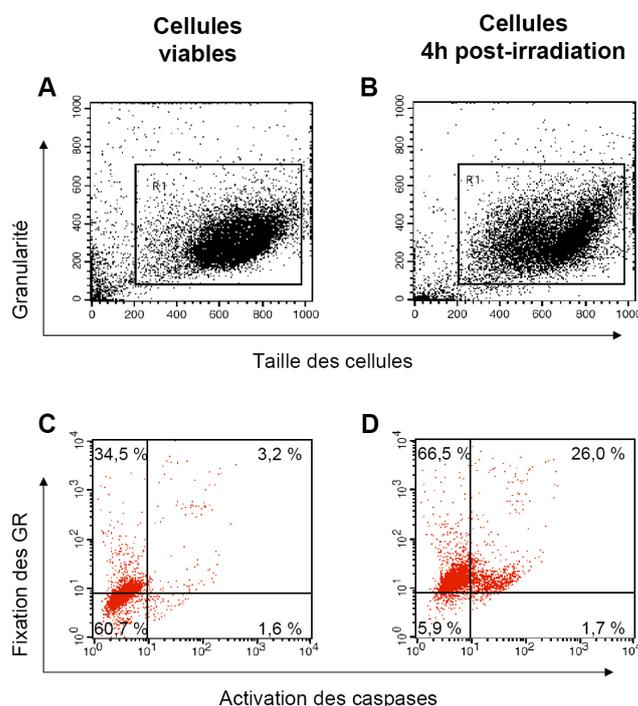


FIG. 3.3 – Analyse de la spécificité de fixation des GR à la surface des cellules apoptotiques. Les cellules HeLa non traitées (A. et C.) ou 4 h après irradiation (B. et D.) sont incubées avec FAM-VAD-FMK puis avec les GR biotinylées. La fixation des GR est analysée à l'aide de la streptavidine-PE. A partir des cytogrammes FSC/SSC (A. et B.) est défini un filtre (région encadrée) pour l'analyse de la fixation des GR et de l'activation des caspases (C. et D.).

de GR biotinylées et d'un inhibiteur des caspases activées, le FAM-VAD-FMK. Ce petit peptide fluorescent, capable de traverser les membranes, se fixe spécifiquement aux caspases activées.

Comme cela a déjà été observé figure 3.2 A, les cellules viables non traitées fixent légèrement les GR biotinylées (figure 3.3 C). Ces cellules sont à 95,2 % négatives pour l'activation des caspases (figure 3.3 C, quadrants de gauche). Après irradiation, 92,5 % des cellules fixent les GR (figure 3.3 D, quadrants du haut) et 26,0 % sont doublement positives, pour la fixation des GR et l'activation des caspases (figure 3.3 D, quadrant en haut à droite). Ce résultat est en accord avec les résultats de la figure 3.1, où après une même période d'incubation (4 h), 21 % des cellules exposent la PS à leur surface. Ainsi, quel que soit le critère utilisé pour quantifier l'apoptose (exposition de la PS ou activation des caspases), 4 h après irradiation 20 à 25 % des cellules sont apoptotiques et fixent plus fortement les GR.

Ces résultats montrent donc la spécificité de fixation des GR à la surface des cellules apoptotiques.

Il est aussi intéressant de noter qu'une proportion importante de cellules (66,5 %) voient leur fixation de GR augmentée, sans pour autant présenter de capsases activées (figure 3.3 D, panneau supérieur gauche). Encore une fois, ce résultat est cohérent avec les résultats des figures 3.1 et 3.2 qui montrent que 4 h après irradiation 20 % des cellules sont apoptotiques selon le critère d'exposition de la PS tandis que l'ensemble de la population fixe plus fortement les GR.

3.2 Développement d'un test par résonance plasmonique de surface

Actuellement, les données de la littérature restent ambiguës quant au stade à partir duquel C1q reconnaît les cellules apoptotiques. De nombreuses revues présentent encore la fixation de C1q à la surface cellulaire comme marqueur d'un stade avancé de la phagocytose [Roos et al., 2004, Trouw et al., 2008]. De plus, au cours de l'apoptose, les cellules sont en évolution constante et peuvent être sujettes à la perméabilisation. La capacité de C1q à fixer certains composants intra-cellulaires peut alors dans ces conditions poser problème lors du suivi de sa fixation à la surface cellulaire. Il nous a donc semblé important de développer un test démontrant que l'interaction entre C1q et les cellules se fait bien de façon précoce et au niveau membranaire.

La fixation de C1q a été analysée en temps réel par résonance plasmonique de surface (SPR) à l'aide de la technologie Biacore. C1q est immobilisé sur une sensor chip CM5 comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. Les cellules constituent quant à elles le ligand en phase soluble (figure 3.4 A). Dans ce test, on mesure donc le niveau de capture des cellules par C1q immobilisé.

Les cellules HeLa viables ou apoptotiques 2 h, 4 h ou 6 h après irradiation sont récoltées, comptées, puis resuspendues à une concentration de $0,25 \times 10^6$ cellules/ml dans le tampon de course. Cette concentration a été définie comme étant optimale suite à des études préliminaires (résultats non présentés).

Comme le montre la figure 3.4 B, l'injection de cellules viables induit une augmentation du signal de résonance (courbe grise). Cela indique que les cellules sont capturées dans une certaine mesure par C1q immobilisé. Ce résultat est en accord avec une étude de Feng et collaborateurs qui ont montré l'adhérence des cellules endothéliales sur C1q [Feng et al., 2002], mais aussi

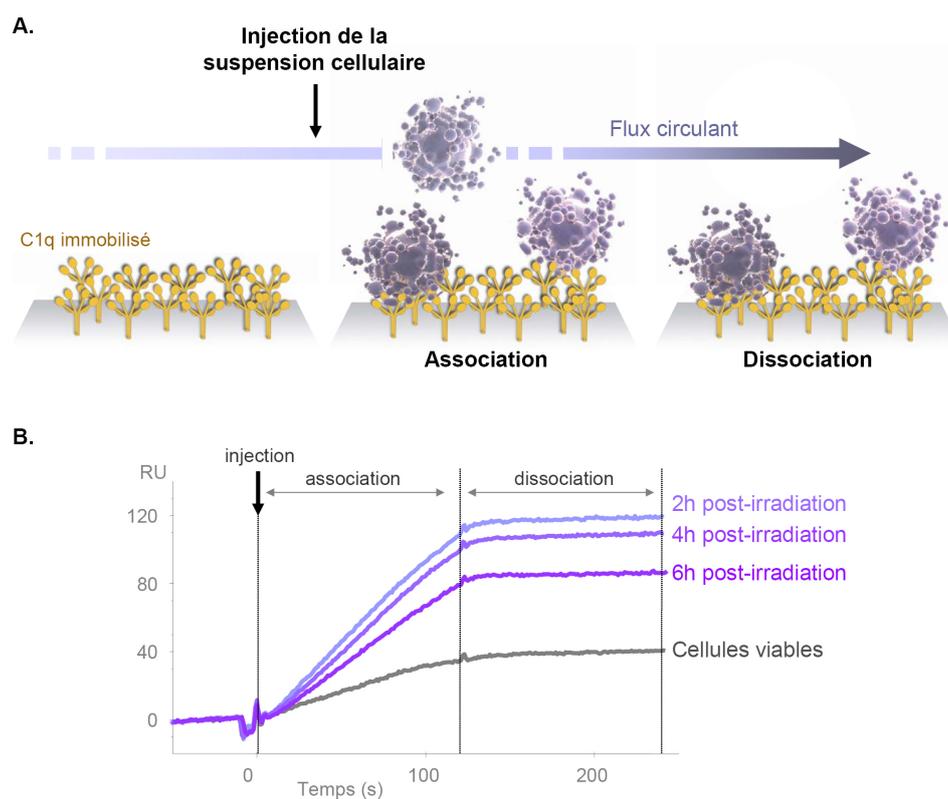


FIG. 3.4 – Analyse par SPR de la capture des cellules apoptotiques par C1q. A. Principe du test développé à l'aide du Biacore. B. Les cellules HeLa non traitées ou apoptotiques, 2 h, 4 h ou 6 h après irradiation sont récoltées puis injectées sur une surface sur laquelle C1q a été préalablement immobilisé. L'association et la dissociation sont analysées pendant 120 s.

avec les résultats que nous avons obtenus en cytométrie en flux (figure 3.2 A). Cette fixation augmente d'un facteur 2,5 quand les cellules apoptotiques 2 h après irradiation sont injectées, à leur tour, sur la surface (figure 3.4 B). L'apoptose induit donc une augmentation de la reconnaissance par C1q. Pour des temps d'induction plus longs, 4 h ou 6 h après irradiation, le signal de fixation diminue progressivement, tout en restant supérieur au signal obtenu avec les cellules viables.

Cette légère diminution du signal à 4 h et 6 h semble *a priori* ne pas être en accord avec les résultats obtenus en cytométrie en flux où le signal de fixation des GR augmente au cours de l'apoptose (figure 3.2). Cependant, il faut souligner que les deux techniques ne peuvent être directement comparées. Par SPR, le signal enregistré reflète des variations de masse à la surface de la sensor chip (figure 3.4). L'hypothèse la plus plausible pour expliquer nos observations est donc que la diminution progressive du signal entre 2 h et 6 h après irradiation est une conséquence directe de la perte de masse cellulaire qui a lieu au cours de l'apoptose. A l'inverse, dans la figure 3.2, la cytométrie en flux permet de mesurer la fixation d'un ligand protéique (ici les GR) à la surface des cellules. Le signal reflète alors la fixation de GR à la population cellulaire totale, quelle que soit la masse des cellules.

Enfin, d'après la figure 3.4, le signal de fixation reste remarquablement stable au cours de la phase de dissociation, indiquant une interaction de haute affinité entre C1q et les cellules.

3.3 Conclusion

Nous avons donc montré ici que C1q est capable de reconnaître les cellules apoptotiques à des stades très précoces de l'apoptose (figures 3.2, 3.3 et 3.4). Le test par SPR développé au Biacore confirme que C1q reconnaît un (ou des) composant(s) membranaire(s) puisque l'interaction a pu être observée par SPR dans une configuration où C1q est immobilisé et où il ne peut donc pas accéder aux composants intracellulaires (figure 3.4).

Enfin, d'après la fixation des GR et le marquage par l'annexine V, l'augmentation de fixation de C1q est concomitante à l'exposition de la PS à la surface cellulaire (figures 3.1 et 3.2).

Chapitre 4

Identification de la PS comme ligand de C1q ¹

Comme cela a été démontré dans le chapitre précédent grâce aux expériences de fixation des GR à la surface cellulaire et de marquage par l'annexine V, l'augmentation de la fixation de C1q est concomitante avec l'exposition de la phosphatidylsérine (PS). En prolongement direct de ces observations, l'hypothèse selon laquelle la PS serait un ligand de C1q à la surface des cellules apoptotiques a donc été examinée.

4.1 Etude *in vitro* de l'interaction entre C1q et la phosphatidylsérine

4.1.1 Analyse de l'interaction par des expériences de co-sédimentation

Les GR ont été incubées en présence de vésicules de phospholipides composées soit de PS, de phosphatidyléthanolamine (PE), de phosphatidylcholine (PC), ou d'un mélange PC : PS (1 : 1), puis ultracentrifugées. La co-sédimentation a été estimée en évaluant la quantité relative de GR associées avec les vésicules dans le culot après centrifugation. Comme le montre la figure 4.1, une proportion importante de GR est détectée dans le culot après incubation avec des vésicules contenant de la PS, seule ou en association avec la PC. A l'inverse, les GR sont détectées uniquement dans le surnageant lorsqu'elles sont incubées en présence de vésicules contenant de la PC seule ou

¹Les chapitres 3 et 4 ont fait l'objet d'une publication : Païdassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehiwet B, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Frachet P (2008). «C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition». J Immunol. 2008 Feb 15;180(4):2329-38.

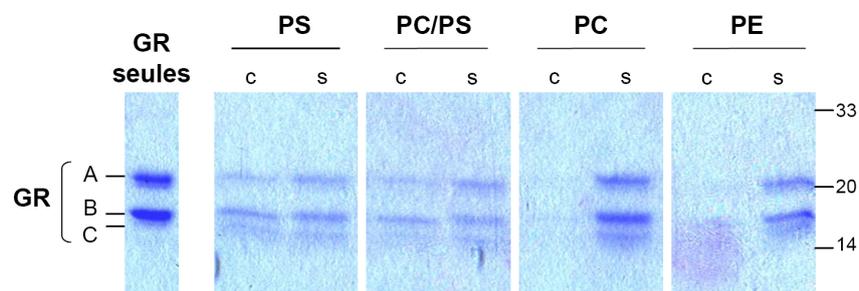


FIG. 4.1 – Analyse par co-sédimentation de l’interaction entre GR et des liposomes contenant la PS. Les GR sont incubées avec des liposomes contenant la PS, un mélange PC : PS (1 : 1), la PC ou la PE. Après ultracentrifugation, les culots (c) et les surnageants (s) sont séparés et leur taux de GR relatif est analysé par SDS-PAGE sur gel d’acrylamide 10 %. $2 \mu\text{l}$ de GR ont également été déposés comme contrôle (panneau de gauche) et les chaînes A, B et C sont indiquées ; les témoins de masse molaire (kDa) sont indiqués à droite de la figure.

de la PE ; aucune interaction n’est donc observée. Ce résultat montre que les GR fixent spécifiquement la PS.

4.1.2 Analyse par SPR de l’interaction entre C1q et PS

La caractérisation détaillée de l’interaction entre C1q et PS a été effectuée par SPR. Les phospholipides ont été immobilisés par adsorption sur une sensor chip HPA. La surface hydrophobe de ce type de surface permet la formation d’un feuillet rigide et plat de phospholipides présentant leur groupes polaires dirigés vers la phase fluide. C1q ou GR sont utilisés comme analytes.

Des expériences préliminaires ont permis de montrer que ni C1q, ni les GR n’interagissaient avec la surface HPA contrôle. La capacité de GR a interagir avec les surfaces contenant soit la PS, la PC ou la PE a ensuite été testée. Comme le montre la figure 4.2 A, les GR se fixent aux feuillets de PS, mais pas aux feuillets contenant de la PC ou de la PE. En accord avec l’expérience précédente de co-sédimentation, ce résultat conforte donc notre conclusion d’une reconnaissance spécifique de la PS par C1q. Les paramètres cinétiques de la reconnaissance de la PS ont été déterminés à l’aide des sensorgrammes enregistrés pour différentes concentrations de GR (figure 4.2 B) et de C1q (figure 4.2 C). Les constantes, cinétiques et de dissociation, ont ainsi été déterminées (tableau 4.1). Tandis que les valeurs de k_{off} sont similaires dans les deux cas, C1q présente un k_{on} significativement plus élevé que celui obtenu avec les GR. En conséquence, la valeur de K_D est environ 7 fois plus élevée pour les GR par rapport au C1q entier, rendant compte une fois encore de la perte d’avidité due à la structure monomérique des GR.

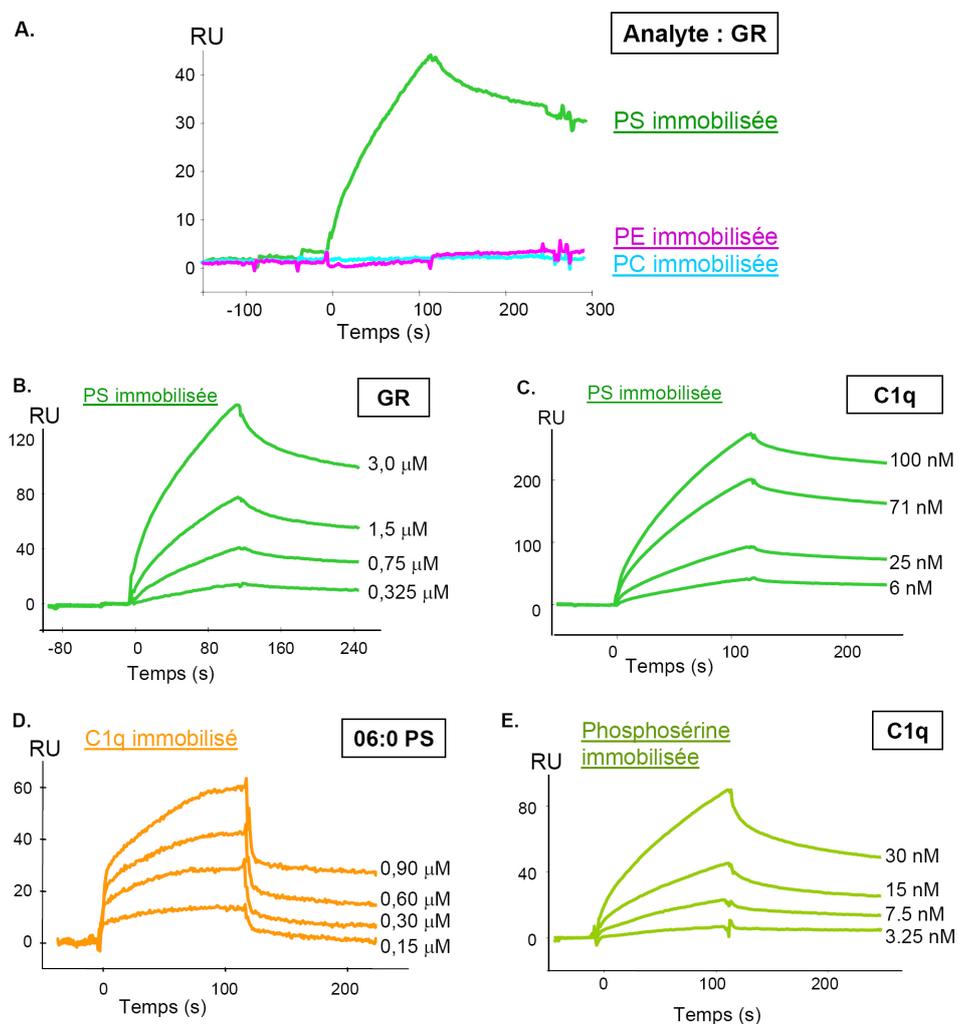


FIG. 4.2 – Analyse par SPR de l'interaction entre C1q et ses GR avec la PS et ses dérivés. (A.) et (B.) Fixation des GR sur PS, PC ou PE immobilisée. (C.) Fixation de C1q entier sur PS immobilisée. (D.) Fixation du dérivé 06 : 0 PS sur C1q immobilisé. (E.) Fixation de C1q sur la phosphosérine immobilisée. Toutes les interactions ont été mesurées dans le tampon de course à un débit de 10 μ l/min. Les conditions détaillées sont décrites dans le chapitre Matériel et Méthodes.

Analyte soluble / ligand immobilisé	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D
C1q / <u>PS</u> ¹	$2,9 \times 10^4$	$2,1 \times 10^{-3}$	70 nM
GR / <u>PS</u> ¹	$3,5 \times 10^3$	$1,8 \times 10^{-3}$	500 nM
06 : 0 PS / <u>C1q</u> ²	13,6	$2,4 \times 10^{-3}$	170 μM
C1q / <u>phosphosérine</u> ²	$8,4 \times 10^4$	$3,1 \times 10^{-3}$	37 nM

TAB. 4.1 – Constantes cinétiques et de dissociation de l'interaction de C1q et de ses GR avec la PS ou ses dérivés.

¹ Interactions mesurées sur une sensor chip HPA

² Interactions mesurées sur une sensor chip CM5

Des études plus approfondies de l'interaction C1q/PS ont été conduites à l'aide d'un dérivé soluble, le 06 : 0 PS comprenant la partie polaire de la PS connectée à deux chaînes hydrocarbonées saturées longues de 6 carbones. Dans ce cas, C1q est lié de façon covalente sur une sensor chip CM5 et 06 : 0 PS est utilisé comme analyte. Comme illustrée dans la figure 4.2 D, l'interaction de 06 : 0 PS avec C1q immobilisé est dépendante de la dose d'analyte utilisée. De façon intéressante, le K_D de cette interaction est environ 2400 fois plus élevé que celui déterminé pour l'interaction entre la PS immobilisé et C1q soluble, essentiellement dû à une diminution très importante de la valeur du k_{on} (tableau 4.1). Une explication possible de cette diminution repose sur le fait que C1q est immobilisé dans la configuration utilisée avec 06 : 0 PS, et perd ainsi son avidité. De plus, il est possible que la fixation chimique de C1q sur la surface dans des configurations variées, n'étant pas toutes optimales pour la fixation du ligand, contribue à la diminution prononcée du k_{on} .

Afin d'obtenir plus d'informations sur la (ou les) régions de la PS reconnue(s) par C1q, le groupement phosphosérine a été immobilisé de façon covalente sur une sensor chip CM5 et C1q soluble a été injecté. Comme l'illustre la figure 4.2 E, C1q fixe efficacement la phosphosérine immobilisée avec un K_D de $3,7 \times 10^{-8}$ M, comparable à la valeur obtenue pour l'interaction avec la PS immobilisée (tableau 4.1). Ces observations indiquent donc clairement que l'interaction C1q/PS a lieu principalement *via* le groupe phosphosérine.

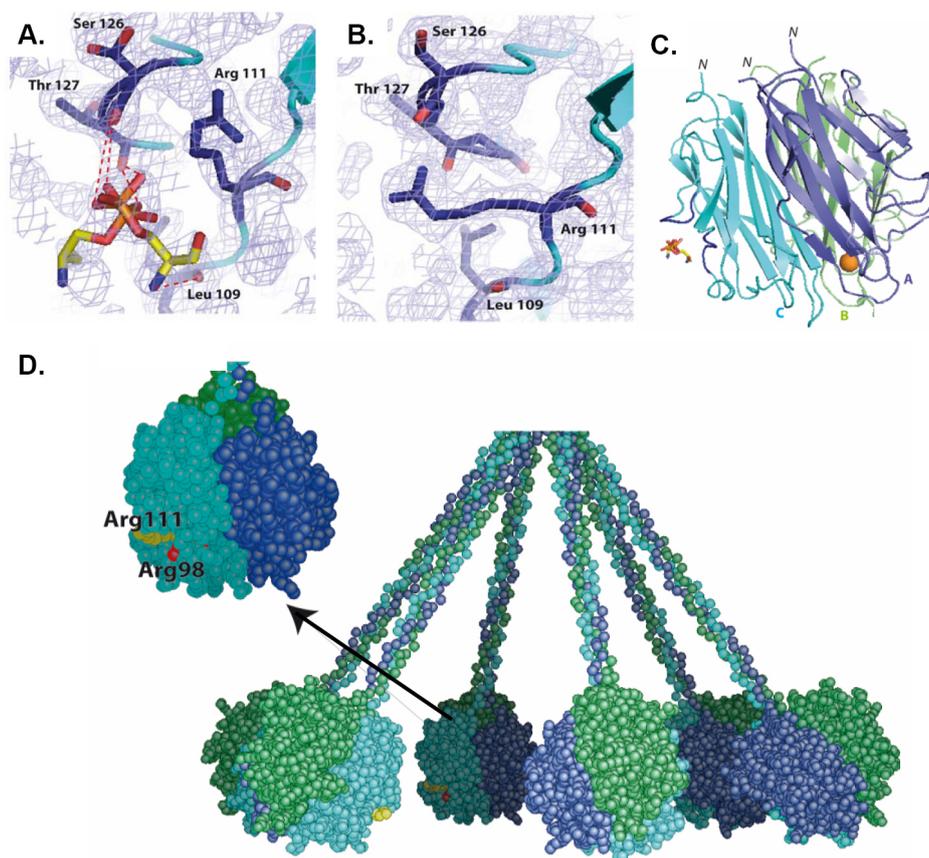


FIG. 4.3 – Structure cristallographique du complexe phosphosérine-GR. (A.) Vue détaillée de l'interaction entre la sous-unité C et la phosphosérine. Les deux conformations de la phosphosérine sont présentées. (B.) Vue détaillée comparative de la région d'interaction de la phosphosérine dans la structure de GR native, illustrant la conformation étendue de la chaîne latérale de l'Arginine¹¹¹. (C.) Vue globale de l'interaction. Les sous-unités A, B et C sont représentées en ruban et colorées en bleu, vert et cyan, respectivement. Le ligand est représenté en bâtonnets. La sphère orangée représente l'ion calcium fixé aux GR. (D.) Modèle général de la molécule de C1q [Gaboriaud et al., 2004], montrant la position du site de fixation de la phosphosérine. L'arginine¹¹¹ et l'arginine⁹⁸ sont colorées en jaune et rouge, respectivement.

4.1.3 Analyse cristallographique de l'interaction entre les têtes globulaires de C1q et la phosphosérine

Les analyses de cristallographie aux rayons X ont été réalisées par Christine Gaboriaud et Virginie Garlatti au laboratoire de Cristallographie et Cristallogénèse des Protéines, IBS. Elles avaient pour but d'observer l'interaction entre les GRs et des ligands dérivés de la PS à l'échelle moléculaire. Deux stratégies principales ont été utilisées :

- la co-cristallisation des GR avec le ligand,
- le trempage de cristaux de GR dans des solutions contenant le ligand.

Les expériences de co-cristallisation avec le dérivé 06 : 0 PS se sont révélées infructueuses. A l'inverse, après trempage prolongé de cristaux de GR dans une solution contenant la phosphosérine, une densité supplémentaire correspondant au ligand est observée, comparativement à la structure des GR natives (figure 4.3 A et B). Comme le montre la figure 4.3 C, la phosphosérine est stabilisée principalement par les résidus de deux boucles de surface (résidus 108 à 111 et 126 à 129) de la sous-unités C des GR. Le ligand est observé dans deux conformations différentes (figure 4.3 A). Dans les deux cas, le groupe phosphoester est stabilisé par des liaisons hydrogènes avec les chaînes carbonées principales de la sérine¹²⁶ et de la thréonine¹²⁷ et par des interactions électrostatiques avec l'arginine¹¹¹.

Selon le modèle actuel de la molécule de C1q [Gaboriaud et al., 2004], ce site est localisé sur la face interne du cône de C1q et orienté vers la surface cible (figure 4.3 C et D).

Bien que la molécule de phosphosérine soit manifestement attirée vers cette position dans le cristal, son orientation est contrainte fortement par l'empilement cristallin et peut donc être légèrement différente de celle réalisée en conditions physiologiques. A cet égard, la région voisine localisée entre l'arginine¹¹¹ et l'arginine¹⁰⁹, qui n'est pas accessible dans la structure cristalline, semble être un site alternatif de fixation possible. Le site d'interaction de la phosphosérine serait alors localisé plus près de la surface cible sous-jacente (figure 4.3 D).

4.2 Recherche de l'interaction phosphatidylsérine-C1q à la surface des cellules apoptotiques

L'ensemble des résultats précédents laissait supposer fortement que la PS était impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q. La pertinence de cette hypothèse a donc été testée à l'échelle cellulaire.

4.2.1 Inhibition par l'annexine V de la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q

Dans un premier temps, nous avons examiné la capacité de l'annexine V, un ligand reconnu de la tête polaire de la PS [Huber et al., 1990, Swairjo et al., 1995], à concurrencer la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q.

La technique de cytométrie en flux a été utilisée initialement. Cependant, aucune inhibition n'a pu être observée dans ces conditions (résultats non présentés). Cela est probablement dû aux contraintes techniques imposées par l'annexine V. En effet, l'annexine V semble se fixer de façon réversible à la PS. Par exemple, comme cela est mentionné dans les protocoles donnés par les fabricants, le marquage de la PS par l'annexine V nécessite d'être analysé soit rapidement après ajout du réactif, soit après fixation des cellules, par exemple par un agent réticulant tel que la paraformaldéhyde. Or, d'une part, dans le cas d'expériences de cytométrie en flux, la détection de la fixation des GR nécessite deux incubations prolongées et de nombreuses étapes de rinçage. Ces conditions sont donc supposées libérer l'annexine V et ne sont donc pas compatibles avec des expériences d'inhibition. D'autre part, puisque notre but est de suivre ce qui se produit à la surface cellulaire, nous ne pouvons pas travailler avec des cellules apoptotiques préalablement fixées, la fixation modifiant les propriétés de la membrane.

A l'inverse, le test mis au point au Biacore nous a semblé être une technique de choix pour analyser les effets de l'annexine V car il permet de suivre en temps réel la capture des cellules par C1q, immédiatement après l'incubation des cellules en présence d'annexine V, en évitant toute étape supplémentaire de marquage.

Les cellules HeLa viables et apoptotiques ont été injectées successivement sur C1q immobilisé, en présence de concentrations croissantes d'annexine V. Comme le montre la figure 4.4 A, le traitement par l'annexine V ne modifie pas la capture des cellules HeLa viables. Par contre, l'annexine V inhibe la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q (figure 4.4 B). De plus, cette inhibition est dépendante de la dose utilisée et atteint un taux de presque 50 % quand l'annexine V est utilisée à une concentration de 1,5 μ M (figure 4.4 C).

Ces résultats constituent une preuve directe que la PS est une cible majeure de C1q à la surface des cellules apoptotiques.

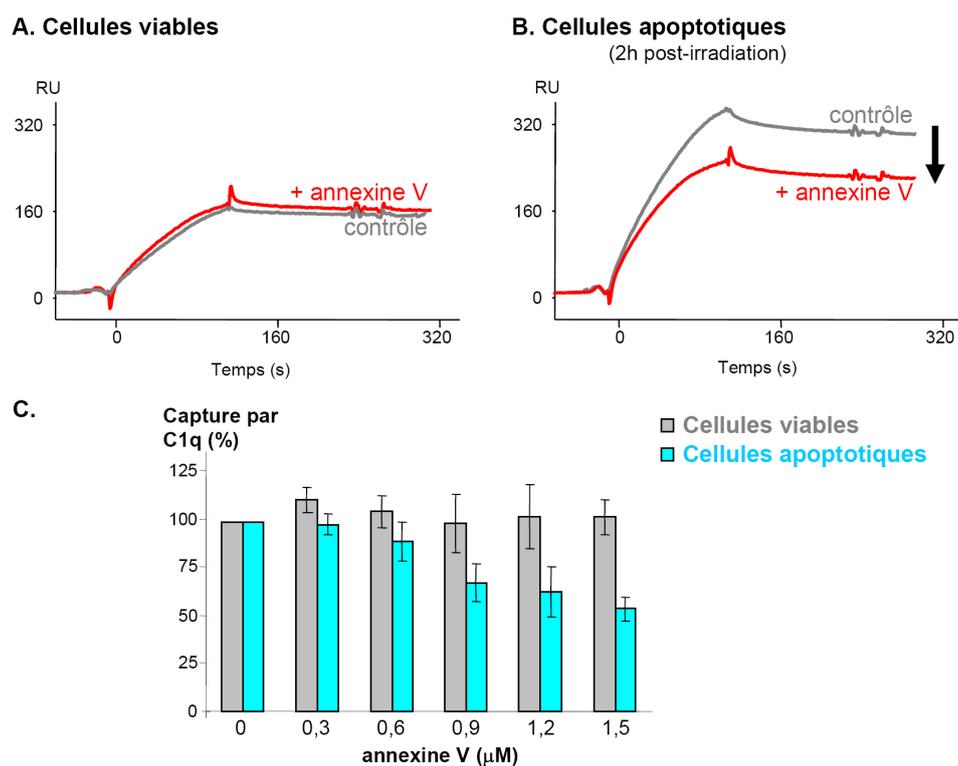


FIG. 4.4 – Inhibition par l’annexine V de la capture des cellules apoptotiques par C1q. Les cellules HeLa viables (A.) ou apoptotiques (B.) sont incubées en présence de tampon (courbe grise) ou de doses croissantes d’annexine V (courbe rouge) puis injectées sur C1q immobilisé sur une sensor chip CM5. Les résultats sont exprimés par rapport à la capture des cellules en absence d’annexine V (C.).

4.2.2 Localisation de l'interaction à la surface cellulaire

Dans un deuxième temps, la distribution de C1q et de la PS à la surface des cellules apoptotiques a été étudiée par microscopie confocale. Les cellules HeLa normales, apoptotiques précoces et tardives (respectivement 2 h et 20 h après irradiation) ont été doublement marquées par immunofluorescence à l'aide d'annexine V et d'anticorps polyclonaux dirigés contre C1q (figure 4.5). Les noyaux ont été visualisés par marquage au Hoechst.

La proportion de cellules marquées par l'annexine V et/ou par C1q est évaluée par comptage. 85 ± 5 % de cellules viables sont marquées faiblement pour C1q (figure 4.5 A, C et D), confirmant les résultats précédents. Par ailleurs, l'exposition de la PS n'est détectée chez aucune de ces cellules (figure 4.5 B).

A l'inverse, 16 ± 3 % des cellules apoptotiques précoces, 2 h après irradiation, présentent une exposition forte de la PS (figure 4.5 E et F) et 81 ± 3 % d'entre elles sont également positives pour C1q. De plus, le marquage C1q a une intensité significativement plus forte que chez les cellules viables. (figure 4.5 C et G). La superposition des marquages par l'annexine V et C1q révèle que les molécules de C1q sont généralement rassemblées dans des îlots (« patches ») membranaires où elles sont co-localisées avec la PS (figure 4.5 H). Comme le révèle l'échantillon représentatif choisi dans la figure 4.5 M, plusieurs situations sont observées pour les cellules doublement marquées. Sur la cellule 1, la PS est regroupée en îlots membranaires bien distincts où C1q est co-localisé. La cellule 2, présente quant à elle un marquage par l'annexine V plus homogène recouvrant presque entièrement la membrane plasmique et presque toutes les molécules de C1q se retrouvent dans des îlots contenant la PS.

4.3 Conclusion et Discussion

Des approches moléculaires, cellulaires et structurales ont permis d'obtenir les résultats présentés dans ce chapitre et nous ont permis de dresser les conclusions suivantes :

1. la fixation de C1q sur les cellules apoptotiques augmente en même temps que l'exposition de la PS à la surface cellulaire et l'annexine V peut l'inhiber de façon dose dépendante,
2. d'après les analyses par SPR et co-sédimentation, C1q reconnaît la PS spécifiquement et avec une forte avidité ($K_D = 3,7$ à 7×10^{-8} M) *via* des interactions multiples entre ses GR et la tête polaire de la PS,
3. la majorité des molécules de C1q sont distribuées de façon remarquable dans des îlots membranaires où elles sont co-localisées avec la PS.

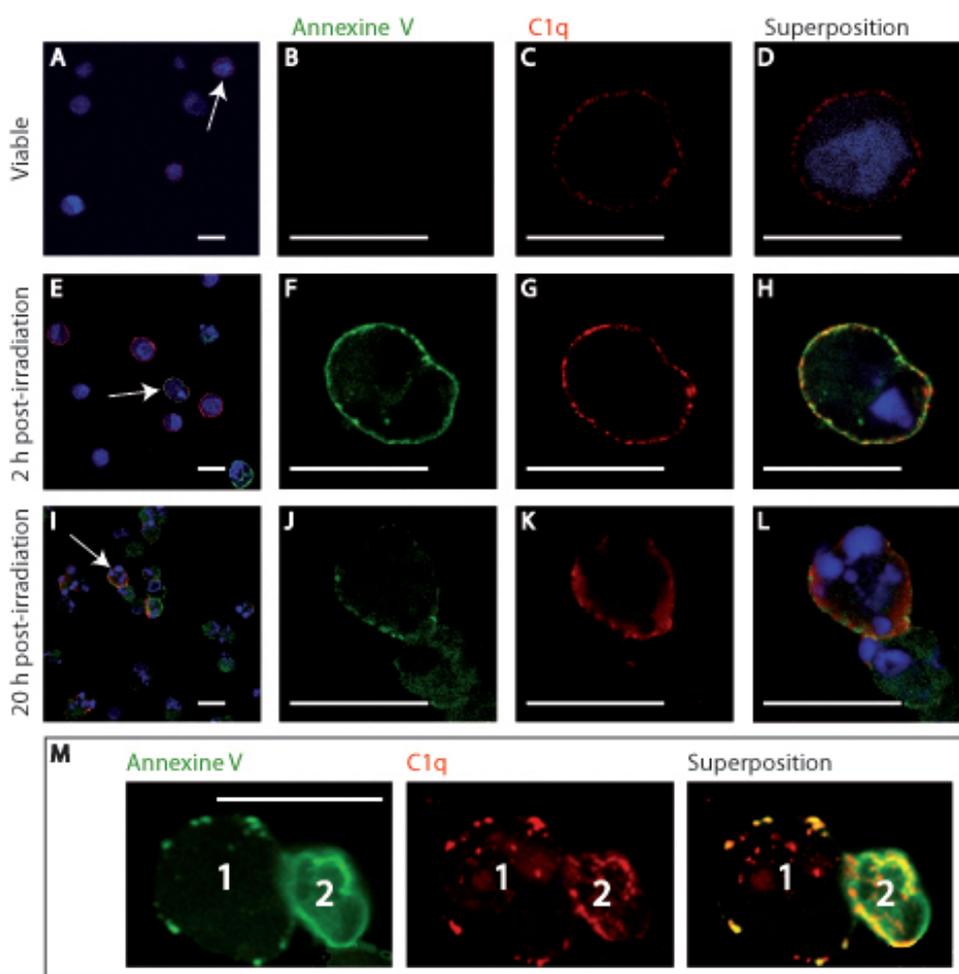


FIG. 4.5 – Etude par microscopie confocale de la localisation de C1q et de la PS à la surface cellulaire. Les cellules sont co-marquées par immunofluorescence pour la PS (vert) et C1q (rouge) comme cela a été décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. Les noyaux sont colorés avec du Hoechst (bleu). Dans chaque vue générale (A, E et I), les flèches indiquent les cellules observées dans les agrandissements. (A-D.) Cellules HeLa viables. (E-H.) Cellules apoptotiques précoces. (I-L.) Cellules apoptotiques tardives. (M.) Deux cellules (1 et 2) représentatives de l'ensemble de la population 2 h après irradiation. Les barres d'échelle représentent 20 μm . Dans les expériences contrôles, aucun marquage n'est observé avec les anticorps primaire et secondaire sans pré-incubation avec C1q.

Ces résultats démontrent donc pour la première fois que C1q reconnaît la PS exposée à la surface des cellules apoptotiques.

De nombreuses études ont maintenant clairement établi que l'exposition de la PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique est une caractéristique générale des cellules apoptotiques qui permet leur élimination et induit des voies répressives qui inhibent la réponse inflammatoire induite par les phagocytes. La PS est ainsi critique pour la reconnaissance et est requise pour l'élimination [Fadok et al., 1998a, Krahling et al., 1999, Callahan et al., 2000, Fadok et al., 2001b]. Le rôle de la PS en tant que signal « eat-me » est corroboré par le fait que des vésicules contenant de la PS et la phospho-L-sérine peuvent bloquer la phagocytose [Fadok et al., 1992] et le fait que l'annexine V empêche l'élimination des cellules apoptotiques par les macrophages [Stach et al., 2000].

Nos résultats montrant la capacité de C1q à se fixer avec une forte affinité à la PS exposée à la surface des cellules apoptotiques confortent l'hypothèse selon laquelle C1q serait une molécule majeure dans la reconnaissance de la PS, nécessaire à l'élimination de ces cellules. Cependant, la PS n'est probablement pas le seul ligand exposé au cours de l'apoptose à la surface cellulaire pouvant être reconnu par C1q.

L'état de la question sur ce point sera fait dans la discussion.

Chapitre 5

Etude de l'implication de p33

Caractérisée par sa capacité à lier les régions globulaires de C1q, gC1qR/p33 est une protéine ubiquitaire multi-fonctionnelle qui se fixe à de nombreux ligands. Elle a été décrite comme étant présente dans la plupart des compartiments cellulaires. Bien que ne possédant ni domaine transmembranaire, ni site de fixation pour une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), elle est présente à la surface de certaines cellules : lymphocytes, monocytes ou plaquettes [Ghebrehiwet et al., 2001, Peerschke et al., 1994]. p33 peut également être sécrétée [Peterson et al., 1997].

De façon intéressante, p33 a été impliquée dans l'induction de l'apoptose. Il a en effet été montré que $\text{TNF}\alpha$ (« tumor necrosis factor »), un inducteur de l'apoptose, peut provoquer l'augmentation de l'expression de p33 chez les cellules endothéliales [Guo et al., 1999]. Une étude plus récente démontre que l'induction de l'apoptose des cellules HeLa par la cisplatine entraîne une augmentation du taux de p33 [Meenakshi et al., 2003]. Cependant, les modifications de l'expression de p33 à la surface cellulaire au cours de l'apoptose n'ont encore jamais été décrites.

Afin d'étudier l'implication possible de p33 dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q, nous avons, dans un premier temps, analysé le profil d'expression de p33 à la surface cellulaire au cours de l'apoptose.

5.1 Etude du profil d'expression de p33 au cours de l'apoptose

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus en partie lors d'un séjour dans le laboratoire du Pr. Berhane Ghebrehiwet, du département de Médecine de l'Université de Stony Brook, NY, USA.

5.1.1 Analyse de l'expression de p33 au niveau de la membrane plasmique

Nous avons analysé le profil d'expression de p33 chez les cellules HeLa, notre modèle cellulaire, et chez les cellules Raji, une lignée lymphocytaire B à partir de laquelle le récepteur des GR a été historiquement cloné [Ghebrehwet et al., 1994]. Les cellules ont été irradiées et incubées pendant différentes périodes. Puis, les cellules ont été lysées et l'expression de p33 a été analysée par immunorévélation après séparation par électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).

La figure 5.1 A (panneau supérieur) révèle que le taux de p33 augmente chez les cellules HeLa dès 2 h après irradiation (d'un facteur 1,2) et jusqu'à 6 h (d'un facteur 1,8). Ce résultat est en accord avec les données de Meenakshi et collaborateurs, selon lesquelles après traitement à la cisplatine, le taux de p33 augmente [Meenakshi et al., 2003].

A l'inverse, concernant les cellules Raji (figure 5.1 A, panneau inférieur), l'induction de l'apoptose par irradiation UV n'entraîne pas d'augmentation du taux de p33. L'augmentation de l'expression de p33 n'est donc pas universelle et semble dépendre du type cellulaire analysé.

Par ailleurs, des lysats membranaires de cellules HeLa témoins ou apoptotiques (2 h, 4 h ou 6 h après irradiation) ont également été analysés. Après séparation par SDS-PAGE et immunotransfert, le profil d'expression de p33 a été analysé. Comme le montre la figure 5.1 B, p33 est détecté dans les lysats membranaires de cellules HeLa viables. Il apparaît que l'expression de p33 augmente après induction de l'apoptose.

Cependant, ces lysats enrichis en membranes contiennent des protéines présentes aussi bien sur le feuillet interne que sur le feuillet externe. Il n'est donc pas possible de conclure quant à la modification de la présentation de p33 à la surface cellulaire.

Afin de compléter cette étude, l'expression de p33 à la surface cellulaire a été analysée par cytométrie en flux.

5.1.2 Analyse de l'expression de p33 à la surface cellulaire

Expression de p33 à la surface des cellules Raji au cours de l'apoptose

Nous avons tout d'abord analysé le profil d'expression de p33 à la surface des cellules Raji. En effet, Ghebrehwet et collaborateurs ont montré par des études d'immunofluorescence indirecte que p33 est exprimé de façon

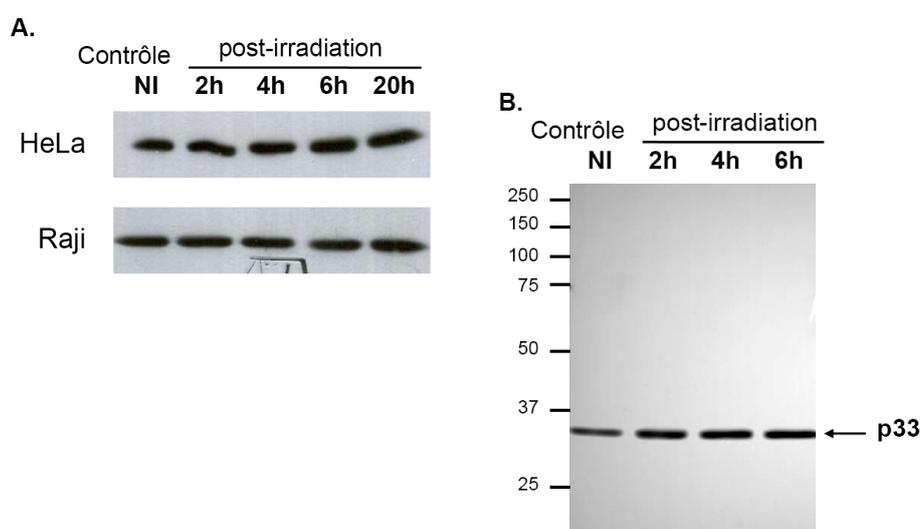


FIG. 5.1 – Analyse du profil d'expression de p33 dans des lysats cellulaires. (A.) Des lysats totaux de cellules HeLa et Raji ou (B.) des lysats enrichis en membranes de cellules HeLa sont préparés à différents temps après induction de l'apoptose par irradiation. L'expression de p33 est analysée par séparation sur gel d'acrylamide 10 % et immunorévélation par un anticorps dirigé contre p33 selon les protocoles décrits dans le chapitre Matériel et Méthodes ; les témoins de masse molaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure.

constitutive à la surface des cellules Raji, qui nous serviront donc de contrôle positif [Ghebrehwet et al., 2001].

Les cellules Raji ont été irradiées et l'expression de p33 a été analysée par immunofluorescence indirecte 4 h et 20 h après induction de l'apoptose. Les cellules n'ont pas été fixées afin d'éviter toute perméabilisation. Plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre p33 et reconnaissant différentes parties de la molécule ont été utilisés : 74.5.2, 60.11 et 25 (cf. chapitre Matériel et Méthodes).

Comme cela a été décrit précédemment [Ghebrehwet et al., 2001], l'anticorps 74.5.2 détecte la présence de p33 à la surface des cellules Raji (figure 5.2 A). Le niveau d'expression est toutefois hétérogène et reste comparable 4 h après induction de l'apoptose (figure 5.2 B). A 20 h, le pourcentage de cellules plus fortement positives semble augmenter, ce qui peut être la conséquence de la détection de p33 intracellulaire (figure 5.2 C).

Les anticorps 60.11 et 25 ne détectent pas, ou très peu, de p33 à la surface des cellules témoins ou 4 h après irradiation ((figure 5.2 D-E et G-H). A 20 h, une partie de la population est positive après marquage avec ces deux anticorps (figure 5.2 F et I). A ce stade tardif où de nombreuses cellules sont perméabilisées, il est difficile de déterminer si le marquage observé provient de l'exposition de nouveaux épitopes de p33 à la surface cellulaire ou de la détection de p33 intracellulaire sur laquelle les épitopes reconnus par les anticorps 60.11 et 25 sont accessibles.

Expression de p33 à la surface des cellules HeLa au cours de l'apoptose

L'expression de p33 à la surface des cellules HeLa a été analysée de la même façon à l'aide des anticorps anti-p33 74.5.2 et 25 (figure 5.3).

Sur les cellules HeLa, le marquage avec les anticorps 74.5.2 et 25 indique que p33 n'est pas exposée à la surface des cellules viables ou apoptotiques analysées 4 h après irradiation (figure 5.3 A-B et D-E).

A un stade plus tardif, 20 h après traitement, une partie de la population est positive avec les deux anticorps, sans que nous puissions conclure, comme précédemment, quant à l'exposition de p33 à la surface (figure 5.3 C et F).

Finalement, l'absence d'exposition de p33 à la surface des cellules HeLa aux temps précoces de l'apoptose (figure 5.3) permet de conclure que l'augmentation du taux de p33 observée à partir de 2h dans les lysats membranaires (figure 5.1 B) reflète une variation du taux de p33 intracellulaire associée ou non à la membrane plutôt qu'une exposition sur la face externe (en accord avec [Meenakshi et al., 2003]).

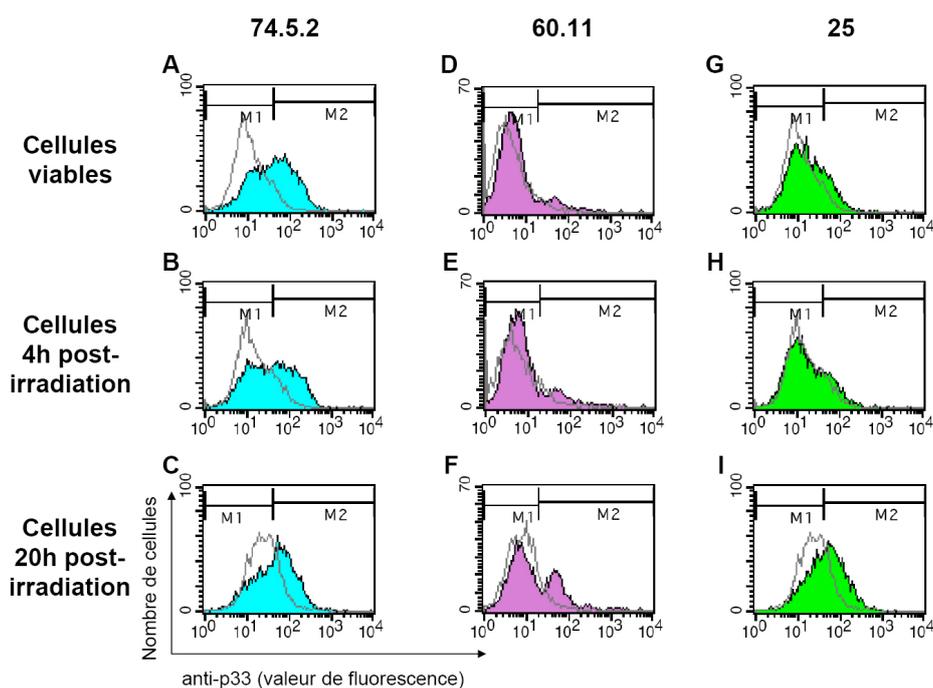


FIG. 5.2 – Analyse par cytométrie en flux du profil d'expression de p33 à la surface des cellules Raji au cours de l'apoptose induite par irradiation. Après récolte, les cellules Raji sont incubées avec l'anticorps primaire anti-p33 74.5.2 (A-C), 60.11 (D-F) ou 25 (G-I) et l'expression de p33 est suivie par cytométrie en flux après marquage à l'aide de l'anticorps secondaire anti-souris couplé au FITC. Les cellules contrôles non traitées (A, D et G), 4 h (B, E et H) ou 20 h (C, F et I) après irradiation sont analysées. Pour chaque panneau les courbes grises représentent le signal de fluorescence obtenu avec le contrôle isotypique.

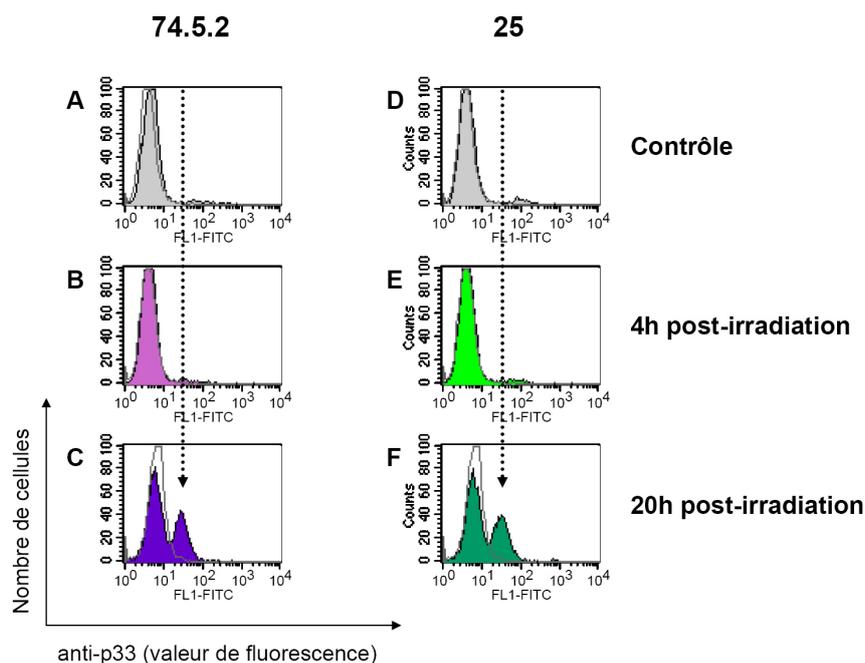


FIG. 5.3 – Analyse par cytométrie en flux du profil d'expression de p33 à la surface des cellules HeLa à différents temps après induction de l'apoptose par irradiation. Après récolte, les cellules HeLa sont incubées avec l'anticorps primaire anti-p33 74.5.2 (A-C) ou anti-p33 25 (C-F) et l'expression de p33 est suivie par cytométrie en flux après marquage à l'aide de l'anticorps secondaire anti-souris couplé au FITC. Les cellules contrôles non traitées (A et D), 4 h (B et E) ou 20 h (C et F) après irradiation sont analysées. Pour chaque panneau les courbes grises représentent le signal de fluorescence obtenu avec le contrôle isotypique.

5.2 Discussion

Tout d'abord, nos résultats montrent que l'induction de l'apoptose par irradiation UV induit une augmentation de l'expression de p33, comme cela est le cas 24 h après traitement à la cisplatine [Kamal and Datta, 2006].

Cependant, l'analyse en cytométrie en flux n'a pas permis de détecter la présence de p33 à la surface des cellules HeLa (figure 5.3), bien qu'il semble que p33 soit exprimée au niveau de la membrane (figure 5.1 B).

Ces résultats apparemment contradictoires peuvent être expliqués de deux façons différentes.

- Tout d'abord, les lysats membranaires contiennent les protéines présentes sur les feuillettes internes et externes de la membrane plasmique et sont probablement en partie contaminés par des protéines cytosoliques. Afin de s'affranchir de cette incertitude, il serait intéressant de réaliser l'analyse du profil d'expression de p33 à partir de protéines purifiées par exemple après biotinylation de la surface cellulaire.
- Par ailleurs, il est possible que p33 soit présente à la surface cellulaire, mais qu'elle y soit masquée. Ainsi, la protéine serait révélée par immunontransfert, mais ne serait pas disponible pour interagir avec des protéines circulantes et ne serait donc reconnue ni par des anticorps spécifiques ni par C1q.

Comme l'ont montré Ghebrehwet et collaborateurs avec l'anticorps 74.5.2, p33 est exprimée à la surface des cellules Raji [Ghebrehwet et al., 2001]. Cependant cette localisation cellulaire ne semble pas ubiquitaire. En effet, les résultats obtenus en cytométrie en flux montrent qu'à la surface des cellules HeLa, p33 n'est pas détectée.

Par ailleurs, ces travaux montrent que les profils d'expression de p33 à la surface des cellules Raji au cours de l'apoptose sont différents selon l'anticorps utilisé. Cela laisse supposer, soit que p33 est sujette à des changements de conformation, soit qu'une partie de la protéine est masquée selon l'état de la cellule.

p33, une cible de C1q à la surface cellulaire ?

La structure cristallographique de p33 a été déterminée à une résolution de 2,25 Å [Jiang et al., 1999]. C'est un beignet (« doughnut ») homotrimérique, représenté figure 5.4.

p33 est une protéine très acide, avec un pI de 4,15. Cependant la distribution de charge à la surface de la protéine est très asymétrique. L'une des faces a une forte proportion de résidus chargés négativement (figure 5.5 B). La face opposée est à l'inverse beaucoup moins chargée (figure 5.5 A). Cette

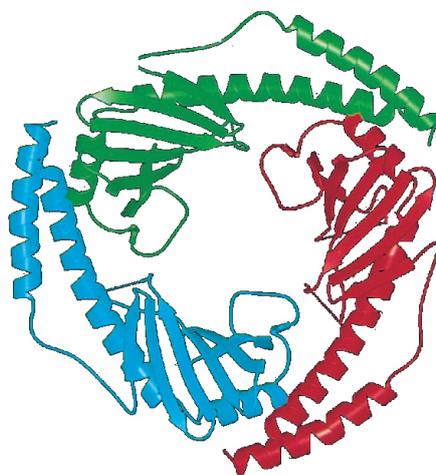


FIG. 5.4 – Structure de p33. Représentation en ruban du trimère p33. Les trois monomères sont colorés respectivement en rouge, vert et bleu et correspondent respectivement aux sous-unités A, B et C. D'après Jiang et collaborateurs [Jiang et al., 1999].

polarité de distribution de charge suggère des rôles fonctionnels différents.

L'anticorps 74.5.2 reconnaît le site de fixation du kininogène de haut poids moléculaire (HK, « high molecular weight kininogen ») situé dans la partie C-terminale de p33 (résidus 204 à 218). HK est un élément de la voie intrinsèque de la coagulation sanguine. L'anticorps 60.11 reconnaît, quant à lui, le site de fixation de C1q, situé dans la partie N-terminale de p33 (résidus 76 à 93). Ces anticorps ont déjà été décrits [Ghebrehiwet et al., 2002, Ghebrehiwet et al., 1996]. Le site reconnu par l'anticorps 25 n'est quant à lui pas encore identifié.

Ghebrehiwet et collaborateurs ont cartographié les sites reconnus par les anticorps 74.5.2 et 60.11. Le site de fixation de C1q (60.11) est situé à l'équateur du beignet, tandis que celui de HK (74.5.2) est restreint à l'intérieur du pore. Les auteurs ont également montré qu'aucun des sites n'était exposé sur la face faiblement chargée [Ghebrehiwet et al., 2002].

Pour les cellules Raji, bien que p33 soit présente (marquée par l'anticorps 74.5.2, figures 5.2 A et B), il semble que le site de fixation de l'anticorps 60.11 ne soit pas exposé de façon constitutive ou précocement après induction de l'apoptose (figures 5.2 D et E). On peut donc supposer que p33 se trouve dans une conformation où le site de fixation de C1q est masqué.

Pour les cellules HeLa, p33 n'est détectée à la surface cellulaire par aucun des anticorps dirigés contre p33 (figure 5.3 A et D). L'induction de l'apoptose

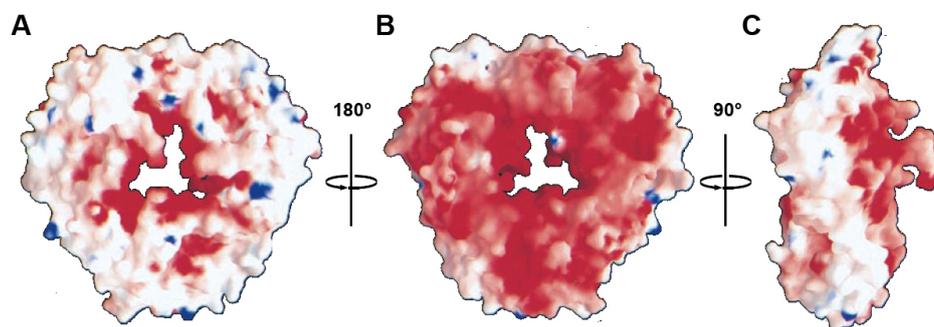


FIG. 5.5 – Distribution des charges à la surface de p33. (A.) Distribution des charges vue dans la même direction que la figure 5.4. Cette face est appelée la face positive. Les potentiels électriques chargés positivement et négativement sont indiqués respectivement en bleu et rouge. (B.) Un nombre significativement plus grand de résidus chargés négativement est présent sur la face opposée. Cette face est appelée la face négative. (C.) Une vue de côté de la surface de la protéine montre l'asymétrie de distribution de charge sur les deux faces. D'après Jiang et collaborateurs [Jiang et al., 1999].

par irradiation ne conduit pas non plus au démasquage ou à l'exposition précoce de p33 (figures 5.3 B et E).

Ainsi, p33 ne semble pas impliqué dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q, au moins aux stades précoces.

p33, un modulateur des réponses inflammatoires

Il faut cependant souligner que p33 peut également être sécrétée activement dans le milieu extra-cellulaire *in vivo*, bien que les mécanismes de cette sécrétion ne soient pas connus. Il est donc possible que p33 puisse être relarguée par les cellules en cours d'apoptose. p33 ainsi relarguée pourrait être la cible d'interactions protéine-protéine. A cet égard, plusieurs études ont rapporté que p33 pouvait avoir un rôle de modulateur des fonctions de C1q [Kuna et al., 1996, Leigh et al., 1998].

En conséquence, p33 ne peut probablement pas servir de signal « eat-me » précoce, compte-tenu de l'absence de variations de son expression à la surface cellulaire au cours de l'apoptose. Cependant, sa sécrétion par les cellules pourrait modifier les réponses cellulaires et inflammatoires et avoir des effets chimio-attractants [Leigh et al., 1998].

Chapitre 6

Caractérisation de l'interaction calréticuline-C1q

La calréticuline (CRT) est un récepteur connu des fragments de type collagène de C1q (CLF) [Arvieux et al., 1984, Malhotra et al., 1990, Stuart et al., 1996, Eggleton et al., 1998]. La CRT étant présente à la surface de nombreux types cellulaires, elle peut donc être considérée comme une cible de C1q [Stuart et al., 1997, Eggleton et al., 2000, McGreal and Gasque, 2002, Ghiran et al., 2003].

Ogden et collaborateurs ont montré que la CRT, présente **à la surface des macrophages**, pouvait initier la phagocytose, en fixant les CLF de C1q adsorbé à la surface des cellules apoptotiques *via* ses régions globulaires. La CRT ne possède pas de domaine transmembranaire mais semble induire la phagocytose des cellules apoptotiques par association avec CD91, aussi appelé LRP (« LDL receptor related-protein »), à la surface du macrophage [Ogden et al., 2001].

Récemment, Gardai et collaborateurs ont montré que la CRT pouvait en outre servir de signal « eat-me » **à la surface des cellules apoptotiques** et qu'elle était directement impliquée dans leur élimination par les phagocytes [Gardai et al., 2005].

Enfin, bien qu'initialement identifiée comme un récepteur des CLF [Arvieux et al., 1984, Malhotra et al., 1990, Stuart et al., 1996, Eggleton et al., 1998], d'autres études ont montré que la CRT avait également la capacité d'interagir avec les régions globulaires (GR) de C1q [Kishore et al., 1997, Kovacs et al., 1998, Steinø et al., 2004].

L'un de nos objectifs a donc été de rechercher si la CRT, présente à la surface des cellules apoptotiques, est une cible de C1q et plus particulièrement de ses régions globulaires. Nous avons abordé cette question de deux

façons complémentaires :

1. par l'étude approfondie des caractéristiques biochimiques et structurales de l'interaction entre C1q et CRT,
2. par la recherche de cette interaction à la surface des cellules apoptotiques.

6.1 Etude de l'interaction CRT-C1q

Avant d'étudier sa signification au niveau cellulaire, l'interaction CRT-C1q a été caractérisée à l'échelle moléculaire par résonance plasmonique de surface (SPR).

6.1.1 Caractérisation des régions de C1q interagissant avec la CRT

La CRT placentaire humaine fournie par Gunnar Houen a été immobilisée sur la sensor chip CM5. Sa capacité d'interaction avec C1q, ses régions globulaires (GR) ou ses fragments collagéniques (CLF) a été testée. Les données cinétiques ont été collectées en injectant des concentrations croissantes de C1q, de GR et de CLF (figure 6.2).

Dans une étude précédente étudiant par ELISA les mécanismes moléculaires de l'interaction entre C1q et CRT, Steinø et collaborateurs n'avaient pu mettre en évidence cette interaction que lorsque C1q était immobilisé [Steinø et al., 2004]. Comme l'illustre la figure 6.1, C1q, les CLF et les GRs se lient spécifiquement à la CRT immobilisée. C'est donc la première fois que cette interaction est mise en évidence dans cette configuration.

Les sensorgrammes présentent chacun des allures différentes. Les CLF semblent par exemple avoir une association et une dissociation relativement rapide. En comparaison, les GR présentent une interaction se mettant en place plus lentement, mais apparemment plus stable avec une dissociation plus lente. Ces observations suggèrent que l'interaction de la CRT avec les différents domaines de C1q met en jeu des mécanismes d'interaction distincts.

6.1.2 Analyse cinétique de l'interaction C1q-CRT

L'analyse cinétique des interactions a été réalisée pour C1q, les GR et les CLF (figure 6.2).

Pour les GR et les CLF, les constantes cinétiques (k_{off} et k_{on}) et de dissociation (K_D) calculées à l'aide du modèle d'interaction 1 : 1 sont pré-

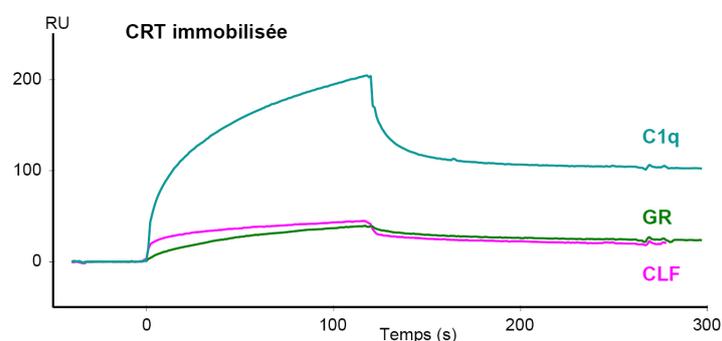


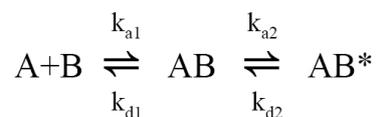
FIG. 6.1 – Analyse par SPR de l'interaction de la calréticuline avec C1q. La calréticuline est immobilisée sur un sensor chip CM5. La fixation de C1q, de ses régions globulaires (GR) et de ses fragments collagéniques (CLF) (chacun à la concentration de 600 nM) est mesurée.

	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)	χ^2
GR	$6,2 \pm 1,3 \times 10^3$	$2,4 \pm 0,2 \times 10^{-3}$	390 ± 150	0,836
CLF	$1,3 \pm 0,9 \times 10^4$	$3,5 \pm 0,6 \times 10^{-3}$	270 ± 50	1,38

TAB. 6.1 – Constantes cinétiques et de dissociation de l'interaction des GR et CLF avec la CRT immobilisée.

sentées dans le tableau 6.1. Les GR et les CLF ont une affinité équivalente pour la CRT, avec une constante de dissociation de l'ordre de 350 nM, mais présentent des paramètres cinétiques différents. Les CLF ont en effet une constante cinétique d'association 2,1 fois supérieure à celle des GR, qui ont elles une constante cinétique de dissociation 1,5 fois inférieure à celle des CLF. Ces valeurs obtenues confirment donc les observations faites à partir de la figure 6.1.

Pour C1q, d'après les analyses cinétiques, le modèle à deux états de réaction est le modèle le plus en adéquation avec les sensorgrammes expérimentaux (figure 6.2 A). Ce modèle prend en compte les changements de conformation du complexe, un complexe de plus en plus stable étant formé en deux étapes. Il répond à l'équation suivante :



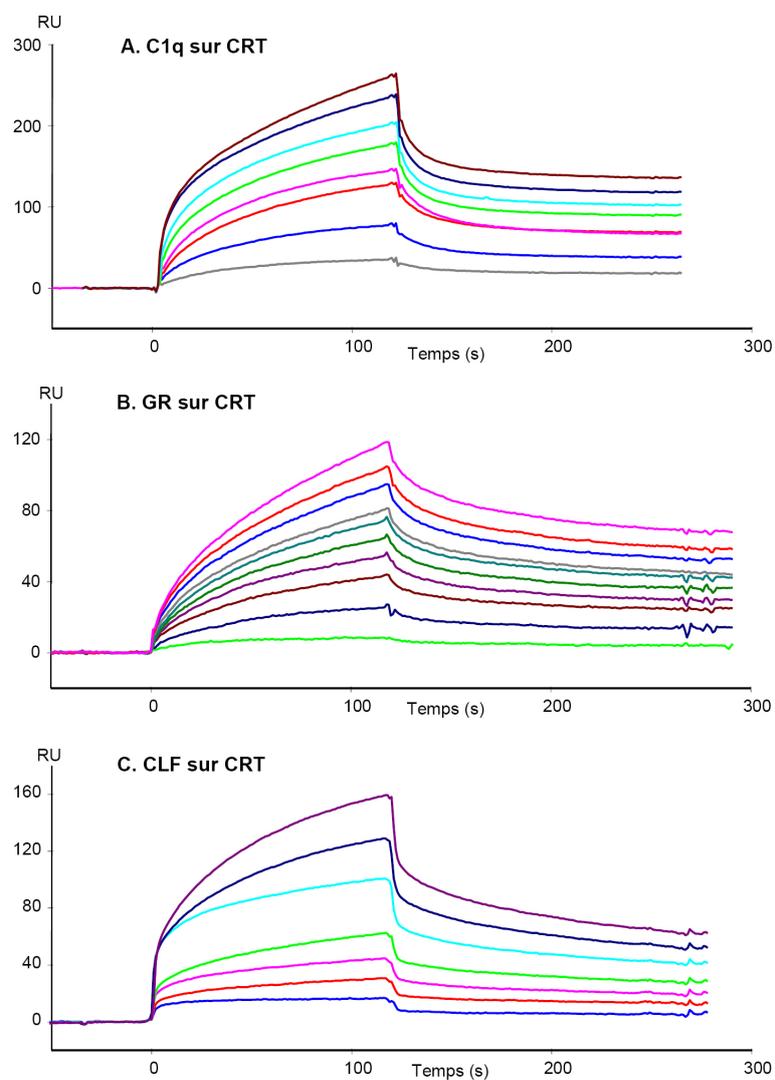


FIG. 6.2 – Analyse cinétique de l'interaction calréticuline-C1q. La calréticuline est immobilisée sur une sensor chip CM5. (A.) C1q (100 à 800 nM), (B.) GR (0,1 à 2 μ M) et (C.) CLF (0,2 à 2 μ M) sont injectés sur la calréticuline immobilisée.

k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	k_{a2} (s^{-1})	k_{d2} (s^{-1})	$1/K$ (nM)	χ^2
$6,5 \times 10^3$	$4,8 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-2}$	$9,3 \times 10^{-4}$	314	1,58

TAB. 6.2 – Données cinétiques de l'interaction de C1q avec la CRT immobilisée. $1/K = \frac{k_{d1}}{k_{a1}} \times \frac{k_{d2}}{k_{a2}}$

Les deux groupes de constantes cinétiques et la constante apparente d'affinité, K , calculée par le logiciel BIAeval sont reportés dans le tableau 6.2.

La bonne corrélation observée entre les résultats expérimentaux et ce modèle indique que la reconnaissance de la CRT immobilisée par C1q implique probablement un changement de conformation. Cependant, la SPR ne permet pas de démontrer directement les changements de conformation. L'existence de telles modifications conformationnelles devrait donc être confirmée à l'aide de techniques complémentaires telles que la RMN ou la spectroscopie.

6.2 Obtention de CRT recombinante fonctionnelle

Nos résultats montrent donc que l'interaction CRT-C1q implique aussi bien les GR que les CLFs. Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la reconnaissance de la CRT exposée à la surface cellulaire, les domaines de la protéine impliqués dans cette interaction ont été caractérisés.

Sur la base de sa séquence polypeptidique, la CRT a été divisée en 3 parties (figure 6.3) : un domaine N-terminal (résidus 1 à 189), un domaine P, riche en Proline (résidus 189 à 288) et un domaine C-terminal acide et flexible (résidus 289 à 400) [Fliegel et al., 1989, Smith and Koch, 1989].

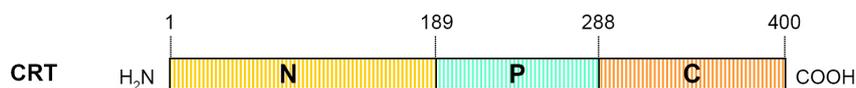


FIG. 6.3 – Représentation schématique de la CRT présentant les différents domaines de la protéine.

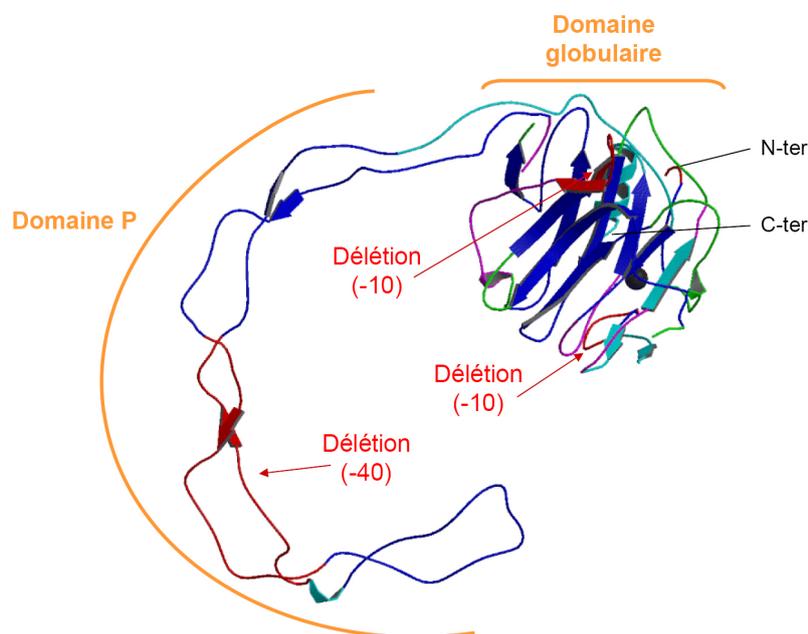


FIG. 6.4 – Similarité structurale globale entre CNX et CRT. Représentation sous forme de ruban de la CNX. Les régions très conservées en séquence entre CRT et CNX et entre les différentes CRT sont représentées respectivement en indigo et en violet. Les régions peu conservées en séquence de même longueur (en cyan) ou présentant de petites insertions ou délétions (1 ou 2 résidus) (en vert) sont indiquées. Les différences importantes sont représentées en rouge. Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées. D'après [Schrag et al., 2001].

La structure cristallographique de la CRT n'est pas connue. Cependant, par homologie de séquence avec la calnexine (CNX), une protéine chaperon homologue [Williams, 2006] dont la structure a été obtenue [Schrag et al., 2001], la CRT peut être divisée en deux domaines structuraux, le domaine globulaire N/C et le domaine P replié en une longue épingle à cheveux (figure 6.4). Des études biophysiques par microscopie électronique et par spectroscopie de dichroïsme circulaire ont confirmé cette organisation structurale prédictive de la CRT [Tan et al., 2006].

Afin d'étudier l'interaction CRT-C1q, la CRT recombinante ainsi que ses domaines N/C et P ont été produits et purifiés.

6.2.1 Production et purification de la CRT humaine recombinante

Expression de HAT-CRT

Le plasmide pHFX-CRT codant pour la calréticuline humaine a été utilisé pour transformer des bactéries BL21(DE3)pLysS. Ce système permet la production de la calréticuline fusionnée à une étiquette HAT (Histidine affinity tag) (HAT-CRT). La culture, l'induction de HAT-CRT et l'extraction des protéines sont réalisées comme indiqué dans la section 2.2 du chapitre Matériel et Méthodes. L'analyse par SDS-PAGE (figure 6.5 A) montre que la production de HAT-CRT est observée après 3 h 30 en présence d'IPTG 1 mM.

Purification de HAT-CRT

HAT-CRT est ensuite purifiée comme indiqué dans la section 6.2.1 du chapitre Matériel et Méthodes. La première étape est réalisée sur une colonne d'affinité, à l'aide d'une résine TALON. L'étiquette HAT, placée en position N-terminale de la CRT permet la fixation spécifique de la protéine aux ions cobalt de la résine *via* les atomes d'azote du cycle histidine. L'élution est effectuée à l'aide d'une solution contenant un compétiteur pour la fixation au cobalt, l'imidazole à une concentration de 150 mM. La purification est analysée par SDS-PAGE (figure 6.5 B).

Les fractions contenant HAT-CRT (fraction du lavage en présence d'imidazole 10 mM et fractions d'élution 1 à 3) sont rassemblées et dialysées contre le tampon d'équilibration (Tris-HCl 20 mM, NaCl 350 mM, pH 7,5) de la colonne échangeuse d'ions, Mono Q 5/50 GL, utilisée dans la seconde étape de purification. L'élution est réalisée par un gradient de NaCl 350 - 740 mM, à l'aide d'un tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5. On détecte 3 pics sur le chromatogramme présenté figure 6.5 C (fractions 2, 4 et 5). L'analyse des fractions par SDS-PAGE montre que les trois pics contiennent HAT-CRT (figure 6.5 D).

Afin de mieux caractériser les différentes fractions d'élution, la composition des fractions 2 et 5 est analysée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) (figure 6.5 E). Seule l'analyse de la fraction 2 permet d'obtenir un spectre présentant un pic indiquant une masse de 49.432 ± 49 Da. Cette valeur correspond à la masse attendue de HAT-CRT sans la méthionine initiale (tableau 6.4). Dans le cas de la fraction 5, le spectre obtenu ne présente pas de pic (figure 6.5 E). Une explication possible est que l'extrémité C-terminale chargée de HAT-CRT est partiellement dégradée. Cela entraînerait une modification du point isoélectrique de la protéine et donc de son profil d'élution

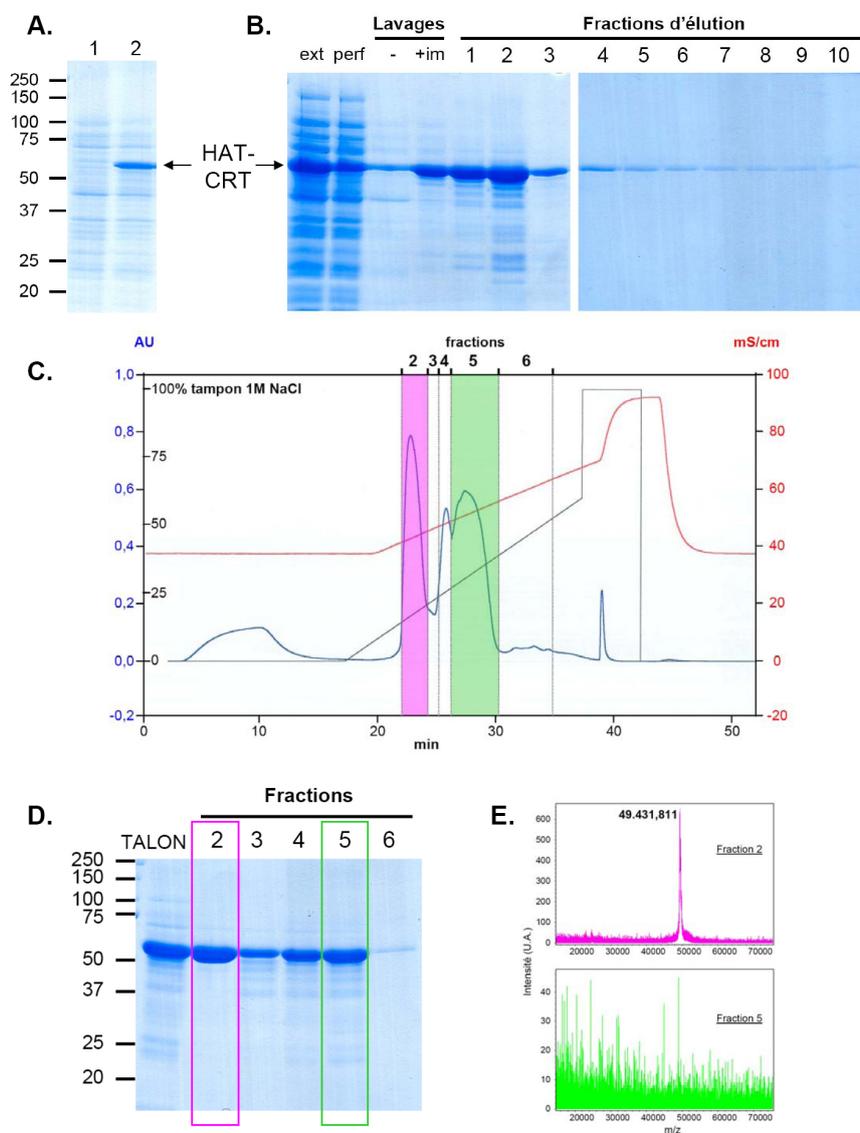


FIG. 6.5 – Production et purification de HAT-CRT. (A.) Analyse par SDS-PAGE de l'induction de la production de CRT. 2 ml de la culture bactérienne sont prélevés avant (piste 1) et à la fin (piste 2) de l'induction pendant 3 h 30 à 37°C par l'IPTG 1mM. Après centrifugation, les culots sont repris dans 200 μl de SDS 2 % et 6 (piste 1) ou 3 μl (piste 2) de l'extrait sont analysés (B.) Analyse par SDS-PAGE de la première étape de purification par chromatographie d'affinité sur colonne TALON. 5 μl d'extrait protéique (ext) et de perfusate (perf), 26 μl du lavage (-) et 10 μl du lavage en présence d'imidazole 10 mM (+im) et des fractions d'éluion 1 à 10 sont analysés sur gel. (C.) et (D.) Deuxième étape de purification de HAT-CRT par chromatographie échangeuse d'ions sur colonne Mono Q 5/50 GL. (C.) Chromatogramme de l'éluion par un gradient de NaCl 350 - 740 mM à l'aide du tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5. (D.) Analyse par SDS-PAGE de 10 μl d'échantillon provenant de la première étape et des fractions d'éluion 2 à 6. (E.) Analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) des fractions 2 (panneau du haut) et 5 (panneau du bas) de la chromatographie échangeuse d'ions. L'ensemble des analyses SDS-PAGE a été réalisé sur gel d'acrylamide 10 %; les témoins de masse molaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure.

sans pour autant en changer significativement la masse molaire apparente. Cette fraction contiendrait alors de nombreuses espèces, difficiles à détecter et à distinguer en spectrométrie de masse.

La protéine pure est obtenue en regroupant les fractions contenant le premier pic (ici la fraction 2). Environ 12 mg de protéine sont obtenus par litre de culture bactérienne.

6.2.2 Analyse fonctionnelle de HAT-CRT

Afin de vérifier que la protéine recombinante se comporte comme la protéine native, HAT-CRT a été analysée par spectroscopie de dichroïsme circulaire et par SPR, en comparaison avec la protéine isolée du placenta.

Analyse par spectroscopie de dichroïsme circulaire de HAT-CRT

L'analyse par spectroscopie de dichroïsme circulaire a été réalisée avec Pierre Gans du laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire, IBS.

Le spectre dans l'UV lointain de HAT-CRT est caractérisé par un maximum à 208 nm et une épaule proéminente à 229 nm (figure 6.6 A). Le spectre ne présente pas les caractéristiques typiques d'une protéine contenant de nombreuses structures secondaires bien définies telles que les hélices α ou les feuillets β .

Cependant HAT-CRT (courbe bleue, panneau de gauche) ne présente pas de différence spectrale apparente avec la CRT purifiée, dont le spectre a déjà été caractérisé [Li et al., 2001]. Ce résultat suggère donc que les éléments de la structure secondaire sont convenablement organisés : HAT-CRT est donc correctement repliée.

Analyse par SPR de HAT-CRT

La protéine recombinante a ensuite été comparée à la protéine native purifiée à partir de placenta par SPR. Pour cela, HAT-CRT et la CRT purifiée fournie par Gunnar Houen ont été immobilisées sur une sensor chip CM5, puis C1q a été injecté sur la surface.

Comme le montre la figure 6.7, C1q interagit spécifiquement avec les deux protéines. On remarque que les sensorgrammes présentent des profils similaires.

L'analyse cinétique des interactions a été réalisée à l'aide de concentrations croissantes de C1q.

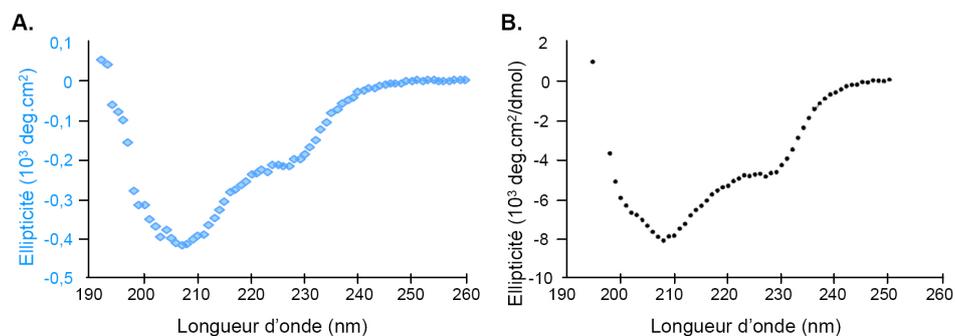


FIG. 6.6 – Analyse de HAT-CRT par spectroscopie de dichroïsme circulaire. (A.) Spectre d'ellipticité de HAT-CRT (B.) Spectre d'ellipticité molaire de la CRT d'après [Li et al., 2001]

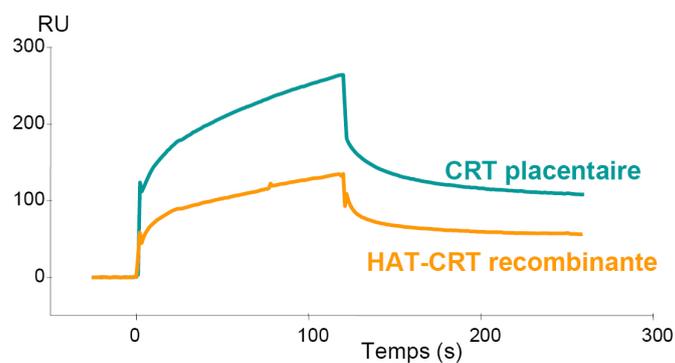


FIG. 6.7 – Analyse fonctionnelle de HAT-CRT par SPR. HAT-CRT (5.600 RU, courbe jaune) et la CRT placentaire (5.350 RU, courbe bleue) sont immobilisées sur une sensor chip CM5. La fixation de C1q (500 nM) est mesurée.

	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	k_{a2} (s^{-1})	k_{d2} (s^{-1})	$1/K$ (nM)
CRT placentaire	$3,5 \times 10^4$	$8,5 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-3}$	362
HAT-CRT	$3,6 \times 10^4$	$7,5 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-3}$	346

TAB. 6.3 – Données cinétiques de l'interaction de C1q avec la CRT placentaire ou recombinante immobilisée.

Comme précédemment (cf. section 6.1.2), le modèle à deux états de réaction est le modèle le plus en adéquation, que ce soit avec les sensorgrammes expérimentaux de la CRT placentaire, ou avec ceux de la CRT recombinante (figure 6.7). Les deux groupes de constantes cinétiques et la constante apparente d'affinité, K , calculés par le logiciel BIAeval sont reportés dans le tableau 6.3. D'après ces résultats, la CRT recombinante a des propriétés d'interaction vis-à-vis de C1q similaires à celles de la CRT purifiée à partir de placenta.

Les données de spectroscopie de dichroïsme circulaire et de SPR montrent donc que HAT-CRT est correctement structurée et fonctionnelle quant à ses propriétés d'interaction avec C1q.

6.3 Purification de fragments recombinants de la CRT

6.3.1 Obtention du domaine P de la CRT

Le domaine P de la CRT a été obtenu de façon recombinante.

Clonage du domaine P de la calréticuline

Le vecteur pHFX-CRTdomP codant pour le domaine P de la calréticuline (résidus 189 à 288) a été obtenu par mutagénèse dirigée à partir du vecteur pHFX-CRT. Les parties N- et C-terminales de la CRT sont délétées successivement, comme indiqué dans la partie 2.8.2 du chapitre Matériel et Méthodes. Le clonage induit l'ajout d'une étiquette HAT à l'extrémité N-terminale. La séquence peptidique du fragment et ses caractéristiques générales sont données dans la figure 6.8 et le tableau 6.4, respectivement.

Etiquette HAT domaine P

MGKDHLIHNV HKEEHAHAHN **KGS**IEGR**KKI** KDPDASKPED WDERAKIDDP 50

TDSKPEDWDK PEHIPDDPAK KPEDWDEEMD GEWEPPVIQN PEYKGEWKPR 100

QIDNPDYKGT WIHPEIDNPE YSPDPSI 127

FIG. 6.8 – Séquence peptidique de HAT-domaine P (résidus 189 à 288). Le début du domaine P ainsi que l'étiquette HAT (soulignée) et le site de clivage par le facteur Xa (en gras) sont précisés sur la séquence peptidique.

	HAT-CRT	HAT-domaine P
Résidus de la CRT	1 à 400	189 à 288
Nombre d'acides aminés	427	127
Masse molaire calculée	49.530 kDa	14.884 Da
pI	4,23	4,51
ϵ_{280nm} l.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	81.735	37.470

TAB. 6.4 – Caractéristiques principales des protéines recombinantes. Les masses molaires et les points isoélectriques ont été calculés à l'aide du logiciel d'analyse de séquences protéiques de <http://www.zbio.net/>

Expression du domaine P

Les bactéries BL21(DE3)pLysS ont été transformées à l'aide du plasmide pHFX-CRTdomP. La culture, l'induction de l'expression du domaine P fusionné à l'étiquette HAT (HAT-domaine P), et l'extraction des protéines sont réalisées comme indiqué dans la section 2.2. L'analyse par SDS-PAGE présentée à la figure 6.9 A montre que la production de HAT-domaine P est effective après 3 h 30 en présence d'IPTG 1 mM.

Purification du domaine P

L'étiquette HAT permet de réaliser une première étape de purification par chromatographie d'affinité à l'aide de la résine TALON, comme décrit dans la section 2.3.2 du chapitre Matériel et Méthodes. La purification a été analysée par SDS-PAGE (figure 6.9 B). On peut remarquer ici que la masse molaire apparente lors de la migration est environ de 23 kDa, et est donc très supérieure à la masse molaire théorique de 14.884 kDa (tableau 6.4).

Les fractions contenant HAT-domaine P sont rassemblées et dialysées contre le tampon d'équilibration (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) de la colonne échangeuse d'ions, Mono Q 5/50 GL. L'élution est réalisée par un gradient de NaCl 0 - 500 mM à l'aide du tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5. On détecte sur le chromatogramme présenté figure 6.9 C un pic principal présentant un épaulement. L'analyse des fractions par SDS-PAGE montre que l'épaulement (fraction 4) contient un contaminant important (figure 6.9 D). Le pic principal contient HAT-domaine P quasiment pur. On remarque un contaminant d'environ 20 kDa, mais en quantité relativement faible.

La fraction 3 est analysée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) (figure 6.9 E), qui indique une masse de 14.756 ± 15 Da qui correspond à la masse attendue de HAT-domaine P sans la méthionine initiale (tableau 6.4). On remarque la présence d'une espèce mineure d'environ 14.950 Da. Cette espèce n'a pas été identifiée.

Au final, on obtient environ 40 mg de HAT-domaine P purifié par litre de culture.

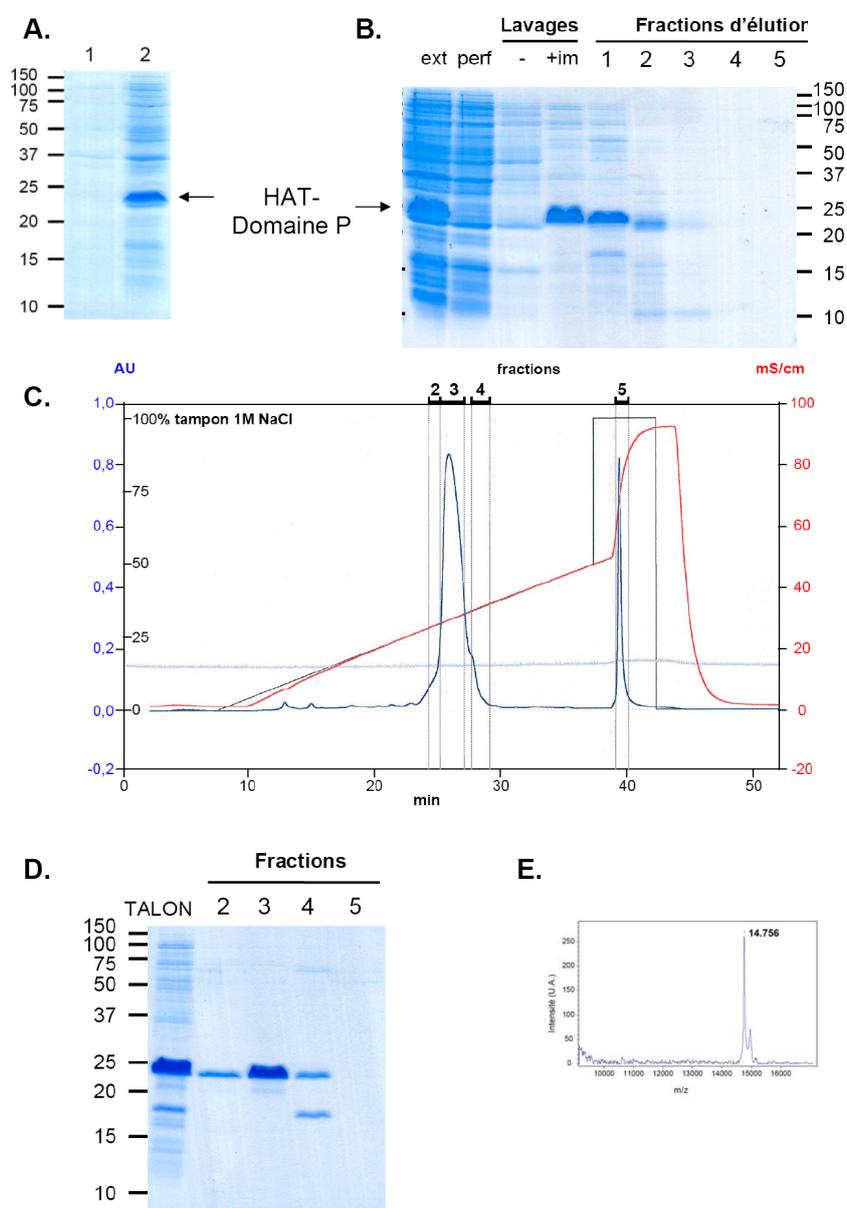


FIG. 6.9 – Production et purification de HAT-domaine P. (A.) Analyse par SDS-PAGE de l'induction de la production de HAT-domaine P. 2 ml de la culture bactérienne sont prélevés avant (piste 1) et à la fin (piste 2) de l'induction pendant 3 h 30 à 37°C par l'IPTG 1mM. Après centrifugation, les culots sont repris dans 200 μ l de SDS 2 % et 3 μ l (piste 1) ou 6 μ l (piste 2) de l'extrait sont analysés (B.) Analyse par SDS-PAGE de la première étape de purification par chromatographie d'affinité sur colonne TALON. 5 μ l d'extrait protéique (ext) et de perfusât (perf), 26 μ l du lavage (-) et 10 μ l du lavage en présence d'imidazole 10 mM (+im) et des fractions d'éluïtion 1 à 5 sont analysés sur gel. (C.) et (D.) Deuxième étape de purification de HAT-domaine P par chromatographie échangeuse d'ions sur colonne Mono Q 5/50 GL. (C.) Chromatogramme de l'éluïtion par un gradient de NaCl de 0 à 500 mM à l'aide du tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 7.5. (D.) Analyse par SDS-PAGE de 10 μ l d'échantillon provenant de la première étape et des fractions d'éluïtions 2 à 5. (E.) Analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) de la fraction 3 de la chromatographie échangeuse d'ions. L'ensemble des analyses SDS-PAGE a été réalisé sur gel d'acrylamide 14 % ; les témoins de masse molaire (kDa) sont indiqués.

6.3.2 Production du domaine globulaire de la CRT

La production du domaine globulaire N/C de la CRT peut être envisagée sous deux approches :

- soit par une approche recombinante en fusionnant le domaine N-terminal (résidus 1 à 188) au domaine C-terminal (résidus 289 à 400) en les reliant à l'aide d'une séquence de quelques acides aminés [Tan et al., 2006],
- soit par protéolyse ménagée de la CRT entière.

L'approche recombinante entraînant l'insertion non physiologique d'une séquence peptidique entre la région N- et la région C-terminale, nous avons, dans un premier temps, privilégié l'approche par protéolyse ménagée. Cette approche devrait nous permettre de définir des domaines résistant à la protéolyse, comme cela doit normalement être observé dans le cas d'un domaine globulaire. Une fois ce travail effectué, nous envisageons de revenir à une approche recombinante afin de produire plus efficacement les régions d'intérêt.

Protéolyse ménagée de la CRT

La calréticuline est digérée par une gamme d'enzymes protéolytiques de spécificités différentes : chymase, kallibréine, papaïne, plasmine, thermolysine, thrombine. La protéolyse est analysée par SDS-PAGE (figure 6.10).

Parmi les différentes conditions étudiées, les digestions par la kallibréine, la papaïne, la plasmine et la thermolysine produisent entre autres un fragment de masse molaire apparente d'environ 40 kDa. Etant donné sa résistance à la protéolyse ménagée, ce fragment pourrait correspondre au domaine globulaire de la CRT.

La digestion par la plasmine donne le meilleur profil de digestion. Il a donc été choisi pour la suite d'optimiser les conditions de coupure par la plasmine pour la production de ce domaine.

Digestion de la CRT par la plasmine

HAT-CRT est digéré pendant 3 h par la plasmine en présence ou non de CaCl_2 2 mM. La coupure est analysée par SDS-PAGE. D'après la figure 6.11, HAT-CRT est digéré en un seul fragment de masse molaire apparente d'environ 40 kDa. Ce fragment étant stabilisé en présence de calcium, les expériences suivantes ont été réalisées en présence de CaCl_2 2 mM.

CRT-HAT est incubé en présence de deux concentrations de plasmine pendant 3 h à 37°C. La cinétique est analysée par SDS-PAGE. D'après la

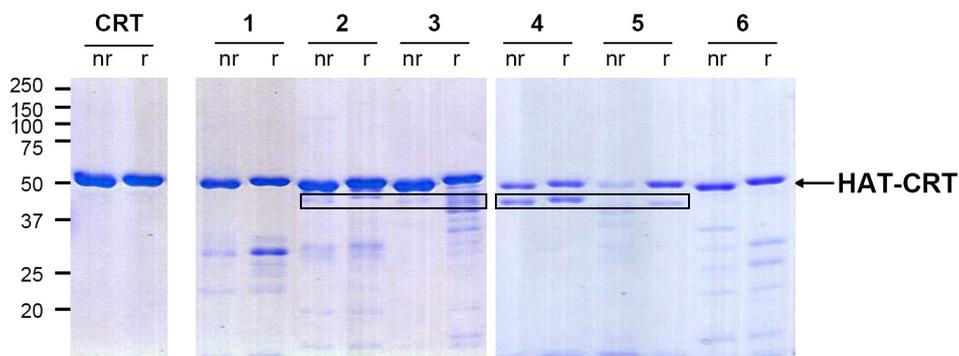


FIG. 6.10 – Analyse par SDS-PAGE de la protéolyse ménagée de la CRT. HAT-CRT a été soit non traitée (CRT), soit digérée à 37°C par la chymase 1 : 40 pendant 2 h (1), la kallibréine 1 : 10 pendant 2 h (2), la papaïne 1 : 10 pendant 3 h (3), la plasmine 1 : 20 pendant 1 h 30 (4), la thermolysine 1 : 40 pendant 1 h (5), la thrombine 0,4 U/ μ l/ml pendant 3 h (6), avec les rapports enzyme : substrat indiqués (p/p). 5 μ l de chaque réaction sont analysés sur gel d'acrylamide 10 % en conditions réduites (r) ou non (nr) ; les témoins de masse molaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure. Une bande de masse molaire proche est obtenue dans plusieurs conditions (encadrés noirs).

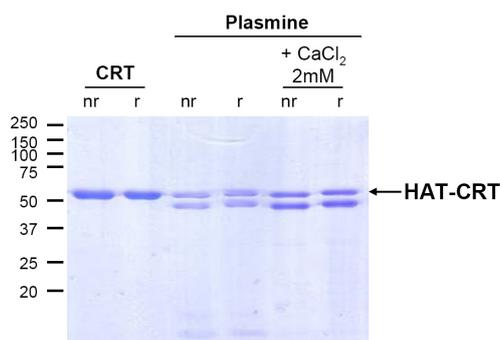


FIG. 6.11 – Effet du calcium sur la protéolyse de HAT-CRT par la plasmine. HAT-CRT a été soit non traitée (CRT), soit digérée à 37°C par la plasmine 1 : 20 pendant 3 h à 37°C, en présence ou en absence de CaCl₂ 2 mM. 5 μ l de chaque réaction sont analysés sur gel d'acrylamide 10 % en conditions réduites (r) ou non (nr) ; les témoins de masse molaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure.

figure 6.12, quelque soit la concentration de plasmine, HAT-CRT est digéré en un seul fragment de masse molaire apparente de 40 kDa. De façon surprenante, le séquençage N-terminal des deux fragments donne le même résultat : S I E G R. Ce résultat est reporté sur la séquence totale de HAT-CRT (figure 6.13). Le fragment de masse molaire apparente de 55 kDa ne correspond donc pas à HAT-CRT entier mais à un fragment dont l'étiquette HAT a été clivée.

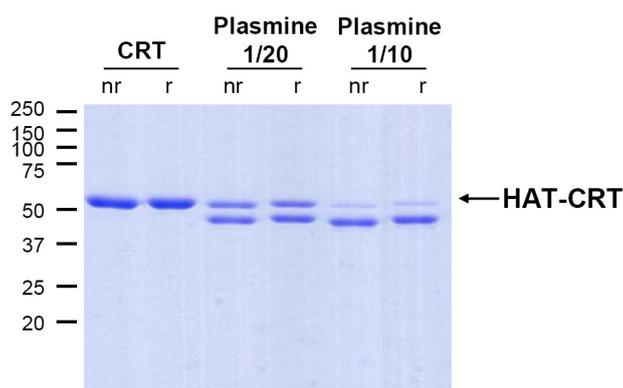


FIG. 6.12 – Analyse par SDS-PAGE de la cinétique de protéolyse de HAT-CRT par la plasmine 1 : 10 (panneau de gauche) ou 1 : 20 (panneau de droite) pendant 30, 60, 90, 120 ou 240 minutes. 10 μ l de chaque réaction sont analysés sur gel d'acrylamide 10 %; les témoins de masse molaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure. Les fragments a, b, c et d ont été séquencés.

L'analyse du mélange réactionnel par spectrométrie de masse indique la présence de deux fragments de 46.942 ± 47 et 41.943 ± 42 Da. A l'aide de ce résultat et du séquençage N-terminal des fragments, on a pu déterminer les séquences correspondantes des deux fragments (Tableau 6.5 et figure 6.13). Le fragment de 42 kDa obtenu contient donc toujours les domaines N, P et C. Seule la partie fortement chargée du domaine C a été digérée.

Au moment d'écrire ce chapitre, nous n'avons pas encore pu définir des conditions nous permettant d'obtenir le domaine globulaire de la CRT. Nous n'avons donc pas pu tester l'interaction de C1q avec le domaine globulaire de la CRT.

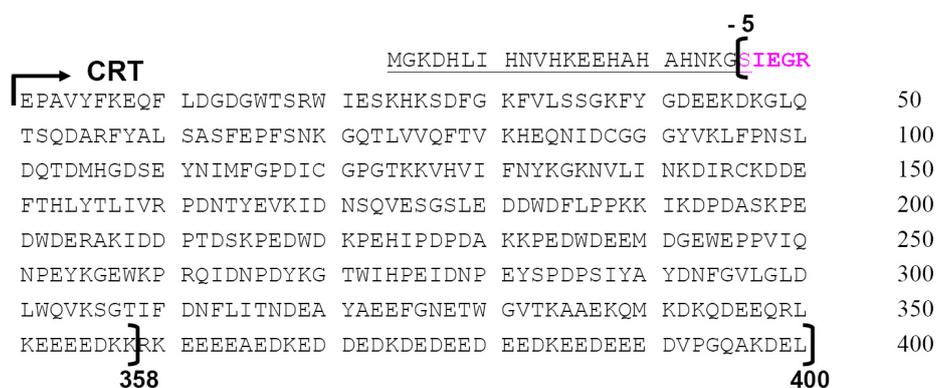


FIG. 6.13 – Localisation des séquences N-terminales des fragments issus de la digestion par la plasmine de HAT-CRT sur sa séquence peptidique. Le début de la CRT, l'étiquette HAT (soulignée) et le site de clivage par le facteur Xa (en gras) sont précisés sur la séquence. La numérotation commence après le site de clivage, au début de la séquence de la CRT native. La séquence N-terminale des deux fragments est indiquée en rose.

Masse molaire (Da) déterminée par SM	Fragment de HAT-CRT (nombre de résidus)	Masse molaire calculée (Da)
46.942 ± 47	- 5 à 400 (405)	47.008
41.943 ± 42	- 5 à 358 (363)	41.985

TAB. 6.5 – Masses molaires des deux fragments issus de la digestion de HAT-CRT par la plasmine. Les masses molaires ont été soit déterminées par spectrométrie de masse, soit calculées à l'aide du logiciel d'analyse de séquences protéiques de <http://www.zbio.net/>

6.4 Etude de l'expression de la CRT à la surface cellulaire

La deuxième approche que nous nous étions proposée pour déterminer si la CRT est une cible de C1q était la recherche de cette interaction à la surface des cellules apoptotiques. Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression de la CRT à la surface cellulaire. Les cellules HeLa viables et apoptotiques, 4 h après irradiation, ont été marquées à l'aide d'anticorps dirigés contre la CRT. Le marquage a été observé par microscopie confocale.

On remarque que la CRT est présente à la surface des cellules HeLa viables (figure 6.14 A), en accord avec ce qui a été décrit par Gardai et collaborateurs pour les cellules Jurkat [Gardai et al., 2005]. La calréticuline semble distribuée en îlots (« patches ») membranaires. Après induction de l'apoptose, on observe une forte augmentation de l'expression de CRT à la surface cellulaire (figure 6.14 B). Il semble de plus que la CRT soit redistribuée à la surface des cellules et qu'elle se concentre au niveau de certaines zones (figure 6.14 B, flèches).

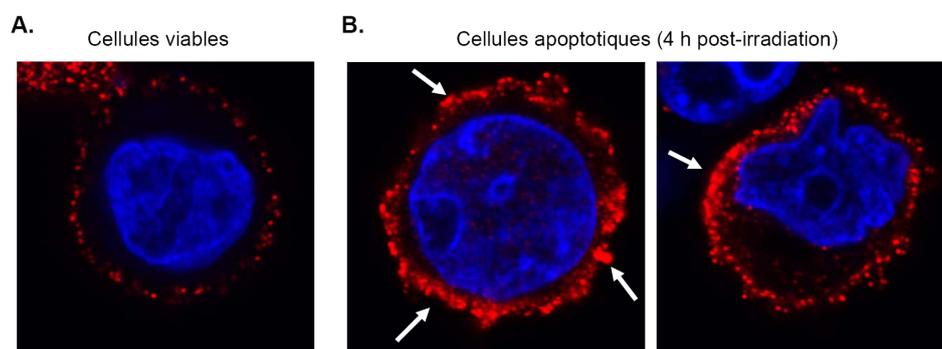


FIG. 6.14 – Etude par microscopie confocale de la localisation de la CRT à la surface cellulaire. Les cellules sont marquées par immunofluorescence à l'aide d'anticorps dirigés contre la CRT comme cela a été décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. Les noyaux sont colorés avec du Hoechst (bleu). (A.) Cellules HeLa viables. (B.) Cellules apoptotiques, 4 h après irradiation. Aucun marquage n'est observé avec les contrôles isotypiques. Les flèches blanches indiquent les zones où les îlots de CRT sont concentrés.

Afin de tester si l'interaction entre CRT et C1q est pertinente à la surface cellulaire, des études de co-marquage à l'aide de GR et d'anticorps dirigés contre la CRT ont été entreprises. Le marquage a été analysé par microscopie confocale et des résultats préliminaires sont présentés dans la figure 6.15.

A la surface des cellules viables, les GR se fixent dans des îlots membranaires disjoints de ceux contenant la CRT (figure 6.15 A). 4 h après induction

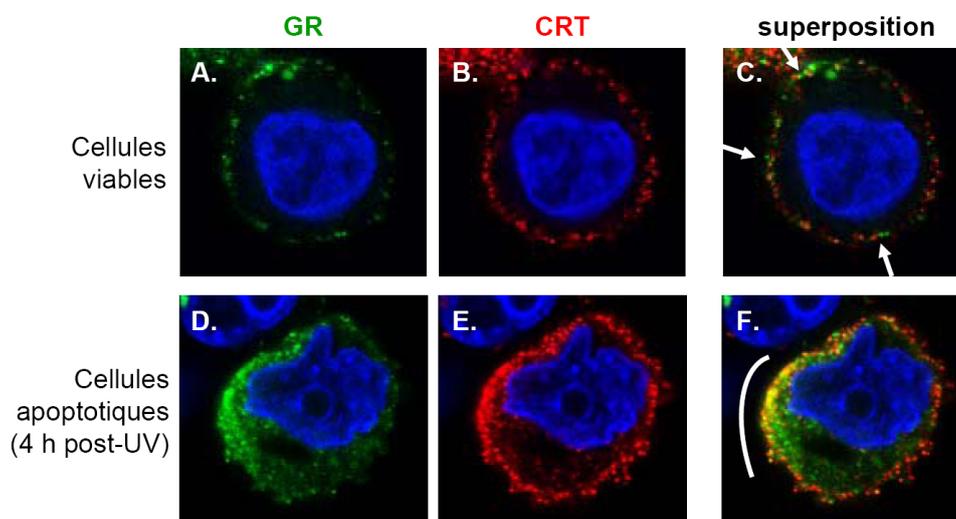


FIG. 6.15 – Etude par microscopie confocale de la localisation des GR et de la CRT à la surface cellulaire. Après récolte, les cellules viables (A-C) et apoptotiques 4 h après irradiation (D-F) sont co-marquées par immunofluorescence pour la fixation des GR (vert) et de la CRT (rouge), comme cela a été décrit dans le Matériel et Méthodes. Les noyaux sont colorés au Hoechst (bleu). Les flèches indiquent des îlots membranaires de CRT et de GR dissociés. L'arc de cercle indique une zone où les îlots de CRT et de GR sont co-localisés. Dans les expériences contrôles, aucun marquage n'est observé avec les anticorps primaire et secondaire sans pré-incubation avec GR.

de l'apoptose, les GR et la CRT sont situés dans de grandes zones où elles co-localisent (figure 6.15 B). Au cours de l'apoptose, il semble qu'il ait lieu une redistribution de la CRT et des sites de fixation des GR dans des régions membranaires semblables.

Ces expériences préliminaires doivent être poursuivies pour confirmer ce résultat.

6.5 Discussion

6.5.1 La CRT pourrait être impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q

La CRT est un marqueur de l'apoptose, aussi bien chez les mammifères que chez la Drosophile [Gardai et al., 2005, Kuraishi et al., 2007]. Au cours de l'apoptose, la CRT naturellement présente à la surface cellulaire est redistribuée sous forme d'agrégats, ce que nous avons confirmé dans notre modèle cellulaire (figure 6.14).

Gardai et collaborateurs ont proposé que CD91/LRP à la surface des macrophages était le récepteur de la CRT de la cellule apoptotique, responsable de la phagocytose de ces cellules [Gardai et al., 2005].

Cependant, C1q est connu pour jouer un rôle prépondérant dans l'élimination des cellules en cours d'apoptose, grâce à sa capacité de s'adsorber *via* ses GR à la surface des cellules apoptotiques [Navratil et al., 2001]. Les cellules ainsi opsonisées sont éliminées par les phagocytes [Botto et al., 1998].

Les résultats présentés ici montrent pour la première fois que C1q, ses GR et ses CLF ont la capacité de se fixer à la CRT immobilisée. Cette interaction entre C1q et CRT implique probablement un changement de conformation de la CRT. La configuration utilisée pour caractériser cette interaction reproduit les conditions où la CRT exposée à la surface cellulaire au cours de l'apoptose est présentée au C1q circulant.

En outre, nos résultats préliminaires de co-marquage montrent que CRT et GR sont co-localisées à la surface des cellules apoptotiques. Ainsi la CRT pourrait être un des ligands de C1q à la surface des cellules apoptotiques et permettrait ainsi leur reconnaissance.

Il est maintenant envisagé de caractériser l'implication de cette interaction au niveau cellulaire.

6.5.2 Etudes structurales de la CRT

A ce jour, la structure tridimensionnelle de la CRT entière n'a pas été déterminée. Des études par spectroscopie RMN ont permis de résoudre la structure tri-dimensionnelle du domaine P de la CRT qui est replié en épingle à cheveux [Ellgaard et al., 2001, Ellgaard et al., 2002]. L'apparente flexibilité du domaine P explique peut-être en partie les échecs de cristallisation de la protéine entière.

La production du domaine globulaire de la CRT mise au point dans ce chapitre permet d'envisager l'obtention de la structure cristallographique de ce domaine. L'obtention d'un modèle structural de la protéine permettrait une meilleure compréhension des fonctions qu'elle exerce.

Chapitre 7

Implication de l'activité lectine de C1q ¹

La modification des glycosylations à la surface cellulaire est un des facteurs impliqué dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes [Sarter et al., 2007]. Une étude montre par exemple que la reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes implique une interaction de type lectine [Morris et al., 1984]. Des travaux plus récents [Azuma et al., 2002, Rapoport et al., 2003, Dias-Baruffi et al., 2003] démontrent que des altérations du profil de glycosylation à la surface des cellules apoptotiques jouent un rôle important dans la phagocytose de ces cellules.

Par ailleurs, il a été rapporté que des polysaccharides synthétiques peuvent induire la fixation de C1q ainsi que l'activation du complexe C1 [Schultz and Arnold, 1981]. D'autres études plus récentes montrent que C1q a la capacité de se fixer à la THP (« Tamm-Horsfall protein »), une glycoprotéine urinaire, et que cette fixation est réduite après le retrait des glycoconjugués de cette protéine par des glycosydases [Rhodes, 2002, Rhodes, 2006]. L'ensemble de ces études suggère fortement que C1q possède une activité de type lectine. Cette hypothèse est corroborée par des études phylogénétiques qui démontrent que l'orthologue de C1q chez la lamproie, le vertébré le plus primitif, est une lectine se fixant à la N-acétyl-glucosamine, et que cette lectine est impliquée dans l'immunité innée [Matsushita et al., 2004].

Notre objectif a donc été d'étudier l'activité lectine de C1q et son implication dans sa capacité à reconnaître les cellules apoptotiques.

¹Ce chapitre a fait l'objet d'un article en révision à FEBS letters : Païdassi H, Tacnet-Delorme P, Arlaud GJ, Thielens N, Frchet P. « The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition »

7.1 Etude de la capacité de C1q à reconnaître les sucres

Les résultats présentés dans cette première partie ont été obtenus par Nicole Thielens, au laboratoire. Ces résultats n'ayant été que partiellement publiés, et afin de justifier la démarche suivie, ils sont ici brièvement explicités.

7.1.1 Analyse de l'interaction C1q-glycoconjugués par SPR

La capacité de C1q à reconnaître les sucres a été étudiée par Nicole Thielens au laboratoire par SPR [Gaboriaud et al., 2007]. Ces résultats, présentés dans la figure 7.1 A montrent que C1q se fixe au galactose (Gal), à la N-acétyl-galactosamine (Gal-NAc) et à la N-acétyl-glucosamine (Glc-NAc) conjugués à la BSA et ce avec une haute affinité (tableau 7.1). Les régions globulaires (GR) de C1q fixent également ces glycoconjugués, mais avec une affinité plus faible (figure 7.1 B et tableau 7.1). Les GR isolées sont donc moins efficaces que C1q entier pour la reconnaissance des sucres. Cet effet d'avidité suggère que l'interaction de C1q avec les sucres implique l'engagement simultané de plusieurs régions globulaires. L'interaction sucres-C1q est également observée dans la configuration inverse, c'est-à-dire en injectant des glycoconjugués solubles sur C1q immobilisé (résultats non présentés).

Ces résultats démontrent que C1q a la capacité de reconnaître certains sucres neutres avec une haute affinité, et pour la première fois, que cette interaction se fait par l'intermédiaire des régions globulaires.

7.1.2 Des hexoses et des pentoses inhibent l'interaction C1q-glycoconjugués

La fixation de C1q sur les glycoconjugués immobilisés GlcNAc-BSA et Gal-BSA a pu être partiellement inhibée par des hexoses (GlcNAc, D-Gal, D-fucose et maltose) et des pentoses (L-ribose, L-arabinose et D-ribose) avec un taux d'inhibition compris entre 35 à 50% d'inhibition à une concentration de 100 mM (figure 7.2). Le désoxy-D-ribose est le compétiteur le plus efficace et induit 80% d'inhibition dans ces conditions.

Ces observations sont particulièrement intéressantes car le désoxy-D-ribose est l'un des trois constituants de base des nucléotides dont la séquence compose l'acide désoxyribonucléique.

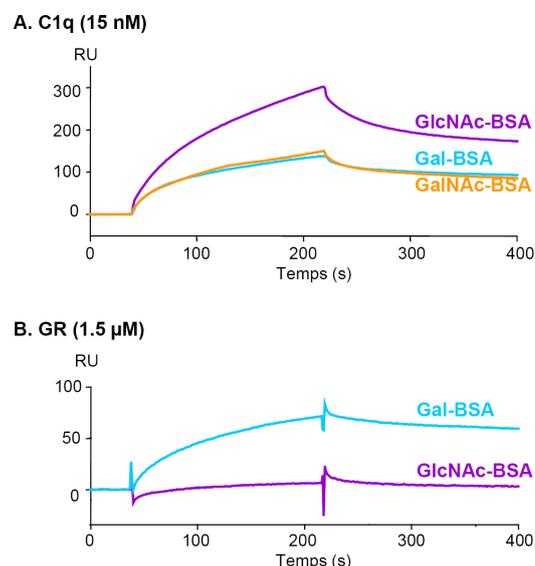


FIG. 7.1 – Analyse de l'interaction entre C1q et les sucres par SPR. Les glycoconjugués sont immobilisés sur une sensor chip CM5. La fixation de C1q (A.) et de son domaine globulaire (B.) est mesurée sur une surface où ont été immobilisés 5700 à 6500 RU de glycoconjugués.

Analyte	Ligand immobilisé	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)	R_{max} (RU)
C1q	GlcNAc-BSA	$4,7 \times 10^5$	$2,8 \times 10^{-3}$	5,9	525
	Gal-BSA	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^{-3}$	1,0	145
	GalNAc-BSA	$6,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^{-3}$	2,6	200
Région globulaire de C1q	GlcNAc-BSA	$6,2 \times 10^3$	$5,1 \times 10^{-3}$	822	25
	Gal-BSA	$1,8 \times 10^4$	$9,1 \times 10^{-4}$	51	145
	GalNAc-BSA	-	-	-	-

TAB. 7.1 – Constantes cinétiques de la fixation de C1q et de sa région globulaire sur les glycoconjugués immobilisés. La fixation de C1q (2-20 nM) et de ses GR (0,3-2,4 μM) sur les glycoconjugués a été mesurée dans les conditions décrites dans la figure 7.1. Les constantes d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) et la capacité maximale de fixation (R_{max}) ont été déterminées par ajustement global des données au modèle de fixation Langmuir 1 : 1 ($A+B \leftrightarrow AB$, BIAevaluation 3.1). Les constantes de dissociations K_D ont été déterminées par le rapport k_{off}/k_{on} .

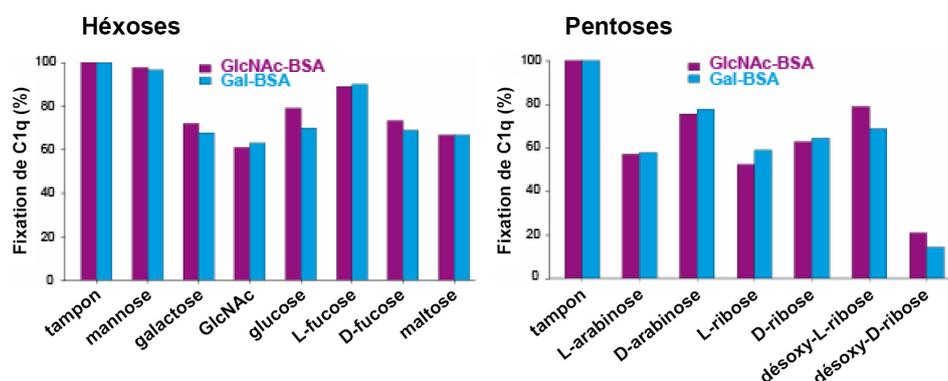


FIG. 7.2 – Analyse par SPR de la compétition des hexoses (panneau de gauche) et des pentoses (panneau de droite) pour l'interaction C1q-glycoconjugués.

7.2 Etude de l'interaction entre GR et ADN

Il a été montré récemment par Elward et collaborateurs que 4 h après induction de l'apoptose par traitement à la camptothécine, les cellules Jurkat apoptotiques présentent à leur surface des acides nucléiques [Elward et al., 2005].

Des expériences de co-précipitation C1q-ADN et des tests en phase solide utilisant C1q immobilisé ont montré que cette interaction implique soit les fragments de type collagène (CLF) [Rosenberg et al., 1988, Tissot et al., 2003], soit les régions globulaires (GR) [Schravendijk and Dwek, 1982] soit les deux [Jiang et al., 1992, Uwatoko and Mannik, 1990]. C1q a donc la capacité de fixer l'ADN, mais la région précise de la protéine impliquée dans cette interaction est sujette à controverse. Afin d'étudier le rôle de l'ADN dans la reconnaissance des cellules apoptotiques, nous avons dans un premier temps cherché à savoir si cette interaction C1q-ADN se faisait *via* les GR.

De l'ADN plasmidique linéarisé a été incubé avec C1q ou ses GR. Les complexes ont ensuite été analysés sur gel d'agarose comme cela a été décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. Comme le montre la figure 7.3 (panneau de gauche), C1q retarde la migration de l'ADN dans le gel d'électrophorèse, à une concentration de 32 nM. Pour une même concentration, les GR ne modifient pas le profil de migration (résultat non présenté).

Toutefois, à une concentration de 6,5 μM , soit 200 fois supérieure à celle utilisée pour C1q, les GR entraînent un retard total de la migration d'une

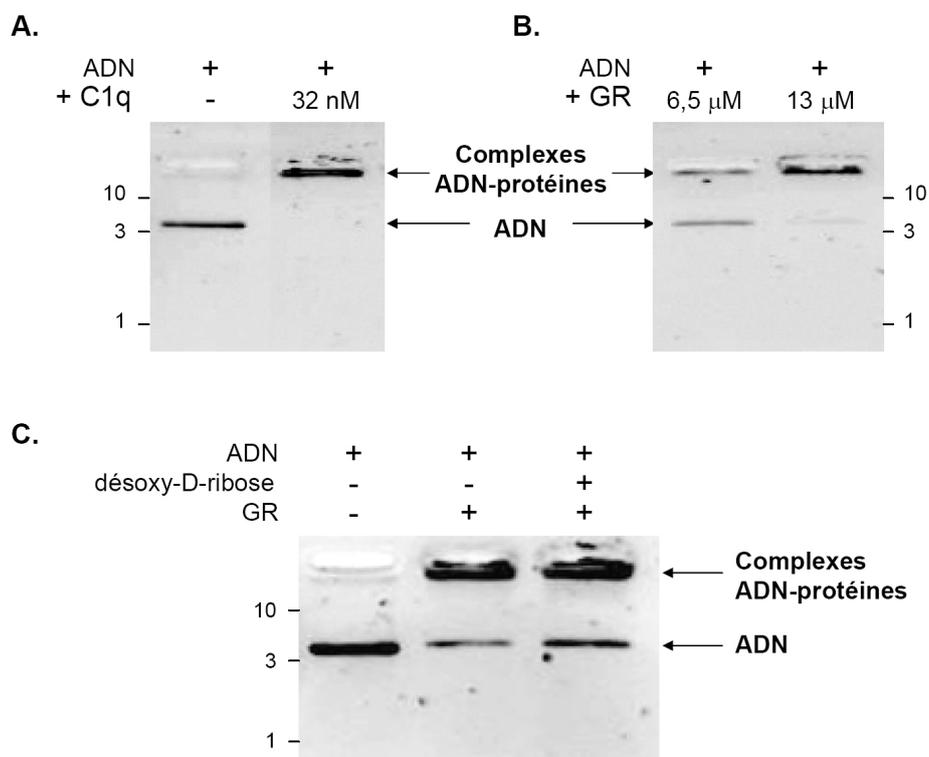


FIG. 7.3 – Analyse par gel retard de la fixation de C1q à l'ADN. Le plasmide pBlueScript linéarisé est incubé seul, en présence de C1q 32 nM (A.) ou de GR 6,5 et 13 μ M (B.), comme décrit dans le Matériel et Méthodes. L'interaction est analysée sur gel d'agarose 1%. La fixation des GR à l'ADN est également analysée en présence de désoxy-D-ribose 100 mM (C.).

fraction seulement de l'ADN. Le retard est quasi-total à une concentration de GR de 13 μ M (figure 7.3 panneau de droite).

Ces résultats montrent que C1q peut fixer l'ADN *via* ses GR. Le rapport de concentration C1q : GR de 1 : 400 nécessaire pour induire un même retard de migration de l'ADN illustre encore une fois la perte d'avidité des GR par rapport à C1q entier.

Pour tester la pertinence de ce résultat, nous avons évalué la capacité du désoxy-D-ribose soluble à inhiber la formation du complexe ADN-GR. Comme le montre la diminution du retard observé dans la figure 7.3 C, la présence de 100 mM de désoxy-D-ribose inhibe partiellement la formation du complexe ADN-GR.

7.3 Analyse par SPR de l'implication de l'ADN dans la capture des cellules apoptotiques par C1q

Comme nous l'avons montré, C1q interagit avec l'ADN par le biais de ses GR. L'ADN, exposé à la surface des cellules apoptotiques est donc une cible potentielle de C1q grâce à son activité de type lectine.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé le test Biacore développé dans le chapitre 4. Ce test permet de suivre, en temps réel, l'effet d'un traitement des cellules sur leur capture par C1q.

Les cellules HeLa viables (non irradiées) ou apoptotiques (2 h après irradiation) ont été incubées en présence de DNase avant d'être injectées sur la surface où C1q a été préalablement immobilisé.

Comme cela a été observé précédemment (*cf.* chapitre 3), les cellules viables se fixent faiblement mais significativement sur C1q immobilisé (figure 7.4 A, courbe grise). Toujours en accord avec le chapitre 3, la capture par C1q des cellules apoptotiques 2 h après irradiation (figure 7.4 B, courbe bleue) augmente et est environ deux fois plus importante que celle des cellules viables (figure 7.4 A, courbe grise).

Le traitement à la DNase n'a pas d'effet significatif sur la capture des cellules viables par C1q (figure 7.4 A). A l'inverse, pour les cellules apoptotiques, le traitement à la DNase induit une diminution importante de leur capture par C1q (figure 7.4 B).

Des doses croissantes de DNase ont ensuite été utilisées (figure 7.4 C). Dans le cas des cellules viables, quelle que soit la dose, le traitement n'a pas d'effet significatif. A l'inverse, l'utilisation de doses croissantes de DNase entraîne une inhibition croissante de la capture des cellules apoptotiques, avec plus de 40% d'inhibition à une concentration en DNase de 400 Kunitz/ml.

Ainsi, tandis que le traitement à la DNase inhibe de façon dose-dépendante la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q, il n'a pas d'effet significatif sur la capture des cellules viables.

L'ADN, et plus particulièrement le désoxy-D-ribose est donc une cible directe de l'activité lectine de C1q à la surface des cellules apoptotiques. Ces résultats précisent l'implication des acides nucléiques dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q.

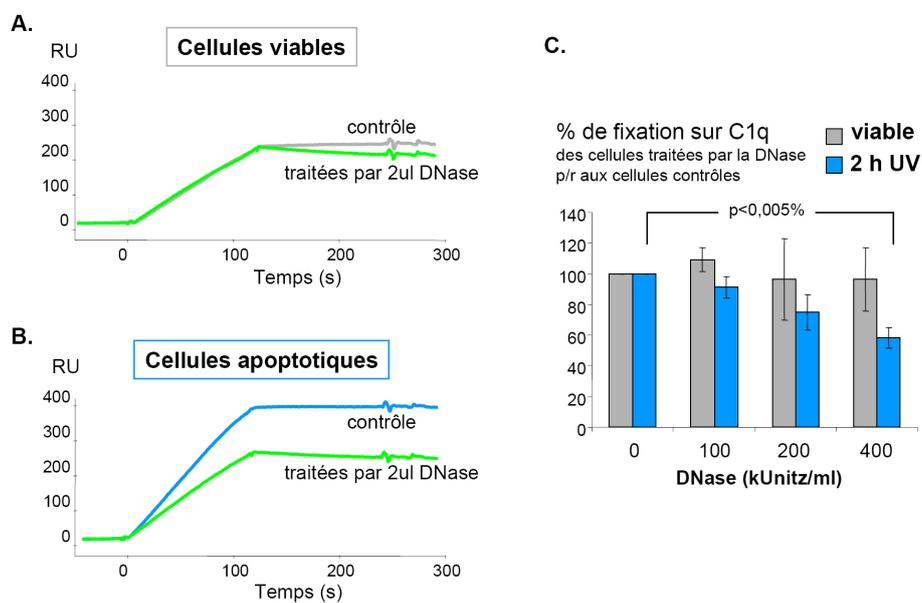


FIG. 7.4 – Inhibition par traitement à la DNase de la capture des cellules apoptotiques par C1q. Les cellules HeLa viables (A.) ou apoptotiques (B.) sont incubées en présence de tampon (courbes grise et bleue respectivement) ou de doses croissantes de DNase (courbes vertes) puis injectées sur C1q immobilisé sur une sensor chip CM5. Les résultats sont exprimés par rapport à la capture des cellules en absence de DNase (C.).

7.4 Variation du profil de glycosylation à la surface cellulaire au cours de l'apoptose

Dans la section 7.1, nous avons mis en évidence que C1q avait la capacité de reconnaître certains sucres neutres comme le galactose et la N-acétyl-glucosamine.

Des études récentes effectuées sur différentes lignées cellulaires montrent que le profil de glycosylation de la surface cellulaire change au cours de l'apoptose : perte des acides sialiques, augmentation de la N-acétyl-glucosamine, du mannose, du fucose, du galactose [Azuma et al., 2000, Bilyy and Stoika, 2003, Batisse et al., 2004, Franz et al., 2006].

C1q pourrait donc détecter grâce à son activité de type lectine les modifications de ce profil de glycosylation. En vue de vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps analysé les modifications de l'exposition des sucres au cours de l'apoptose dans notre modèle cellulaire.

7.4.1 Analyse par cytométrie en flux

Les cellules HeLa viables ou apoptotiques (3 h après irradiation) ont été marquées à l'aide de lectines biotinylées, dont les spécificités sont rappelées dans le tableau 7.2, et de streptavidine couplée à la R-phycoérythrine (streptavidine-PE).

L'analyse par cytométrie en flux montre que les lectines biotinylées se fixent aussi bien sur les cellules viables que sur les cellules apoptotiques. Ce résultat est confirmé par l'analyse du marquage par microscopie confocale (figure 7.5).

Par cytométrie en flux, aucune modification significative de la fixation des lectines PHA-E, PSL, MAA ou PA-I n'est observée après induction de l'apoptose (figure 7.6). Par contre, l'irradiation induit une augmentation d'un facteur 1,2 de l'intensité moyenne de fluorescence due à la fixation de la lectine WGA à la surface des cellules HeLa, 3 h après le traitement. Ce résultat indique une augmentation du taux de N-acétyl-glucosamine à la surface cellulaire rapidement après induction de l'apoptose.

7.4.2 Analyse par électrophorèse sur gel

Par ailleurs, nous avons également suivi le profil de glycosylation sur gel. Des lysats membranaires ont été préparés à partir de cellules HeLa viables non irradiées et apoptotiques, 2 h, 4 h et 6 h après irradiation. Les protéines glycosylées ont été séparées par SDS-PAGE et révélées après électrotransfert

Lectine	Abréviation	Spécificité
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHA-E	oligosaccharide
<i>Pisum sativum</i>	PSL	α -mannose
<i>Maackia amurensis</i>	MAA	acide sialique
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	N-acétyl-glucosamine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA-I	galactose

TAB. 7.2 – Tableau de spécificité des lectines utilisées

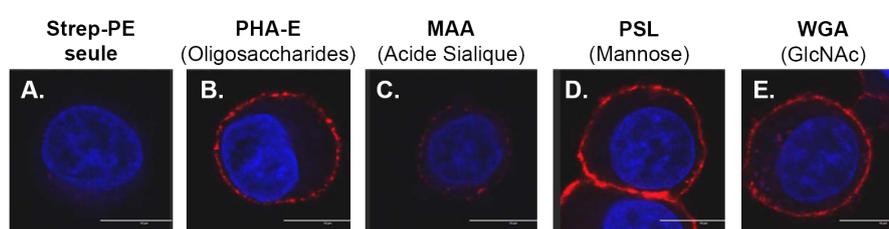


FIG. 7.5 – Observation par microscopie confocale des sites reconnus par les lectines. Les cellules HeLa viables sont incubées en absence (A.) ou en présence des lectines biotinylées PHA-E, MAA, PSL et WGA. Le marquage est révélé à l'aide de streptavidine-PE (rouge). Les noyaux sont colorés avec du Hoechst (bleu). Les barres d'échelle représentent $10\ \mu\text{m}$. Dans l'expérience contrôle avec la streptavidine-PE seule, aucun marquage n'est observé.

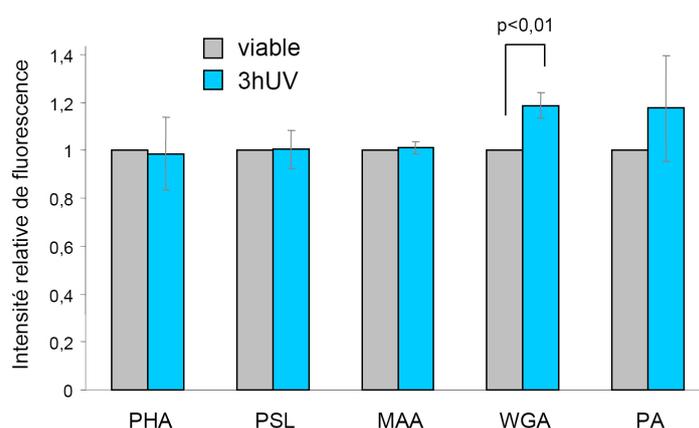


FIG. 7.6 – Modification du profil de glycosylation après irradiation des cellules HeLa, 3 h après irradiation. La fixation des lectines biotinylées est estimée en intensité relative de fluorescence par rapport à celle obtenue avec les cellules viables. Les données sont le résultat d'au moins 3 expériences.

à l'aide des lectines biotinylées. A titre de comparaison, une série d'échantillons a été analysée à l'aide de GR biotinylées.

L'ensemble des lectines utilisées interagit avec des glycoprotéines présentes dans les extraits membranaires (figure 7.7). L'intensité d'un grand nombre de bandes fluctue en fonction de l'état apoptotique des cellules.

On remarque également la similarité des profils obtenus avec les GR (figure 7.7 A) et la lectine PHA-E (figure 7.7 B). La lectine PHA-E n'est pas spécifique d'un sucre particulier et permet de marquer les oligosaccharides d'une façon générale. Cette première observation permet de renforcer l'hypothèse selon laquelle C1q possède une activité de type lectine portée par ses GR.

Par ailleurs, cette analyse permet de mettre en évidence une protéine de masse molaire apparente 33 kDa. Cette bande est détectée, non seulement avec les GR et PHA-E, mais également à l'aide de la lectine PA-I qui est spécifique du galactose (figure 7.7 C). Elle peut même être détectée faiblement avec la lectine PSL, spécifique du mannose (figure 7.7 D). Dans tous les cas, il semble que l'intensité de cette protéine augmente au cours de l'apoptose.

Le suivi de la N-acétyl-glucosamine à l'aide de l'agglutinine WGA ne permet pas de révéler des modifications de son profil au cours de l'apoptose (figure 7.7 E). Les observations faites précédemment par cytométrie en flux (figure 7.6) ne sont donc pas corroborées par cette méthode d'analyse.

Enfin, pour les acides sialiques, deux groupes de protéines sont observés (figure 7.7 F). Pour le premier, comprenant des protéines ayant des masses molaires comprises entre 100 et 150 kDa, l'intensité du marquage semble diminuer au cours de l'apoptose. Ce résultat est en accord avec les observations rapportées par Azuma, Batisse et leurs collaborateurs qui ont montré par cytochimie que les acides sialiques diminuent à la surface cellulaire [Azuma et al., 2000, Batisse et al., 2004]. Cependant, on remarque également l'augmentation de l'intensité d'une protéine de masse molaire apparente d'environ 40 kDa marquée à l'aide de la lectine MAA.

L'analyse de l'ensemble de ces résultats ne permet pas de montrer de modification générale du profil de glycosylation des protéines membranaires. Cependant, on observe des modifications individuelles de certaines bandes, dont l'intensité varie au cours de l'apoptose. A ce stade de nos observations, il est par contre impossible de conclure si cette variation est due à la modification de l'expression de ces protéines ou à celle de leur profil de glycosylation.

Ainsi, contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature, dans notre modèle, le profil global de glycosylation à la surface cellulaire ne semble pas changer de façon significative au cours de l'apoptose.

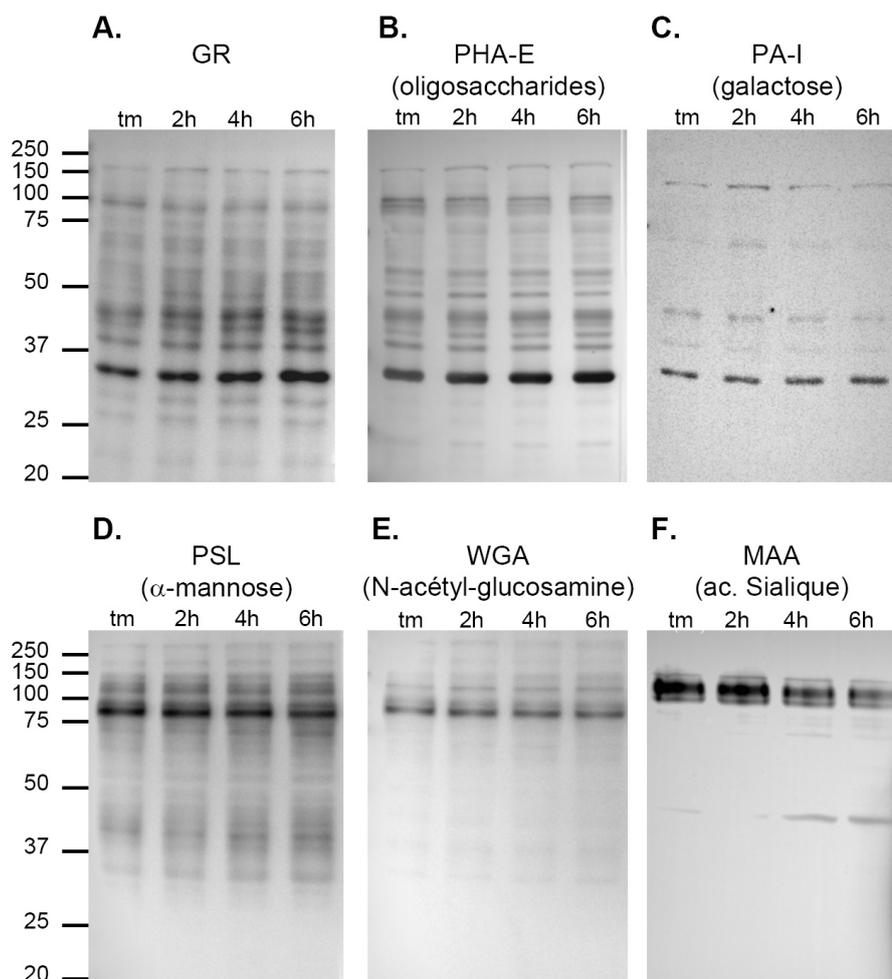


FIG. 7.7 – Analyse du profil de glycosylation des protéines membranaires. Les protéines de lysats membranaires de cellules HeLa viables témoins (tm) ou apoptotiques 2 h, 4 h et 6 h après irradiation sont séparées sur gel d'acrylamide 10% et révélées à l'aide de protéines biotinylées ; les témoins de masse molaire (kDa) sont indiqués à gauche de la figure.

7.5 Discussion

Nous avons démontré que C1q a une activité de type lectine portée par les GR, lui permettant de se fixer aux sucres neutres et en particulier au désoxy-D-ribose, qui est l'un des constituants de l'ADN. Nous avons également montré qu'un traitement préalable des cellules apoptotiques à la DNase permet d'inhiber leur capture par C1q immobilisé. L'interaction entre le désoxy-D-ribose et les GR est donc mise en jeu dans la fixation de C1q à l'ADN exposé à la surface cellulaire au cours de l'apoptose.

Cependant, l'ADN n'est probablement pas le seul ligand pour lequel l'activité lectine de C1q est impliquée. Même si nous n'avons pas montré de modification significative du profil général de glycosylation dans notre modèle à la surface cellulaire, il semble que le marquage des oligosaccharides par PHA-E présente un profil similaire à celui obtenu après marquage à l'aide des GR. Les GR se comporteraient donc comme une lectine. Les motifs précis reconnus par C1q restent cependant à déterminer.

Par ailleurs, l'analyse des profils de glycosylation obtenus à l'aide de différentes lectines a permis d'identifier une protéine de masse molaire apparente 33 kDa dont l'intensité augmente au cours de l'apoptose, qui est également révélée à l'aide des GR. Cette protéine pourrait constituer un nouveau signal de reconnaissance des cellules apoptotiques.

Etant donné sa masse molaire apparente de 33 kDa, il a tout d'abord été supposé que cette protéine, capable d'interagir avec les GR, était le récepteur p33. L'analyse par électrotransfert et révélation à l'aide d'anticorps anti-p33 et le séquençage de cette bande a permis de rejeter cette hypothèse et d'identifier la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ou GAPDH. Des études sont actuellement en cours au laboratoire pour étudier son rôle présumé dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q.

Il faudrait tout d'abord spécifier quelle composante, protéique ou glucidique, de la GAPDH est reconnue par C1q, et analyser en détail cette interaction. L'étude précise de son exposition à la surface de cellules entières au cours de l'apoptose est envisagée.

En conclusion, ces résultats apportent la preuve que l'activité lectine de C1q est impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques. Il reste cependant à préciser l'ensemble des modifications détectées par C1q et leur importance relative dans la reconnaissance des cellules apoptotiques.

Chapitre 8

Conclusions et perspectives

8.1 Conclusions

Les résultats obtenus au cours de cette thèse constituent une contribution à la compréhension des mécanismes de la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q. Pour la première fois, nous avons identifié des ligands de C1q exposés au niveau de la surface cellulaire au cours de l'apoptose, qui sont directement impliqués dans la discrimination entre les cellules normales et les cellules apoptotiques. Nos données ont également permis de mieux caractériser les implications des « récepteurs » connus de C1q dans ce processus et de proposer un rôle pour certains d'entre eux.

Dans un premier temps, nous avons montré que C1q et la phosphatidylsérine (PS) interagissent *in vitro* et que cette interaction fait intervenir les régions globulaires de C1q (GR) et la tête polaire de la PS. Ce résultat a été corroboré par l'étude cristallographique du complexe GR/phosphosérine qui a permis de localiser, sur le modèle tridimensionnel de C1q, un site d'interaction situé sur la face interne du « bouquet de tulipes » et orienté vers la surface cible. Enfin, l'intervention et la localisation de cette interaction au niveau cellulaire lors de la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q ont été confirmées par des expériences d'inhibition de la fixation de C1q par l'annexine V, et par des études de microscopie confocale. Ainsi, la PS, exposée précocement et de façon ubiquitaire à la surface cellulaire au cours de l'apoptose, est responsable, au moins en partie, de la fixation de C1q sur les cellules apoptotiques.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au rôle possible dans ce processus des protéines décrites comme pouvant interagir avec C1q : gC1qR/p33 et cC1qR/CRT. D'après nos résultats il semble que gC1qR/p33 ne soit pas impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques, au moins aux stades précoces de l'apoptose. Cependant cette protéine pourrait

avoir un rôle de modulateur des réponses inflammatoires, lorsqu'elle est sécrétée par les cellules en train de mourir. Concernant la calréticuline (CRT), les premiers résultats de l'étude des caractéristiques biochimiques de l'interaction entre cette protéine et C1q ont montré que la CRT immobilisée sur une surface fixe les GR. Il est donc envisageable que la CRT, dont l'expression et l'exposition varient au cours de l'apoptose, puisse être un ligand de C1q à la surface des cellules apoptotiques.

Enfin, dans le but d'évaluer la capacité de C1q à reconnaître divers signaux « eat-me » nous nous sommes intéressés à son activité lectine. Nous avons montré que C1q a la capacité de reconnaître certains sucres neutres par l'intermédiaire de ses régions globulaires et que cette interaction peut être inhibée par certains hexoses et pentoses dont le désoxy-D-ribose, composant élémentaire de l'ADN. Plus précisément, nous avons montré que GR et ADN interagissent *in vitro* et que cette interaction qui met en jeu l'activité lectine de C1q est impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques.

8.2 Perspectives

Nous avons donc identifié deux ligands de C1q à la surface des cellules apoptotiques, mais nos résultats et les données de la littérature suggèrent que C1q reconnaîtrait de multiples cibles. Il reste donc à identifier et à caractériser les autres ligands de C1q, et à préciser les conditions dans lesquelles C1q pourrait reconnaître plusieurs de ces cibles simultanément.

8.2.1 Caractériser l'ensemble des structures reconnues par C1q

Préciser le rôle de la CRT

Initialement, la CRT a été impliquée dans l'élimination des cellules apoptotiques comme un récepteur phagocytaire des collectines et de C1q (figure 8.1 A). A la surface du phagocyte, la CRT reconnaît les fragments de type collagène de C1q et des collectines qui sont fixés sur la cellule apoptotique *via* leurs régions globulaires. En association avec son co-récepteur LRP/CD91, la CRT permet donc la phagocytose des cellules apoptotiques opsonisées par les collagènes de défense (figure 8.1 A).

Plus récemment, Gardai et collaborateurs ont montré que la CRT pouvait également jouer un rôle dans ce processus mais cette fois-ci en tant que signal « eat-me » à la surface des cellules apoptotiques [Gardai et al., 2005]. Ils proposent que dans ce cas-là, la CRT induise la phagocytose des cellules apoptotiques en activant directement son co-récepteur LRP/CD91 à la surface du phagocyte (figure 8.1 B).

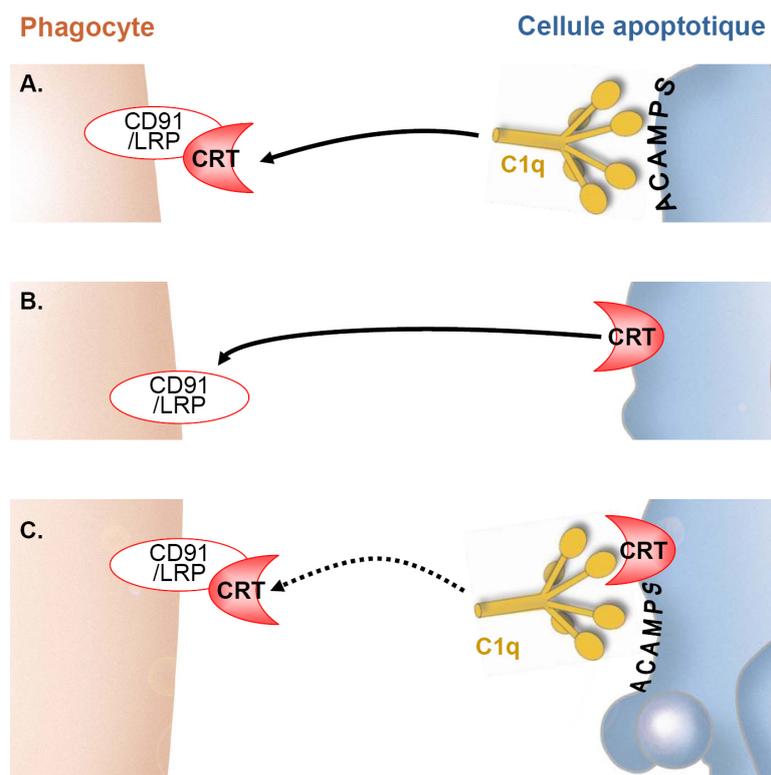


FIG. 8.1 – Rôles de la CRT lors de la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques. A. C1q et les collectines adsorbés à la surface des cellules apoptotiques engagent la CRT et son co-récepteur CD91/LRP à la surface des phagocytes, ce qui induit la phagocytose de la cellule cible. [Ogden et al., 2001]. B. La CRT présente à la surface de la cellule apoptotique est reconnue directement par son co-récepteur CD91/LRP à la surface du phagocyte [Gardai et al., 2005]. C. La CRT à la surface de la cellule apoptotique serait reconnue par C1q par l'intermédiaire de ses GR, tandis que ses CLF engageraient le complexe CRT-CD91/LRP à la surface du phagocyte.

Nos résultats permettent cependant de proposer une autre possibilité puisque nous avons montré que C1q pouvait se fixer sur la CRT immobilisée par l'intermédiaire de ses GR. Cela permet d'envisager la configuration selon laquelle la CRT serait un ligand de C1q à la surface des cellules apoptotiques. Dans ce modèle, C1q servirait de molécule de pontage entre la CRT de la cellule apoptotique et celle du phagocyte (figures 8.1 C et 8.4). Cette hypothèse reste à tester.

Suivre les nouvelles pistes

Confirmer l'implication de la GAPDH L'étude de l'activité lectine de C1q a permis de mettre en évidence une nouvelle protéine capable d'interagir avec les GR : la glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH). L'interaction entre la GAPDH et C1q a été initialement montrée par révélation d'électrotransfert (chapitre 7) puis confirmée par différentes techniques dont des études d'interaction par SPR. La similitude des profils obtenus avec les GR et la lectine PHA-E décrits au chapitre 7 suggère que la GAPDH pourrait être reconnue du fait de ses glycosylations. Il faudrait donc dans un premier temps déterminer laquelle des parties peptidique ou glucidique de la GAPDH est reconnue par les GR.

Dans le cas où l'interaction entre C1q et la GAPDH serait dépendante de la glycosylation, nous chercherons à savoir si l'augmentation de la détection de la GAPDH au cours de l'apoptose est due à une sur-expression de la protéine à la surface ou bien à une modification de son profil de glycosylation.

Au laboratoire, des expériences par SPR et par co-immuno-précipitation ont permis de confirmer cette interaction *in vitro*. La GAPDH, *via* l'augmentation de son expression à la surface ou la modification de son profil de glycosylation, pourrait permettre une fixation accrue de C1q à la surface cellulaire et donc la reconnaissance spécifique des cellules apoptotiques. Le rôle physiologique de ce nouveau ligand potentiel de C1q reste à tester. L'étude est en cours.

Identifier les motifs oxydés reconnus par C1q Comme décrit dans la section 1.4.2, des épitopes spécifiques de l'oxydation exposés à la surface cellulaire au cours de l'apoptose, et non encore caractérisés, sont impliqués dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques.

Des anticorps dirigés contre les phospholipides oxydés peuvent se fixer à la surface des cellules apoptotiques et peuvent, comme les oxLDL, inhiber de façon compétitive la fixation des cellules apoptotiques sur les macrophages [Sambrano and Steinberg, 1995, Bird et al., 1999, Chang et al., 1999]. Or, il a été montré au laboratoire que C1q interagit spécifiquement avec les

oxLDL immobilisés, et ce avec une forte affinité de l'ordre de 30 nM [Biró et al., 2007]. Ces résultats suggèrent que C1q pourrait reconnaître à la surface des cellules apoptotiques des sites de type oxLDL (figure 8.4).

Ces sites doivent maintenant être caractérisés de façon plus précise et leur implication dans la reconnaissance spécifique des cellules apoptotiques doit être examinée. Des démarches similaires seront conduites pour les autres ligands potentiels de C1q.

Partir à la pêche au ligand

Par une approche protéomique, il serait possible d'identifier par analyse différentielle les protéines présentes à la surface cellulaire qui, au cours de l'apoptose, voient leur expression modulée ou subissent des modifications post-traductionnelles. Il est également envisageable de rechercher de nouveaux ligands potentiels de C1q par des approches d'immunoprécipitation.

Dans tous les cas, une fois ces ligands potentiels identifiés, il faudra caractériser leurs modalités d'interaction avec C1q et déterminer leur implication dans la reconnaissance des cellules apoptotiques.

8.2.2 Comprendre la complexité de la reconnaissance des cellules apoptotiques

Reconnaissance coordonnée de plusieurs signaux « eat-me » ?

L'exposition de la PS est considérée comme un signal précoce d'apoptose et la phagocytose des cellules apoptotiques peut-être inhibée par des liposomes contenant de la PS [Fadok et al., 1992]. Cependant, les cellules nécrotiques ainsi que certaines cellules viables telles que les plaquettes activées et les macrophages en cours de différenciation peuvent également exhiber de la PS à leur surface [Waring et al., 1999, Vance and Steenbergen, 2005]. Or, ces cellules, bien qu'exposant la PS, ne sont pas phagocytées. La présentation de la PS est donc nécessaire mais pas suffisante à l'induction de la phagocytose.

De même, il a été montré que la CRT peut agir comme signal de reconnaissance des cellules apoptotiques [Gardai et al., 2005]. Pourtant, encore une fois, et comme c'est déjà le cas pour la PS, la CRT est présente à la surface de nombreuses cellules viables sans que cela n'induisse leur phagocytose [Stuart et al., 1997, Eggleton et al., 2000, McGreal and Gasque, 2002, Ghiran et al., 2003].

En outre, Gardai et collaborateurs ont montré que la CRT présente à la surface des cellules apoptotiques se localise significativement (même si non exclusivement) dans des îlots où la PS est également exposée.

Cette dernière observation est favorable à l'idée qu'un seul signal de reconnaissance ne soit pas suffisant pour induire l'élimination d'une cellule. Ainsi, l'exposition d'un seul de ces signaux de façon isolée, par exemple lors de l'activation cellulaire, n'entraîne pas la phagocytose de cette cellule. A l'inverse, au cours de l'apoptose, de nombreuses molécules sont nouvellement exposées et fournissent des informations convergentes qui constituent ensemble un signal fort de reconnaissance et d'élimination des cellules apoptotiques.

Perte de signaux « don't-eat-me » ?

Une autre hypothèse peut être avancée pour expliquer l'observation selon laquelle les phagocytes ignorent les cellules viables exposant un signal de reconnaissance : la phagocytose des cellules apoptotiques nécessiterait non seulement la présentation de un ou plusieurs signaux « eat-me » mais également la perte de signaux de protection ou signaux « don't-eat-me » qui caractérisent les cellules viables.

Il a justement été montré que la rencontre fortuite entre une cellule viable et un phagocyte mène à une répulsion active du phagocyte, et ce grâce à l'interaction homophile de CD31 présent à la fois à la surface du phagocyte et de la cellule cible [Brown et al., 2002]. CD31 est également présent à la surface des cellules apoptotiques mais sa signalisation semble être inactivée de telle façon que la cellule apoptotique n'est plus rejetée par le phagocyte [Brown et al., 2002]. La perte de ce signal de répulsion, associée à l'apparition de signaux de reconnaissance cause l'attachement de la cellule apoptotique au phagocyte, puis sa phagocytose.

La sialylation des glycoprotéines est une autre stratégie permettant de marquer les cellules viables et de les protéger d'une phagocytose inopportune [Medzhitov and Janeway, 2002]. Les glycoprotéines sialylées sont spécifiquement reconnues par des récepteurs phagocytaires (SIGLECS, « sialic acid-binding Ig-like lectins »), responsables de l'inhibition de l'ingestion des cellules normales [Medzhitov and Janeway, 2002]. Les formes asialylées des glycoprotéines n'étant pas reconnues par les SIGLECS, les cellules apoptotiques, dont les oligosaccharides ne présentent plus d'acide sialique terminal (du fait de l'action de sialidase et de l'exposition de glycoprotéines immatures) ne sont donc plus protégées et sont phagocytées.

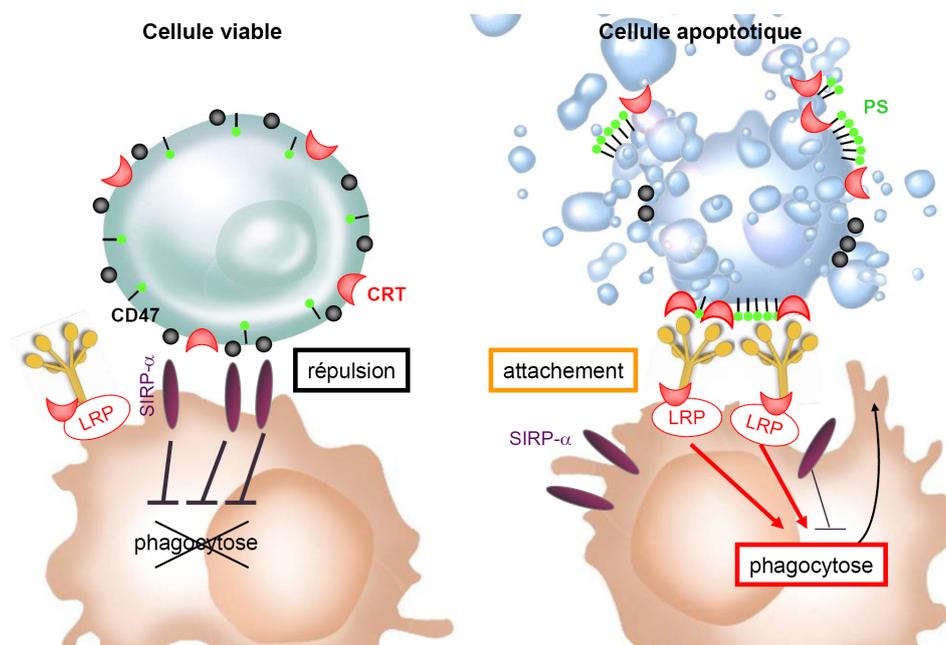


FIG. 8.2 – Rôle de CD47 dans la protection des cellules apoptotiques et importance de son inactivation au cours de l'apoptose. A la surface des cellules viables, CD47 est un signal « don't-eat-me » qui protège les cellules viables d'une phagocytose inopportune. Au cours de l'apoptose, l'inactivation et la redistribution de CD47, associée à l'exposition de signaux « eat-me » permet la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques.

Plus récemment, Gardai et collaborateurs ont montré que CD47 est un marqueur de surface reconnu par la protéine régulatrice du signal SIRP- α (« signal inhibitory regulatory protein ») à la surface du phagocyte et empêche l'ingestion des cellules viables (figure 8.2 panneau de gauche) [Gardai et al., 2005]. Au cours de l'apoptose, l'expression de CD47 diminue. L'inhibition exercée par SIRP- α est donc levée et les cellules apoptotiques sont alors phagocytées (figure 8.2 panneau de droite). De plus, l'apoptose affecte non seulement l'expression de CD47, mais également sa distribution. Au cours de l'apoptose, CD47 est redistribué dans des îlots membranaires, qui sont dissociés de ceux contenant la CRT, ce qui permet de dévoiler ce signal de reconnaissance [Gardai et al., 2005] (figure 8.2 panneau de droite). Ainsi, en masquant certains signaux de reconnaissance et en induisant via SIRP- α des voies de signalisation inhibitrices chez le phagocyte, CD47 prévient la phagocytose inappropriée des cellules viables.

Collection de différents types de signaux

Ainsi la reconnaissance des cellules apoptotiques implique la détection d'un ensemble de signaux présentés successivement à la surface des cellules apoptotiques et dont l'apparition résulte de différents mécanismes :

1. la modification accidentelle (oxydation des phospholipides) ou enzymatique (désialylation des glycoprotéines membranaires) de structures déjà présentes à la surface cellulaire.
2. l'exposition d'épitopes normalement séquestrés dans la cellule, sur la face interne de la membrane (PS) ou dans les compartiments intracellulaires (glycoprotéines immatures, GAPDH), voire dans le noyau (ADN).
3. le dévoilement de structures initialement présentes à la surface mais inefficaces car préalablement masquées par exemple par des signaux « don't-eat-me » (redistribution de la CRT dans des îlots membranaires disjoints de ceux contenant CD47).

Ainsi de nombreux signaux de reconnaissance ont été identifiés à l'heure actuelle, même si les mécanismes permettant leur exposition ne sont pas encore connus avec précision. De plus, même si de nombreux récepteurs phagocytaires et molécules de pontage ont été décrits, la nature des signaux qu'ils reconnaissent à la surface des cellules apoptotiques n'est bien souvent pas connue. Ce constat vient probablement du fait des modifications perpétuelles qui ont lieu au niveau de la membrane plasmique au cours de l'apoptose et qui rendent ces études difficiles.

Reconnaissance coordonnée des cellules apoptotiques par C1q

La reconnaissance des cellules apoptotiques implique donc la collection d'un grand nombre de signaux et implique comme nous l'avons vu de nombreux récepteurs phagocytaires ou solubles. Parmi eux, C1q semble occuper une position particulière de par sa capacité à reconnaître plusieurs de ces signaux.

L'ensemble de nos résultats a permis d'identifier à ce jour deux ligands de C1q exposés à la surface des cellules apoptotiques : la PS et l'ADN. De plus, certains de nos résultats préliminaires et les données de la littérature suggèrent que C1q pourrait également reconnaître à la surface cellulaire d'autres partenaires, tels que la CRT, la GAPDH, ou des macromolécules dont la glycosylation ou l'état d'oxydation ont été modifiés. C1q a donc de multiples ligands potentiels à la surface des cellules apoptotiques.

Cependant la question de l'implication relative de ces ligands dans la fixation de C1q reste ouverte. PS et ADN ayant été formellement identifiés comme ligands de C1q, des expériences de co-inhibition à l'aide d'annexine V (ligand spécifique de la PS) et de DNase permettraient de donner un premier élément de réponse quant à l'engagement respectif de ces deux ligands, et à l'intervention éventuelle d'autres ligands.

Par ailleurs, nous avons montré que C1q et PS sont co-localisés dans des îlots membranaires à la surface des cellules apoptotiques (chapitre 4). Dans le chapitre 6, des résultats préliminaires montrent que les GR se fixent au niveau d'îlots membranaires contenant de la CRT. Ainsi la CRT et la PS seraient co-localisées dans des structures membranaires où s'effectuerait la reconnaissance par les GR. Ce résultat est en accord avec les observations selon lesquelles PS et CRT se regroupent dans des îlots membranaires au cours de l'apoptose [Gardai et al., 2005].

Enfin, il a été montré que la PS fixe les histones de la chromatine contribuant ainsi à l'exposition des nucléosomes à la surface des cellules apoptotiques [Fürnrohr et al., 2007]. Ainsi, la CRT, la PS et l'ADN regroupés dans des îlots membranaires et reconnus par C1q pourraient fournir un signal fort pour la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques (figure 8.3).

8.2.3 C1q, un acteur majeur de la tolérance immune

C1q, un détecteur multipotent des cellules apoptotiques

Nos résultats, en accord avec ceux de Navratil et collaborateurs montrent que les GR sont responsables de la fixation de C1q à la surface des cellules apoptotiques. Les GR sont donc capables à elles seules de détecter les cellules apoptotiques [Navratil et al., 2001]. Nous avons également démontré dans cette étude que C1q reconnaît la PS et le désoxy-D-ribose de l'ADN à la surface des cellules apoptotiques. Enfin, certains de nos résultats préliminaires et les données de la bibliographie suggèrent que d'autres signaux de reconnaissance pourraient être la cible de C1q : la CRT, les oligosaccharides asialylés, les phospholipides oxydés, ... L'implication de ces interactions au niveau cellulaire reste à démontrer.

Cependant, comme nous venons de le présenter, il semble de plus en plus évident que l'identification d'une cellule apoptotique implique la reconnaissance de multiples signaux « eat-me » probablement regroupés dans des îlots membranaires. Dans ce cas, on peut s'attendre à ce que C1q joue un rôle central dans la reconnaissance des cellules apoptotiques du fait de sa capacité à reconnaître une grande variété de cibles [Kishore et al., 2004]. C1q serait donc un acteur clé de ce processus de par sa capacité à reconnaître et à collecter plusieurs signaux du « soi altéré ».

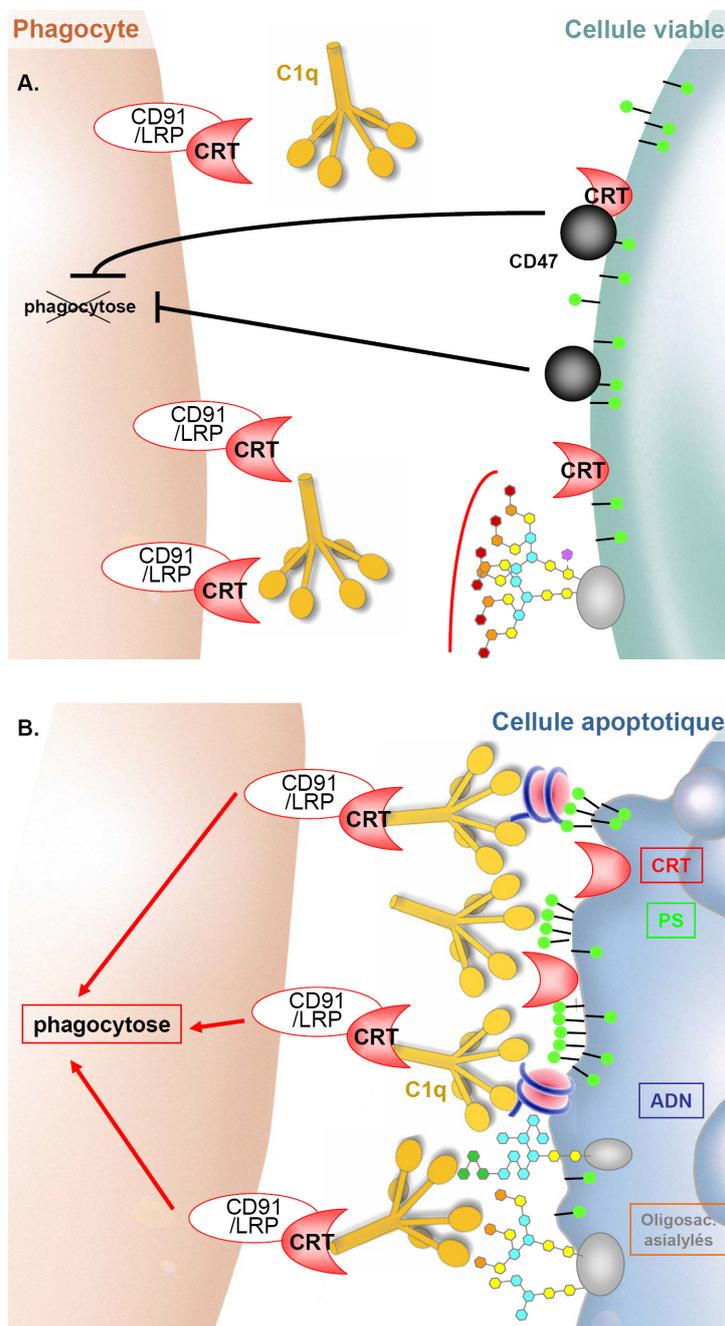


FIG. 8.3 – Rôle de C1q dans la collection et l'intégration des signaux de reconnaissance à la surface des cellules apoptotiques. A. A la surface cellulaire sont normalement présentes des glycoprotéines asialylées et des signaux « don't-eat-me » qui protègent la cellule normale de la phagocytose. L'exposition accidentelle et/ou faible de signaux « eat-me » isolés, comme la PS ou la CRT n'induit pas de reconnaissance. B. L'induction de l'apoptose entraîne l'exposition de nombreux signaux de reconnaissance qui se regroupent dans des îlots membranaires. Leur reconnaissance par les GR de C1q qui interagit par l'intermédiaire de ses CLF avec le complexe CRT-CD91/LRP permet l'induction de la phagocytose des cellules apoptotiques. A noter qu'en parallèle, les signaux « don't-eat-me » sont, de leur côté, inactivés.

D'après la structure cristallographique des GR [Gaboriaud et al., 2003] et par des études de mutagenèse dirigée [Roumenina et al., 2006], deux sites majeurs de reconnaissance ont été identifiés : le premier à l'apex de la tête globulaire de C1q (CRP, IgM), le second dans la région équatoriale de la partie globulaire de la sous-unité B (IgG). Nous avons, dans notre étude, identifié un nouveau site d'interaction au niveau de la sous-unité C où peut se fixer la PS. Ce site, éloigné de ceux décrits précédemment, permet de supposer que cette interaction PS-C1q est peu soumise aux interférences dues à la fixation d'autres ligands. Ces éléments renforcent l'idée selon laquelle la versatilité des propriétés de reconnaissance de C1q provient de la structure hétérotrimérique de son domaine globulaire, qui permet la coexistence de multiples sites d'interaction [Gaboriaud et al., 2007].

Enfin, C1q présente non pas une mais six GR, chacune pouvant se fixer à des ligands différents. Une seule molécule de C1q peut donc reconnaître et collecter simultanément plusieurs signaux. Le caractère oligomérique de C1q couplé à sa multivalence permet donc de démultiplier les propriétés de reconnaissance de cette molécule.

Au final, cette capacité de C1q à reconnaître et à collecter simultanément plusieurs ligands exposés à la membrane au cours de l'apoptose est un argument supplémentaire en faveur d'un rôle majeur de C1q en tant qu'acteur de la reconnaissance et de l'élimination des cellules apoptotiques (figure 8.4).

C1q, inducteur de l'opsonisation des cellules apoptotiques nécessaire à leur élimination

Grâce à ses capacités multiples de reconnaissance, C1q se fixe *via* ses différents ligands à la surface des cellules apoptotiques et joue ainsi le rôle d'opsonine. C1q peut également permettre l'opsonisation indirecte des cellules apoptotiques à travers l'activation du complément [Mevorach et al., 1998a]. Le dépôt résultant de C3b à la surface cellulaire stimule la phagocytose par le biais du récepteur du complément CR3 [Mevorach et al., 1998a]. Or, une molécule de C1q peut induire le dépôt de plusieurs molécules de C3b. Lu et collaborateurs ont donc proposé que le dépôt de C3b dû à l'activation du complément, comparé à l'opsonisation directe par C1q, permet une phagocytose plus efficace, à condition bien sûr que l'activation de C3 ne provoque pas de dommages tissulaires ou une inflammation excessive [Lu et al., 2008].

Cependant, l'activation du système du complément mène normalement à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (MAC) et la production non seulement d'opsonines mais également d'anaphylatoxines, responsables de l'inflammation. Or de façon apparemment contradictoire, la reconnaissance des cellules apoptotiques par C1q semble avoir pour conséquence de limiter la libération de matériel intra-cellulaire et l'induction de l'inflammation.

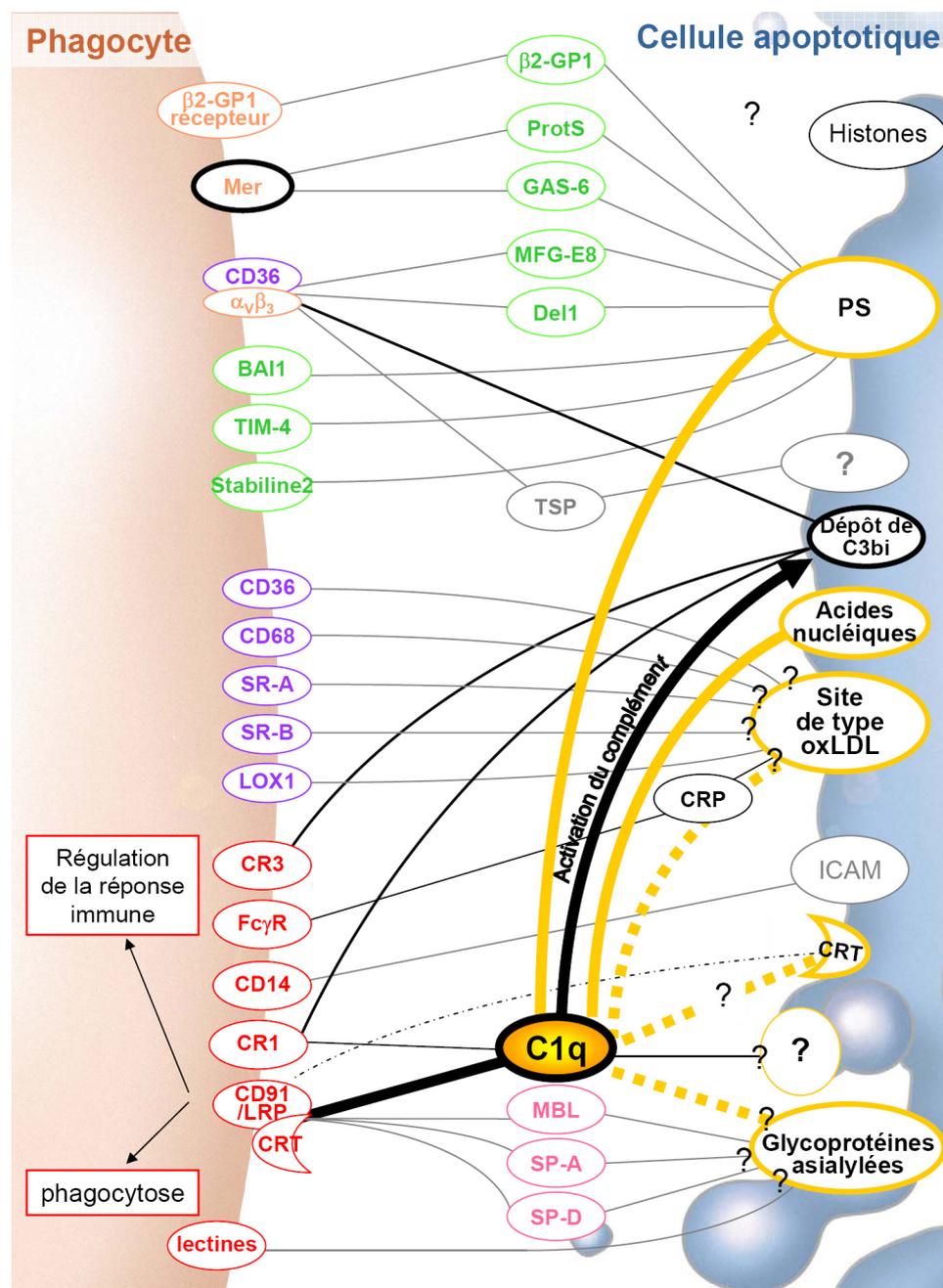


FIG. 8.4 – Rôle central de C1q pour la reconnaissance des cellules apoptotiques par le phagocyte. Les récepteurs phagocytaires et les molécules de pontage impliqués dans la reconnaissance directe de la PS sont ceclés de vert. Les récepteurs scavenger, les récepteurs des PAMPs et les collectines sont en violet, rouge et rose, respectivement. Les autres récepteurs phagocytaires sont ceclés en orangé. Les traits représentent les interactions entre les différents acteurs, tandis que les flèches indiquent une activation. Les points d'interrogation signifient que le motif exact reconnu n'est pas formellement identifié. En jaune sont représentés les sites reconnus par C1q. Les pointillés indiquent que la pertinence de ces interactions pour la reconnaissance des cellules apoptotiques est à confirmer.

Ainsi, lorsque le complément est recruté à la surface des cellules apoptotiques, il doit exister des mécanismes de contrôle de l'activation du complément menant au dépôt des opsonines C3b et C4b sans générer ni d'anaphylatoxine C5a et ni le complexe lytique (voir section 1.2.1). Cette observation peut s'expliquer par deux constatations. Premièrement, en conditions normales les macrophages synthétisent seulement les éléments précoces de la cascade du complément mais pas les éléments tardifs tels que C5, C6, C7, C8 ou C9 [Colten et al., 1986]. Si C5-C9 sont absents ou faiblement présents dans les tissus, l'activation du complément sera naturellement arrêtée après l'activation de C3 (voir section 1.2.1). Dans ces conditions, l'activation partielle du complément n'induit pas d'inflammation et de dommages tissulaires significatifs. Deuxièmement, quand la CRP se fixe à la surface des cellules apoptotiques, elle inhibe l'activation du complément [Gershov et al., 2000]. La CRP est une protéine de phase aiguë qui est induite positivement lors de l'inflammation. Cette protéine peut se fixer à la surface des cellules apoptotiques et induire le recrutement de C1q et l'activation de la voie classique du complément. Il a cependant été montré que CRP protège les cellules de l'assemblage du complexe lytique terminal du système du complément et a donc un rôle tolérogénique.

C1q, un régulateur de la réponse immune

Bien que C1q soit traditionnellement considéré comme une molécule capable d'induire l'activation de la voie classique du complément en réponse à la reconnaissance directe ou indirecte des pathogènes, de récentes études ont apporté la preuve que cette molécule a un rôle essentiel dans la détection de structures du soi altéré, comme cela a été démontré dans le cas des fibrilles amyloïdes, de la forme pathologique de la protéine prion, des cellules apoptotiques ou des LDL modifiés [Korb and Ahearn, 1997, Tacnet-Delorme et al., 2001, Blanquet-Grossard et al., 2005, Biró et al., 2007]. Sans équivoque, les déficiences en C1q induisent une défaillance dans l'élimination des cellules apoptotiques et en conséquence un affaiblissement du contrôle de l'inflammation [Botto et al., 1998, Taylor et al., 2000, Botto and Walport, 2002].

C1q, de par sa participation active à la reconnaissance et à l'élimination précoces des cellules apoptotiques, permet de limiter le relargage d'éléments intra-cellulaires potentiellement nocifs et immunogéniques, et participe donc activement au maintien de la tolérance. D'autres collagènes de défense ont également été impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques : SP-A, SP-D et MBL. Cependant, chez la souris, alors que la déficience en C1q conduit au développement de maladies auto-immunes [Botto et al., 1998], l'inactivation de la MBL mène à une accumulation de cellules apoptotiques

mais pas au déclenchement de l'auto-immunité [Stuart et al., 2005]. Cette observation met en avant le rôle particulier que doit jouer C1q dans le maintien de la tolérance immune.

Pour comprendre le rôle particulier de C1q, il faut savoir que, contrairement à la plupart des protéines du complément qui sont synthétisées dans le foie par les hépatocytes, C1q a une position particulière du fait de sa synthèse privilégiée par les cellules d'origine hématopoïétique et non par les hépatocytes [Colten et al., 1986]. Ainsi, les macrophages et les cellules dendritiques immatures présents dans les tissus périphériques permettent la sécrétion locale de C1q [Lu et al., 2008].

Mais C1q a également une position unique, du fait de sa capacité à réguler les activités de ces cellules cibles. Chez les macrophages et les cellules dendritiques immatures, l'opsonisation des cellules apoptotiques induit l'activation de la phagocytose, la production de cytokines anti-inflammatoires et le développement de propriétés tolérogéniques et immuno-suppressives [Lu et al., 2008]. Pourtant C1q a également la capacité de promouvoir la migration par chimiotactisme des mastocytes, des granulocytes, des monocytes et des cellules dendritiques immatures. Dans ce sens, la sécrétion locale de C1q par les cellules dendritiques immatures et les macrophages permettrait la création d'un gradient positif vers les tissus périphériques. Les monocytes peuvent d'ailleurs se différencier en cellules dendritiques ou en macrophages, cellules justement responsables de la synthèse de C1q. On assiste donc à une amplification de la synthèse locale de C1q.

8.3 Le mot de la fin...

Ainsi C1q combine des caractéristiques structurales et fonctionnelles particulières qui en font un candidat idéal pour détecter et recueillir plusieurs motifs moléculaires différents à la surface des cellules apoptotiques. Cette capacité unique de C1q à détecter de multiples signaux, associée au fait qu'il soit impliqué dans le dialogue entre immunité innée et immunité adaptative, fait qu'il peut être considéré comme un acteur majeur de la tolérance immune.

Annexe A

Principe de la résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface (SPR, « surface plasmon resonance ») est un phénomène physique principalement connu pour son utilisation comme méthode de mesure de la liaison d'un « analyte » sur un « ligand » adsorbé ou immobilisé à la surface d'une couche métallique. Un système de détection SPR mesure la variation de l'indice de réfraction au voisinage de l'interface quand le ligand se fixe aux récepteurs.

A l'interface entre deux milieux d'indice de réfraction différents (ici le verre et le milieu aqueux), un faisceau de lumière monochromatique et polarisée, arrivant avec une incidence particulière, est totalement réfléchi. Dans ces conditions une composante électromagnétique de la lumière, appelée onde évanescente, pénètre le milieu d'indice de réfraction inférieur sur une courte distance et balaye une zone appelée champ évanescent (figure A.1). L'interposition d'un film d'or à l'interface des deux milieux engendre une résonance entre les électrons délocalisés de la couche périphérique de l'or et l'onde évanescente, conduisant à une perte d'énergie lumineuse dans le faisceau réfléchi (signal SPR), et ceci dans un angle précis appelé angle de résonance. Cet angle de résonance dépend de plusieurs paramètres et notamment de l'indice de réfraction du milieu dans lequel l'onde évanescente se propage, c'est à dire le milieu aqueux.

Les interactions moléculaires entre un ligand immobilisé sur la « sensor chip » et un analyte en solution se produisent dans le champ évanescent. Les variations de masse, induites par l'association ou la dissociation des complexes, modifient la réfringence de la surface et entraînent une variation de l'angle de résonance (figure A.2). La sensor chip, support de l'interaction, est pris en sandwich entre la cellule microfluidique et le banc optique. La cellule microfluidique dessine les cellules de mesure et assure les flux de tampon et

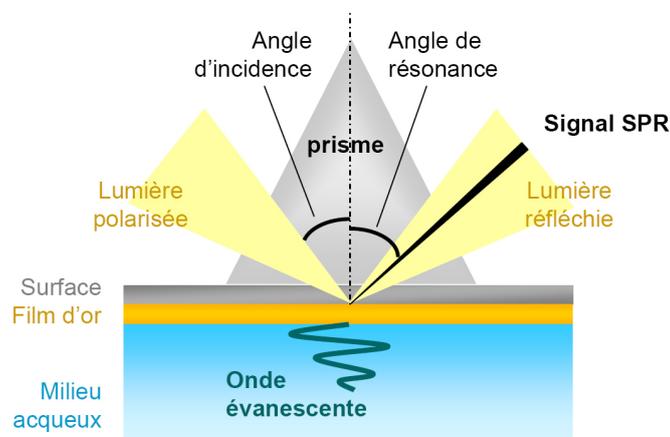


FIG. A.1 – Principe de la résonance plasmonique de surface.

de molécules.

Le tracé en continu des variations de l'angle de résonance dans le temps constitue le sensorgramme. Le signal de résonance est quantifié en unité de résonance (RU). Les différentes étapes d'un cycle d'analyse sont détaillées dans la figure A.3.

Après les phases d'association et de dissociation, la régénération permet de dissocier de façon exhaustive toutes les molécules d'analyte ayant interagi avec le ligand et de retrouver une surface disponible pour un nouveau cycle d'interaction. Les agents les plus couramment utilisés, seuls ou associés entre eux, sont : la force ionique, les effets pH, les agents chaotropiques, les détergents et les chélateurs.

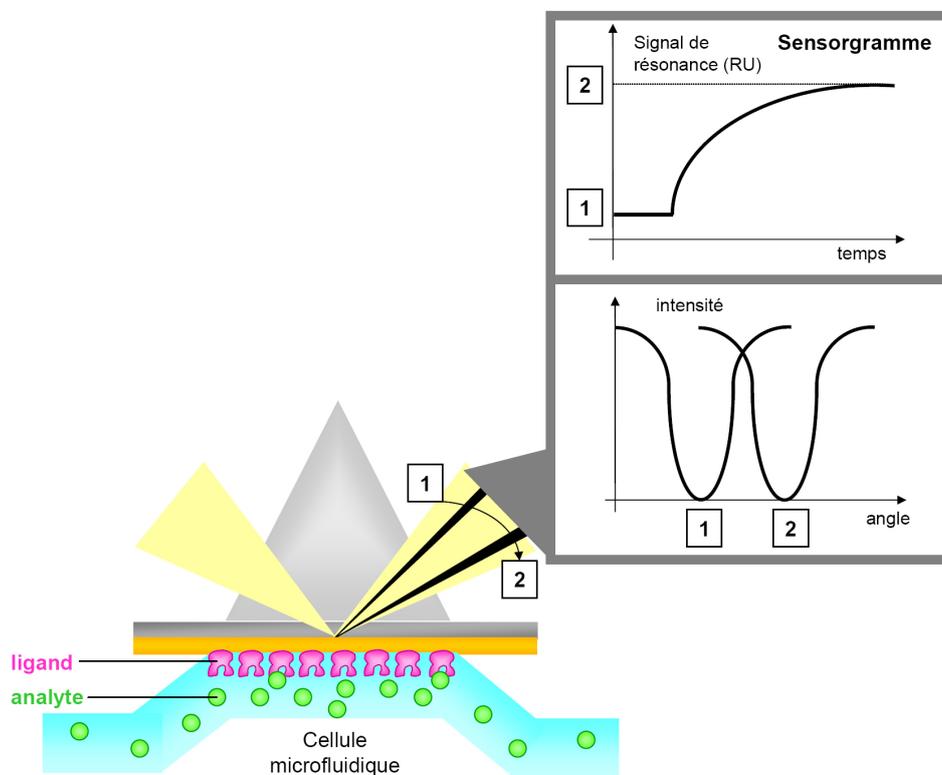


FIG. A.2 – Principe de la détection d’une interaction par SPR. Les positions 1 et 2 correspondent aux variations de l’angle de résonance en fonction de la concentration en analyte au voisinage de la sensor chip.

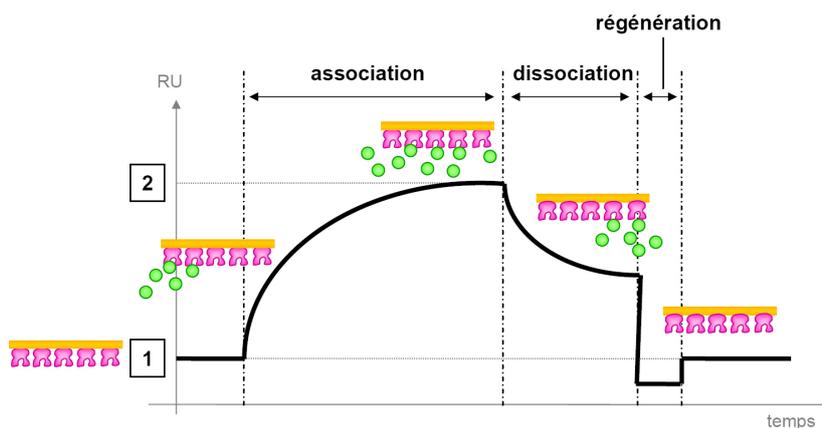


FIG. A.3 – Sensorgramme représentant un cycle d’analyse avec les phases d’association et de dissociation, ainsi que la phase de régénération.

Annexe B

Publications et travaux

B.1 Publications

Gaboriaud C, **Païdassi H**, Frachet P, Tacnet-Delorme P, Thielens N and Arlaud GJ (2007). « C1q : a versatile pattern recognition molecule and sensor of altered self ». Collagen-related lectins in innate immunity, chapter 6 - Research signpost.

Païdassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehiwet B, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Frachet P (2008). « C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition ». J Immunol. 2008 Feb 15 ;180(4) :2329-38.

Païdassi H, Tacnet-Delorme P, Arlaud GJ, Thielens N, Frachet P. « The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition ». En révision à FEBS letters.

B.2 Travaux présentés en meetings

Présentation orale

9-13 septembre 2005, Heidelberg (Allemagne). 10th Meeting on Complement in Human Disease. « Phosphatidylserine is one of the C1q ligands on the surface of apoptotic cells ». **Païdassi H**, Tacnet-Delorme P, Ghebrehiwet B, Arlaud GJ, Frachet P.

29 septembre - 4 octobre 2006, Chia (Italie). 14th Euroconference on Apoptosis. « C1q recognizes phosphatidylserine and likely acts as an early, multiligand bridging molecule in apoptotic cell clearance ». **Païdassi H**,

Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehiwet B, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Frachet P.

Présentations affichées

26-26 octobre 2005, Nantes (France). Congrès Annuel et Forum Jeunes Chercheurs de la SFBBM. « La phosphatidylsérine est l'un des ligands de C1q à la surface des cellules apoptotiques ». **Païdassi H**, Tacnet-Delorme P, Ghebrehiwet B, Arlaud GJ, Frachet P.

15-16 décembre 2006, Villejuif (France). 1st Worskhop on the immune response against dying tumor cells. « C1q recognizes phosphatidylserine and likely acts as an early, multiligand bridging molecule in apoptotic cell clearance ». **Païdassi H**, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehiwet B, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Frachet P.

26-31 octobre 2007, Portoroz (Slovénie). 15th Euroconference on Apoptosis. « Seeking additional C1q ligands on the apoptotic cell surface ». **Païdassi H**, Tacnet-Delorme P, Thielens N, Houen G, Arlaud GJ, Frachet P.

12-13 décembre 2007, Paris (France). Workshop on Plasmacytoid dendritic cells and immune responses. « Seeking additional C1q ligands on the apoptotic cell surface ». **Païdassi H**, Tacnet-Delorme P, Thielens N, Houen G, Arlaud GJ, Frachet P.

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 Ghebrehiwet,[‡] 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.

Copyright © 2008 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/08/\$2.00

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

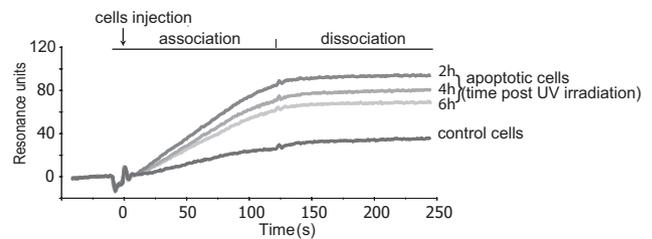


FIGURE 1. SPR analysis of apoptotic cell capture on a C1q-coated surface. Viable or UV-B-irradiated HeLa cells were harvested using trypsin-EDTA, suspended at 2.5×10^5 cells/ml in 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2.5 mM CaCl_2 , and 25 mM HEPES (pH 7.4) containing 0.005% surfactant P20, and then 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.

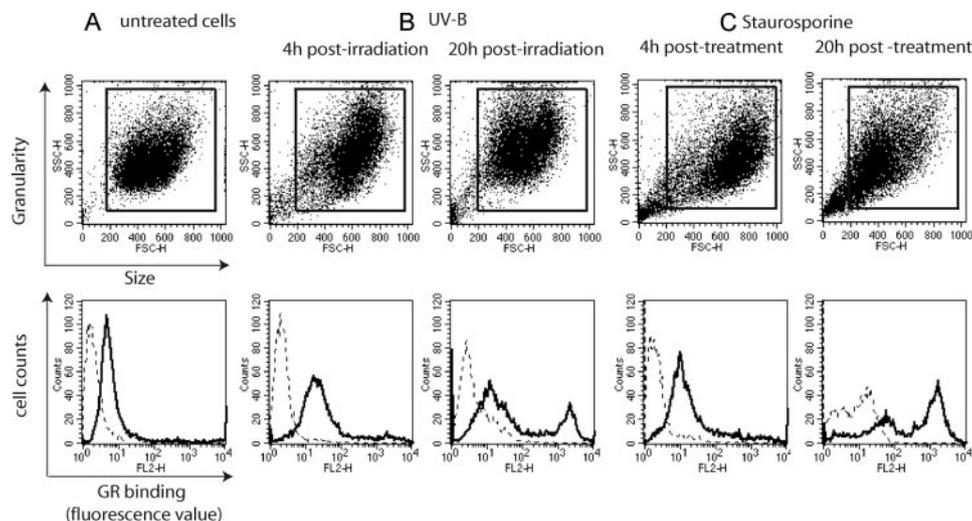


FIGURE 2. Flow cytometry analysis of the interaction between the C1q GR and apoptotic HeLa cells at various periods after UV-B irradiation or treatment with staurosporine. Cells were incubated with biotinylated GR molecules and binding was monitored by flow cytometry after addition of streptavidin-PE. 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.

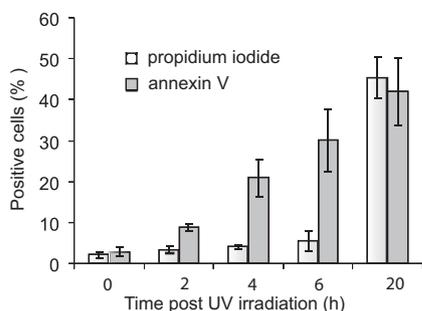


FIGURE 3. C1q GR binding to apoptotic cells is concomitant with PS exposure. Time course analysis of PS exposure and cell permeabilization during apoptosis. PS exposure and cell permeabilization were analyzed by double annexin V/PI labeling as described in *Materials and Methods*. The data shown represent 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.

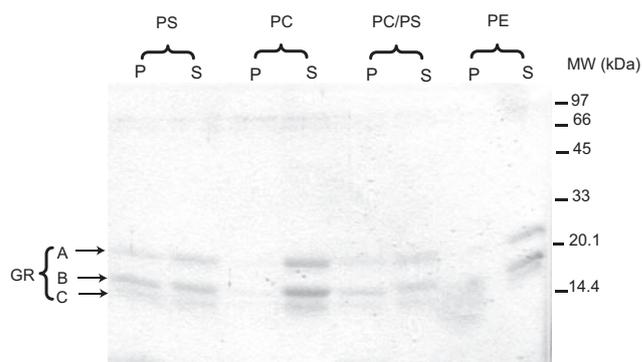


FIGURE 4. Analysis by cosedimentation of the interaction between the C1q GR and PS-containing liposomes. The C1q GR was allowed to interact with liposomes containing PS, PC, phosphatidylethanolamine, or a 1:1 PC:PS mixture. After ultracentrifugation, the pellet and supernatant fractions were separated 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.

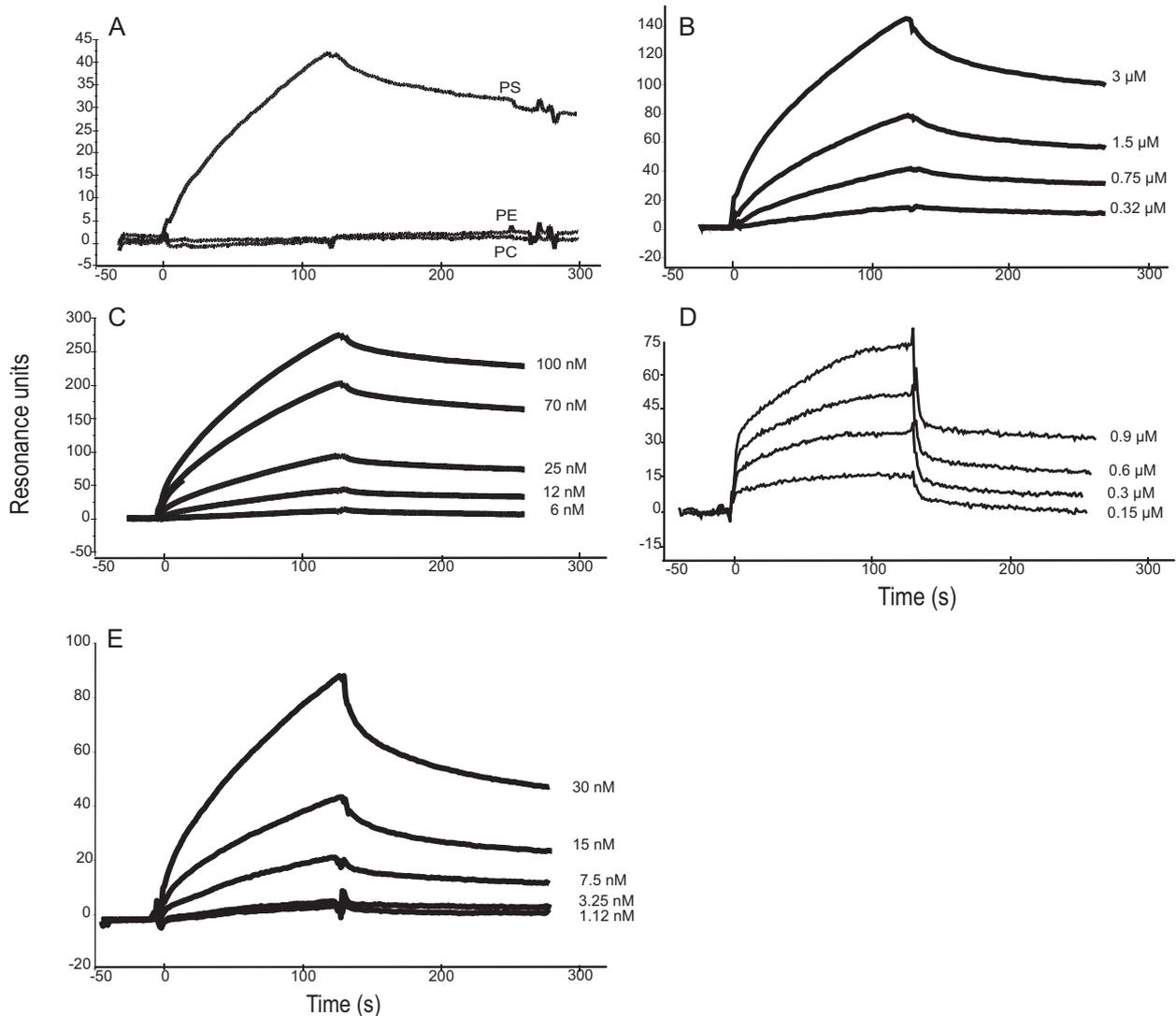


FIGURE 5. SPR analysis of the interaction between C1q or its GR and PS or PS derivatives. *A* and *B*, Binding of the C1q GR to immobilized PS. *C*, Binding of intact C1q to immobilized PS. *D*, Binding of 06:0 PS to immobilized C1q. *E*, Binding of C1q to immobilized phosphoserine. All interactions 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 CM5^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)	
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$ ^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} = $\{\sum hkl \sum i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum hkl \sum i I_i(hkl)\} \times 100$, where I_i 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

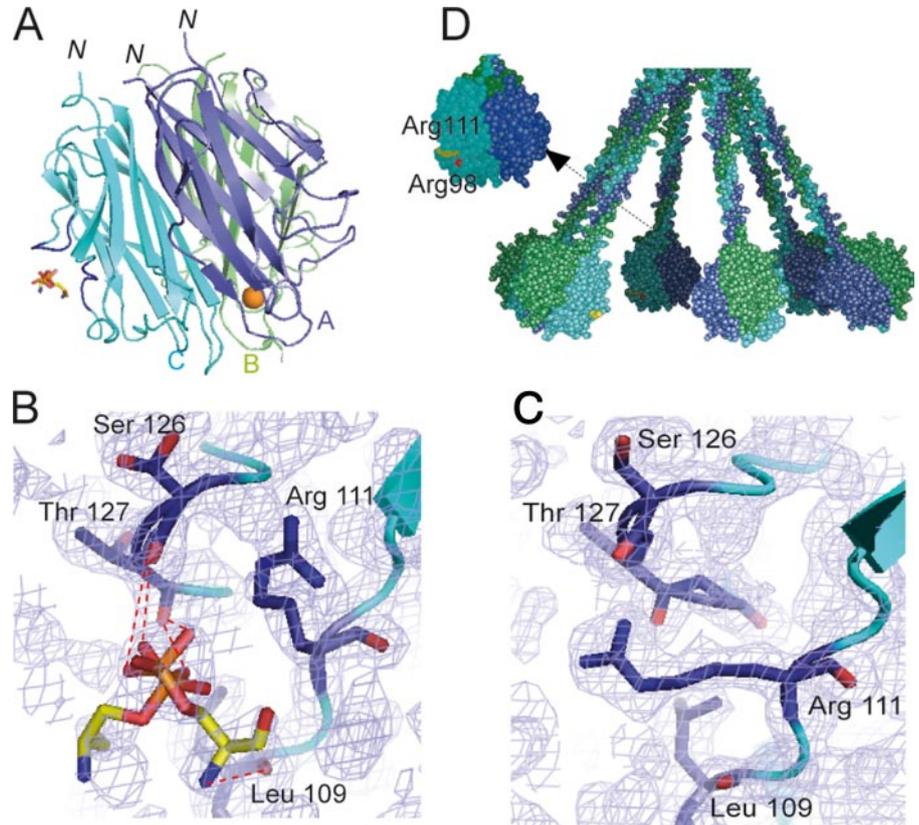
X-ray crystallography analyses were conducted with the aim to observe interaction between the C1q GR and PS-derived ligands at the atomic level. Two main strategies were used for this purpose: cocrystallization of the C1q GR with the ligand and soaking of native C1q GR crystals into ligand-containing 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. 8B). 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. 8H) 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. 8M. On cell 1, PS is

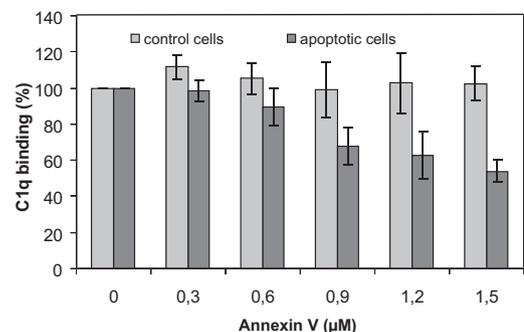


FIGURE 7. Annexin V inhibits apoptotic cell recognition by C1q. Apoptotic HeLa cells were harvested 2 h after UV-B irradiation and incubated at 2.5×10^5 cells/ml in the presence of increasing concentrations of annexin V for 20 min at room temperature in 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2.5 mM CaCl_2 , 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.

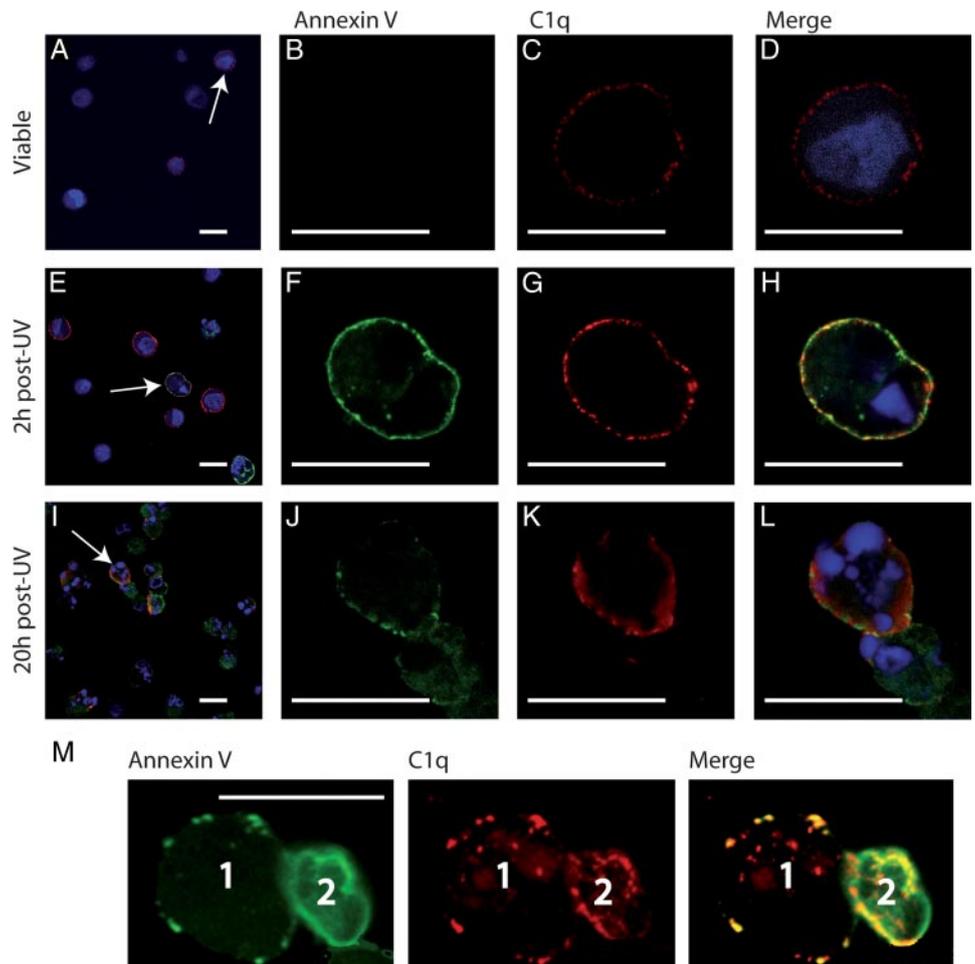


FIGURE 8. PS and C1q colocalize within membrane patches on apoptotic cells. Cells were submitted to a double immunofluorescent labeling for PS (green) and C1q (red) as described in *Materials and Methods*. Nuclei were labeled with Hoechst (blue). In overall views (A, E, and I), white arrows indicate 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. Wisniewski, 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. Peersche, 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. Hohenadl, 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. Verdager, 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: 10711–10717.
48. Krahlhng, 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. Colamonic, 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 (C1qa^{-/-}) 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.



6

Clq: A versatile pattern recognition molecule and sensor of altered self

**Christine Gaboriaud¹, Helena Païdassi², Philippe Frchet²
Pascale Tacnet-Delorme², Nicole M. Thielens² and Gérard J. Arlaud²**

¹Laboratoire de Cristallographie et Cristallogénèse des Protéines and

²Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, Institut de Biologie Structurale
Jean-Pierre Ebel, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France

Abstract

Clq, the binding subunit of the C1 complex of complement, is an archetypal pattern recognition molecule known for its striking ability to recognize a wide variety of targets. Due to its ability to bind most antibodies in antibody-antigen complexes, it is traditionally viewed as a secondary (antibody-dependent) recognition molecule. However, there is increasing evidence that this multi-potent protein plays a crucial role in the detection of altered self, as documented in the case of amyloid fibrils, the pathological form of the prion proteins and

apoptotic cells. Recent studies also indicate that C1q has lectin-like activity, suggesting that carbohydrates may provide additional C1q targets on pathogens and cell debris. The X-ray structure of the heterotrimeric C1q recognition domain has been solved recently, providing insights into the versatility of its recognition properties. The purpose of this chapter is to review these recent functional and structural advances.

1. Introduction

C1q is the recognition subunit of C1, the macromolecular complex that triggers activation of the classical pathway of complement. Like most of the recognition molecules involved in innate immunity, it is an oligomeric protein with the ability to sense “danger” signals that are characteristic of pathogens and altered self structures. Human C1q is a 460-kDa protein made up of 18 polypeptide chains of three different types (6A, 6B, and 6C chains) that have similar lengths and homologous amino acid sequences [1]. Each chain has a short N-terminal region involved in the formation of A-B and C-C interchain disulfide bonds. This region is followed by a collagen-like sequence that gives rise to the formation of six heterotrimeric (A, B, C) collagen-like triple helices which first associate as a bundle and then, due to interruptions in the repeating Gly-X-Y collagen-like motif, diverge to form six individual stems. Each stem is prolonged by a C-terminal globular “head” region (GR) formed from the heterotrimeric association of protein domains known as “gC1q” modules [2,3].

It is well documented that most of the C1q ligands are recognized by its peripheral globular heads, thus triggering activation of C1r and C1s, the proteases associated with C1q [4]. C1q is traditionally known for its ability to bind immune complexes containing IgG or IgM. Nevertheless, it recognizes an amazing variety of other ligands, including bacteria, viruses, parasites, and mycoplasma [3,5], underscoring its role as a primary (antibody-independent) defence protein. C1q is also capable of recognizing structures aberrant from self. Thus, in addition to cellular debris and sub-cellular membranes [6], C1q binds to and elicits clearance of apoptotic cells [7], thereby playing a major role in immune tolerance. Recent studies also indicate that β -amyloid fibrils and the prion protein are recognized by C1q [8-10]. The fact that C1q was recently shown to display lectin-like activity [11] adds a further facet to the versatile binding properties of this protein. The aim of this chapter is to review these data and to illustrate, in light of the recently determined C1q GR X-ray structure [12], how this molecule can bind to such a variety of ligands.

2. Recognition of β -amyloid fibrils

Alzheimer’s disease is a common dementia resulting from neuronal loss, characterized by excessive deposition in the central nervous system of the β -amyloid peptide, a 40- to 42-residue peptide arising from proteolytic cleavage

of the larger amyloid precursor protein [13, 14]. The β -amyloid peptide is the major protein component of the senile (neuritic) plaques, a hallmark of Alzheimer's disease pathology in the brain, and there are several lines of evidence that its accumulation in the form of amyloid fibrils causes neurotoxicity through different direct or indirect mechanisms [15, 16]. As described initially for astrocytes [17], brain cells express a full arsenal of complement factors and inhibitors [18]. Eikelenboom and Stam [19] first demonstrated that complement proteins are present in senile plaques, and subsequently numerous studies have reported the association of proteins of the classical complement pathway in Alzheimer's disease pathology [20]. Strong support for the hypothesis that complement activation may play a role in the pathogenesis of Alzheimer's disease came from the demonstration that the β -amyloid peptide activates the classical pathway *in vitro* [8], and from the observation that C1q immunostaining is co-localized to nearly all neuritic plaques [21].

Subsequent studies based on functional assays, binding assays, and/or electron microscopy have provided evidence that C1q binds directly to fibrillar but not soluble β -amyloid, substantiating the view that this interaction is correlated with the conversion from the nonfibrillar diffuse β -amyloid to the fibrillar plaques [22-24]. Based on the use of truncated peptides, the segment comprising amino acid residues 4-11 of the β -amyloid peptide was identified as essential to elicit activation of the classical complement pathway, and further investigations provided evidence for a critical role of Asp7 [25]. In keeping with these findings, it was later shown that, contrary to the wild-type full-length (1-42) β -amyloid peptide, the truncated peptide 12-42 and the double mutant (D7N, E11Q) do not yield C1 activation [9].

Further investigations at the molecular level led initially to the conclusion that interaction between C1q and the β -amyloid peptide involves a major binding site located at or near residues 14-26 of the C1q A chain, close to the N-terminal end of the collagen-like stalks [22]. The corresponding sequence segment (A-G-R-P-G-R-R-G-R-P-G-L-K) is highly positively charged and corresponds to the C1q region identified as the binding site for some of its nonimmune ligands such as C-reactive protein, serum amyloid P component, and DNA [26-28]. However, it should be emphasized that these experiments were all largely based on peptide inhibition, and that tetralysine was found to inhibit complement activation by β -amyloid fibrils as efficiently as peptide C1qA 14-26 [22, 29]. It cannot be excluded, therefore, that the highly basic segment 14-26 of the C1q A chain corresponds to a non specific binding site with low affinity for acidic compounds, including the β -amyloid peptide.

In sharp contrast with the above observations, subsequent studies based on C1q binding and C1 activation assays provided strong evidence that C1q recognizes β -amyloid fibrils through its C-terminal globular region [9]. Thus, whereas the C1q GR competed efficiently for binding of C1q to immobilized β -amyloid fibrils (Fig. 1), the collagen-like fragment of the protein had no

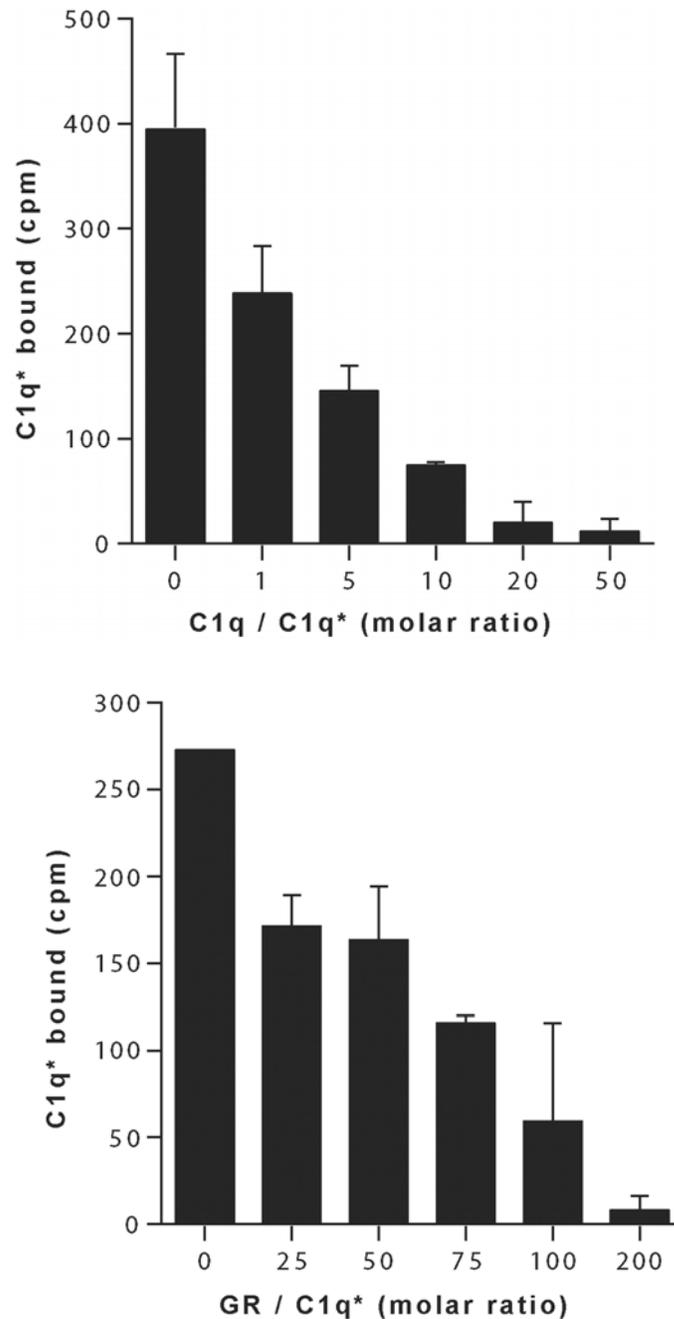


Figure 1. Binding of ^{125}I -labelled C1q to β amyloid fibrils: competition by intact C1q and the C1q globular domain. ^{125}I -labelled C1q was allowed to bind to microtiter wells coated with β 1-42 fibrils in the presence of increasing amounts of unlabelled C1q (A) or the C1q globular domain (B). From Tacnet-Delorme *et al.* [9].

significant inhibitory effect. Likewise, the GR inhibited C1 activation by β -amyloid fibrils. In addition, the C1qA 14-26 peptide had no effect on the interaction between C1q and β -amyloid fibrils, as assessed by binding and activation assays. Based on these findings, it was proposed that C1q binds to β -

amyloid fibrils through multivalent interaction with recognition sites located in its peripheral globular domains [9]. Consistent with this proposal, a recombinant protein comprising the B subunit of the C1q GR fused to maltose-binding protein was shown to bind in a dose-dependent and specific manner to immobilized β -amyloid fibrils [30].

3. Recognition of the pathological form of PrP

Transmissible spongiform encephalopathies are infectious neurodegenerative disorders characterized by the aggregation and accumulation in the central nervous system of a protein termed prion or PrP^{sc}, corresponding to an abnormal structural isoform of PrP^c, a glycoprotein expressed at the surface of neurons and other cells [31]. The C-terminal globular domain of PrP^c is attached to the membrane through a GPI anchor, whereas its flexible N-terminal region comprises 8-amino acid repeats with the ability to bind various divalent ions, including Cu²⁺ [32]. Although the prevalent hypothesis in prion pathogenesis is that PrP^{sc} is the infectious principle [33], it appears likely that its generation and/or propagation requires additional cellular or molecular cofactors. The hypothesis that complement may be involved is sustained by several reports indicating that proteins of the classical pathway, including C1q and C3, are present in the extracellular amyloid deposits characteristic of Creutzfeldt-Jakob disease [34, 35]. Moreover, C1q was shown to be one of the 19 proteins exhibiting increased synthesis in scrapie-infected brain tissues [36,37]. Further support for the implied role of complement in the pathogenesis of prion diseases arises from studies demonstrating that C1q-deficient mice and, to a lesser extent, C3-deficient or C3-depleted mice exhibit protection against experimental infection by limiting doses of PrP^{sc} [10, 38]. These data are consistent with a direct activation of the classical complement pathway by PrP^{sc}, resulting in increased localization of PrP^{sc} in lymphoid tissues at the early stages of infection.

To verify this hypothesis, surface plasmon resonance spectroscopy was recently used to test the ability of human C1q to recognize recombinant mouse PrP immobilized on a sensorchip surface [39]. In this configuration, C1q bound avidly to PrP, with a K_D of 5.4 nM. The C1q GR also bound to immobilized PrP, although with a higher K_D, due to a 45-fold decrease in k_{on}, and interaction was strongly enhanced by Cu²⁺ ions, with a 10-fold increase in overall binding in the presence of 10 μ M CuSO₄. In contrast with the above observations, surface plasmon resonance spectroscopy, gel filtration, and chemical cross-linking each failed to yield evidence for an interaction between soluble PrP and intact C1q or its GR. Comparative mapping of the antigenic reactivity of soluble and immobilized PrP towards monoclonal antibodies revealed that the immobilized form undergoes a conformational change in the sequence stretch 141-159 located in its C-terminal globular domain. In keeping with other reports [40, 41] these experiments have led to the proposal that PrP

undergoes structural modifications that mimic the conformational changes occurring during conversion to the pathological isoform, and that C1q represents a natural sensor of these changes [39].

4. Recognition of early apoptotic cells

Proper recognition and clearance of apoptotic cells is critical for many biological processes including development, tissue remodelling and maintenance of homeostasis. The rapid removal of unwanted autologous cells by phagocytes prevents the release of intracellular contents and is essential to reduce inappropriate inflammation and to avoid autoimmunity. The uptake of apoptotic cells involves a wide variety of phagocyte receptors and soluble bridging molecules [42] which bind these cells in response to “eat me” signals. Increasingly, C1q is being implicated in this process. Its involvement in apoptotic cell recognition and clearance *in vivo* has been demonstrated by knockout experiments [43, 44], and C1q deficiency has been clearly shown to be associated with systemic lupus erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases [45, 46]. *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 [44], but the mechanisms by which C1q recognizes ‘unwanted’ autologous cells remain elusive. In addition, it was shown that complement may serve as an opsonin for fragments of late apoptotic and necrotic cells [47]. Whereas the C1q binding site on apoptotic cells is still poorly documented, it was clearly demonstrated by immunofluorescence studies that C1q recognizes apoptotic cells through its GR [7]. In a recent study [48], it has been proposed that C1q senses nucleic acids rapidly exposed on the apoptotic cell surface. Other recent data have revealed a specific role for C1q in the biology of dendritic cells (DCs). Thus, immature DCs are an important C1q source, whereas maturation abrogates C1q production [49]. On the other hand, opsonization with C1q targets apoptotic cells to DCs [50].

Taken together, these findings provide a strong indication that C1q is a key player in the maintenance of immune tolerance. This prompted us to identify the apoptotic cell component(s) recognized by C1q at the early stages of apoptosis, when efficient removal prevents release of intracellular components into the surrounding medium [51]. HeLa cells were rendered apoptotic by UV-B irradiation and C1q binding was analysed by surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy, using immobilized C1q and cells as fluid-phase ligands. In this configuration, a 2.5-fold increase in the binding was observed when cells were irradiated for 2 h prior to analysis, indicating that early apoptosis induces a marked increase in C1q recognition. Further investigations by flow cytometric analysis provided evidence for the ability of the C1q GR to recognize apoptotic cells, and indicated that C1q binding proceeded in parallel with exposure of phosphatidylserine (PS) on the cell surface.

The interaction between C1q and PS was investigated by SPR, initially using phospholipid surfaces assembled on sensorchips and the intact C1q molecule or its GR as soluble ligands. Both C1q and its GR readily bound to PS-containing monolayers, but not to surfaces coated with phosphatidylcholine or phosphatidylethanolamine, providing evidence of the C1q binding specificity for PS. Further binding experiments indicated that most, if not all, of the C1q/PS interaction occurred through the phosphoserine moiety of PS, and the K_D of the C1q-phosphoserine interaction was estimated at 3.7×10^{-8} M. X-ray crystallographic analysis of a GR crystal soaked in a phosphoserine-containing solution revealed that the phosphoserine molecule is stabilized mainly by residues from two surface loops (108-111 and 126-129) of subunit C of the C1q GR. According to our current model of the C1q molecule [4], this site is located at the inner face of the C1q cone and oriented towards the target surface.

To test the relevance of these findings at the cellular level, we have investigated whether annexin V, an established ligand of the PS polar head group has the ability to compete for apoptotic cell recognition by C1q. 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. Confocal laser microscopy was also used to investigate the distribution of C1q and PS on early apoptotic HeLa cells, and indicated that most C1q molecules were distributed in membrane patches where they co-localized with PS (Fig. 2). Altogether these data indicate that PS, the canonical marker of apoptosis, is a major ligand recognized by C1q on the apoptotic cell surface. Given the known versatility of its recognition function, this suggests that C1q has the unique ability to sense different ligands which collectively might provide strong “eat me” signals. These observations shed a new light on the role of C1q as a major bridging molecule in apoptotic cell recognition and clearance [51].

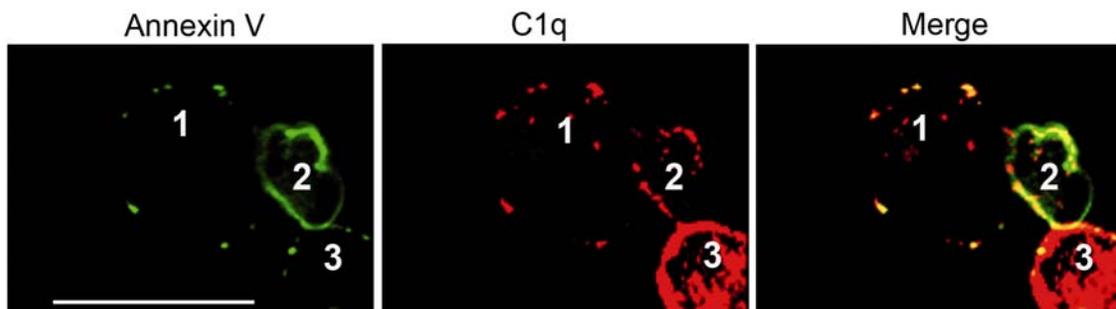


Figure 2. PS and C1q co-localize within membrane patches on early apoptotic HeLa cells. Cells irradiated with UV-B for 2 h were submitted to a double immunofluorescence labelling for PS exposure (green) and C1q binding (red). Three particular cells (1, 2 and 3) which expose PS and bind C1q to various extents, representative of the whole apoptotic cell population, are shown. The scale bar represents 20 μ m.

5. The lectin-like activity of C1q

Early studies have provided evidence for activation of C1 in human serum by a heterogeneous polysaccharide from tropical ant venom and by a smaller hydrolysis product derived from it [52, 53]. Further studies demonstrated that synthetic neutral di-, tri- and tetra-saccharides containing L-fucose, D-galactose and D-GlcNAc linked to the carrier 8-methoxycarbonyloctanol were able to mediate C1 activation through C1q binding [54]. It was reported more recently that C1q binds to an abundant urine glycoprotein, Tamm-Horsfall protein (THP), with high affinity (K_D in the nanomolar range) [55] and that THP inhibits activation of the classical pathway of human complement in a dose-dependent manner [56]. Removal of THP carbohydrates by glycosidases markedly reduced binding of the protein to C1q and abolished its ability to inhibit complement activation. That C1q has lectin-like activity is also substantiated by phylogenetic studies demonstrating that the orthologue of mammalian C1q in lamprey, the most primitive vertebrate, is a GlcNAc-binding lectin that plays an important role in innate immunity [57].

The carbohydrate binding ability of human C1q has been investigated recently using surface plasmon resonance spectroscopy [11]. C1q was found to bind to immobilized BSA-glycoconjugates (Fig. 3A), with K_D values of 1.0 nM for Gal-BSA, 5.9 nM for GlcNAc-BSA, and 2.6 nM for GalNAc-BSA. The isolated C1q GR also bound to the immobilized glycoconjugates (Fig. 3B), although with higher K_D values (51 and 822 nM for Gal-BSA and GlcNAc-BSA, respectively), due to decreased k_{on} values, the k_{off} values remaining essentially unchanged. This observation suggests that the interaction of the hexameric C1q molecule with carbohydrates involves simultaneous engagement of several globular domains, thus strengthening binding through increased avidity. The C1q-carbohydrate interaction was also observed in the reverse configuration, *i.e.* using glycoconjugates as soluble ligands and immobilized C1q (Fig. 3C), and K_D values of 139 and 370 nM were obtained for GlcNAc-BSA and GalNAc-BSA, respectively.

Binding of C1q to immobilized GlcNAc-BSA and Gal-BSA could be partially inhibited by hexoses (GlcNAc, D-Gal, D-fucose, and maltose) and by pentoses (L-ribose, L-arabinose, and D-ribose) with inhibition values of 35-50% inhibition at a concentration of 100 mM. Deoxy D-ribose was the most efficient competitor and yielded 80% inhibition under these conditions. Since the latter is the sugar constituent of DNA, a known ligand of C1q [58], it is tempting to hypothesize that C1q may recognize the pentose units of DNA, as recently proposed for SP-D, an oligomeric lectin involved in innate immune recognition [59]. Binding of C1q to DNA has been reported to involve the globular region of the protein [58], but also its collagen-like region [27, 60].

The lectin-like activity of C1q may endow this protein with additional means to recognize pathogens or altered self. Interestingly, some ligands identified so far

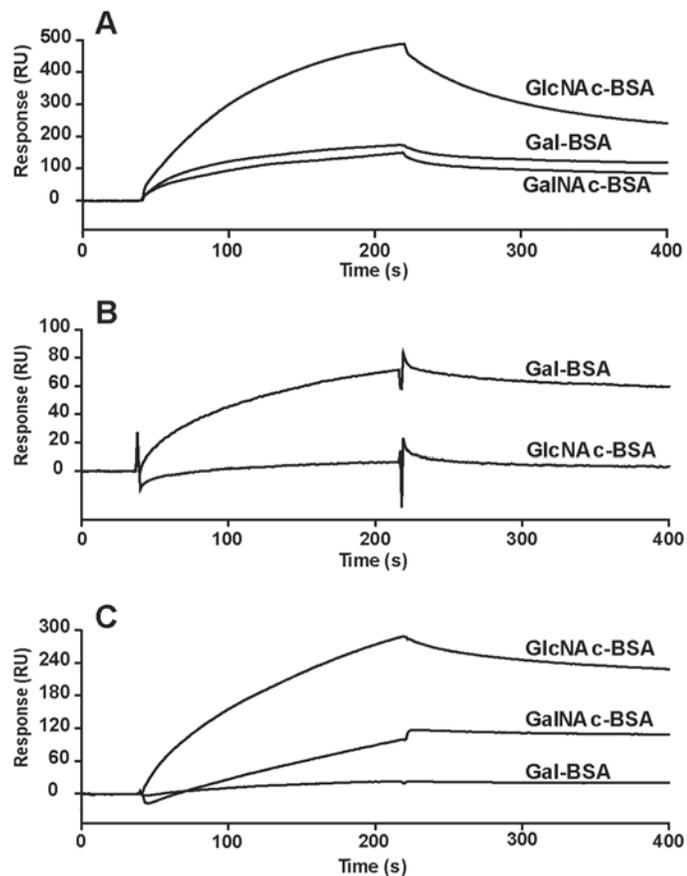


Figure 3. Analysis of C1q-carbohydrate interaction by surface plasmon resonance spectroscopy. BSA glycoconjugates were immobilized onto the carboxymethylated dextran surface of a CM5 sensorchip using the amine coupling chemistry. Binding of human C1q (A) and of its globular domain (B) was measured over 5,700-6,500 resonance units (RU) of immobilized glycoconjugates. (C) C1q (19,000 RU) was covalently immobilized on a CM5 sensorchip and binding of the glycoconjugates was measured as in (A).

identified so far such as heparin [61], DNA and fucoidan [60], contain both charge and carbohydrate patterns, and are therefore potential targets for the lectin-like activity of C1q. However, the fine specificity of C1q for carbohydrates remains to be determined at the molecular and structural levels.

6. X-ray structure of the C1q recognition domain

C1q recognizes a broad range of ligands via its heterotrimeric GR [3, 62]. The fact that many polyionic structures are recognized by C1q [5] has led to the suggestion that it may function as a charge pattern recognition molecule. Nevertheless, how this protein manages to specifically bind such a large number of diverse nonself and altered self ligands remains an intriguing question. In order to get insights into the structural basis of this recognition

versatility, we have determined the crystal structure of the C1q GR [12]. The structure shows that the domain has a compact, almost spherical heterotrimeric structure with a pseudo 3-fold symmetry (Fig. 4A). The three subunits are tightly packed together in the clockwise order A, B, C when viewed from the top (Figs. 4A and 4C), their N and C termini emerging at the base of the trimer (Fig. 4B). Each subunit structure shows the typical gC1q/tumor necrosis factor topology [3], with a jellyroll consisting of a 10-stranded β sandwich made up of two five-stranded antiparallel β sheets [12]. The pseudo three-fold symmetry seen at the framework level (Fig. 4A) disappears when surface patterns are considered (Fig. 4C) since the three subunits exhibit striking differences in their surface distribution of charged and hydrophobic residues [12]. For instance, subunits A and C show a combination of basic and acidic residues scattered on their external face, whereas subunit B shows a predominance of positive charges, including a continuous patch of arginine residues (B101, B114, B129). Thus, each subunit exposes different patches of charged or hydrophobic residues and, because of the tight subunit interaction, the combination of these different patches can provide interactions with a wide variety of unrelated targets. Although there are technical difficulties in expressing recombinant heterotrimeric GR and in obtaining crystals of GR-ligand complexes, there are sufficient data to suggest that binding sites can be formed in several ways depending on the particular features of the ligand. For instance, the C1q molecule can provide multivalent binding through the apex of its GR to the top of a cluster of flat ligands lying on a surface. It can also bind through lateral interactions with a bulky surface-bound ligand such as an IgG molecule, or through the inner part of its cone to bulges on a target surface. One of these possible recognition modes is illustrated by C-reactive protein, an acute phase protein that binds to the phosphocholine groups of membrane phospholipids and is, in turn, recognized by C1q [63]. In the interaction model proposed on the basis of available structural and mutagenesis data [12, 64, 65], the apex of the GR, which is predominantly basic, is accommodated by the negatively charged central pore of C-reactive protein, the interaction involving each of the three C1q subunits (Figs. 4E and 4F). In contrast, the model proposed for the interaction with IgG b12, a human IgG1 molecule, is an example of a recognition mediated by a single GR subunit (Fig. 4G). Based on the X-ray structure of IgG b12 [66] and available information about the C1q-IgG interaction [67-69], the model features binding of the equatorial region of subunit B of C1q at the Fab/Fc interface, implicating the above mentioned arginine residues B114 and B129 [12]. This model raises the interesting possibility that C1q binds not only to the Fc domain but also to additional sites in the Fab arm, underscoring the possible role of the hinge region of IgG as a limiting factor of C1q recognition [70, 71]. Given the location of the C1q B module on the external part of the molecule (Fig. 4G), this model appears

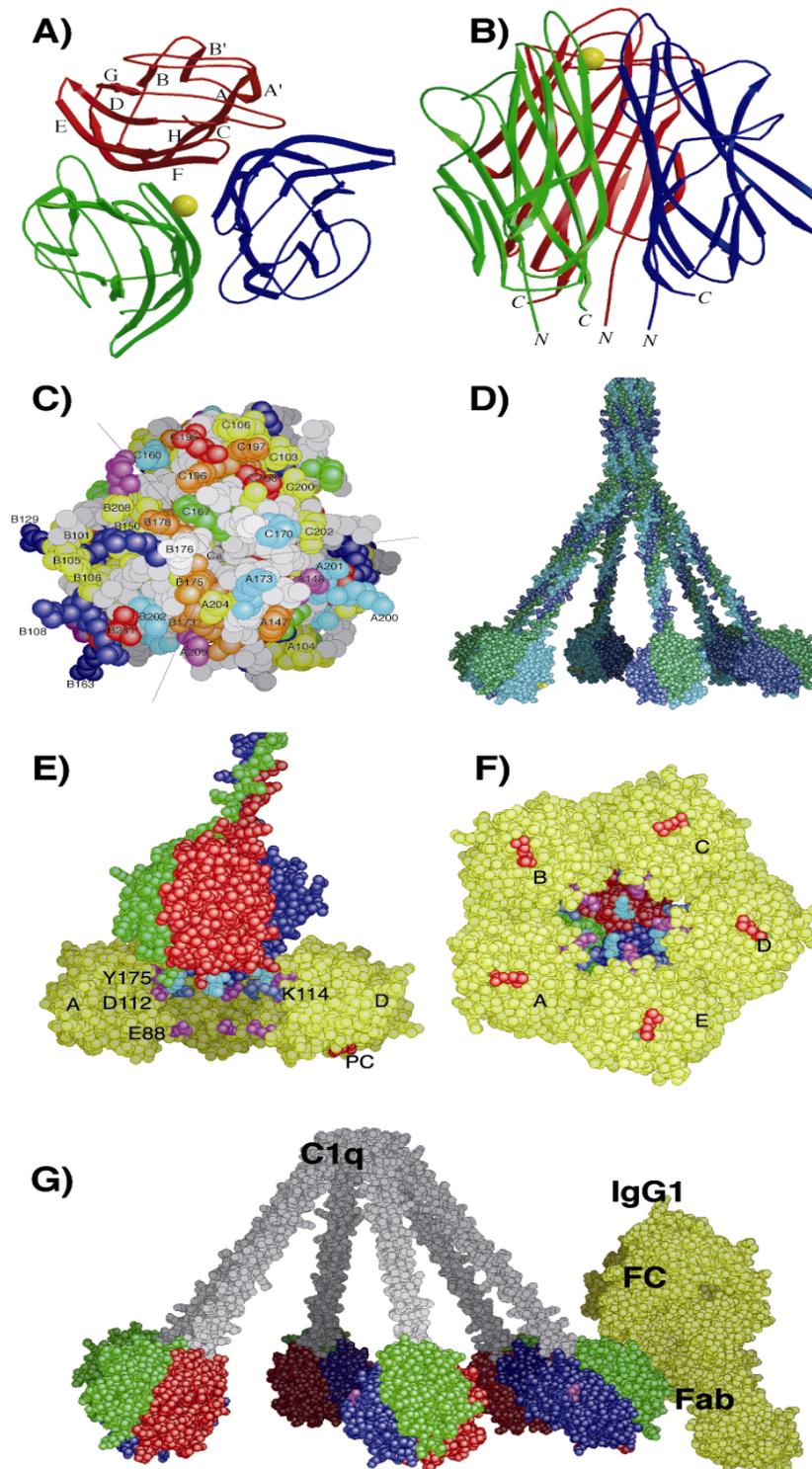


Figure 4. Structural basis of the versatile recognition function of C1q. (A) Top view, and (B) side view of the structure of the heterotrimeric C1q globular region (GR) (ribbon representation). Subunits A, B and C are shown in blue, green and red, respectively. The β -strands are labelled according to the gC1q/tumor necrosis factor nomenclature and the Ca^{2+} ion located at the top of the structure is represented as a golden sphere. *N* and *C*

Figure 4. Legend continued

indicate the N- and C-terminal ends of each subunit. (C) Top view of the C1q GR, showing the different surface patterns in the three subunits, as illustrated by the distribution of basic (lysines in cyan, arginines in blue, histidines in green), acidic (glutamic and aspartic acids in magenta and red, respectively), hydrophobic (yellow), and aromatic (orange) residues. The lines indicate the approximate module boundaries. (D) Three-dimensional structural model of human C1q [4, 12]. Subunits A, B and C are shown in blue, green and cyan, respectively. The yellow colour on the inner side of the C1q cone marks the position of the proposed phosphoserine binding site (Arg111). (E) Side view, and (F) bottom view of a model of the C1q-C-reactive protein interaction. Colour coding for the C1q subunits is as in (A, B). A-E designate the C-reactive protein protomers as described by Shrive *et al* [72]. Protomers B and C have been removed for clarity in (E). The lysines at the GR apex (A173, A200, A201, C170) and Tyrosine B175 are in light blue. Color coding for C-reactive protein mutations [65] is as follows: impaired complement activation after mutation (E88, D112, Y175): magenta; enhanced complement activation after mutation (K114): blue. The phosphocholine (PC) ligand is in red, and the neighbouring Ca^{2+} ion is in green. (G) Model of the interaction between C1q and IgG1 b12. The IgG Fc domain and Fab arms are indicated. Adapted from Gaboriaud *et al.* [12].

appears particularly well adapted to the recognition of IgG molecules within an immune complex network. An alternative recognition mode involving the inner face of subunit C has been postulated in the case of apoptotic cell recognition, as mentioned above (Fig. 4D).

One of the most fascinating aspects of the C1q molecule arises from the combination of its multimeric structure and the ability of its heterotrimeric GR to sense a wide variety of molecular motifs. This double characteristic is probably unique among innate immunity pattern recognition molecules, which, for the most part, are highly specific molecules recognizing a single type of ligand. This particular feature possibly endows C1q with the ability to bind in a multivalent manner different danger signals on the same biological target surface, a property that may be determinant in the discrimination between host cells and altered self or nonself.

References

1. Sellar, G.C., Blake, D.J. and Reid, K.B.M. 1991, *Biochem. J.*, 274, 481
2. Kishore, U. and Reid, K.B.M. 2000, *Immunopharmacology*, 49, 159
3. Kishore, U., Gaboriaud, C., Waters, P., Shrive, A.K., Greenhough, T.J., Reid, K.B., Sim, R.B. and Arlaud, G.J. 2004, *Trends Immunol.*, 25, 551
4. Gaboriaud, C., Thielens, N.M., Gregory, L.A., Rossi, V., Fontecilla-Camps, J.C. and Arlaud, G.J. 2004, *Trends Immunol.*, 25, 368
5. Cooper, N.R. 1985, *Adv. Immunol.*, 37, 151
6. Storrs, S.B., Kolb, W.P., Pinckard, R.N. and Olson, M.S. 1981, *J. Biol. Chem.*, 256, 10924

7. Navratil, J.S., Watkins, S.C., Wisnieski, J.J. and Ahearn, J.M. 2001, *J. Immunol.*, 166, 3231
8. Rogers, J., Cooper, N.R., Webster, S., Schultz, J., McGeer, P.L., Styren, S.D., Civin, W.H., Brachova, L., Bradt, B., Ward, P. and Lieberburg, I. 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 10016
9. Tacnet-Delorme, P., Chevallier, S. and Arlaud, G.J. 2001, *J. Immunol.*, 167, 6374
10. Mabbott, N.A., Bruce, M.E., Botto, M., Walport, M.J. and Pepys, M.B. 2001, *Nat. Med.*, 7, 485
11. Thielens, N.M., Tacnet-Delorme, P. and Arlaud, G.J. 2006, *Mol. Immunol.*, 43, 122 (abstract)
12. 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
13. Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grezeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. 1987, *Nature*, 325, 733
14. Selkoe, D.J. 2001, *Neuron*, 6, 487
15. Yankner, B.A., Duffy, L.K. and Kirschner, D.A. 1990, *Science*, 250, 279
16. Koh, J.Y., Yang, L.L. and Cotman, C.W. 1990, *Brain Res.*, 533, 315
17. Levi-Strauss, M. and Mallat, M. 1987, *J. Immunol.*, 139, 2361
18. Morgan, B.P. and Gasque, P. 1996, *Immunol. Today*, 17, 461
19. Eikelenboom, P. and Stam, F.C. 1982, *Acta Neuropathol.*, 57, 329
20. Gasque, P., Dean, Y.D., McGreal, E.P., VanBeek, J. and Morgan, B.P. 2000, *Immunopharmacology*, 49, 171
21. Afagh, A., Cummings, B.J., Cribbs, D.H., Cotman, C.W. and Tenner, A.J. 1996, *Exp. Neurol.*, 138, 22
22. Jiang, H., Burdick, D., Glabe, C.G., Cotman, C.W. and Tenner, A.J. 1994, *J. Immunol.*, 152, 5050
23. Webster, S., Glabe, C. and Rogers, J. 1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 217, 869
24. Webster, S., Bonnell, B. and Rogers, J. 1997, *Am. J. Pathol.*, 150, 1531
25. Velazquez, P., Cribbs, D.H., Poulos, T.L. and Tenner, A.J. 1997, *Nat. Med.*, 3, 77
26. Jiang, H., Robey, F.A. and Gewurz, H. 1992, *J. Exp. Med.*, 175, 1373
27. Jiang, H., Cooper, B., Robey, F.A. and Gewurz, H. 1992, *J. Biol. Chem.*, 267, 25597
28. Ying, S.-C., Gewurz, A.T., Jiang, H. and Gewurz, H. 1993, *J. Immunol.*, 150, 169
29. Chen, S., Frederickson, R.C.A. and Brunden, K.R. 1996, *Neurobiol. Aging*, 17, 781
30. Kishore, U., Gupta, S.K., Perdikoulis, M.V., Kojouharova, M.S., Urban, B.C. and Reid, K.B.M. 2003, *J. Immunol.*, 171, 812
31. Aguzzi, A. and Polymenidou, M. 2004, *Cell*, 116, 313
32. Deignan, M.E., Prior, M., Stuart, L.E., Comerford, E.J. and McMahon, H.E. 2004, *J. Alzheimers Dis.*, 6, 283
33. Prusiner, S.B. 1982, *Science*, 216, 136
34. Ishii, T., Haga, S., Yagishita, S. and Tateishi, J. 1984, *Appl. Pathol.*, 2, 370
35. Kovacs, G.G., Gasque, P., Strobel, T., Lindeck-Pozza, E., Strohschneider, M., Ironside, J.W., Budka, H. and Guentchev, M. 2004, *Neurobiol. Dis.*, 15, 21
36. Dandoy-Dron, F., Guillo, F., Benboudjema, L., Deslys, J.P., Lasmezas, C., Dormont, D., Tovey, M.G. and Dron, M. 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 7691

37. Riemer, C., Queck, I., Simon, D., Kurth, R. and Baier, M. 2000, *J. Virol.*, 74, 10245
38. 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, *Nat. Med.*, 7, 488
39. Blanquet-Grossard, F., Thielens, N.M., Vendrely, C., Jamin, M. and Arlaud, G.J. 2005, *Biochemistry*, 44, 4349
40. Leclerc, E., Peretz, D., Ball, H., Sakurai, H., Legname, G., Serban, A., Prusiner, S.B., Burton, D.R. and Williamson, R.A. 2001, *EMBO J.*, 20, 1547
41. Paramithiotis, E., Pinard, M., Lawton, T., LaBoissiere, S., Leathers, V.L., Zou, W.Q., Estey, L.A., Lamontagne, J., Lehto, M.T., Kondejewski, L.H., Francoeur, G.P., Papadopoulos, M., Haghghat, A., Spatz, S.J., Head, M., Will, R., Ironside, J., O'Rourke, K., Tonelli, Q., Ledebur, H.C., Chakrabarty, A. and Cashman, N.R. 2003, *Nat. Med.*, 9, 893
42. Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C. and Haslett, C. 2002, *Nat. Rev. Immunol.*, 2, 965
43. Botto, M. 1998, *Exp. Clin. Immunogenet.*, 15, 231
44. Taylor, P.R., Carugati, A., Fadok, V.A., Cook, H.T., Andrews, M., Carroll, M.C., Savill, J.S., Henson, P.M., Botto, M. and Walport, M.J. 2000, *J. Exp. Med.*, 192, 359
45. Carroll, M. C. 1998, *Nat. Genet.*, 19, 3
46. Tsao, B. P. 1998, *Lupus*, 7, 585
47. Gaip, U.S., Kuenkele, S., Voll, R.E., Beyer, T.D., Kolowos, W., Heyder, P., Kalden, J.R. and Herrmann, M. 2001, *Cell. Death Differ.*, 8, 327
48. Elward, K., Griffiths, M., Mizuno, M., Harris, C.L., Neal, J.W., Morgan, B.P. and Gasque, P. 2005, *J. Biol. Chem.*, 280, 36342
49. Castellano, G., Woltman, A.M., Nauta, A.J., Roos, A., Trouw, L.A., Seelen, M.A., Schena, F.P., Daha, M.R. and van Kooten, C. 2004, *Blood*, 103, 3813
50. Nauta, A.J., Castellano, G., Xu, W., Woltman, A.M., Borrias, M.C., Daha, M.R., van Kooten, C. and Roos A. 2004, *J. Immunol.*, 173, 3044
51. Païdassi, H., Tacnet, P., Ghebrehiwet, B., Arlaud, G.J. and Frchet, P. 2005, *Mol. Immunol.*, 43, 136 (abstract)
52. Schultz, D.R., Arnold, P.I., Wu, M.-C., Lo, T.M., Volanakis, J.E. and Loos, M. 1979, *Mol. Immunol.*, 16, 253
53. Dieminger, L., Schultz, D.R. and Arnold, P.I. 1979, *J. Immunol.*, 123, 2201
54. Schultz, D.R. and Arnold, P.I. 1981, *J. Immunol.*, 126, 1994
55. Rhodes, D.C. 2002, *Immunol. Cell. Biol.*, 80, 558
56. Rhodes, D.C. 2006, *Immunol. Cell. Biol.*, 84, 357
57. Matsushita, M., Matsushita, A., Endo, Y., Nakata, M., Kojima, N., Mizuochi, T. and Fujita, T. 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 10127
58. Van Schravendijk, M.R. and Dwek, R.A. 1982, *Mol. Immunol.*, 19, 1179
59. Palaniyar, N., Nadesalingam, J., Clark, H., Shih, M.J., Dodds, A.W. and Reid, K.B. 2004, *J. Biol. Chem.*, 279, 32728
60. Tissot, B., Daniel, R. and Place, C. 2003, *Eur. J. Biochem.*, 270, 4714
61. Almeda, S., Rosenberg, R.D. and Bing, D.H. 1983, *J. Biol. Chem.*, 258, 785
62. Kishore, U., Ghai, R., Greenhough, T.J., Shrive, A.K., Bonifati, D.M., Gadjeva, M.G., Waters, P., Kojouharova, M.S., Chakraborty, T. and Agrawal, A. 2004, *Immunol. Lett.*, 95, 113
63. Szalai, A.J., Agrawal, A., Greenhough, T.J. and Volanakis, J.E. 1999, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37, 265

64. Thompson, D., Pepys, M.B. and Wood, S.P. 1999, *Structure*, 7, 169
65. Agrawal, A., Shrive, A.K., Greenhough, T.J. and Volanakis, J.E. 2001, *J. Immunol.*, 166, 3998
66. Saphire, E.O., Parren, P.W., Pantophlet, R., Zwick, M.B., Morris, G.M., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Stanfield, R.L., Burton, D.R. and Wilson, I.A. 2001, *Science*, 293, 1155
67. Marques, G., Anton, L. C., Barrio, E., Sanchez, A., Ruiz, S., Gavilanes, F. and Vivanco, F. 1993, *J. Biol. Chem.*, 268, 10393
68. Idusogie, E.E., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Wong, P.Y., Ultsch, M., Meng, Y.G. and Mulkerrin, M.G. 2000, *J. Immunol.*, 164, 4178
69. Idusogie, E.E., Wong, P.Y., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Ultsch, M. and Mulkerrin, M.G. 2001, *J. Immunol.*, 166, 2571
70. Hezareh, M., Hessel, A.J., Jensen, R.C., van de Winkel, J.G. and Parren, P.W. 2001, *J. Virol.*, 75, 12161
71. Dall'Acqua, W.F., Cook, K.E., Damschroder, M.M., Woods, R.M. and Wu, H. 2006, *J. Immunol.*, 177, 1129
72. Shrive, A.K., Cheetham, G.M., Holden, D., Myles, D.A., Turnell, W.G., Volanakis, J.E., Pepys, M.B., Bloomer, A.C. and Greenhough, T.J. 1996, *Nat. Struct. Biol.*, 3, 346

The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition

**Helena Païdassi, Pascale Tacnet-Delorme, Gérard J. Arlaud, Nicole M. Thielens* and
Philippe Frachet^{§*}**

**Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre
Ebel (UMR 5075), 41 rue J. Horowitz, F-38027 Grenoble, CEA, CNRS, Université
Joseph Fourier.**

*Both authors contributed equally to this work.

[§]Corresponding author:

**Dr. Philippe Frachet, Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, Institut de Biologie
Structurale Jean-Pierre Ebel, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France.
Tel.: +33 4 38 78 41 37; Fax: +33 4 38 78 54 94.**

E-mail : philippe.frachet@ibs.fr

Keywords: complement/lectin activity/DNA/apoptotic cell recognition

Abbreviations: EMSA, electrophoretic mobility shift assay; GlcNAc, N-acetyl glucosamine;
GalNAc, N-acetyl galactosamine; GR, C1q globular region. SPR, surface plasmon resonance.

Abstract:

C1q, the binding subunit of the C1 complex of complement, is an archetypal pattern recognition molecule known for its striking ability to recognize a wide variety of targets ranging from pathogenic non self to altered self. DNA is one of the C1q ligands but the precise region of C1q and the DNA motifs that support interaction have not been characterized yet. Here, we report for the first time that the peripheral globular region of the C1q molecule displays a lectin-like activity which contributes to DNA binding through interaction with its deoxy D-ribose moiety and may participate in apoptotic cells recognition.

1. Introduction

C1q is well characterized for its role as the recognition protein of the C1 complex and its ability to trigger activation of the classical complement pathway [1,2]. Over the past years, there has been increasing evidence that, owing to its heterotrimeric nature and its oligomeric structure, this protein plays a crucial role in the detection and scavenging of a wide variety of potentially noxious substances ranging from pathogenic non self to altered self, such as β -amyloid fibrils, the pathological form of the prion protein, necrotic and apoptotic cells, or modified forms of the low-density lipoprotein [3-8].

It is well documented that the complement activating function of C1q is mediated through binding of its globular peripheral regions to targets (pathogen surfaces and IgG- or IgM-containing immune complexes) [1,2,9]. The nature of the C1q binding sites and the mechanisms involved in the recognition of altered self structures are still debated even though the heterotrimeric structure of its globular regions (GRs) is likely a key to the versatility of the C1q recognition properties [10]. The GRs are involved in the sensing of “eat me” signals exposed at the apoptotic cell surface [7], and it was recently demonstrated that the polar head of phosphatidylserine (PS) is one of the C1q GR ligands [11]. Calreticulin, another known C1q ligand, has been proposed recently to play a central role in apoptotic cell clearance [12], but how C1q is involved in this process remains to be fully elucidated at the molecular level. It has also been reported by Elward *et al.* [13] that C1q recognizes self DNA accessible early on apoptotic cells, before PS becomes exposed. However, the precise region of C1q involved in DNA binding is a matter of controversy, since both the collagen-like region and the GR have been implicated [14-18]. On the other hand, the DNA motifs that support interaction with C1q have not been characterized yet. Nevertheless, several observations support the

hypothesis that C1q may exhibit carbohydrate binding ability, suggesting that it could recognize DNA through its sugar moiety. Thus, it was shown early that synthetic polysaccharides are able to mediate C1 activation through C1q binding [19]. As reported more recently, C1q binds to an abundant urine glycoprotein (Tam-Horsfall protein) and recognition of this protein by C1q is markedly reduced after removal of its carbohydrates by glycosidases [20,21]. Phylogenetic studies also indicate that the C1q orthologue in lamprey, the most primitive vertebrate, is a GlcNAc binding lectin that plays an important role in innate immunity [22].

The purpose of the present study was to further investigate the lectin-like activity of human C1q using surface plasmon resonance spectroscopy as well as its possible implications in DNA and apoptotic cell recognition.

2. Materials and methods

2.1 Proteins and carbohydrates

C1q was purified from human serum and its GRs were prepared and quantified as described previously [5,23]. Carbohydrates and DNase were obtained from Sigma-Aldrich. BSA glycoconjugates were obtained from Dextra laboratories. The concentrations of GlcNAc-BSA and GalNAc-BSA were determined using Mr values of 84,488 and 79,177, respectively.

2.2 Cells

HeLa cells (ATCC # CCL-2) were cultivated in Glutamax D-MEM medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% (v/v) foetal calf serum, 2.5 U/ml penicillin and 2.5 µg/ml streptomycin (Invitrogen). Apoptosis was induced and quantified as described previously [11]. Briefly, 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 D-MEM medium. Cells were then incubated under 5% CO₂ at 37°C for 2 h.

2.3 Surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy

Analyses were carried out on a BIAcore 3000 or a BIAcore X instrument (BIAcore, GE Healthcare).

Analyses on C1q- or BSA glycoconjugates-coated surfaces: The running buffer for C1q and BSA glycoconjugates immobilization was 145 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Hepes, pH 7.4. C1q and BSA glycoconjugates were diluted to 50 µg/ml in 10 mM Na acetate, pH 5.0 and to 25 µg/ml in 10 mM Na acetate, pH 4.0, respectively, and immobilized onto a CM5 sensor chip (GE Healthcare) using the BIAcore amine coupling kit. Binding of glycoconjugates to immobilized C1q (19,000 RU) and of C1q or its GR to immobilized glycoconjugates (5,700-6,500 RU) was measured at a flow rate of 20 µl/min in 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 20 mM Hepes, pH 7.4 containing 0.005% surfactant P20. Surfaces were regenerated by 3 injections of 10 µl of 2 M NaCl, 40 mM EDTA. The specific binding signal shown was obtained by subtracting the background signal, routinely obtained by injection of the sample over a surface with immobilized BSA. 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 (GE Healthcare). All data presented were obtained with a statistic *chi* 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}). For competition analyses, binding of C1q (10 nM) to immobilized GlcNAc-BSA and Gal-BSA (6,500 RU) was recorded in the running buffer containing 100 mM competitors, at a flow rate of 20 µl/min.

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 µl/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. Both untreated control cells and apoptotic cells 2 h post-irradiation were incubated with increasing concentrations of DNase for 30 min at room temperature before injection over immobilized C1q.

2.4 Electrophoretic mobility shift assay

DNA-protein complexes were prepared for gel shift assay as described by Pananiyar *et al.* [16] with minor modifications. One hundred ng of the Eco RI-digested Bluescript DNA plasmid (2950 bp) (Stratagene) were incubated with C1q or its GR for 60 min at 37°C in 20 µl reaction buffer containing 20 mM Tris-HCl, 145 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ (pH 7.4). The DNA-protein complexes were analysed by agarose (1% w/v) gel electrophoresis in 40 mM Tris-acetate, pH 8 in the absence of EDTA and visualized in the presence of SYBR safe (Invitrogen) under UV light.

3. Results

3.1 C1q interacts with neutral carbohydrates with high affinity through its globular region.

The carbohydrate binding ability of human C1q was investigated by surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy using immobilized BSA glycoconjugates. Control experiments showed that neither C1q nor its GRs bound to a significant extent to unmodified BSA used as the immobilized ligand. In contrast, C1q was found to bind to immobilized Gal-BSA, GlcNAc-BSA and GalNAc-BSA (Fig.1A) with K_D values of 1.0, 5.9 and 2.6 nM, respectively (Table I). We next tested the ability of the GR to interact with the immobilized glycoconjugates. As illustrated in Fig. 1B, the isolated C1q GR also bound to Gal-BSA and GlcNAc-BSA. The association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) rate constants, and the resulting K_D were determined (Table 1) and compared to those obtained for whole C1q. Whereas the k_{off} values were in the same range in both cases, C1q exhibited significantly higher k_{on} values than

its GR. As a result, the K_D values of the interactions were higher for the GR (51 and 822 nM for Gal-BSA and GlcNAc-BSA, respectively) compared to intact C1q. This observation suggests that the interaction of the hexameric C1q molecule with carbohydrates involves simultaneous engagement of several globular domains, hence strengthening binding through an avidity phenomenon. The C1q-carbohydrate interaction was also observed in the reverse configuration, *i.e.* using BSA glycoconjugates as soluble ligands and immobilized C1q (Fig. 1C). In this case, K_D values of 139 nM and 370 nM were determined for GlcNAc-BSA and GalNAc-BSA, respectively.

3.2 Hexoses and pentoses compete for the C1q-carbohydrate interaction.

To gain further insights into the C1q-glycoconjugates interaction we tested the ability of a panel of soluble hexoses and pentoses to compete for C1q binding to immobilized GlcNAc-BSA and Gal-BSA, as measured by SPR spectroscopy. As illustrated in Fig. 2, inhibition values ranging from 35 to 80% were observed using four different hexoses (GlcNAc, D-galactose, D-fucose, and maltose) and three pentoses (L-ribose, L-arabinose, and D-ribose), each at a concentration of 100 nM. Interestingly, each of these carbohydrates inhibited interaction with GlcNAc-BSA and Gal-BSA to similar extents. As expected from our initial SPR measurements, GlcNAc and D-Gal inhibited C1q binding to GlcNAc-BSA and Gal-BSA (Fig. 2A). No inhibition was observed with mannose, in keeping with other observations that C1q or its GR did not interact significantly with mannose-BSA immobilized on a sensor chip (data not shown). Interestingly, deoxy D-ribose was the most efficient competitor, yielding over 80% inhibition at a concentration of 100 nM (Fig. 2B). Since deoxy D-ribose is the sugar component of DNA, a known ligand of C1q [18], it is tempting to hypothesize that C1q recognizes DNA through its pentose units. The observation that deoxy D-ribose was a much better competitor than deoxy L-ribose (Fig. 2B) lends further credit to this hypothesis, considering that nucleic acids only contain the D-form of pentoses.

3.3 Binding of C1q GR to DNA is detected by EMSA

The above observations prompted us to further investigate the ability of the C1q GR to interact with DNA. An electrophoretic mobility shift assay was used for this purpose, as previously described by Palaniyar *et al.* for collectins SPA and SPD [16]. C1q or its GR were incubated with a linear DNA plasmid and formation of DNA-protein complexes was assessed by agarose gel electrophoresis. As depicted in Fig. 3A, both intact C1q and its GR shifted DNA migration, indicating complex formation. All DNA was complexed in the presence of 32 nM C1q. In contrast, only part of the DNA was shifted using 6.5 μ M GR, and a concentration of 13 μ M was required to reach nearly complete complex formation. This latter observation is fully consistent with the fact that, in contrast with the native hexameric C1q molecule, the C1q GR is monomeric and loses binding avidity.

To investigate whether GR-carbohydrate interactions were involved in DNA recognition by C1q, we tested the ability of soluble deoxy D-ribose to inhibit formation of DNA-protein complexes. As shown in Fig. 3B, the presence of a large excess (100 mM) of deoxy D-ribose partially impaired formation of DNA-GR complexes, as demonstrated by the increased intensity of the band corresponding to uncomplexed DNA.

3.4 DNA is involved in C1q binding to apoptotic cell surface

Taken together with previous data indicating that nucleic acids are exposed at the cell surface at early stages of apoptosis [13], our results strongly suggested that the ability of C1q to recognize apoptotic cells may involve, at least in part, its lectin-like activity towards the sugar moiety of DNA. To assess the role of cell surface DNA in apoptotic cell recognition by C1q we used a SPR-based assay developed in a recent study [11]. HeLa cells were rendered apoptotic by UV-B irradiation, and then both control cells and early apoptotic cells were allowed to bind immobilized C1q with or without prior incubation with 400 Kunitz/ml DNase

(Fig. 4A). Whereas DNase treatment had no significant effect on the capture of viable cells by C1q (Fig. 4A, C), it inhibited recognition of early apoptotic cells (Fig. 4B). Inhibition was dose-dependent (Fig. 4C), decreasing C1q binding by >40% at a DNase concentration of 400 Kunitz/ml. This result provided direct evidence of the implication of DNA as a target for C1q on the apoptotic cell surface, shedding new light on the biological implication of the lectin-like activity of C1q.

4. Conclusion

This study provides evidence for a lectin-like activity of human C1q contributed by the globular region of the molecule. This novel function may be physiologically relevant as it may endow this protein with additional means to recognize pathogens as well as apoptotic cells through interactions with carbohydrates and/or DNA.

This conclusion is supported by the following observations: (i) C1q recognizes BSA glycoconjugates specifically and avidly, with K_D values in the nM range; (ii) this interaction is also observed using the isolated C1q GR; (iii) data from competition assays indicate that C1q binds preferentially to deoxy D-ribose, a DNA component. (iv) The C1q GR binds to DNA, as shown by an electrophoretic mobility shift assay; (v) DNase treatment inhibits the capture of apoptotic cells by C1q in a dose-dependent manner. Moreover, this study adds new insights into the nature of C1q-DNA binding. We demonstrate for the first time that the peripheral globular region of the C1q molecule is directly involved in DNA binding through its lectin activity. Although the C1q orthologue in lamprey which may be considered as the ancestor of vertebrate C1q, is known as a GlcNAc binding lectin [22], this function had not yet been described for mammalian C1q. Thus, it appears that the traditional portrait of C1q, considered to be a non-lectin collagen defence molecule of the immune system, as opposed to the collectins SPA, SPD and mannose-binding lectin (MBL), should be revised. This newly demonstrated lectin activity broadens the recognition spectrum of the C1q molecule and

emphasizes its particular ability to recognize targets by “tethering” various ligands and receptors. One of the best illustrations is the role of C1q in apoptotic cells recognition and clearance. There is indeed growing evidence that the cell death signature is composed of multiple molecules such as DNA, calreticulin, phosphatidylserine and carbohydrates [11-13,18,24,25]. Even if some of them are newly exposed on the cell surface as a result of apoptosis, it is unlikely that they might be perceived individually as a harmful signal. By its capacity to bind several of these motifs, C1q would be a key protein acting as a sensor for these potential “eat me” signals and then triggering a specific immune machinery.

References

- [1] Kishore, U., Gaboriaud, C., Waters, P., Shrive, A.K., Greenhough, T.J., Reid, K.B., Sim, R.B. and Arlaud, G.J. (2004) C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends Immunol.* 25, 551-561.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.

- [5] 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.
- [6] Blanquet-Grossard, F., Thielens, N.M., Vendrely, C., Jamin, M. and Arlaud, G.J. (2005) Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry* 44, 4349-4356.
- [7] 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.
- [8] Biro, A., Thielens, N.M., Cervenak, L., Prohaszka, Z., Fust, G. and Arlaud, G.J. (2007) Modified low density lipoproteins differentially bind and activate the C1 complex of complement. *Mol. Immunol.* 44, 1169-1177.
- [9] Roumenina, L., Bureeva, S., Kantardjiev, A., Karlinsky, D., Andia-Pravdivy, J.E., Sim, R., Kaplun, A., Popov, M., Kishore, U. and Atanasov, B. (2007) Complement C1q-target proteins recognition is inhibited by electric moment effectors. *J. Mol. Recognit.* 20, 405-415.
- [10] 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.
- [11] Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Garlatti, V., Darnault, C., Ghebrehwet, 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.

- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Kishore, U., Gupta, S.K., Perdikoulis, M.V., Kojouharova, M.S., Urban, B.C. and Reid, K.B. (2003) Modular organization of the carboxyl-terminal, globular head region of human C1q A, B, and C chains. *J. Immunol.* 171, 812-820.
- [15] Nauta, A.J., Trouw, L.A., Daha, M.R., Tijmsa, O., Nieuwland, R., Schwaeble, W.J., Gingras, A.R., Mantovani, A., Hack, E.C. and Roos, A. (2002) Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur. J. Immunol.* 32, 1726-1736.
- [16] Palaniyar, N., Nadesalingam, J., Clark, H., Shih, M.J., Dodds, A.W. and Reid, K.B. (2004) Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin. *J. Biol. Chem.* 279, 32728-32736.
- [17] Tissot, B., Daniel, R. and Place, C. (2003) Interaction of the C1 complex of complement with sulfated polysaccharide and DNA probed by single molecule fluorescence microscopy. *Eur. J. Biochem.* 270, 4714-4720.
- [18] Jiang, H., Cooper, B., Robey, F.A. and Gewurz, H. (1992) DNA binds and activates complement via residues 14-26 of the human C1q A chain. *J. Biol. Chem.* 267, 25597-25601.

- [19] Schultz, D.R. and Arnold, P.I. (1981) Activation of first component of complement (C1) in guinea pig serum by a polysaccharide is prevented by C1 inhibitor. *J. Immunol.* 126, 1558-1561.
- [20] Rhodes, D.C. (2002) Binding of Tamm-Horsfall protein to complement 1q and complement 1, including influence of hydrogen-ion concentration. *Immunol. Cell. Biol.* 80, 558-566.
- [21] Rhodes, D.C. (2006) Importance of carbohydrate in the interaction of Tamm-Horsfall protein with complement 1q and inhibition of classical complement activation. *Immunol. Cell. Biol.* 84, 357-365.
- [22] Matsushita, M., Matsushita, A., Endo, Y., Nakata, M., Kojima, N., Mizuochi, T. and Fujita, T. (2004) Origin of the classical complement pathway: Lamprey orthologue of mammalian C1q acts as a lectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 10127-10131.
- [23] Arlaud, G.J., Sim, R.B., Duplaa, A.M. and Colomb, M.G. (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.
- [24] Morris, R.G., Hargreaves, A.D., Duvall, E. and Wyllie, A.H. (1984) Hormone-induced cell death. 2. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. *Am. J. Pathol.* 115, 426-436.
- [25] Rapoport, E. and Pendu, J.L. (1999) Glycosylation alterations of cells in late phase apoptosis from colon carcinomas. *Glycobiology* 9, 1337-1345.

Figure legends

Fig. 1. SPR analysis of the interaction between BSA glycoconjugates and human C1q or its GR. (A) Binding of 15 nM human C1q and (B) of 1.5 μ M GR to immobilized BSA glycoconjugates. (C) Binding of BSA glycoconjugates to immobilized C1q. The specific binding signal shown was obtained by subtracting the background signal (obtained by injection of the protein or the glycoconjugate sample over a surface with immobilized BSA). Other experimental conditions are described in *Materials and Methods*.

Fig. 2. SPR analysis of the competition of the interaction between C1q and BSA glycoconjugates by soluble hexoses and pentoses. (A) Competition of C1q binding to immobilized GlcNAc-BSA and Gal-BSA by hexoses. (B) competition by pentoses. The SPR response at the end of a 3-min injection obtained in the absence of competitor was taken as 100%, and the relative binding was calculated for each competitor at a concentration of 100 mM.

Fig. 3. Assessment of the binding of C1q and C1q GR to DNA by EMSA. (A) Agarose gel electrophoresis showing migration of a linear Bluescript DNA plasmid (100 ng) in the absence of protein (-) or in the presence of C1q (32 nM), or C1q GR (6.5 μ M and 13 μ M). Interaction was assessed at physiological salt concentrations, as described in *Materials and Methods*. DNA molecular weight markers are shown. (B) EMSA showing that the DNA mobility shift observed with GR is partly inhibited by deoxy D-ribose. GR at a concentration of 13 μ M was incubated with or without 100 mM deoxy D-ribose for 15 min before interaction with DNA.

Fig. 4. SPR analysis of the effect of DNase treatment on apoptotic cell capture by C1q. Control cells (A) or early apoptotic cells (B) were pre-treated, or not, by 400 Kunitz/ml DNase and then injected over immobilized C1q. (C) Dose-dependence of the DNase treatment. Results are expressed relative to the capture of either viable cells (white bars) or apoptotic cells (black bars) by C1q in the absence of DNase treatment. The data shown represent the mean values \pm SD of three independent experiments. Significance was determined by Student's *t* test.

Table 1. Kinetic constants for the binding of C1q and its globular region to immobilized BSA glycoconjugates.

immobilized ligand	C1q			C1q globular region		
	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
GlcNAc-BSA	$4.7 \pm 0.6 \times 10^5$	$2.8 \pm 0.3 \times 10^{-3}$	5.9 ± 1.2	6.2×10^3	5.1×10^{-3}	822
Gal-BSA	$1.1 \pm 0.2 \times 10^6$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	1.0 ± 0.2	1.8×10^4	9.1×10^{-4}	51
GalNAc-BSA	$6.5 \pm 1.0 \times 10^5$	$1.7 \pm 0.2 \times 10^{-3}$	2.6 ± 0.7	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>

ND: Not determined

Binding of C1q (2-20 nM) and its GR (0.3-2.4 μ M) to BSA glycoconjugates was measured as described in *Material and Methods*. The association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) rate constants were determined by global fitting of the data using a 1:1 Langmuir binding model ($A + B \rightleftharpoons AB$, BIAevaluation 3.2). The dissociation constants K_D were determined from the k_{off} / k_{on} ratios. The values shown for C1q are means of two separate experiments.

Fig. 1

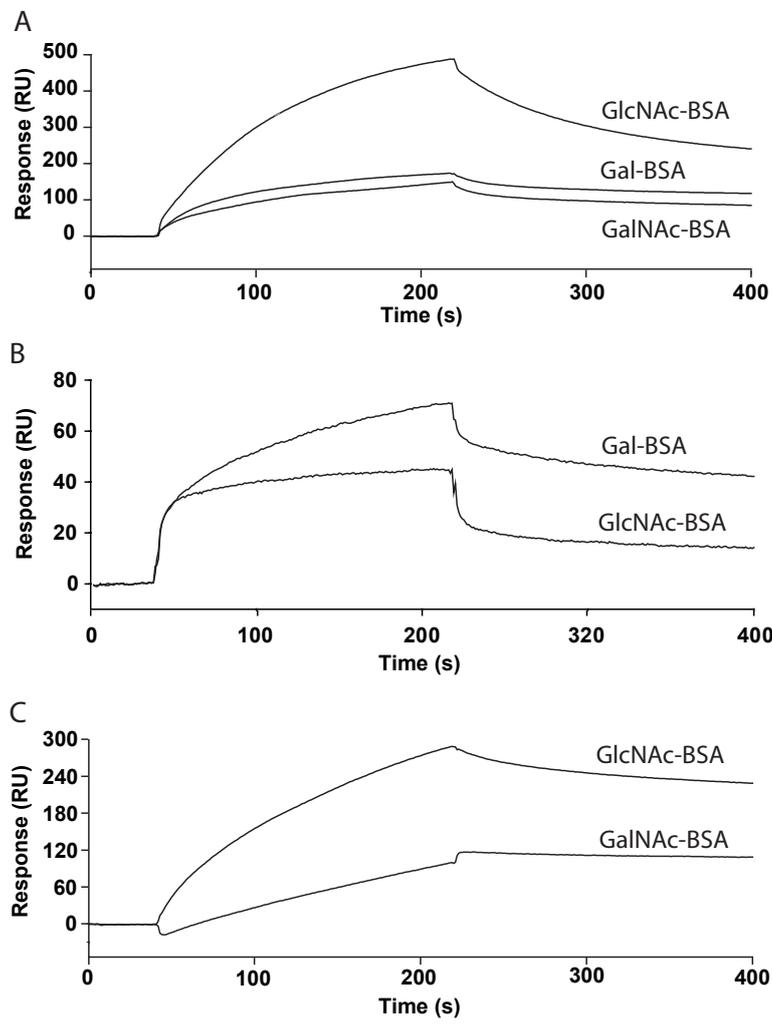
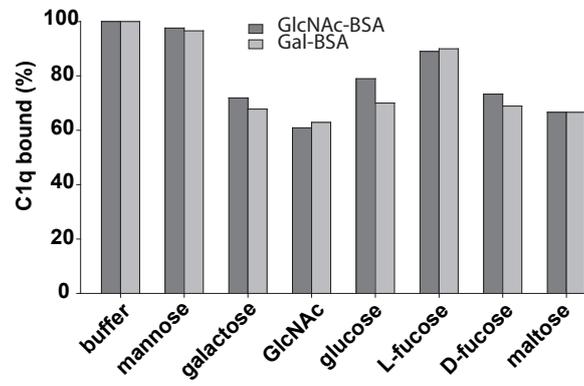


Fig. 2

A Competition by hexoses



B Competition by pentoses

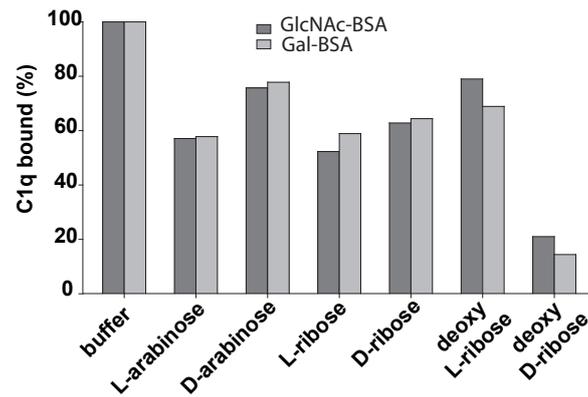
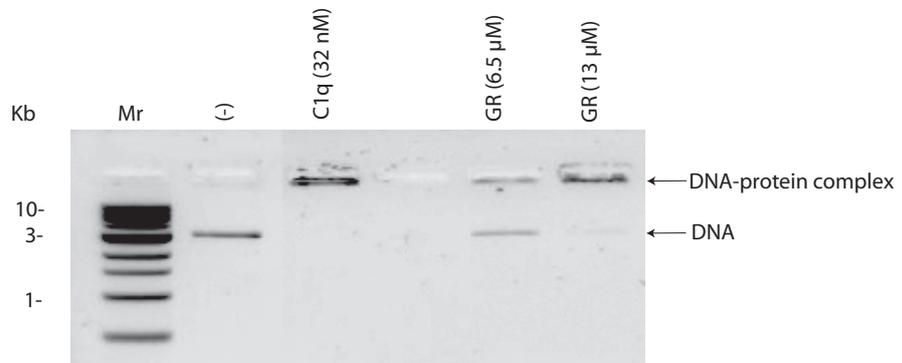


Fig. 3

A



B

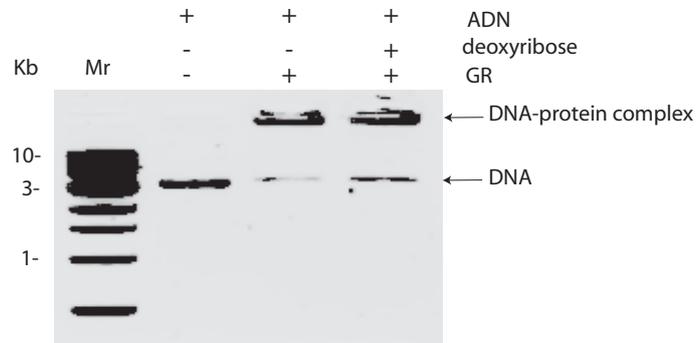
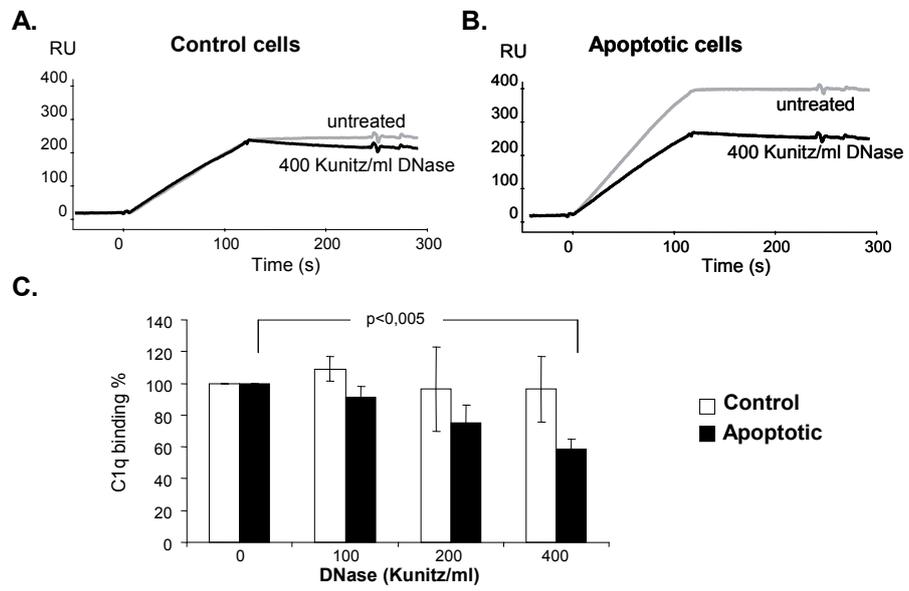


Fig. 4



Bibliographie

- [Abbas Abul K., 2005] Abbas Abul K., L. A. H. (2005). *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Elsevier.
- [Aderem and Underhill, 1999] Aderem, A. and Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, **17**, 593–623.
- [Akakura et al., 2004] 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**(2), 403–416.
- [Alberts B., 2002] Alberts B., Johnson A., L. J. R. M. R. K. W. P. (2002). *Molecular biology of the cell*.
- [Anderson et al., 2003] Anderson, H. A., Maylock, C. A., Williams, J. A., Paweletz, C. P., Shu, H., and Shacter, E. (2003). Serum-derived protein s binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol*, **4**(1), 87–91.
- [Arlaud et al., 2002] Arlaud, G. J., Gaboriaud, C., Thielens, N. M., Budayova-Spano, M., Rossi, V., and Fontecilla-Camps, J. C. (2002). Structural biology of the c1 complex of complement unveils the mechanisms of its activation and proteolytic activity. *Mol Immunol*, **39**(7-8), 383–394.
- [Arlaud et al., 1979] Arlaud, G. J., Sim, R. B., Duplaa, A. M., and Colomb, M. G. (1979). Differential elution of clq, clr and cls from human cl bound to immune aggregates. use in the rapid purification of cl subcomponents. *Mol Immunol*, **16**(7), 445–450.
- [Arlaud G, 2001] Arlaud G, C. M. (2001). *Complement : Classical Pathway*. Encyclopedia of Life Sciences - Nature publishing group.
- [Arosa et al., 1999] Arosa, F. A., de Jesus, O., Porto, G., Carmo, A. M., and de Sousa, M. (1999). Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood t lymphocytes in association with major histocompatibility complex class i molecules. *J Biol Chem*, **274**(24), 16917–16922.

- [Arvieux et al., 1984] Arvieux, J., Reboul, A., Bensa, J. C., and Colomb, M. G. (1984). Characterization of the c1q receptor on a human macrophage cell line, u937. *Biochem J*, **218**(2), 547–555.
- [Ashkenazi and Dixit, 1998] Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998). Death receptors : signaling and modulation. *Science*, **281**(5381), 1305–1308.
- [Azuma et al., 2002] Azuma, Y., Inami, Y., and Matsumoto, K. (2002). Alterations in cell surface phosphatidylserine and sugar chains during apoptosis and their time-dependent role in phagocytosis by macrophages. *Biol Pharm Bull*, **25**(10), 1277–1281.
- [Azuma et al., 2000] Azuma, Y., Taniguchi, A., and Matsumoto, K. (2000). Decrease in cell surface sialic acid in etoposide-treated jurkat cells and the role of cell surface sialidase. *Glycoconj J*, **17**(5), 301–306.
- [Balasubramanian et al., 1997] 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**(49), 31113–31117.
- [Batisse et al., 2004] Batisse, C., Marquet, J., Greffard, A., Fleury-Feith, J., Jaurand, M.-C., and Pilatte, Y. (2004). Lectin-based three-color flow cytometric approach for studying cell surface glycosylation changes that occur during apoptosis. *Cytometry A*, **62**(2), 81–88.
- [Bedard et al., 2005] Bedard, K., Szabo, E., Michalak, M., and Opas, M. (2005). Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and erp57. *Int Rev Cytol*, **245**, 91–121.
- [Bever et al., 1999] Bever, 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**(3), 317–330.
- [Bilyy et al., 2004] 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**(8-9), 829–838.
- [Bilyy and Stoika, 2003] Bilyy, R. O. and Stoika, R. S. (2003). Lectinocytochemical detection of apoptotic murine leukemia l1210 cells. *Cytometry A*, **56**(2), 89–95.
- [Biró et al., 2007] Biró, A., Thielens, N. M., Cervenák, L., Prohászka, Z., Füst, G., and Arlaud, G. J. (2007). Modified low density lipoproteins differentially bind and activate the c1 complex of complement. *Mol Immunol*, **44**(6), 1169–1177.
- [Bird et al., 1999] Bird, D. A., Gillotte, K. L., Hörkkö, S., Friedman, P., Dennis, E. A., Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1999). Receptors for oxidized low-density lipoprotein on elicited mouse peritoneal macrophages can recognize both the modified lipid moieties and the modified protein moieties : implications with respect to macrophage recognition of apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(11), 6347–6352.

- [Blanquet-Grossard et al., 2005] Blanquet-Grossard, F., Thielens, N. M., Vendrely, C., Jamin, M., and Arlaud, G. J. (2005). Complement protein c1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry*, **44**(11), 4349–4356.
- [Botto et al., 1998] 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**(1), 56–59.
- [Botto and Walport, 2002] Botto, M. and Walport, M. J. (2002). C1q, autoimmunity and apoptosis. *Immunobiology*, **205**(4-5), 395–406.
- [Bowness et al., 1994] Bowness, P., Davies, K. A., Norsworthy, P. J., Athanassiou, P., Taylor-Wiedeman, J., Borysiewicz, L. K., Meyer, P. A., and Walport, M. J. (1994). Hereditary c1q deficiency and systemic lupus erythematosus. *QJM*, **87**(8), 455–464.
- [Braun et al., 2000] Braun, L., Ghebrehiwet, B., and Cossart, P. (2000). gc1q-r/p32, a c1q-binding protein, is a receptor for the inlb invasion protein of listeria monocytogenes. *EMBO J*, **19**(7), 1458–1466.
- [Brown et al., 2002] Brown, S., Heinisch, I., Ross, E., Shaw, K., Buckley, C. D., and Savill, J. (2002). Apoptosis disables cd31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature*, **418**(6894), 200–203.
- [Böse et al., 2004] Böse, J., Gruber, A. D., Helming, L., Schiebe, S., Wegener, I., Hafner, M., Beales, M., Köntgen, F., and Lengeling, A. (2004). The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J Biol*, **3**(4), 15.
- [Burns et al., 1994] Burns, K., Duggan, B., Atkinson, E. A., Famulski, K. S., Nemer, M., Bleackley, R. C., and Michalak, M. (1994). Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature*, **367**(6462), 476–480.
- [Buttke and Sandstrom, 1994] Buttke, T. M. and Sandstrom, P. A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*, **15**(1), 7–10.
- [Callahan et al., 2000] Callahan, M. K., Williamson, P., and Schlegel, R. A. (2000). Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death Differ*, **7**(7), 645–653.
- [Celik et al., 2001] Celik, I., Stover, C., Botto, M., Thiel, S., Tzima, S., Künkel, D., Walport, M., Lorenz, W., and Schwaeble, W. (2001). Role of the classical pathway of complement activation in experimentally induced polymicrobial peritonitis. *Infect Immun*, **69**(12), 7304–7309.
- [Chaga et al., 1999] Chaga, G., Bochkariov, D. E., Jokhadze, G. G., Hopp, J., and Nelson, P. (1999). Natural poly-histidine affinity tag for purifica-

- tion of recombinant proteins on cobalt(ii)-carboxymethylaspartate cross-linked agarose. *J Chromatogr A*, **864**(2), 247–256.
- [Chang et al., 1999] Chang, M. K., Bergmark, C., Laurila, A., Hörkkö, S., Han, K. H., Friedman, P., Dennis, E. A., and Witztum, J. L. (1999). Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages : evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(11), 6353–6358.
- [Chang et al., 2002] Chang, M.-K., Binder, C. J., Torzewski, M., and Witztum, J. L. (2002). C-reactive protein binds to both oxidized ldl and apoptotic cells through recognition of a common ligand : Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(20), 13043–13048.
- [Charles A Janeway, 2001] Charles A Janeway, Paul Travers, M. W. M. J. S. (2001). *Immunobiology*. Garland Publishing, New York.
- [Choi et al., 2004] Choi, J.-J., Reich, C. F., and Pisetsky, D. S. (2004). Release of dna from dead and dying lymphocyte and monocyte cell lines in vitro. *Scand J Immunol*, **60**(1-2), 159–166.
- [Choi et al., 2005] Choi, J.-J., Reich, C. F., and Pisetsky, D. S. (2005). The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular dna from apoptotic and necrotic cells. *Immunology*, **115**(1), 55–62.
- [Cikala et al., 2004] Cikala, M., Alexandrova, O., David, C. N., Pröschel, M., Stiening, B., Cramer, P., and Böttger, A. (2004). The phosphatidylserine receptor from hydra is a nuclear protein with potential fe(ii) dependent oxygenase activity. *BMC Cell Biol*, **5**, 26.
- [Cocco et al., 1984] Cocco, L., Gilmour, R. S., Papa, S., Capitani, S., and Manzoli, F. A. (1984). Response of isolated nuclei to phospholipid vesicles : analysis of chromatin sensitivity to dnase i and micrococcal nuclease. *Cell Biol Int Rep*, **8**(1), 55–63.
- [Colten et al., 1986] Colten, H. R., Strunk, R. C., Perlmutter, D. H., and Cole, F. S. (1986). Regulation of complement protein biosynthesis in mononuclear phagocytes. *Ciba Found Symp*, **118**, 141–154.
- [Couldwell et al., 1994] Couldwell, W. T., Hinton, D. R., He, S., Chen, T. C., Sebat, I., Weiss, M. H., and Law, R. E. (1994). Protein kinase c inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines. *FEBS Lett*, **345**(1), 43–46.
- [Crocker et al., 2007] Crocker, P. R., Paulson, J. C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **7**(4), 255–266.
- [Daleke and Lyles, 2000] Daleke, D. L. and Lyles, J. V. (2000). Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim Biophys Acta*, **1486**(1), 108–127.

- [Devitt et al., 2004] 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**(6), 1161–1170.
- [Dias-Baruffi et al., 2003] Dias-Baruffi, M., Zhu, H., Cho, M., Karmakar, S., McEver, R. P., and Cummings, R. D. (2003). Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. *J Biol Chem*, **278**(42), 41282–41293.
- [Dini et al., 1992] Dini, L., Autuori, F., Lentini, A., Oliverio, S., and Piacentini, M. (1992). The clearance of apoptotic cells in the liver is mediated by the asialoglycoprotein receptor. *FEBS Lett*, **296**(2), 174–178.
- [Dransfield et al., 1995] Dransfield, I., Stocks, S. C., and Haslett, C. (1995). Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood*, **85**(11), 3264–3273.
- [Duvall et al., 1985] Duvall, E., Wyllie, A. H., and Morris, R. G. (1985). Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology*, **56**(2), 351–358.
- [Edelhoch, 1967] Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, **6**(7), 1948–1954.
- [Eggleton et al., 1997] Eggleton, P., Reid, K. B., Kishore, U., and Sontheimer, R. D. (1997). Clinical relevance of calreticulin in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, **6**(7), 564–571.
- [Eggleton et al., 1998] Eggleton, P., Reid, K. B., and Tenner, A. J. (1998). C1q—how many functions? how many receptors? *Trends Cell Biol*, **8**(11), 428–431.
- [Eggleton et al., 2000] Eggleton, P., Tenner, A. J., and Reid, K. B. (2000). C1q receptors. *Clin Exp Immunol*, **120**(3), 406–412.
- [Ellgaard et al., 2002] Ellgaard, L., Bettendorff, P., Braun, D., Herrmann, T., Fiorito, F., Jelesarov, I., Güntert, P., Helenius, A., and Wüthrich, K. (2002). Nmr structures of 36 and 73-residue fragments of the calreticulin p-domain. *J Mol Biol*, **322**(4), 773–784.
- [Ellgaard et al., 2001] Ellgaard, L., Riek, R., Herrmann, T., Güntert, P., Braun, D., Helenius, A., and Wüthrich, K. (2001). Nmr structure of the calreticulin p-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(6), 3133–3138.
- [Ellis et al., 1991] 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**(1), 79–94.
- [Elward et al., 2005] 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**(43), 36342–36354.

- [Fadeel et al., 1999] Fadeel, B., Gleiss, B., Högstrand, K., Chandra, J., Wiedmer, T., Sims, P. J., Henter, J. I., Orrenius, S., and Samali, A. (1999). Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **266**(2), 504–511.
- [Fadok et al., 1998a] 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**(7), 551–562.
- [Fadok et al., 2001a] Fadok, V. A., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (2001a). Phagocyte receptors for apoptotic cells : recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest*, **108**(7), 957–962.
- [Fadok et al., 1998b] 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**(4), 890–898.
- [Fadok et al., 2000] Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A., and Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, **405**(6782), 85–90.
- [Fadok et al., 2001b] Fadok, V. A., de Cathelineau A, Daleke, D. L., Henson, P. M., and Bratton, D. L. (2001b). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**(2), 1071–1077.
- [Fadok et al., 1992] Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, **148**(7), 2207–2216.
- [Falasca et al., 1996] Falasca, L., Bergamini, A., Serafino, A., Balabaud, C., and Dini, L. (1996). Human kupffer cell recognition and phagocytosis of apoptotic peripheral blood lymphocytes. *Exp Cell Res*, **224**(1), 152–162.
- [Feng et al., 2002] Feng, X., Tonnesen, M. G., Peerschke, E. I. B., and Ghebrehiwet, B. (2002). Cooperation of c1q receptors and integrins in c1q-mediated endothelial cell adhesion and spreading. *J Immunol*, **168**(5), 2441–2448.
- [Ferguson and Anderson, 1981] Ferguson, D. J. and Anderson, T. J. (1981). Ultrastructural observations on cell death by apoptosis in the "resting" human breast. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, **393**(2), 193–203.
- [Finnemann et al., 1997] Finnemann, S. C., Bonilha, V. L., Marmorstein, A. D., and Rodriguez-Boulan, E. (1997). Phagocytosis of rod outer seg-

- ments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(24), 12932–12937.
- [Fliegel et al., 1989] Fliegel, L., Burns, K., MacLennan, D. H., Reithmeier, R. A., and Michalak, M. (1989). Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **264**(36), 21522–21528.
- [Franc, 2002] Franc, N. C. (2002). Phagocytosis of apoptotic cells in mammals, caenorhabditis elegans and drosophila melanogaster : molecular mechanisms and physiological consequences. *Front Biosci*, **7**, d1298–d1313.
- [Franz et al., 2006] Franz, S., Frey, B., Sheriff, A., Gaipf, U. S., Beer, A., Voll, R. E., Kalden, J. R., and Herrmann, M. (2006). Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis. *Cytometry A*, **69**(4), 230–239.
- [Franz et al., 2007] Franz, S., Herrmann, K., Fühnrrohr, B., Sheriff, A., Frey, B., Gaipf, U. S., Voll, R. E., Kalden, J. R., Jäck, H.-M., and Herrmann, M. (2007). After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. *Cell Death Differ*, **14**(4), 733–742.
- [Fühnrrohr et al., 2007] Fühnrrohr, B. G., Groer, G. J., Sehnert, B., Herrmann, M., and Voll, R. E. (2007). Interaction of histones with phospholipids—implications for the exposure of histones on apoptotic cells. *Autoimmunity*, **40**(4), 322–326.
- [Fukasawa et al., 1996] Fukasawa, M., Adachi, H., Hirota, K., Tsujimoto, M., Arai, H., and Inoue, K. (1996). Srb1, a class b scavenger receptor, recognizes both negatively charged liposomes and apoptotic cells. *Exp Cell Res*, **222**(1), 246–250.
- [Gaboriaud et al., 2003] 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**(47), 46974–46982.
- [Gaboriaud et al., 2007] Gaboriaud, C., Païdassi, H., Frachet, P., Tacnet-Delorme, P., Thielens, N., and Arlaud, G. (2007). *Collagen-related lectins in innate immunity*, chapter 6. C1q : A versatile pattern recognition molecule and sensor of altered self, pages 103–117. Research signpost.
- [Gaboriaud et al., 2004] 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**(7), 368–373.
- [Gallin, 1980] Gallin, J. I. (1980). Degranulating stimuli decrease the negative surface charge and increase the adhesiveness of human neutrophils. *J Clin Invest*, **65**(2), 298–306.

- [Gardai et al., 2006] Gardai, S. J., Bratton, D. L., Ogden, C. A., and Henson, P. M. (2006). Recognition ligands on apoptotic cells : a perspective. *J Leukoc Biol*, **79**(5), 896–903.
- [Gardai et al., 2005] Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasn, 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 Irf on the phagocyte. *Cell*, **123**(2), 321–334.
- [Gershov et al., 2000] Gershov, D., Kim, S., Brot, N., and Elkon, K. B. (2000). C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an anti-inflammatory innate immune response : implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med*, **192**(9), 1353–1364.
- [Ghebrehiwet et al., 2002] Ghebrehiwet, B., Jesty, J., and Peerschke, E. I. B. (2002). gc1q-r/p33 : structure-function predictions from the crystal structure. *Immunobiology*, **205**(4-5), 421–432.
- [Ghebrehiwet et al., 1995] Ghebrehiwet, B., Kew, R. R., Gruber, B. L., Marchese, M. J., Peerschke, E. I., and Reid, K. B. (1995). Murine mast cells express two types of c1q receptors that are involved in the induction of chemotaxis and chemokinesis. *J Immunol*, **155**(5), 2614–2619.
- [Ghebrehiwet et al., 2001] Ghebrehiwet, B., Lim, B. L., Kumar, R., Feng, X., and Peerschke, E. I. (2001). gc1q-r/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartmental cellular proteins, is involved in inflammation and infection. *Immunol Rev*, **180**, 65–77.
- [Ghebrehiwet et al., 1994] Ghebrehiwet, B., Lim, B. L., Peerschke, E. I., Willis, A. C., and Reid, K. B. (1994). Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kd cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of c1q. *J Exp Med*, **179**(6), 1809–1821.
- [Ghebrehiwet et al., 1996] Ghebrehiwet, B., Lu, P. D., Zhang, W., Lim, B. L., Eggleton, P., Leigh, L. E., Reid, K. B., and Peerschke, E. I. (1996). Identification of functional domains on gc1q-r, a cell surface protein that binds to the globular "heads" of c1q, using monoclonal antibodies and synthetic peptides. *Hybridoma*, **15**(5), 333–342.
- [Ghebrehiwet and Peerschke, 1998] Ghebrehiwet, B. and Peerschke, E. I. (1998). Structure and function of gc1q-r : a multiligand binding cellular protein. *Immunobiology*, **199**(2), 225–238.
- [Ghebrehiwet et al., 1984] Ghebrehiwet, B., Silvestri, L., and McDevitt, C. (1984). Identification of the raji cell membrane-derived c1q inhibitor as a receptor for human c1q. purification and immunochemical characterization. *J Exp Med*, **160**(5), 1375–1389.

- [Ghiran et al., 2003] Ghiran, I., Klickstein, L. B., and Nicholson-Weller, A. (2003). Calreticulin is at the surface of circulating neutrophils and uses cd59 as an adaptor molecule. *J Biol Chem*, **278**(23), 21024–21031.
- [Ghiran et al., 2002] Ghiran, I., Tyagi, S.-R., Klickstein, L. B., and Nicholson-Weller, A. (2002). Expression and function of c1q receptors and c1q binding proteins at the cell surface. *Immunobiology*, **205**(4-5), 407–420.
- [Green and Reed, 1998] Green, D. R. and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**(5381), 1309–1312.
- [Grimsley and Ravichandran, 2003] Grimsley, C. and Ravichandran, K. S. (2003). Cues for apoptotic cell engulfment : eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol*, **13**(12), 648–656.
- [Guo et al., 1999] Guo, W. X., Ghebrehiwet, B., Weksler, B., Schweitzer, K., and Peerschke, E. I. (1999). Up-regulation of endothelial cell binding proteins/receptors for complement component c1q by inflammatory cytokines. *J Lab Clin Med*, **133**(6), 541–550.
- [Hagenhofer et al., 1998] Hagenhofer, M., Germaier, H., Hohenadl, C., Rohwer, P., Kalden, J. R., and Herrmann, M. (1998). Uv-b irradiated cell lines execute programmed cell death in various forms. *Apoptosis*, **3**(2), 123–132.
- [Hall et al., 2005] Hall, M. O., Obin, M. S., Heeb, M. J., Burgess, B. L., and Abrams, T. A. (2005). Both protein s and gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*, **81**(5), 581–591.
- [Hall et al., 1994] Hall, S. E., Savill, J. S., Henson, P. M., and Haslett, C. (1994). Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol*, **153**(7), 3218–3227.
- [Hanayama et al., 2004a] Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., and Nagata, S. (2004a). Expression of developmental endothelial locus-1 in a subset of macrophages for engulfment of apoptotic cells. *J Immunol*, **172**(6), 3876–3882.
- [Hanayama et al., 2002] 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**(6885), 182–187.
- [Hanayama et al., 2004b] Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2004b). Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in mfg-e8-deficient mice. *Science*, **304**(5674), 1147–1150.
- [Hart et al., 2000] Hart, S. P., Ross, J. A., Ross, K., Haslett, C., and Dransfield, I. (2000). Molecular characterization of the surface of apoptotic

- neutrophils : implications for functional downregulation and recognition by phagocytes. *Cell Death Differ*, **7**(5), 493–503.
- [Heal and McGivan, 1998] Heal, R. and McGivan, J. (1998). Induction of calreticulin expression in response to amino acid deprivation in chinese hamster ovary cells. *Biochem J*, **329** (Pt 2), 389–394.
- [Henson, 2005] Henson, P. M. (2005). Dampening inflammation. *Nat Immunol*, **6**(12), 1179–1181.
- [Henson et al., 2001] Henson, P. M., Bratton, D. L., and Fadok, V. A. (2001). Apoptotic cell removal. *Curr Biol*, **11**(19), R795–R805.
- [Hoffmann et al., 2001] Hoffmann, P. R., deCathelineau, A. M., Ogden, C. A., Leverrier, Y., Bratton, D. L., Daleke, D. L., Ridley, A. J., Fadok, V. A., and Henson, P. M. (2001). Phosphatidylserine (ps) induces ps receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol*, **155**(4), 649–659.
- [Huber et al., 1990] Huber, R., Römisch, J., and Paques, E. P. (1990). The crystal and molecular structure of human annexin v, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J*, **9**(12), 3867–3874.
- [Huynh et al., 2002] Huynh, M.-L. N., 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**(1), 41–50.
- [Ishii et al., 2005] Ishii, M., Fujita, S., Yamada, M., Hosaka, Y., and Kurachi, Y. (2005). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and ca²⁺/calmodulin competitively bind to the regulators of g-protein-signalling (rgs) domain of rgs4 and reciprocally regulate its action. *Biochem J*, **385**(Pt 1), 65–73.
- [Ishimoto et al., 2000] Ishimoto, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., and Nakano, T. (2000). Promotion of the uptake of ps liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *J Biochem*, **127**(3), 411–417.
- [Jethmalani et al., 1997] Jethmalani, S. M., Henle, K. J., Gazitt, Y., Walker, P. D., and Wang, S. Y. (1997). Intracellular distribution of heat-induced stress glycoproteins. *J Cell Biochem*, **66**(1), 98–111.
- [Jiang et al., 1992] Jiang, H., Cooper, B., Robey, F. A., and Gewurz, H. (1992). Dna binds and activates complement via residues 14-26 of the human c1q a chain. *J Biol Chem*, **267**(35), 25597–25601.
- [Jiang et al., 1999] Jiang, J., Zhang, Y., Krainer, A. R., and Xu, R. M. (1999). Crystal structure of human p32, a doughnut-shaped acidic mitochondrial matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(7), 3572–3577.

- [Johnson et al., 2001] Johnson, S., Michalak, M., Opas, M., and Eggleton, P. (2001). The ins and outs of calreticulin : from the er lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol*, **11**(3), 122–129.
- [Kagan et al., 2002] Kagan, V. E., Gleiss, B., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Elenström-Magnusson, C., Liu, S.-X., Serinkan, F. B., Arroyo, A., Chandra, J., Orrenius, S., and Fadeel, B. (2002). A role for oxidative stress in apoptosis : oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing fas-mediated apoptosis. *J Immunol*, **169**(1), 487–499.
- [Kamal and Datta, 2006] Kamal, A. and Datta, K. (2006). Upregulation of hyaluronan binding protein 1 (habp1/p32/gc1qr) is associated with cisplatin induced apoptosis. *Apoptosis*, **11**(5), 861–874.
- [Kerr et al., 1972] 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**(4), 239–257.
- [Kim et al., 2004] Kim, S., Elkon, K. B., and Ma, X. (2004). Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity*, **21**(5), 643–653.
- [Kinchen et al., 2005] 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**(7029), 93–99.
- [Kishore et al., 2004] Kishore, U., Gaboriaud, C., Waters, P., Shrive, A. K., Greenhough, T. J., Reid, K. B. M., Sim, R. B., and Arlaud, G. J. (2004). C1q and tumor necrosis factor superfamily : modularity and versatility. *Trends Immunol*, **25**(10), 551–561.
- [Kishore et al., 1997] Kishore, U., Sontheimer, R. D., Sastry, K. N., Zaner, K. S., Zappi, E. G., Hughes, G. R., Khamashta, M. A., Strong, P., Reid, K. B., and Eggleton, P. (1997). Release of calreticulin from neutrophils may alter c1q-mediated immune functions. *Biochem J*, **322** (Pt 2), 543–550.
- [Kölble and Reid, 1993] Kölble, K. and Reid, K. B. (1993). Genetic deficiencies of the complement system and association with disease—early components. *Int Rev Immunol*, **10**(1), 17–36.
- [Klickstein et al., 1997] 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**(3), 345–355.
- [Korb and Ahearn, 1997] 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**(10), 4525–4528.

- [Kovacs et al., 1998] Kovacs, H., Campbell, I. D., Strong, P., Johnson, S., Ward, F. J., Reid, K. B., and Eggleton, P. (1998). Evidence that c1q binds specifically to ch2-like immunoglobulin gamma motifs present in the autoantigen calreticulin and interferes with complement activation. *Biochemistry*, **37**(51), 17865–17874.
- [Krahling et al., 1999] Krahling, S., Callahan, M. K., Williamson, P., and Schlegel, R. A. (1999). Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Cell Death Differ*, **6**(2), 183–189.
- [Kuna et al., 1996] Kuna, P., Iyer, M., Peerschke, E. I., Kaplan, A. P., Reid, K. B., and Ghebrehiwet, B. (1996). Human c1q induces eosinophil migration. *Clin Immunol Immunopathol*, **81**(1), 48–54.
- [Kuraishi et al., 2007] Kuraishi, T., Manaka, J., Kono, M., Ishii, H., Yamamoto, N., Koizumi, K., Shiratsuchi, A., Lee, B. L., Higashida, H., and Nakanishi, Y. (2007). Identification of calreticulin as a marker for phagocytosis of apoptotic cells in drosophila. *Exp Cell Res*, **313**(3), 500–510.
- [Laemmli, 1970] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, **227**(5259), 680–685.
- [Lauber et al., 2004] Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M., and Weselborg, S. (2004). Clearance of apoptotic cells : getting rid of the corpses. *Mol Cell*, **14**(3), 277–287.
- [Lehmann et al., 2006] Lehmann, F., Tiralongo, E., and Tiralongo, J. (2006). Sialic acid-specific lectins : occurrence, specificity and function. *Cell Mol Life Sci*, **63**(12), 1331–1354.
- [Leigh et al., 1998] Leigh, L. E., Ghebrehiwet, B., Perera, T. P., Bird, I. N., Strong, P., Kishore, U., Reid, K. B., and Eggleton, P. (1998). C1q-mediated chemotaxis by human neutrophils : involvement of gclqr and g-protein signalling mechanisms. *Biochem J*, **330** (Pt 1), 247–254.
- [Li et al., 2003] Li, M. O., Sarkisian, M. R., Mehal, W. Z., Rakic, P., and Flavell, R. A. (2003). Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science*, **302**(5650), 1560–1563.
- [Li et al., 2001] Li, Z., Stafford, W. F., and Bouvier, M. (2001). The metal ion binding properties of calreticulin modulate its conformational flexibility and thermal stability. *Biochemistry*, **40**(37), 11193–11201.
- [Loos et al., 1989] 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*, (84), 32–41.
- [Lu et al., 2008] Lu, J. H., Teh, B. K., da Wang, L., Wang, Y. N., Tan, Y. S., Lai, M. C., and Reid, K. B. M. (2008). The classical and regulatory functions of c1q in immunity and autoimmunity. *Cell Mol Immunol*, **5**(1), 9–21.

- [Lucas et al., 2006] 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**(6), 4047–4054.
- [Malhotra et al., 1990] Malhotra, R., Thiel, S., Reid, K. B., and Sim, R. B. (1990). Human leukocyte c1q receptor binds other soluble proteins with collagen domains. *J Exp Med*, **172**(3), 955–959.
- [Malhotra et al., 1993] Malhotra, R., Willis, A. C., Jensenius, J. C., Jackson, J., and Sim, R. B. (1993). Structure and homology of human c1q receptor (collectin receptor). *Immunology*, **78**(3), 341–348.
- [Maniatis et al., 1989] Maniatis, T., Futsch, E., and Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*.
- [Manzoli et al., 1987] Manzoli, F. A., Cocco, L., Maraldi, N. M., Capitani, S., and Barnabei, O. (1987). Unfolding of nucleosome core induced by phosphatidylserine. *Adv Enzyme Regul*, **26**, 271–283.
- [Maraldi et al., 1987] Maraldi, N. M., Marinelli, F., Papa, S., Galanzi, A., and Manzoli, F. A. (1987). Changes of chromatin organization induced by phospholipids. *Basic Appl Histochem*, **31**(3), 421–428.
- [Martin et al., 1995] Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., and Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus : inhibition by overexpression of bcl-2 and abl. *J Exp Med*, **182**(5), 1545–1556.
- [Matsura et al., 2002] Matsura, T., Serinkan, B. F., Jiang, J., and Kagan, V. E. (2002). Phosphatidylserine peroxidation/externalization during staurosporine-induced apoptosis in hl-60 cells. *FEBS Lett*, **524**(1-3), 25–30.
- [Matsushita and Fujita, 1992] 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**(6), 1497–1502.
- [Matsushita et al., 2004] Matsushita, M., Matsushita, A., Endo, Y., Nakata, M., Kojima, N., Mizuochi, T., and Fujita, T. (2004). Origin of the classical complement pathway : Lamprey orthologue of mammalian c1q acts as a lectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(27), 10127–10131.
- [McGreal and Gasque, 2002] McGreal, E. and Gasque, P. (2002). Structure-function studies of the receptors for complement c1q. *Biochem Soc Trans*, **30**(Pt 6), 1010–1014.
- [McGreal et al., 2002] 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**(10), 5222–5232.

- [Medzhitov and Janeway, 2002] Medzhitov, R. and Janeway, C. A. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, **296**(5566), 298–300.
- [Meenakshi et al., 2003] Meenakshi, J., Anupama, Goswami, S. K., and Datta, K. (2003). Constitutive expression of hyaluronan binding protein 1 (habp1/p32/gc1qr) in normal fibroblast cells perturbs its growth characteristics and induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **300**(3), 686–693.
- [Mevorach et al., 1998a] Mevorach, D., Mascarenhas, J. O., Gershov, D., and Elkon, K. B. (1998a). Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med*, **188**(12), 2313–2320.
- [Mevorach et al., 1998b] Mevorach, D., Zhou, J. L., Song, X., and Elkon, K. B. (1998b). Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J Exp Med*, **188**(2), 387–392.
- [Michalak et al., 1999] Michalak, M., Corbett, E. F., Mesaeli, N., Nakamura, K., and Opas, M. (1999). Calreticulin : one protein, one gene, many functions. *Biochem J*, **344 Pt 2**, 281–292.
- [Mitchell et al., 2006] 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**(9), 5718–5725.
- [Miyanishi et al., 2007] Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., and Nagata, S. (2007). Identification of tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*, **450**(7168), 435–439.
- [Morris et al., 1984] Morris, R. G., Hargreaves, A. D., Duvall, E., and Wyllie, A. H. (1984). Hormone-induced cell death. 2. surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. *Am J Pathol*, **115**(3), 426–436.
- [Nagata et al., 1996] 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**(47), 30022–30027.
- [Nakano et al., 1997] 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**(47), 29411–29414.
- [Nauta et al., 2004] Nauta, A. J., Castellano, G., Xu, W., Woltman, A. M., Borrias, M. C., Daha, M. R., van Kooten, C., and Roos, A. (2004). Opsonization with c1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J Immunol*, **173**(5), 3044–3050.

- [Nauta et al., 2002] Nauta, A. J., Trouw, L. A., Daha, M. R., Tijmsa, O., Nieuwland, R., Schwaeble, W. J., Gingras, A. R., Mantovani, A., Hack, E. C., and Roos, A. (2002). Direct binding of c1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol*, **32**(6), 1726–1736.
- [Navratil et al., 2001] 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**(5), 3231–3239.
- [Nepomuceno et al., 1999] Nepomuceno, R. R., Ruiz, S., Park, M., and Tenner, A. J. (1999). C1qrp is a heavily o-glycosylated cell surface protein involved in the regulation of phagocytic activity. *J Immunol*, **162**(6), 3583–3589.
- [Nepomuceno and Tenner, 1998] Nepomuceno, R. R. and Tenner, A. J. (1998). C1qrp, the c1q receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets. *J Immunol*, **160**(4), 1929–1935.
- [Nguyen et al., 2000] Nguyen, T., Ghebrehwet, B., and Peerschke, E. I. (2000). Staphylococcus aureus protein a recognizes platelet gc1qr/p33 : a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets. *Infect Immun*, **68**(4), 2061–2068.
- [Norsworthy et al., 2004] Norsworthy, P. J., Fossati-Jimack, L., Cortes-Hernandez, J., Taylor, P. R., Bygrave, A. E., Thompson, R. D., Nourshargh, S., Walport, M. J., and Botto, M. (2004). Murine cd93 (c1qrp) contributes to the removal of apoptotic cells in vivo but is not required for c1q-mediated enhancement of phagocytosis. *J Immunol*, **172**(6), 3406–3414.
- [Obeid et al., 2007] Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J.-L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Métivier, D., Larochette, N., van Endert, P., Ciccocanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*, **13**(1), 54–61.
- [Ogden et al., 2001] Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehwet, 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**(6), 781–795.
- [Oka et al., 1998] Oka, K., Sawamura, T., Kikuta, K., Itokawa, S., Kume, N., Kita, T., and Masaki, T. (1998). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(16), 9535–9540.

- [Ostwald and MacLennan, 1974] Ostwald, T. J. and MacLennan, D. H. (1974). Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **249**(3), 974–979.
- [Pace et al., 1995] Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*, **4**(11), 2411–2423.
- [Palaniyar et al., 2004] Palaniyar, N., Nadesalingam, J., Clark, H., Shih, M. J., Dodds, A. W., and Reid, K. B. M. (2004). Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins a and d and mannose-binding lectin. *J Biol Chem*, **279**(31), 32728–32736.
- [Park et al., 2007] Park, D., Tosello-Trampont, A.-C., Elliott, M. R., Lu, M., Haney, L. B., Ma, Z., Klibanov, A. L., Mandell, J. W., and Ravichandran, K. S. (2007). Bail is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the elmo/dock180/rac module. *Nature*, **450**(7168), 430–434.
- [Park et al., 2008a] 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. (2008a). Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ*, **15**(1), 192–201.
- [Park et al., 2008b] Park, S.-Y., Kang, K.-B., Thapa, N., Kim, S.-Y., Lee, S.-J., and Kim, I.-S. (2008b). Requirement of adapter protein gup during stabilin-2-mediated cell corpse engulfment. *J Biol Chem*.
- [Parnaik et al., 2000] Parnaik, R., Raff, M. C., and Scholes, J. (2000). Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr Biol*, **10**(14), 857–860.
- [Peerschke and Ghebrehiwet, 2001] Peerschke, E. I. and Ghebrehiwet, B. (2001). Human blood platelet gc1qr/p33. *Immunol Rev*, **180**, 56–64.
- [Peerschke et al., 1994] Peerschke, E. I., Reid, K. B., and Ghebrehiwet, B. (1994). Identification of a novel 33-kda c1q-binding site on human blood platelets. *J Immunol*, **152**(12), 5896–5901.
- [Peterson et al., 1997] Peterson, K. L., Zhang, W., Lu, P. D., Keilbaugh, S. A., Peerschke, E. I., and Ghebrehiwet, B. (1997). The c1q-binding cell membrane proteins cc1q-r and gc1q-r are released from activated cells : subcellular distribution and immunochemical characterization. *Clin Immunol Immunopathol*, **84**(1), 17–26.
- [Pisetsky and Fairhurst, 2007] Pisetsky, D. S. and Fairhurst, A.-M. (2007). The origin of extracellular dna during the clearance of dead and dying cells. *Autoimmunity*, **40**(4), 281–284.
- [Platt et al., 1998] Platt, N., da Silva, R. P., and Gordon, S. (1998). Recognizing death : the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol*, **8**(9), 365–372.

- [Platt et al., 1996] Platt, N., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T., and Gordon, S. (1996). Role for the class a macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(22), 12456–12460.
- [Radic et al., 2004] Radic, M., Marion, T., and Monestier, M. (2004). Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis. *J Immunol*, **172**(11), 6692–6700.
- [Raff, 1992] Raff, M. C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, **356**(6368), 397–400.
- [Ramprasad et al., 1995] Ramprasad, M. P., Fischer, W., Witztum, J. L., Sambrano, G. R., Quehenberger, O., and Steinberg, D. (1995). The 94- to 97-kda mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human cd68. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(21), 9580–9584.
- [Rapoport et al., 2003] Rapoport, E., Khaidukov, S., Baidina, O., Bojenko, V., Moiseeva, E., Pasynina, G., Karsten, U., Nifant'ev, N., LePendue, J., and Bovin, N. (2003). Involvement of the galbeta1 - 3galnacbeta structure in the recognition of apoptotic bodies by thp-1 cells. *Eur J Cell Biol*, **82**(6), 295–302.
- [Rapoport and Pendu, 1999] Rapoport, E. and Pendu, J. L. (1999). Glycosylation alterations of cells in late phase apoptosis from colon carcinomas. *Glycobiology*, **9**(12), 1337–1345.
- [Reed, 1999] Reed, J. C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*, **17**(9), 2941–2953.
- [Reid and Edmondson, 1984] Reid, K. B. and Edmondson, J. (1984). Location of the binding site in subcomponent c1q for plasma fibronectin. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Suppl*, **284**, 11–17.
- [Rhodes, 2002] Rhodes, D. C. J. (2002). Binding of tamm-horsfall protein to complement 1q and complement 1, including influence of hydrogen-ion concentration. *Immunol Cell Biol*, **80**(6), 558–566.
- [Rhodes, 2006] Rhodes, D. C. J. (2006). Importance of carbohydrate in the interaction of tamm-horsfall protein with complement 1q and inhibition of classical complement activation. *Immunol Cell Biol*, **84**(4), 357–365.
- [Roos et al., 2004] Roos, A., Xu, W., Castellano, G., Nauta, A. J., Garred, P., Daha, M. R., and van Kooten, C. (2004). Mini-review : A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *Eur J Immunol*, **34**(4), 921–929.
- [Rosenberg et al., 1988] Rosenberg, A. M., Prokopchuk, P. A., and Lee, J. S. (1988). The binding of native dna to the collagen-like segment of clq. *J Rheumatol*, **15**(7), 1091–1096.

- [Roumenina et al., 2006] Roumenina, L. T., Ruseva, M. M., Zlatarova, A., Ghai, R., Kolev, M., Olova, N., Gadjeva, M., Agrawal, A., Bottazzi, B., Mantovani, A., Reid, K. B. M., Kishore, U., and Kojouharova, M. S. (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**(13), 4093–4104.
- [Russell et al., 1998] Russell, L., Waring, P., and Beaver, J. P. (1998). Increased cell surface exposure of fucose residues is a late event in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **250**(2), 449–453.
- [Sadasivan et al., 1996] Sadasivan, B., Lehner, P. J., Ortmann, B., Spies, T., and Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of mhc class i molecules with tap. *Immunity*, **5**(2), 103–114.
- [Sambrano and Steinberg, 1995] Sambrano, G. R. and Steinberg, D. (1995). Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages : role of membrane phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(5), 1396–1400.
- [Sarter et al., 2007] Sarter, K., Mierke, C., Beer, A., Frey, B., Führrohr, B. G., Schulze, C., and Franz, S. (2007). Sweet clearance : involvement of cell surface glycans in the recognition of apoptotic cells. *Autoimmunity*, **40**(4), 345–348.
- [Sasaki and Yonemasu, 1983] Sasaki, T. and Yonemasu, K. (1983). Chemical studies on the isolated collagen-like and globular fragment of complement component c1q. comparative studies on bovine and human c1q. *Biochim Biophys Acta*, **742**(1), 122–128.
- [Savill, 1997] Savill, J. (1997). Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull*, **53**(3), 491–508.
- [Savill et al., 2002] Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., and Haslett, C. (2002). A blast from the past : clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*, **2**(12), 965–975.
- [Savill and Fadok, 2000] Savill, J. and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, **407**(6805), 784–788.
- [Savill et al., 1992] Savill, J., Hogg, N., Ren, Y., and Haslett, C. (1992). Thrombospondin cooperates with cd36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest*, **90**(4), 1513–1522.
- [Savill et al., 1989] Savill, J. S., Henson, P. M., and Haslett, C. (1989). Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. *J Clin Invest*, **84**(5), 1518–1527.

- [Schagat et al., 2001] Schagat, T. L., Wofford, J. A., and Wright, J. R. (2001). Surfactant protein a enhances alveolar macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Immunol*, **166**(4), 2727–2733.
- [Schauer, 2004] Schauer, R. (2004). Sialic acids : fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology (Jena)*, **107**(1), 49–64.
- [Schlegel and Williamson, 2001] Schlegel, R. A. and Williamson, P. (2001). Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ*, **8**(6), 551–563.
- [Schrag et al., 2001] Schrag, J. D., Bergeron, J. J., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D. Y., and Cygler, M. (2001). The structure of calnexin, an er chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell*, **8**(3), 633–644.
- [Schravendijk and Dwek, 1982] Schravendijk, M. R. V. and Dwek, R. A. (1982). Interaction of c1q with dna. *Mol Immunol*, **19**(9), 1179–1187.
- [Schultz and Arnold, 1981] Schultz, D. R. and Arnold, P. I. (1981). The first component of human complement : on the mechanism of activation by some carbohydrates. *J Immunol*, **126**(5), 1994–1998.
- [Scott et al., 2001] Scott, R. S., McMahon, E. J., Pop, S. M., Reap, E. A., Caricchio, R., Cohen, P. L., Earp, H. S., and Matsushima, G. K. (2001). Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by mer. *Nature*, **411**(6834), 207–211.
- [Shoenfeld et al., 1987] Shoenfeld, Y., Segol, G., Segol, O., Neary, B., Klajman, A., Stollar, B. D., and Isenberg, D. A. (1987). Detection of antibodies to total histones and their subfractions in systemic lupus erythematosus patients and their asymptomatic relatives. *Arthritis Rheum*, **30**(2), 169–175.
- [Sidransky, 2000] Sidransky, D. (2000). Circulating dna. what we know and what we need to learn. *Ann N Y Acad Sci*, **906**, 1–4.
- [Sims and Wiedmer, 2001] Sims, P. J. and Wiedmer, T. (2001). Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost*, **86**(1), 266–275.
- [Smith and Koch, 1989] Smith, M. J. and Koch, G. L. (1989). Multiple zones in the sequence of calreticulin (crp55, calregulin, hacbp), a major calcium binding er/sr protein. *EMBO J*, **8**(12), 3581–3586.
- [Stach et al., 2000] Stach, C. M., Turnay, X., Voll, R. E., Kern, P. M., Kollwos, W., Beyer, T. D., Kalden, J. R., and Herrmann, M. (2000). Treatment with annexin v increases immunogenicity of apoptotic human t-cells in balb/c mice. *Cell Death Differ*, **7**(10), 911–915.
- [Steel and Whitehead, 1994] 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**(2), 81–88.

- [Steinø et al., 2004] Steinø, A., Jørgensen, C. S., Laursen, I., and Houen, G. (2004). Interaction of c1q with the receptor calreticulin requires a conformational change in c1q. *Scand J Immunol*, **59**(5), 485–495.
- [Stuart et al., 1997] Stuart, G. R., Lynch, N. J., Day, A. J., Schwaeble, W. J., and Sim, R. B. (1997). The c1q and collectin binding site within c1q receptor (cell surface calreticulin). *Immunopharmacology*, **38**(1-2), 73–80.
- [Stuart et al., 1996] Stuart, G. R., Lynch, N. J., Lu, J., Geick, A., Moffatt, B. E., Sim, R. B., and Schwaeble, W. J. (1996). Localisation of the c1q binding site within c1q receptor/calreticulin. *FEBS Lett*, **397**(2-3), 245–249.
- [Stuart et al., 2005] Stuart, L. M., Takahashi, K., Shi, L., Savill, J., and Ezekowitz, R. A. B. (2005). Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. *J Immunol*, **174**(6), 3220–3226.
- [Su et al., 2002] Su, H. P., Nakada-Tsukui, K., Tosello-Trampont, 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**(14), 11772–11779.
- [Swairjo et al., 1995] Swairjo, M. A., Concha, N. O., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R., and Seaton, B. A. (1995). Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin v. *Nat Struct Biol*, **2**(11), 968–974.
- [Tacnet-Delorme et al., 2001] 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**(11), 6374–6381.
- [Tan et al., 2006] Tan, Y., Chen, M., Li, Z., Mabuchi, K., and Bouvier, M. (2006). The calcium- and zinc-responsive regions of calreticulin reside strictly in the n-/c-domain. *Biochim Biophys Acta*, **1760**(5), 745–753.
- [Tas et al., 1999] 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**(9), 5056–5063.
- [Taylor et al., 2000] Taylor, P. R., Carugati, A., Fadok, V. A., Cook, H. T., Andrews, M., Carroll, M. C., Savill, J. S., Henson, P. M., Botto, M., and Walport, M. J. (2000). A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med*, **192**(3), 359–366.
- [Taylor et al., 2001] Taylor, P. R., Seixas, E., Walport, M. J., Langhorne, J., and Botto, M. (2001). Complement contributes to protective immunity against reinfection by plasmodium chabaudi chabaudi parasites. *Infect Immun*, **69**(6), 3853–3859.

- [Teillet, 2006] Teillet, F. (2006). *Caractérisation fonctionnelle et structurale de la protéase MASP-3 associée à la MBL et aux ficolines*. PhD thesis, Université Joseph Fourier.
- [Tenner, 1998] Tenner, A. J. (1998). C1q receptors : regulating specific functions of phagocytic cells. *Immunobiology*, **199**(2), 250–264.
- [Thielens et al., 1993] Thielens, N. M., Bally, I. M., Ebenbichler, C. F., Die-rich, M. P., and Arlaud, G. J. (1993). Further characterization of the interaction between the c1q subcomponent of human c1 and the trans-membrane envelope glycoprotein gp41 of hiv-1. *J Immunol*, **151**(11), 6583–6592.
- [Tissot et al., 2003] Tissot, B., Daniel, R., and Place, C. (2003). Interac-tion of the c1 complex of complement with sulfated polysaccharide and dna probed by single molecule fluorescence microscopy. *Eur J Biochem*, **270**(23), 4714–4720.
- [Trouw et al., 2008] Trouw, L. A., Blom, A. M., and Gasque, P. (2008). Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol Immunol*, **45**(5), 1199–1207.
- [Uwatoko and Mannik, 1990] Uwatoko, S. and Mannik, M. (1990). The lo-cation of binding sites on c1q for dna. *J Immunol*, **144**(9), 3484–3488.
- [Vance and Steenbergen, 2005] Vance, J. E. and Steenbergen, R. (2005). Me-tabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res*, **44**(4), 207–234.
- [Vandivier et al., 2002] Vandivier, R. W., Ogden, C. A., Fadok, V. A., Hoff-mann, 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**(7), 3978–3986.
- [Varki, 1997] Varki, A. (1997). Sialic acids as ligands in recognition pheno-mena. *FASEB J*, **11**(4), 248–255.
- [Vaux and Korsmeyer, 1999] Vaux, D. L. and Korsmeyer, S. J. (1999). Cell death in development. *Cell*, **96**(2), 245–254.
- [Voll et al., 1997] Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., and Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, **390**(6658), 350–351.
- [Walport, 2001] Walport, M. J. (2001). Complement. first of two parts. *N Engl J Med*, **344**(14), 1058–1066.
- [Waring et al., 1999] Waring, P., Lambert, D., Sjaarda, A., Hurne, A., and Beaver, J. (1999). Increased cell surface exposure of phosphatidylserine on propidium iodide negative thymocytes undergoing death by necrosis. *Cell Death Differ*, **6**(7), 624–637.

- [Warren et al., 2002] Warren, J., Mastroeni, P., Dougan, G., Noursadeghi, M., Cohen, J., Walport, M. J., and Botto, M. (2002). Increased susceptibility of c1q-deficient mice to salmonella enterica serovar typhimurium infection. *Infect Immun*, **70**(2), 551–557.
- [Watanabe-Fukunaga et al., 1992] Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, **356**(6367), 314–317.
- [White et al., 1995] White, T. K., Zhu, Q., and Tanzer, M. L. (1995). Cell surface calreticulin is a putative mannoside lectin which triggers mouse melanoma cell spreading. *J Biol Chem*, **270**(27), 15926–15929.
- [Williams, 2006] Williams, D. B. (2006). Beyond lectins : the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, **119**(Pt 4), 615–623.
- [Wlodawer and Hodgson, 1975] Wlodawer, A. and Hodgson, K. O. (1975). Crystallization and crystal data of monellin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**(1), 398–399.
- [Wood et al., 2000] Wood, W., Turmaine, M., Weber, R., Camp, V., Maki, R. A., McKercher, S. R., and Martin, P. (2000). Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless pu.1 null mouse embryos. *Development*, **127**(24), 5245–5252.
- [Wyllie et al., 1980] Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death : the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **68**, 251–306.
- [Yao et al., 2004] Yao, Z. Q., Eisen-Vandervelde, A., Waggoner, S. N., Cale, E. M., and Hahn, Y. S. (2004). Direct binding of hepatitis c virus core to gc1qr on cd4+ and cd8+ t cells leads to impaired activation of lck and akt. *J Virol*, **78**(12), 6409–6419.
- [Youle and Strasser, 2008] Youle, R. J. and Strasser, A. (2008). The bcl-2 protein family : opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**(1), 47–59.
- [Zhang et al., 1997] Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R., and Yan, G. (1997). Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin v. *Biotechniques*, **23**(3), 525–531.
- [Zhou et al., 2001] Zhou, Z., Hartwig, E., and Horvitz, H. R. (2001). Ced-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *c. elegans*. *Cell*, **104**(1), 43–56.