



HAL
open science

Etude de la calréticuline de la cellule en apoptose précoce et son interaction avec C1q et le phagocyte

Rim Osman

► **To cite this version:**

Rim Osman. Etude de la calréticuline de la cellule en apoptose précoce et son interaction avec C1q et le phagocyte. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV042 . tel-01599050

HAL Id: tel-01599050

<https://theses.hal.science/tel-01599050>

Submitted on 1 Oct 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Rim OSMAN

Thèse dirigée par **Philippe FRACHET**

préparée au sein du **Institut de Biologie Structurale**
Groupe IRPAS, Equipe ASP
dans **l'École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

Etude de la calréticuline de la cellule en apoptose précoce et son interaction avec C1q et le phagocyte

Thèse soutenue publiquement le **23 novembre 2015**
devant le jury composé de :

Mme Claire VOURC'H

Professeur de l'Université de Grenoble, Présidente du jury

Mme Véronique FREMEAUX-BACCHI

Praticien Hospitalier, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Rapporteur

M. Sylvain PERRUCHE

Chargé de recherche 1 INSERM, Etablissement Français du sang B/FC Besançon, Rapporteur

Mme Véronique WITKO-SARSAT

Directeur de Recherche INSERM, Institut Cochin Paris, Examineur

M. Jean-Michel JAULT

Directeur de Recherche CNRS, Institut de Biologie et Chimie des Protéines Lyon, Examineur

M. Philippe FRACHET

Maître de conférences de l'Université de Grenoble, Directeur de thèse



Remerciements

Je tiens à exprimer tout d'abord ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Dr. Philippe Frachet, pour m'avoir accueillie dans son équipe. Je le remercie pour le soutien, la confiance et l'indépendance qu'il m'a accordés au cours de ces trois années.

Mes sincères remerciements vont au Pr. Claire Vourc'h d'avoir accepté la présidence du jury. J'adresse mes remerciements et ma gratitude aux docteurs Véronique Fremeaux-Bacchi et Sylvain Perruche pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie chaleureusement les docteurs Véronique Witko-Sarsat et Jean-Michel Jault pour leurs conseils lors de mes comités de suivi de thèse. Je les remercie également d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie Pascale Tacnet pour son aide technique, ses encouragements et sa gentillesse. Je remercie le Dr. Jean-Philippe Kleman et Françoise Lacroix pour leur aide en cytométrie et en microscopie, en particulier pour les expériences de FRET.

Mes remerciements vont aussi aux membres du groupe IRPAS tout particulièrement à Monique pour son sourire, sa gentillesse et nos belles discussions.

Merci au Dr. Nicole Thielens pour ses conseils concernant la molécule de C1q.

Je remercie mes collègues de bureau Christophe et Catarina. Merci Catarina pour ton respect, ton soutien et ton attention.

Je remercie mes amies de l'IBS Rida, Amel, Mariam, Lynda et Elodie. Un grand merci à Hind. J'ai également une pensée pour Mathias et Sabine qui ont fait de courts stages dans notre laboratoire.

Je ne peux pas oublier ma chère Naima, et mon amie et ma sœur Maha pour avoir toujours été à mes côtés malgré la distance qui nous sépare. Merci aussi à Haydi, Houssam et Zahira.

Finalement, je remercie infiniment et de tout cœur ma famille tout particulièrement mes parents. Ma reconnaissance envers vous est inestimable. Merci pour vos sacrifices, votre amour et votre générosité. Je remercie ma grand-mère, mes frères, mes sœurs et mes beaux-parents. Et à toi Abdallah, je t'adresse mes immenses remerciements, merci d'être là, merci pour ta patience et merci parce que tu es toi.

A mon grand-père,

Que ce travail soit parmi les bonnes œuvres

Table des matières

I. INTRODUCTION	1
I.1 Apoptose et efferocytose	1
I.1.1 Apoptose	1
I.1.1.1 Voies d'activation de l'apoptose	3
I.1.1.2 Rôles physiologique et pathologique de l'apoptose	5
I.1.2 Phagocytose des cellules apoptotiques	6
I.1.2.1 Signaux « find-me » : Recrutement des phagocytes	7
I.1.2.2 Signaux « eat-me » : Reconnaissance de la cellule apoptotique	7
I.1.2.3 Voies intracellulaires de réorganisation du cytosquelette d'actine du phagocyte	9
I.1.2.4 Mécanismes d'internalisation	12
I.1.2.5 Types de phagocytes et réponse anti-inflammatoire	12
I.1.2.5.a Phagocytes professionnels	13
I.1.2.5.b Phagocytes non professionnels	15
I.1.2.6 Autres conséquences de la phagocytose des cellules apoptotiques	16
I.2 C1q	18
I.2.1 Structure du C1q	18
I.2.2 Fonctions immunologiques du C1q	19
I.2.2.1 C1q active la voie classique du complément	19
I.2.2.2 C1q contribue à l'efferocytose	20
I.2.2.3 Interactions de C1q et activation du complément	24
I.3 Calréticuline	25
I.3.1 Structure de la CRT	25
I.3.2 Modifications post-traductionnelles de la CRT	27
I.3.3 Fonctions de la CRT	28
I.3.3.1 Chaperonne/Contrôle-Qualité	29
I.3.3.2 Rôle de la CRT dans l'apoptose et la phagocytose	30
I.3.3.3 Immunogénicité de la CRT de surface	33
I.3.3.4 Effet immunomoduleur de la CRT soluble	35
I.3.3.5 Mécanismes de translocation de la CRT à la surface cellulaire	36
I.4 Projet de thèse	40
I.4.1 Résultats à la base du projet	40
I.4.2 Objectifs de mon travail de thèse	42
II. MATERIELS ET METHODES	43
II.1 Biologie cellulaire	43
II.1.1 Lignées et culture cellulaire	43
II.1.2 Induction de l'apoptose	44
II.1.3 Transfection des cellules	44
II.2 Analyses de la fluorescence	47
II.2.1 Marquage par des protéines fluorescentes	47
II.2.2 Marquage par immunofluorescence	47
II.2.3 Analyse par cytométrie en flux	48
II.2.4 Analyse par microscopie	49

II.3 Analyses fonctionnelles	50
II.3.1 Analyse de l'apoptose	50
II.3.2 Tests de phagocytose	51
II.3.2.1 Phagocytose des cellules apoptotiques	51
II.3.2.2 Phagocytose des billes.....	53
II.3.3 Test de migration.....	54
II.3.4 Test de prolifération.....	55
II.4 Analyses biochimiques	55
II.4.1 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS	55
II.4.2 Techniques de transfert sur membrane	56
II.4.3 Préparation des protéines d'intérêt	57
II.4.3.1 Préparation des protéines cellulaires	57
II.4.3.2 Purification du C1q plasmatique et de ses têtes globulaires.....	58
II.4.3.3 Purification de la calréticuline recombinante	58
II.4.3.4 Détermination de la concentration des protéines purifiées	59
II.5 Analyse des interactions protéiques	59
II.5.1 Mesure de FRET	59
II.5.2 Analyse par overlay	61
II.6 Analyse statistique	62
III. RESULTATS	64
III.1 Temps précoce d'apoptose	64
III.1.1 Modèle cellulaire et inducteur d'apoptose	64
III.1.2 Comparaison de l'exposition membranaire de la CRT et de la PS	65
III.1.3 Fixation de C1q	67
III.1.4 Co-localisation entre CRT et C1q.....	68
III.1.5 Etude par FRET de l'interaction entre CRT et C1q.....	69
III.1.5.1 Mise au point du protocole	69
III.1.5.2 Détection de l'interaction CRT/C1q	71
III.1.6 Effet de C1q sur la phagocytose	74
III.1.6.1 Optimisation du test de phagocytose	74
III.1.6.2 Effet de C1q sur la phagocytose des cellules pré-apoptotiques	74
III.1.6.3 Effet de la diminution de l'expression de la CRT endogène	75
III.1.7 Conclusion	76
III.2 Calréticuline extracellulaire	77
III.2.1 Les cellules apoptotiques précoces relarguent leur CRT.....	77
III.2.2 Effets de la CRT extracellulaire sur la biologie des phagocytes	80
III.2.2.1 La fonction de phagocytose	80
III.2.2.1.a La capacité d'induire la phagocytose des billes	80
III.2.2.1.b La capacité d'induire la phagocytose des cellules apoptotiques	81
III.2.2.2 La morphologie.....	84
III.2.2.3 La migration.....	85
III.2.2.4 La différenciation	87
III.2.2.5 La différenciation des monocytes.....	89
III.2.2.6 La prolifération des monocytes	90
III.2.3 Conclusion	91

III.3 Fixation et internalisation de la CRT exogène par les phagocytes.....	92
III.3.1 Analyse de la CRT des macrophages incubés avec des surnageants des cellules apoptotiques	92
III.3.2 Fixation de la CRT recombinante sur les macrophages	94
III.3.3 Internalisation de la CRT exogène par les macrophages	95
III.3.4 Conclusion	98
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	99
IV.1 L'exposition en surface de la calréticuline est un signal « pré-apoptotique ».....	99
IV.2 C1q favorise la phagocytose des cellules pré-apoptotiques <i>via</i> son interaction précoce avec la calréticuline.....	100
IV.3 La calréticuline est relarguée par les cellules apoptotiques.....	102
IV.4 La calréticuline extracellulaire module les fonctions du macrophage	103
IV.5 La calréticuline interagit avec le macrophage	106
IV.5.1 A la recherche des partenaires de surface	106
IV.5.2 Endocytose par macropinocytose.....	110
IV.5.3 Mot de la fin	111
ANNEXE.....	113
REFERENCES	114

Table des illustrations

Figure 1. Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.	4
Figure 2. Pathologies associées à la dérégulation de l'apoptose.	5
Figure 3. Voies de signalisation impliquées dans l'internalisation des cellules apoptotiques.....	11
Figure 4. Types de phagocytes et leurs réponses au cours de l'efferoctose.	17
Figure 5. Représentation structurale de C1q.	19
Figure 6. Modèle illustrant les différentes voies de contribution de C1q à l'efferoctose.	23
Figure 7. Modèle hypothétique de l'activation de C1 en fonction des sites de liaison situés dans le domaine globulaire de C1q.....	24
Figure 8. Structures linéaire et tridimensionnelle de la calréticuline.	27
Figure 9. Différents rôles de la CRT à l'intérieur et à l'extérieur du RE.	28
Figure 10. Modifications survenant à la surface des cellules apoptotiques.	33
Figure 11. Exposition immunogène de la CRT à la surface des cellules cancéreuses.	35
Figure 12. Voies d'exposition de la CRT à la surface cellulaire à différents stades d'apoptose.....	39
Figure 13. Coopération entre C1q et CRT au sein de la synapse efferoctaire.	41
Figure 14. Analyse de l'apoptose des cellules Jurkat irradiées.	50
Figure 15. Analyse de la phagocytose des cellules Jurkat irradiées.	53
Figure 16. Analyse de la phagocytose des billes.	54
Figure 17. Représentation schématique des différents domaines de la calréticuline humaine recombinante entière.....	58
Figure 18. Spectres de fluorescence du couple donneur/accepteur utilisé pour le FRET.....	60
Figure 19. Analyse comparative de l'exposition de la PS et de la CRT à la surface des cellules à des temps très précoces d'apoptose.	66
Figure 20. Analyse de la fixation des gC1q à la surface des cellules non irradiées et apoptotiques précoces.	68
Figure 21. Double marquage CRT/C1q de la surface des cellules IR 30'.	68
Figure 22. Schéma représentant la stratégie d'immunomarquage utilisée pour tester le FRET entre la CRT et C1q.....	70
Figure 23. Analyse de l'interaction de la CRT et des têtes globulaires de C1q (ou C1q) à la surface des cellules IR 30' pré-apoptotiques.	71
Figure 24. Analyse par FRET de l'interaction entre la CRT et les têtes globulaires de C1q à la surface des cellules N IR et IR 120'.	73
Figure 25. Effet de C1q sur la phagocytose des cellules IR 30' et IR 120'.	75

Figure 26. Analyse de la CRT à la surface des cellules et relarguée dans le milieu de culture.	79
Figure 27. Effet de la CRT exogène recombinante sur la capacité des macrophages à phagocyter des billes.....	81
Figure 28. Analyse de la fixation de la CRT exogène sur les cellules Jurkat IR 120' et son effet sur leur phagocytose.	82
Figure 29. Analyse de la fixation de la CRT exogène sur les macrophages THP1 et son effet sur la phagocytose.	83
Figure 30. Changements morphologiques des phagocytes THP1 matures provoqués par l'ajout de CRT _r dans leur milieu.....	84
Figure 31. Effet de la calréticuline exogène sur la migration cellulaire.	86
Figure 32. Effet de CRT _r sur les marqueurs CD11b, CD11c et CD14 de la surface des macrophages.	88
Figure 33. Effet de la CRT exogène sur les marqueurs de surface CD14 et CD11c des monocytes THP1.....	89
Figure 34. Effet de la CRT exogène sur la prolifération des monocytes THP1.	90
Figure 35. Analyse de la CRT de surface des macrophages mis en contact avec des milieux conditionnés.	93
Figure 36. Comparaison de la fixation de la CRT _r -A488 par les macrophages à 4 °C et à 37 °C.	94
Figure 37. Etude de l'internalisation de la CRT exogène par les macrophages THP1.....	95
Figure 38. Analyse de l'internalisation de la CRT exogène par les macrophages traités par la cytochalasine D et l'EIPA.	96
Figure 39. Expression de CD91 sur les macrophages THP1 et comparaison de sa localisation avec celle de la CRT exogène.	97
Figure 40. Double marquage CRT endogène/CD91 de la surface des macrophages THP1.	107
Figure 41. Interaction entre la CRT et les protéines membranaires du macrophage.	108
Figure 42. Analyse cinétique de l'interaction entre CRT et SREC-1.....	109
Figure 43. Modèle hypothétique des rôles de la calréticuline dans la phagocytose des cellules apoptotiques très précoces.	112

Table des tableaux

Tableau 1. Liste des molécules avec lesquelles C1q peut interagir à la surface de la cellule apoptotique et du phagocyte	20
Tableau 2. Liste des molécules de la surface de la cellule mourante, de l'espace intermédiaire et de la surface du phagocyte avec lesquelles la CRT peut interagir	32
Tableau 3. Séquences des ARNi utilisés pour la transfection des cellules Jurkat.....	45
Tableau 4. Différentes conditions testées pour la transfection des siARN CRT par électroporation....	46
Tableau 5. Configuration optique du cytomètre MACSQuant.....	49
Tableau 6. Coefficients d'extinction molaire et masses molaires des protéines purifiées.....	59
Tableau 7. Liste des anticorps utilisés.....	63

Liste des abréviations

A488	Fluorophore Alexa 488 (<i>Alexa Fluor 488</i>)
ACAMP	Motifs moléculaires associés aux cellules apoptotiques (<i>Apoptotic Cell Associated Molecular Patterns</i>)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
APC	Cellules présentatrices d'antigènes (<i>Antigen presenting cells</i>)
ARNi	Acide RiboNucléique interférent
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
AV	Annexine V
BSA	Albumine sérique bovine (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
Btk	Tyrosine kinase de Bruton (<i>Bruton's tyrosine kinase</i>)
cC1q	Queue collagène de C1q
cC1qR	Récepteur de la queue collagène de C1q
CED	Mort cellulaire de <i>C.elegans</i> (<i>C.elegans cell Death</i>)
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CMH I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité I
CNX	Calnexine
CR1	Récepteur 1 du complément (<i>Complement receptor 1</i>)
CRT	Calréticuline
CRT _r	Calréticuline recombinante
Cyan 3	Cyanine 3
CytD	Cytochalasine D
DAMP	Motifs moléculaires associés au danger (<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>)
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DD	Domaine de mort (<i>Death Domain</i>)
DIC	Contraste interférentiel différentiel
DO	Densité Optique
EIPA	Ethylisopropylamiloride
ERp57	Protéine du réticulum endoplasmique de 57 kDa (<i>Endoplasmic Reticulum protein 57 kDa</i>)
FRET	Transfert d'énergie par résonance en fluorescence (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)
FSC	Lumière diffractée mesurée en face (<i>Forward Scatter</i>)
GAPDH	GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
gC1q	Région globulaire de C1q
gC1qR	Récepteur de la région globulaire de C1q
HSP	Protéines de choc thermique (<i>Heat Shock Proteins</i>)
IBS	Institut de Biologie Structurale
IF	ImmunoFluorescence
IL	Interleukine
IR	Irradié
KD	Constante d'affinité
kDa	Kilo Dalton
KDEL	Séquence (Lys-Asp-Glu-Leu) de rétention dans le RE
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	Lipoprotéine de faible densité-protéine apparentée au récepteur (<i>Low density Lipoprotein Receptor-Related Protein</i>)
MBL	Lectine liant le mannose (<i>Mannan-Binding Lectin</i>)
MCI	Mort cellulaire immunogène
MFI	Moyenne de l'intensité de fluorescence
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B (<i>Nuclear Factor-kappa B</i>)
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes (<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PBS	Tampon phosphate salin (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PFA	Paraformaldéhyde
PI	Iodure de propidium (<i>Propidium Iodide</i>)
PM	Poids Moléculaire
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PRR	Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (<i>Pattern Recognition Receptors</i>)
PS	Phosphatidylsérine
p/v	Poids/volume

PVDF	Polyfluorure de vinylidène
RAP	<i>Related-Associated Protein</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RFI	Moyenne d'intensité de fluorescence relative
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène (<i>Reactive oxygen species</i>)
rpm	Rotation par minute
SD	Ecart-type (Standard Deviation)
SDS	Dodécylsulfate de sodium (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
siARN	Petit ARN interférent (<i>Small interfering ARN</i>)
SIRP α	Protéine α régulatrice inhibitrice du signal (<i>Signal Inhibitory Regulatory Protein α</i>)
SPR	Résonance plasmonique de surface
SRA	Récepteur « scavenger » A (<i>Scavenger receptor A</i>)
SREC-1	Récepteur « scavenger » 1 exprimé par les cellules endothéliales (<i>Scavenger Receptor Expressed by Endothelial cells-1</i>)
SSC	Lumière diffractée mesurée sur le côté (<i>Side SCatter</i>)
SVF	Sérum de veau foetal
TGF	Facteur de croissance transformant (<i>Transforming growth factor</i>)
TLR	Récepteurs de type Toll (<i>Toll-like Receptors</i>)
TNF	Facteur de nécrose tumorale (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
Treg	Lymphocytes T régulateurs
UV	Radiations UltraViolettes
WB	Western Blot

I. INTRODUCTION

I.1 Apoptose et efferocytose

I.1.1 Apoptose

S'il est évident que les cellules doivent se diviser et se différencier pour constituer un organisme complexe, il est contre-intuitif que des millions de cellules meurent durant le développement et la vie adulte. Cependant, une mitose sans une mort cellulaire peut provoquer l'accumulation de deux tonnes de moelle osseuse et de ganglions lymphatiques, et 16 kilomètres d'intestins chez un individu à l'âge de 80 ans. Il existe donc un équilibre entre la division et la mort cellulaire qui assure la régulation du nombre des cellules dans l'organisme (Melino, 2001).

La première description de la mort cellulaire a été introduite après l'établissement de la théorie cellulaire par Carl Vogt en 1842 (Peter *et al.*, 1997). Mais le vrai concept de « mort cellulaire programmée » n'a été évoqué qu'en 1965 pour expliquer le fait que les cellules sont en quelque sorte programmées pour mourir au cours de l'embryogenèse (Lockshin *et al.*, 1965). Sept ans plus tard, Kerr et ses collègues ont décrit les changements morphologiques de la mort cellulaire au cours du développement et de l'homéostasie tissulaire. Ils ont utilisé le terme « apoptose » signifiant la chute des feuilles en grec pour distinguer ce type de mort cellulaire de la nécrose, destruction cellulaire induite par des conditions physico-chimiques extrêmes (Kerr *et al.*, 1972).

La mort cellulaire s'effectue selon au moins deux modes très différents : un mode programmé et bien géré qui est l'apoptose et une forme accidentelle et non ordonnée qui est la nécrose (pour revue Kanduc *et al.*, 2002). Un troisième mode a été également décrit sous le nom de la mort cellulaire autophagique (pour revue Tsujimoto et Shimizu, 2005).

L'autophagie est un processus physiologique survenant dans des conditions de stress cellulaire, en particulier dans le cas de manque de nutriments et de facteurs de croissance. Elle permet à la cellule de maintenir ses fonctions homéostatiques afin d'assurer sa survie. Plusieurs études ont permis aujourd'hui de démontrer que sous certaines conditions, la machinerie de l'autophagie peut être aussi recrutée pour induire la mort cellulaire appelée spécifiquement mort cellulaire autophagique (Gozuacik et Kimchi, 2007). Ce type de mort est

accompagné par la vacuolisation autophagique à grande échelle du cytoplasme et se produit en absence de condensation de la chromatine (pour revue Kroemer et Levine, 2008).

En ce qui concerne la nécrose, elle est généralement induite par l'exposition des cellules à des conditions extrêmes comme une anoxie brutale, la chaleur et les radiations UV. Elle est associée à l'apparition de plusieurs maladies comme la neurodégénérescence et l'ischémie-reperfusion (pour revue Vanlangenakker *et al.*, 2008). Les conséquences de la nécrose sur la cellule sont dramatiques : une destruction générale provenant de la désintégration de la membrane cytoplasmique suivie par le relargage du contenu cellulaire toxique dans le milieu extracellulaire, ce qui va endommager les tissus environnants et provoquer une réponse inflammatoire (pour revue Henson et Hume, 2006).

Quant à la mort cellulaire par apoptose, elle est moins « agressive » aussi bien pour la cellule que pour son environnement. Ainsi, l'intégrité de la membrane plasmique et la structure des organelles cellulaires sont maintenues au cours des premières phases de l'apoptose. La cellule apoptotique développe plusieurs caractéristiques morphologiques comme la condensation du cytoplasme, l'agrégation de la chromatine, la fragmentation du noyau, et la formation à la surface de la cellule de structures caractéristiques appelées « blebs » ou corps apoptotiques contenant du matériel cytoplasmique et des fragments de noyau. Une fois le programme apoptotique déclenché, les dégradations cellulaires se font progressivement ce qui laisse le temps aux phagocytes d'intervenir pour permettre l'élimination. Contrairement à la nécrose qui est un processus inflammatoire, l'apoptose ne provoque généralement pas de réponse inflammatoire car les cellules apoptotiques sont rapidement éliminées avant que leurs structures ne soient dégradées empêchant ainsi la libération du contenu intracellulaire toxique. Cependant un défaut dans ce processus provoque une « nécrose secondaire » pouvant conduire à une réaction inflammatoire (pour revue Hensen et Hume, 2006).

Malgré les grandes différences entre l'apoptose et la nécrose, ces 2 mécanismes ne sont pas complètement indépendants, et une voie de « cross talk » intermédiaire a été mise en évidence. Il s'agit en effet d'une forme programmée de mort cellulaire par nécrose dite « nécroptose » partageant plusieurs caractéristiques avec l'apoptose et souvent rencontrée *in vivo*, notamment dans les cas de neurodégénération, d'ischémie et d'infection (pour revue Nikolettou *et al.*, 2013).

Dans la suite de cette partie sera présenté un aperçu général sur la mort cellulaire par apoptose, ses voies d'activation, ses rôles physiologique et pathologique ainsi que les processus d'élimination des cellules apoptotiques.

I.1.1.1 Voies d'activation de l'apoptose

Les mécanismes d'apoptose impliquent une cascade complexe d'événements moléculaires. Ces mécanismes ont été pour l'essentiel décrits grâce aux études faites sur le développement du nématode *C. elegans* (Horvitz, 1999).

L'apoptose est étroitement régulée par une famille de protéases appelées caspases (cysteinyl-aspartate-cleaving protease) qui fonctionnent en clivant leurs substrats au niveau de résidus aspartate. Les caspases assurent deux fonctions majeures : les caspases 1, 4, 5 et 11 sont essentielles lors de l'activation des cytokines pro-inflammatoires, alors que les caspases 2, 3, 6, 7, 8 et 9 sont associées à l'exécution de l'apoptose. Toutes les caspases existent sous forme de molécules inactives ou zymogènes et sont activées par la dimérisation et/ou la protéolyse. Les caspases peuvent être divisées en deux classes en fonction de la longueur de leur pro-domaine : les caspases initiatrices et les caspases effectrices. Une fois activées, les caspases initiatrices activent à leur tour les caspases effectrices qui clivent ensuite un large nombre de protéines cellulaires vitales conduisant ainsi aux différents changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose (Cavallucci et D'Amelio, 2010).

Deux voies principales d'apoptose existent en fonction du stimulus de la mort : la voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque et la voie mitochondriale ou voie intrinsèque (figure 1). Une troisième voie dépendante du réticulum endoplasmique (RE) en réponse à un stress a également été décrite (figure 1).

- La voie extrinsèque ou des récepteurs de mort

Un récepteur de mort est typiquement constitué d'une région extracellulaire nécessaire pour la fixation du ligand de mort et d'une région intracellulaire contenant un domaine de mort DD (Death Domain) important pour les interactions homotypiques protéine-protéine. Les récepteurs de mort sont des membres de la famille des récepteurs TNF (Tumor Necrosis Factor) et comprennent les récepteurs TNFR-1 (TNF Receptor-1), CD95 (appelé aussi Fas et APO-1), DR3 (Death Receptor-3), TRAIL-R1 (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor-1 ou aussi DR4) et TRAIL-R2 (appelé aussi DR5 chez l'homme). La voie extrinsèque est activée suite à la fixation des ligands de mort comprenant TNF, CD95-L (CD-95-Ligand appelé aussi Fas-L), TRAIL (ou Apo2-L) et TL1A (TNF-Like Ligand 1A) à leurs récepteurs de mort à la surface des cellules. Un signal de transduction apoptotique est ainsi généré par le domaine DD à travers des interactions homotypiques. Ces interactions recrutent des molécules adaptatrices contenant le domaine DD comme FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) qui lui possède un domaine DED (Death Effector

Domain) permettant à son tour le recrutement homotypique des caspases initiatrices contenant le domaine DED comme la pro-caspase 8. Ces interactions conduisent à la formation du complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex) qui va activer la caspase initiatrice 8 entraînant l'auto-protéolyse et l'activation des caspases effectrices en aval comme les caspases 3 et 7 (Cavallucci et D'Amelio, 2010).

- La voie intrinsèque ou mitochondriale

Comme son nom l'indique, cette voie est déclenchée au niveau de la mitochondrie en réponse à divers stimuli non-médiés par les récepteurs comme par exemple l'absence de certains facteurs de croissance, l'exposition aux radiations UV et aux agents chimiothérapeutiques. Elle est régulée par la famille de protéines Bcl-2 comprenant des facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. En réponse à un stimulus, les protéines pro-apoptotiques de Bcl-2 fonctionnent en perméabilisant la membrane mitochondriale externe ce qui provoque la libération de plusieurs protéines de l'intérieur de la mitochondrie dans le cytoplasme. Parmi les protéines relarguées figure le cytochrome c qui, en s'associant à APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) et à la pro-caspase 9 *via* le domaine CARD (Caspase Recruitment Domain), participe à la formation de l'apoptosome, un complexe d'activation des caspases. La pro-caspase 9 est ensuite clivée en caspase 9 active qui à son tour activera, par clivage des pro-domaines, des caspases effectrices comme les caspases 3 et 7.

La voie extrinsèque peut chevaucher avec la voie intrinsèque *via* le clivage de BID (protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2) par la caspase 8, ce qui provoque ensuite le relargage des protéines mitochondriales (Cavallucci et D'Amelio, 2010).

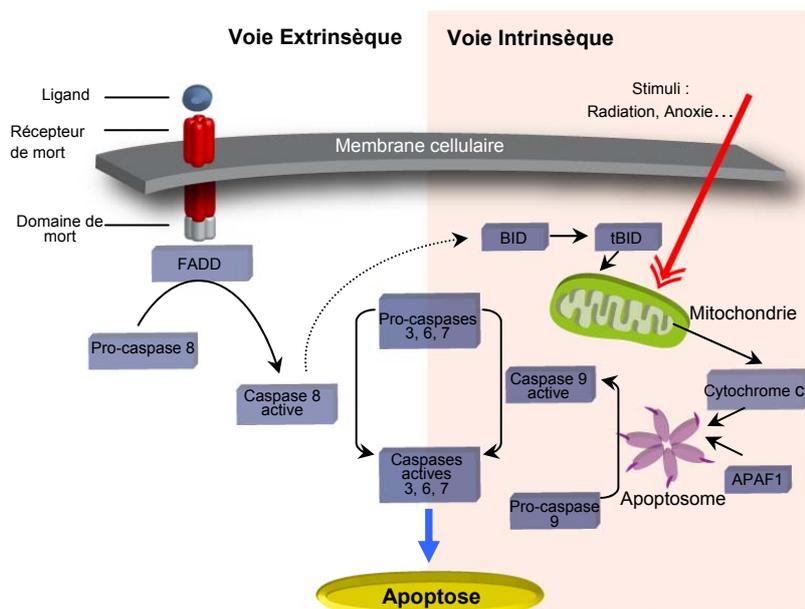


Figure 1. Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.

La voie extrinsèque de l'apoptose est activée par la fixation d'un ligand au récepteur de mort à la surface de la cellule. La voie intrinsèque est activée par des stimuli qui provoquent la libération du cytochrome c dans le cytoplasme. Les deux voies aboutissent à l'activation des caspases effectrices et l'initiation de l'apoptose.

I.1.1.2 Rôles physiologique et pathologique de l'apoptose

Un équilibre entre la mort et la vie cellulaire est nécessaire pour le bon fonctionnement de l'organisme durant le développement et la vie post-natale.

Au cours de l'embryogenèse, l'apoptose joue un rôle important dans la sculpture de certaines parties du corps. Un exemple classique est celui de la disparition par apoptose des cellules de l'espace entre les doigts en cours de formation. L'apoptose participe également à l'élimination de certaines structures embryonnaires en fonction du sexe de l'embryon comme par exemple le canal de Müller et le canal de Wolff qui constituent des structures indifférenciées des voies génitales de l'embryon. Ainsi durant le stade embryonnaire, le canal de Müller est détruit chez le mâle et le canal de Wolff est détruit chez la femelle.

Pendant la vie adulte, la perturbation de l'équilibre entre la mort et la vie cellulaire a pour conséquence l'apparition de diverses pathologies. Ainsi, le déficit d'apoptose provoque l'accumulation des cellules anormales dans le cas du cancer, l'expansion des lymphocytes dans le cas des maladies auto-immunes et la propagation des infections virales... De même, une apoptose excessive est caractéristique de plusieurs maladies comme les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), et le Sida provoqué par la réduction des lymphocytes T helper CD4+ suite à l'infection par le virus VIH-1. Sur la figure 2 les maladies provoquées par l'altération de l'apoptose sont classées en deux groupes : celles qui surviennent suite à une augmentation de survie cellulaire ou une baisse d'apoptose, et celles résultant d'un déficit d'apoptose (Cavallucci et D'Amelio, 2010).

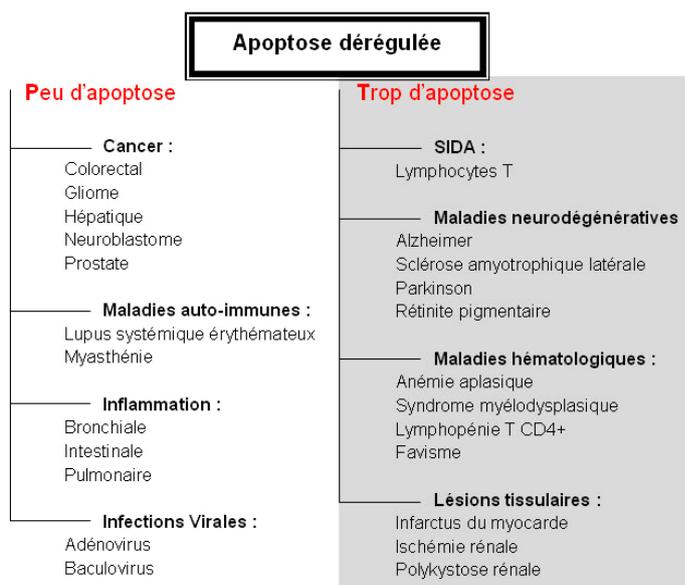


Figure 2. Pathologies associées à la dérégulation de l'apoptose.

La dérégulation de l'équilibre entre la vie et la mort cellulaire provoque le développement d'une variété de maladies. Un taux anormalement bas d'apoptose favorise la survie et l'accumulation des cellules anormales, entraînant l'apparition des maladies auto-immunes et du cancer. En revanche, une apoptose excessive est associée à plusieurs pathologies aiguës et progressives (adapté de Cavallucci et D'Amelio, 2010).

I.1.2 Phagocytose des cellules apoptotiques

Une cellule apoptotique doit être éliminée le plus rapidement possible avant qu'elle n'entre en nécrose secondaire provoquant la libération aléatoire de son contenu toxique dans le milieu environnant. Chez le nématode *C. elegans*, les cellules apoptotiques sont reconnues et éliminées avant qu'elles ne soient totalement dégradées. Cette élimination constitue alors une étape clé du programme apoptotique, et contribue au maintien de l'homéostasie tissulaire et à la protection contre l'auto-immunité (Hochreiter-Hufford et Ravichandran, 2013).

Le terme « efferocytose » est employé aujourd'hui pour désigner spécifiquement la phagocytose des cellules apoptotiques (deCathelino et Henson 2003). Les phagocytes impliqués ne sont pas seulement des professionnels comme les macrophages et les cellules dendritiques, mais aussi des non professionnels qui sont les cellules avoisinantes des cellules apoptotiques. Contrairement à la phagocytose des pathogènes ou des cellules nécrotiques, l'efferocytose ne déclenche pas de réponse inflammatoire (Henson, 2005).

Le phagocyte module donc sa réponse selon sa cible. Selon quels mécanismes ? Bien que cela reste à découvrir, les récepteurs de surface des phagocytes sont, inévitablement, en première ligne. Les cellules du système immunitaire inné expriment à leur surface des récepteurs PRRs (Pattern Recognition Receptors) qui sont capables d'interagir avec des structures PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) conservées de la surface du microbe et aussi avec des ligands ACAMPs (Apoptotic Cell Associated Molecular Patterns) spécifiques de la surface de la cellule apoptotique (Tennant *et al.*, 2013). Ainsi, un même récepteur de la surface du macrophage peut générer deux réponses immunitaires opposées en fonction de son ligand. C'est le cas par exemple du CD14 qui provoque une réponse pro-inflammatoire quand il lie le LPS (Pugin *et al.*, 1994), tandis qu'il favorise silencieusement (sans réponse inflammatoire) l'efferocytose quand il reconnaît les molécules de la surface de la cellule apoptotique (Pugin *et al.*, 1994 ; Devitt *et al.*, 1998 ; Devitt et Marshall, 2011).

L'efferocytose se déroule en plusieurs étapes. Quand une cellule devient apoptotique, elle avertit son entourage de son état en libérant des signaux « trouvez-moi » ou « find-me » qui vont permettre de recruter les phagocytes sur le site de l'apoptose. Ensuite commence l'étape de reconnaissance des signaux « mangez-moi » ou « eat-me » exposés à la surface de la cellule apoptotique par les récepteurs engagés de la surface du phagocyte. Cette étape déclenche un ensemble de voies de signalisation intracellulaires nécessaires à la réorganisation du cytosquelette d'actine permettant au phagocyte d'engloutir et de procéder à la digestion du corps apoptotique (Ravichandran, 2011). De plus, la dégradation et le

traitement appropriés du matériel apoptotique par les phagocytes professionnels, en particulier les cellules dendritiques, sont impératifs pour la présentation des antigènes du soi nécessaire pour établir et maintenir la tolérance (Delamarre *et al.*, 2005 ; Erwig et Henson, 2008 ; Hochreiter-Hufford et Ravichandran, 2013).

Dans les paragraphes suivants sont présentées les différentes étapes de l'efferocytose, les différents types de phagocytes sollicités au cours de ce processus et les conséquences de l'élimination des cellules apoptotiques.

I.1.2.1 Signaux « find-me » : Recrutement des phagocytes

Les signaux « find-me » sont des molécules secrétées par la cellule apoptotique, permettant d'annoncer sa décision de mort à son entourage et d'attirer rapidement les phagocytes responsables de son élimination (Ravichandran, 2010).

Les deux lipides LPC (LysoPhosphatidylCholine) et S1P (Sphingosine-1-Phosphate) sont décrits comme des signaux « find-me ». Leur sécrétion caspase-dépendante par la cellule mourante et leur fixation sur leurs récepteurs respectifs G2A (G2 Accumulation protein) et S1P-R de la surface du macrophage stimule le chimiotactisme des phagocytes vers le site d'apoptose (Lauber *et al.*, 2003 ; Peter *et al.*, 2008 ; Gude *et al.*, 2008). Un autre exemple est celui de la protéine associée à la membrane, fractalkine ou CX3CL1, qui est rapidement relarguée par les neurones et les cellules B apoptotiques. Elle est capable de déclencher le chimiotactisme des microglies et des macrophages après sa liaison au récepteur CX3CR1 présent à leur surface (Peter *et al.*, 2010). Une nouvelle classe de signaux « find-me » est représentée par les nucléotides UTP et ATP qui sont libérés précocement au cours de l'apoptose et qui permettent de créer un gradient d'attraction pour les monocytes *in vivo* et *in vitro* (Elliott *et al.*, 2009).

I.1.2.2 Signaux « eat-me » : Reconnaissance de la cellule apoptotique

Une fois à proximité de la cellule apoptotique, le phagocyte doit être capable de la reconnaître et de la distinguer d'une autre cellule vivante. Cette reconnaissance se fait *via* des signaux appelés « eat-me » que la cellule en apoptose, expose à sa surface et qui sont reconnus par les récepteurs de surface du phagocyte. Parallèlement, la cellule normale dispose de signaux répulsifs nommés « don't eat-me » qui empêchent son élimination par le phagocyte. Le CD31 et le CD47 sont les candidats « don't eat-me » les mieux décrits jusqu'à présent (Brown *et al.*, 2002 ; Gardai *et al.*, 2005). Ainsi, l'interaction homotypique entre le CD31 de la surface du neutrophile viable et celui de la surface du phagocyte favorise la

dissociation des deux cellules (Brown *et al.*, 2002). En ce qui concerne le CD47, il a été démontré que des érythrocytes déficients en cette molécule injectés chez la souris, sont rapidement éliminés par les macrophages contrairement aux érythrocytes CD47 positifs (Oldenborg *et al.*, 2000). De plus, Gardai et ses collègues ont proposé que le CD47 à la surface des cellules viables est reconnu par la protéine SIRP α (Signal Inhibitory Regulatory Protein α) présente à la surface du phagocyte et que cette reconnaissance bloque l'élimination *via* l'activation des tyrosines phosphatases inhibitrices (Gardai *et al.*, 2005 ; 2006).

De nombreux signaux « eat-me » sont identifiés à nos jours. Ils incluent le changement du profil de glycosylation des protéines de surface, la modification de la charge de surface, l'expression de la molécule ICAM3 (InterCellular Adhesion Molecule 3) et l'exposition du matériel nucléaire et de certaines protéines intracellulaires comme la calréticuline et l'annexine I (pour revue Hochreiter-Hufford et Ravichandran, 2013 ; Païdassi *et al.*, 2009). Néanmoins, l'exposition de la phosphatidylsérine (PS) résultant de la perte de l'asymétrie de la bicouche lipidique reste la modification la plus connue et étudiée à la surface de la cellule apoptotique (Fadok *et al.*, 1992 ; 1998 ; 2001). Le mécanisme exact de cette exposition commence à être mieux défini et il semble être dépendant des caspases (Nagata *et al.*, 2010). Un modèle proposé suggère que les translocases ATP-dépendantes qui maintiennent la PS dans la couche membranaire interne de la cellule vivante sont inactivées au cours de l'apoptose. En même temps, des scramblases Ca²⁺-dépendantes sont activées et provoquent la translocation de la PS à la surface cellulaire (Balasubramanian et Schroit, 2003 ; Sahu *et al.*, 2007). La propriété des cellules apoptotiques à exposer la PS à leur surface a été mise à profit dans le test « d'apoptose » à l'annexine V (qui reconnaît la PS) permettant de quantifier et de caractériser l'apoptose au sein d'une population cellulaire (Gardai *et al.*, 2006). Il apparaît aujourd'hui que la PS est l'un des principaux motifs qui conduit à la reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes.

La protéine chaperonne calréticuline (CRT) du réticulum endoplasmique (RE) a été classée comme le deuxième ligand de reconnaissance général (après la PS) quand elle est exposée et redistribuée à la surface des cellules apoptotiques. Elle est capable de lier et d'activer le récepteur LRP (LDL Receptor-Related Protein) ou CD91 présent à la membrane du phagocyte. La co-localisation de la CRT avec la PS à la surface des cellules en apoptose suggère que les deux molécules coopèrent ensemble pour stimuler la phagocytose (Gardai *et al.*, 2005). Le rôle de la CRT et son implication dans l'efferocytose seront détaillés dans les paragraphes ultérieurs.

La PS et les autres signaux « eat-me » de surface de la cellule apoptotique sont reconnus par des récepteurs engagés de la surface du phagocyte. Cette reconnaissance se fait soit d'une façon directe, soit d'une façon indirecte à travers des molécules solubles qui vont jouer le rôle de pont entre les deux côtés (Hochreiter-Hufford et Ravichandran, 2013). On peut donc imaginer l'espace entre la cellule apoptotique et le phagocyte comme une synapse où les molécules de surface communiquent directement ou indirectement à travers des intermédiaires. Les récepteurs phagocytaires de la PS exposée à la surface de la cellule apoptotique sont ainsi divisés en deux catégories : i) les récepteurs de liaison directe comme la famille de protéines TIM (TIM4 ; TIM1 et TIM3), BAI1 (Brain Angiogenesis Inhibitor), MFG-E8 et ii) ceux qui reconnaissent leur ligand *via* des molécules pontantes comme Gas6, la protéine S, impliquées dans la liaison de la PS aux récepteurs TAM (Tyro-3-Axl-Mer) présents à la surface des phagocytes (pour revue Ravichandran, 2010). La molécule C1q a été aussi proposée par notre groupe comme capable de ponter la PS à ses récepteurs à la surface du phagocyte (Païdassi *et al.*, 2008). C1q joue plusieurs rôles dans la reconnaissance et l'élimination des cellules en cours d'apoptose. Ces rôles seront développés ultérieurement.

I.1.2.3 Voies intracellulaires de réorganisation du cytosquelette d'actine du phagocyte

La réorganisation du cytosquelette d'actine du phagocyte est essentielle pour l'internalisation et la phagocytose du corps apoptotique. Des études menées chez le nématode *C. elegans* ont permis d'identifier deux cascades de signalisation impliquées dans cette étape : CED-1, CED-6, CED-7 et CED-2, CED-5, CED-12. Ces deux voies convergent vers CED-10 qui, une fois activé, conduit au réarrangement du cytosquelette (Kinchen *et al.*, 2005). L'homologue de CED-10 chez les mammifères est la petite protéine G Rac-1 appartenant à la famille des GTPases Rho connues pour leurs fonctions dans la régulation des mouvements cellulaires (Ridley, 2001). Les membres de cette famille fonctionnent comme un commutateur moléculaire dont l'activité, régulée par un facteur d'échange nucléotidique GEF, cycle entre une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP (figure 3).

- La voie CED-2, CED-5, CED-12

CED-2, CED-5 et CED-12 correspondent respectivement à CrkII, Dock180 et ELMO chez les mammifères. La molécule adaptatrice CED-2/CrkII s'associe avec CED-5/Dock180, un facteur d'échange nucléotidique pour CED-10/Rac, et cette interaction est régulée positivement par CED-12/ ELMO (Côté et Vuori, 2007). Ce groupe de protéines est impliqué dans divers processus nécessitant le réarrangement du cytosquelette comme l'élimination des cellules apoptotiques, la migration cellulaire, la croissance des neurites et la fusion

musculaire (Nagata *et al.*, 2010). Il a été démontré que cette voie est utilisée par plusieurs récepteurs à la surface du phagocyte au cours de l'élimination de la cellule en apoptose. Il s'agit surtout des récepteurs, indirects ou directs, de la PS comme les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$, le récepteur Mer et le récepteur BAI1 identifié récemment (Hochreiter-Hufford et Ravichandran, 2013).

- La voie CED-1, CED-6, CED-7

La liaison de la protéine transmembranaire CED-1 à son ligand permet l'activation de cette voie. CED-1 est l'homologue du récepteur CD91 qui a été décrit pour son rôle dans l'élimination des cellules apoptotiques (Ogden *et al.*, 2001). Suite à la reconnaissance de la cellule apoptotique, CED-1/CD91 interagit directement avec l'adaptateur CED-6/GULP, ce qui conduit à la réorganisation du cytosquelette d'actine *via* l'activation de CED-10/Rac-1 (Su *et al.*, 2002). Le rôle de la protéine de surface CED-7 et de son homologue mammalien ABCA1 (ABC transporter) n'étant pas bien clair dans cette voie, il a été proposé qu'elle peut assister à la reconnaissance des signaux « eat-me » ou fonctionner en aval de CED-1 (Mangahas et Zhou, 2005). L'observation que CD91, à la surface du phagocyte, est un co-récepteur avec la CRT pour C1q et les collectines (Vandivier *et al.*, 2002) suggère qu'une activation de cette voie pourrait avoir lieu suite à des interactions avec le système immunitaire inné (Païdassi *et al.*, 2009). Une étude récente renforce cette hypothèse en démontrant que le récepteur « scavenger » SREC-I, un autre orthologue de CED-1 chez les mammifères, participe à l'élimination des cellules apoptotiques *via* son interaction avec C1q (Ramirez-Ortiz *et al.*, 2013).

Bien que ces deux voies de signalisation soient stimulées par des récepteurs différents, un modèle de coordination entre elles a été proposé. En effet, la Stabiline-2 qui reconnaît la PS et GULP peut aussi interagir directement avec l'intégrine $\alpha\beta5$ et coordonner les activités des deux voies de signalisation (Kim *et al.*, 2012).

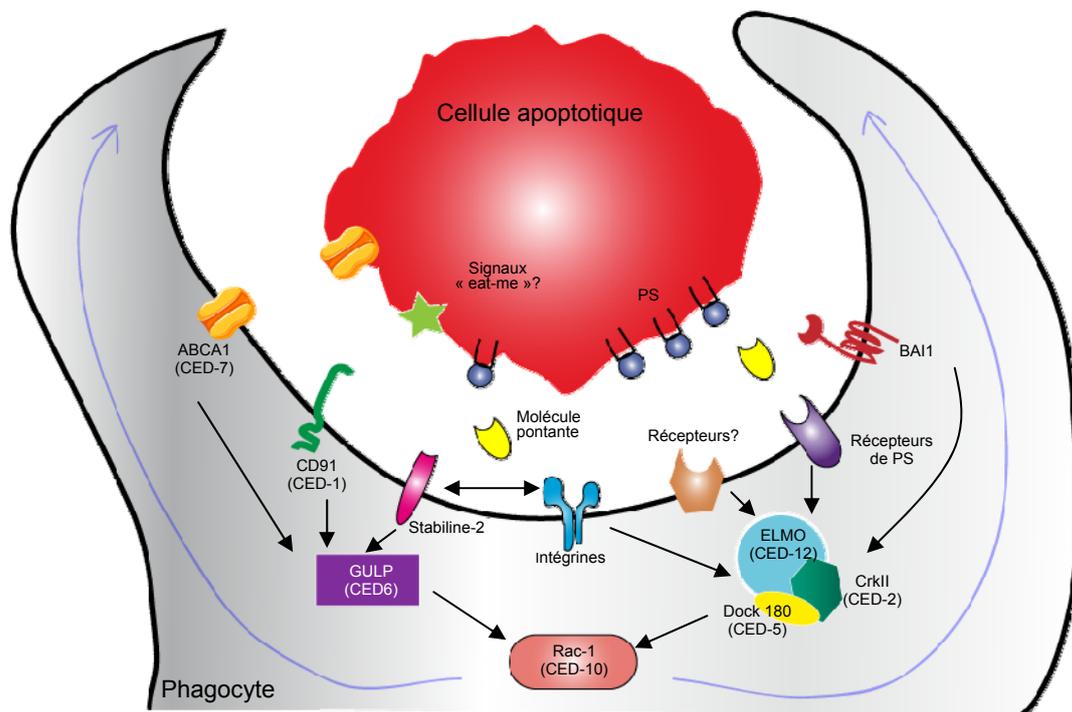


Figure 3. Voies de signalisation impliquées dans l'internalisation des cellules apoptotiques.

La liaison directe ou indirecte des récepteurs à la surface du phagocyte aux signaux exposés à la surface de la cellule apoptotique déclenche deux cascades de signalisation intracellulaires : 1) La voie CrkII, Dock 180, ELMO homologue de CED-2, CED-5, CED-12 chez *C. elegans*, et 2) La voie CD91, GULP, ABCA1 ou CED-1, CED-6, CED-7 chez *C. elegans*. La cible de ces deux voies est la GTPase Rac-1 qui, une fois activée, contribue à la réorganisation du cytosquelette d'actine. La stabiline-2 est capable d'orchestrer une coordination entre les deux cascades.

I.1.2.4 Mécanismes d'internalisation

Les processus mécaniques de l'internalisation ont été décrits comme un mécanisme «zipper-like». Ce mécanisme se traduit par la réorganisation du réseau d'actine du phagocyte conduisant à la formation des extensions membranaires qui vont entourer la particule visée suffisamment proche, pour constituer ce qu'on appelle «une coupe phagocytaire» (Krysko *et al.*, 2003 ; 2006a). Ensuite, les deux extrémités de la coupe fusionnent ensemble pour encercler exclusivement la cible (sans ingestion de solutés) qui devient intégrée dans une vésicule membranaire fine appelée « le phagosome ». Cette étape est suivie par la dépolymérisation du cytosquelette d'actine résultant de la désactivation de la GTPase Rac-1. L'activation-désactivation de Rac-1 au cours de ce processus suggère qu'il existe un contrôle spatio-temporel régulé par la disponibilité des ligands à la surface de la cellule apoptotique (Nagata *et al.*, 2010 ; Krysko *et al.*, 2006b).

Néanmoins, d'autres études ont démontré que l'élimination des cellules apoptotiques se fait initialement par un mécanisme de macropinocytose caractérisé par la formation de larges phagosomes, accompagnée de l'ingestion du liquide extracellulaire (Ogden *et al.*, 2001 ; Hoffman *et al.*, 2001 ; Jersmann *et al.*, 2003 ; Xu *et al.*, 2006).

Dans tous les cas, quel que soit le mécanisme d'internalisation, le devenir de la particule ingérée semble être le même. Après la formation de la vésicule membranaire contenant la cellule apoptotique ou phagosome, ce dernier entame une étape de maturation. Il devient fortement acide et fusionne avec les lysosomes pour devenir un «phagolysosome» contenant les enzymes nécessaires à la dégradation de la cellule apoptotique. L'observation qu'un phagocyte est capable d'ingérer plusieurs corps apoptotiques en même temps met en avant l'efficacité et la rapidité de l'efferocytose (Hochreiter-Hufford et Ravichandran, 2013).

I.1.2.5 Types de phagocytes et réponse anti-inflammatoire

Une grande partie de notre compréhension de la phagocytose des cellules apoptotiques vient des études de l'élimination des neutrophiles apoptotiques durant la résolution de l'inflammation. En effet, les neutrophiles qui ont massivement migré au site de l'inflammation ou de l'infection, doivent être efficacement « nettoyés » pour permettre la restauration du tissu à son état d'origine. Les neutrophiles recrutés, ayant une courte durée de vie, empruntent la voie d'apoptose et sont par la suite éliminés par les phagocytes (Savill *et al.*, 1989). Cette élimination rapide et efficace est accompagnée de la suppression de la sécrétion des molécules pro-inflammatoires comme le TNF α et la stimulation de la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires, IL-10 et TGF β , par les macrophages (Kennedy et Deleo,

2009). Ainsi, la phagocytose des neutrophiles apoptotiques au cours de la réponse inflammatoire contribue à l'homéostasie tissulaire (Witko-Sarsat *et al.*, 2011).

Comme pour le cas de l'élimination des neutrophiles apoptotiques, le processus d'efferocytose est, en général, immunologiquement silencieux grâce aux réponses anti-inflammatoires et immunosuppressives élaborées par les différents types de phagocytes décrits dans les paragraphes qui suivent.

I.1.2.5.a Phagocytes professionnels

- Les macrophages

Les macrophages sont des phagocytes professionnels capables de contrôler et de moduler leurs activités en fonction des signaux reçus de leur environnement. Ainsi, la réponse d'un macrophage est généralement inflammatoire face à un pathogène tandis qu'elle est anti-inflammatoire face à une cellule apoptotique.

Plusieurs études ont décrit et expliqué les effets anti-inflammatoires et aussi immunosuppressifs de la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages. Il a été démontré, d'une façon intéressante, que la phagocytose des cellules apoptotiques stimule la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF β , l'IL-10, le PAF (Platlet-Activating-Factor) et la prostaglandine E2 par les macrophages (Chung *et al.*, 2007 ; Voll *et al.*, 1997). Les cellules apoptotiques participent, elles mêmes, aussi à la création de cet environnement anti-inflammatoire en sécrétant du TGF β (Chen *et al.*, 2001) et de l'IL-10 (Gao *et al.*, 1998). En parallèle, la production des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et le TNF α par les macrophages est bloquée suite à l'inhibition de l'activation de la voie NF- κ B (Kim *et al.*, 2004 ; Perruche *et al.*, 2009). Une étude récente effectuée *in vivo* soulève le rôle joué par le récepteur nucléaire Nr4a1, dont l'expression est induite d'une manière PS-dépendante par les cellules apoptotiques, dans l'inhibition de la voie NF- κ B et la sécrétion de l'IL-12 par les macrophages (Ipseiz *et al.*, 2014).

Il a été reporté d'une manière intéressante que le contact cellule-cellule peut être suffisant pour provoquer la réponse cytokinique des macrophages car l'internalisation du corps apoptotique n'est pas requise pour stimuler cette réponse (Hochreiter-Hufford et Ravichandran, 2013). En effet, les membranes des cellules apoptotiques seules sont suffisantes pour empêcher la sécrétion de l'IL-12 par des macrophages activés au LPS (Kim *et al.*, 2004). De même, des vésicules de PS peuvent, seules, stimuler la sécrétion de TGF β par les macrophages (Huynh *et al.*, 2002).

Toutefois, une réponse macrophagique neutre, ni pro-inflammatoire ni anti-inflammatoire, a été proposée essentiellement lorsque ce sont des cellules en apoptose très précoces qui sont phagocytées (Kurosaka *et al.*, 2003).

- Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des phagocytes hautement spécialisés capables d'initier une réponse immunitaire adaptative suite à la présentation de leurs antigènes aux lymphocytes T. Les mécanismes d'élimination des cellules apoptotiques par les cellules dendritiques impliquent le récepteur « scavenger » CD36 et les intégrines α_v , mécanismes similaires à ceux décrits pour les macrophages (Albert *et al.*, 1998a). Cependant, la réponse des cellules dendritiques à l'élimination des corps apoptotiques est spécifique. Albert et ses collègues ont publié en 1998 une série d'études particulièrement intéressantes sur ce sujet. Ils ont démontré que les cellules dendritiques génèrent, à partir du matériel apoptotique internalisé, des peptides épitopes pour les molécules du CMH I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) et sont ainsi capables d'activer une réponse des lymphocytes T CD8+ (Albert *et al.*, 1998a ; 1998b). Comme conséquence, les cellules T CD8+ peuvent orchestrer une réponse cytotoxique primaire accompagnée par l'expression du récepteur de mort TRAIL qui tue les lymphocytes T CD4+ et favorise ainsi la tolérance (Garg *et al.*, 2014). Les cellules apoptotiques peuvent pré-sélectionner les déterminants antigéniques importants pour favoriser leur présentation par les cellules dendritiques (Blachère *et al.*, 2005). En plus, la phagocytose des cellules apoptotiques empêche activement la maturation des cellules dendritiques (Green *et al.*, 2009) et affecte directement leur phénotype en diminuant l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et des molécules de co-stimulation comme CD40 ; CD80 et CD86 (Stuart *et al.*, 2002 ; Morelli *et al.*, 2003). Des sous-populations de cellules dendritiques sont capables d'internaliser les cellules apoptotiques. Un exemple est celui d'une sous-population de cellules dendritiques qui capture en continu les cellules épithéliales apoptotiques de l'intestin régulièrement éliminées après la desquamation. Les cellules dendritiques migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques mésentériques où elles peuvent inactiver les cellules T naïves auto-réactives (Huang *et al.*, 2000).

Bien que l'interaction avec les cellules apoptotiques affecte la maturation et la production de cytokines par les cellules dendritiques, la capacité migratoire de ces dernières vers les ganglions lymphatiques proches est préservée ou au moins redéfinie (Perruche et Saas, 2013). Dans les ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques présentant des antigènes chargés du matériel apoptotique peuvent interagir et induire la différenciation des cellules T CD4+ naïves en cellules régulatrices (reg) capables de sécréter de l'IL-10 comme les

cellules Treg FoxP⁺ ou Treg 1 IL-10⁺ (Perruche et Saas, 2013). Les macrophages jouent aussi un rôle dans l'induction de l'expansion des lymphocytes T régulateurs *via* la molécule TGFβ qu'ils produisent durant l'élimination des cellules apoptotiques (Kleinclauss *et al.*, 2006). Il a été démontré récemment qu'au cours de l'efferocytose, les cellules dendritiques produisent elles mêmes de la prostaglandine E2 capable d'induire les fonctions des cellules T régulatrices (Pujol-Autonell *et al.*, 2013). Ainsi, la génération de lymphocytes T régulateurs est un aspect additionnel de l'immunotolérance associée à l'efferocytose.

I.1.2.5.b Phagocytes non professionnels

A proximité du site de l'apoptose, des cellules n'appartenant pas au système immunitaire peuvent se prêter à l'élimination de leurs « voisines » apoptotiques. Le mécanisme par lequel ces phagocytes non professionnels agissent n'est pas bien connu, mais il contribue comme pour le cas des phagocytes spécialisés à l'homéostasie tissulaire.

Au cours du développement, les cellules mésenchymateuses s'engagent à éliminer les cellules interdigitales en absence des macrophages (Wood *et al.*, 2000). Un autre exemple est illustré par la phagocytose des cellules épithéliales mammaires apoptotiques par des cellules épithéliales mammaires viables après l'involution de la glande mammaire (Monks *et al.*, 2005 ; 2008). En plus, et comme pour les macrophages, une modulation de la réponse inflammatoire accompagne ce processus *via* la sécrétion de TGFβ et la sous-régulation des cytokines inflammatoires (Monks *et al.*, 2005). Ceci suggère que ces phagocytes emploient les mêmes récepteurs utilisés par les macrophages au cours de l'élimination des cellules apoptotiques surtout qu'ils en expriment plusieurs à leur surface (Monks *et al.*, 2005).

L'environnement anti-inflammatoire et immunosuppresseur créé par les phagocytes professionnels et non professionnels en réponse aux cellules apoptotiques est une caractéristique importante de l'efferocytose. Ce potentiel tolérogène a permis l'émergence de nouvelles thérapies à base de cellules apoptotiques visant la prévention du rejet de greffe et la modulation des conditions auto-immunes comme le diabète de type I (Castro *et al.*, 2010 ; Morelli et Larregina, 2010). En plus, les défauts d'élimination des cellules apoptotiques provoquent l'accumulation « pathologique » de ces cellules dans l'organisme, ce qui va entraîner la rupture de l'immunotolérance et le développement de plusieurs pathologies comme les maladies auto-immunes (le lupus systémique érythémateux et la polyarthrite rhumatoïde) et le cancer (Elliott et Ravichandran, 2010).

I.1.2.6 Autres conséquences de la phagocytose des cellules apoptotiques

Outre son rôle dans la modulation de la réponse immunitaire, la phagocytose des cellules apoptotiques favorise la survie et la croissance des cellules environnantes (Krysko *et al.*, 2006b). Dans une étude curieusement intitulée « la vie après la mort cellulaire », les auteurs ont démontré que la phagocytose des cellules Jurkat apoptotiques par des cellules épithéliales mammaires de souris (HC-11) stimule l'expression et la sécrétion de plusieurs facteurs de croissance par les cellules HC-11 comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). En plus, l'incubation des cellules endothéliales microvasculaires avec le surnageant des cellules HC-11 ayant phagocyté des Jurkat apoptotiques favorise leur croissance (Golpon *et al.*, 2004). Une autre étude a démontré que la phagocytose des cellules apoptotiques stimule la survie des macrophages péritonéaux murins et des macrophages dérivés de la moelle osseuse (Reddy *et al.*, 2002). Les résultats présentés par Weigert *et al.* indiquent que les cellules apoptotiques libèrent des molécules de protection S1P transmettant un message de survie aux macrophages (Weigert *et al.*, 2006). La sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire TGF β au cours de l'élimination des cellules vasculaires lisses apoptotiques est accompagnée de la libération des chimiokines MCP-1 (Monocyte-Chemoattractant Protein 1) et CINC (Cytokine-Induced Neutrophils Chemoattractant) qui permettent le recrutement spécifique des phagocytes professionnels (Fries *et al.*, 2005). Chez la drosophile *D. melanogaster*, les cellules apoptotiques expriment le facteur mitogène *wingless* qui est capable d'activer directement la prolifération cellulaire (Ryoo *et al.*, 2004).

Les différents types de phagocytes sollicités au cours de l'efferocytose ainsi que les réponses associées sont résumés dans la figure 4.

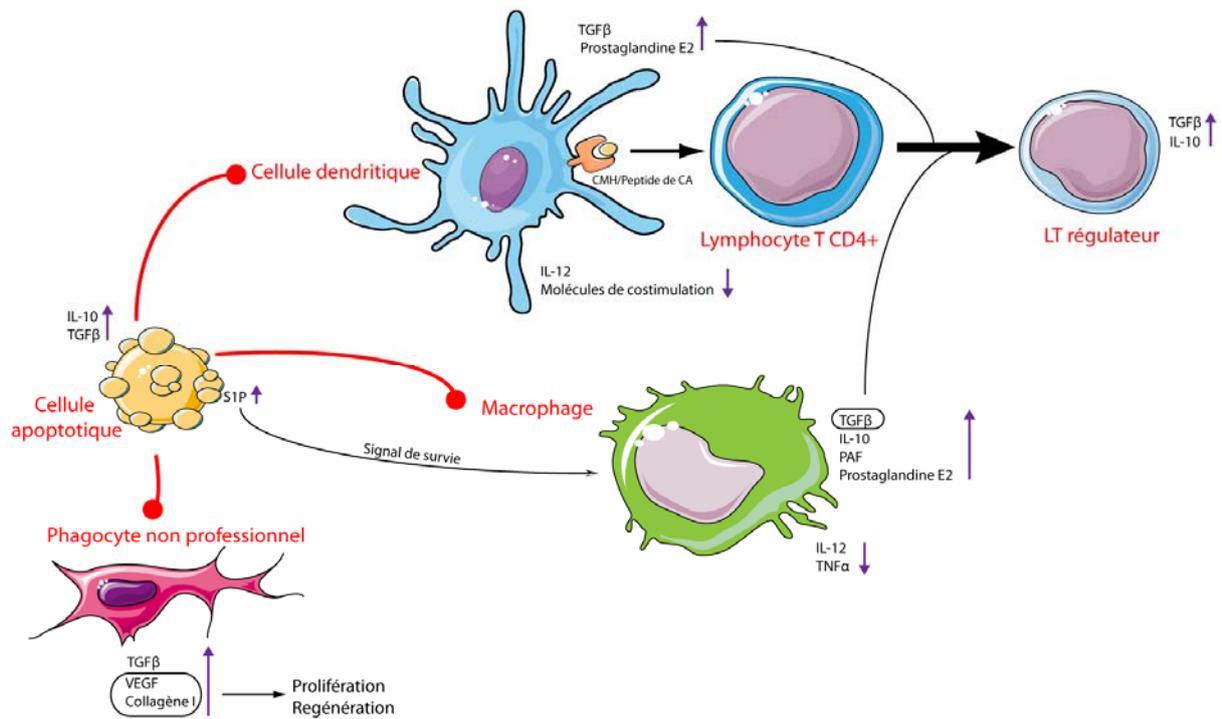


Figure 4. Types de phagocytes et leurs réponses au cours de l'efferocytose.

Des phagocytes professionnels ou non professionnels participent à l'élimination « silencieuse » des cellules apoptotiques. La modulation de la réponse inflammatoire au cours de ce processus se fait grâce à la stimulation de la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires et l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires. CA : cellule apoptotique ; LT : lymphocyte T.

I.2 C1q

Les travaux de recherche menés au cours de ces 20 dernières années ont permis d'élargir nos connaissances structurales et fonctionnelles sur la molécule C1q. Classiquement connue comme l'unité de reconnaissance de la voie classique du complément, C1q est aujourd'hui décrit comme un capteur moléculaire capable de détecter plusieurs structures altérées du soi, comme la forme pathologique de la protéine du prion (Klein *et al.*, 2001 ; Erlich *et al.*, 2010), les fibrilles β -amyloïdes (Tacnet-Delorme *et al.*, 2001), les formes modifiées des LDLs (Low Density Lipoprotein) (Biro *et al.*, 2010 ; 2007) et les cellules apoptotiques (Korb *et al.*, 1997 ; Taylor *et al.*, 2000 ; Navratil *et al.*, 2001). Contrairement aux autres composants du système du complément qui sont essentiellement synthétisés dans le foie, C1q est, quant à lui, produit par les cellules myéloïdes comme les macrophages et les cellules dendritiques ainsi que par de nombreux autres types cellulaires (pour revue Ghebrehiwet *et al.*, 2012). Le C1q synthétisé peut être transitoirement associé à la membrane cellulaire (Loos, 1983), ou aussi sécrété dans le milieu extracellulaire où il peut moduler plusieurs réponses cellulaires spécifiques *via* son interaction avec des récepteurs de surface et leurs partenaires de signalisation (Menzies *et al.*, 2008).

I.2.1 Structure du C1q

La molécule C1q est une glycoprotéine de 460 kDa, qui de part sa composition d'une région globulaire (gC1q) C-terminale et d'une queue collagène (cC1q) N-terminale, appartient à la famille des collagènes de défense. Cette famille de protéines comprend aussi la MBL (Mannan-Binding Lectin), l'adiponectine, les ficolines et les SP-A et SP-D (Lung surfactant proteins) qui fonctionnent comme des molécules de reconnaissance du système immunitaire inné (Bohlson *et al.*, 2007 ; Galvan *et al.*, 2012).

La figure 5 montre la structure complexe de C1q constituée de 3 chaînes polypeptidiques distinctes A, B et C répétées chacune 6 fois (6A, 6B et 6C). Ces 18 chaînes sont regroupées par 3 (A, B et C) de façon à former 6 brins hélicoïdaux, on parle ainsi d'un hexamère d'hétérotrimères (Reid, 1989). Dans chaque brin, la triple hélice est constituée des séquences N-terminales de type collagène des 3 chaînes alors que la tête globulaire correspond aux parties C-terminales de ces chaînes (Sellar *et al.*, 1991 ; Kishore et Reid, 2000).

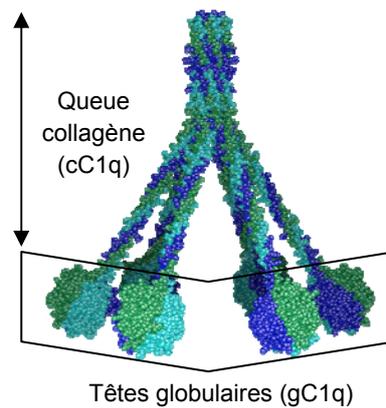


Figure 5. Représentation structurale de C1q.

Les chaînes A, B et C sont représentées en vert, bleu foncé et bleu clair respectivement (Gaboriaud *et al.*, 2012).

I.2.2 Fonctions immunologiques du C1q

I.2.2.1 C1q active la voie classique du complément

Le complexe multimoléculaire C1 est responsable de l'initiation de la voie classique du complément. C1 est le résultat de l'association d'un tétramère de 2 copies de protéases à sérine, C1r et C1s, avec C1q dont le domaine globulaire C-terminal est responsable de la fonction de reconnaissance de ce complexe. Une caractéristique majeure de ce domaine est sa capacité à lier une large variété de ligands. Ainsi, et en plus de sa capacité classique à lier les complexes immuns contenant des IgG et des IgM, C1q peut reconnaître la lectine SIGN-R1, la protéine C-réactive et autres pentraxines liées aux pathogènes, ainsi qu'une large variété de motifs moléculaires des bactéries Gram-négatives et des virus. Le résultat de cette liaison est, dans la plupart des cas, l'activation de la voie classique du complément conduisant à l'opsonisation et à l'élimination inflammatoire par phagocytose de la cible (pour revue Gaboriaud *et al.*, 2012 ; Frachet *et al.*, 2014). Ainsi, une déficience génétique en C1q provoque le développement de nombreuses infections comme les otites et les méningites (Ghebrehiwet *et al.*, 2012).

I.2.2.2 C1q contribue à l'efferocytose

Outre son implication traditionnelle dans l'initiation de la voie classique du complément, C1q contribue à l'élimination des cellules apoptotiques en agissant, au moins, comme un pont physique au sein de la synapse efferocytaire (Galvan *et al.*, 2012). Au cours de ce dernier rôle, C1q interagit d'une manière indépendante du complément avec le phagocyte d'un côté et la cellule mourante de l'autre côté. En effet, une forme libre de C1q non associée à C1r et C1s a été retrouvée dans les tissus. Elle provient notamment d'une synthèse locale par divers types de cellules comme les neurones, les fibroblastes et les ostéoclastes (pour revue Frachet *et al.*, 2014). En plus, une protéine inhibitrice peut lier le complexe C1 et favoriser la dissociation de C1q des autres composants (Galvan *et al.*, 2012). Ainsi, la molécule libre de C1q peut reconnaître de nombreux motifs de la surface des cellules apoptotiques et des phagocytes. Ces motifs sont regroupés dans le tableau 1. Plusieurs études ont reporté que C1q reconnaît des candidats ACAMPs comme l'ADN, la calréticuline, la protéine C-réactive et la phosphatidylsérine exprimés à la surface des cellules apoptotiques. Du côté du phagocyte, la liste des récepteurs capables d'interagir avec C1q n'arrête pas de s'allonger. Elle comprend des récepteurs cC1qR (CRT), gC1qR (p33), CR1 (Complement receptor 1), l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, et plus récemment RAGE, CR3, DC-SIGN, LAIR-1 et SREC-1 (pour revue Frachet *et al.*, 2014).

A la surface de la cellule apoptotique	A la surface du phagocyte
PS	gC1qR (C1qBP)
ADN	cC1qR (CRT)
CRT	CD91
Annexin V	CR1
Annexin II	$\alpha 2\beta 1$
GAPDH	SREC-I
CERT(L)	RAGE
	CR3
	DC-SIGN
	LAIR-1

Tableau 1. Liste des molécules avec lesquelles C1q peut interagir à la surface de la cellule apoptotique et du phagocyte (pour revue Frachet *et al.*, 2014).

Toutefois, C1q peut aussi favoriser l'efferocytose d'une manière complément-dépendante. De cette manière, le C1q du sérum peut stimuler la phagocytose des neutrophiles et des thymocytes apoptotiques *via* les récepteurs CR3 et CR4 présents à la surface des macrophages (Mevorach *et al.*, 1998). En plus, l'ajout de C1q au sérum déficient en cette molécule est capable d'induire le dépôt de C3 sur les cellules apoptotiques (Nauta *et al.*, 2002). D'autre part, les IgM peuvent reconnaître certains déterminants à la surface des cellules apoptotiques et stimuler leur élimination en recrutant C1q (Galvan *et al.*, 2012). Sachant que l'activation du complément en elle-même conduit généralement à l'inflammation, il a été proposé, dans le cas de l'opsonisation des cellules en apoptose, que l'absence de réponse inflammatoire soit le fait du facteur H, une molécule régulatrice connue de l'activation du complément et capable de lier les cellules apoptotiques (Kang *et al.*, 2012). En outre, Zwart et ses collègues ont remarqué que l'activation du complément est extrêmement limitée à un stade précoce de l'apoptose (Zwart *et al.*, 2004).

Ce dernier point ouvre la question sur « l'âge » des cellules apoptotiques reconnues par C1q. Cette question reste jusqu'à présent un sujet de débat principalement à cause de la forte liaison de C1q aux cellules nécrotiques remarquée *in vitro* (Liang *et al.*, 2014 ; Nauta *et al.*, 2002). Néanmoins, l'exposition ou l'augmentation précoce des ligands CRT, PS, GAPDH (GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase) de C1q à la surface des cellules apoptotiques évoque une participation rapide de cette molécule au cours de l'efferocytose (Verneret *et al.*, 2014 ; Païdassi *et al.*, 2008 ; Terrasse *et al.*, 2012). Des travaux récents de notre groupe ont démontré que l'interaction précoce entre les têtes globulaires de C1q et la CRT se produit particulièrement à la surface des cellules HeLa apoptotiques qui ne présentent pas de « blebs » (Verneret *et al.*, 2014).

Un autre aspect de l'implication de C1q dans l'efferocytose est sa capacité à favoriser une réponse anti-inflammatoire en modulant la sécrétion des cytokines par les phagocytes. Ainsi, il a été démontré qu'au cours de la mort cellulaire dans le système nerveux central, C1q joue un rôle protecteur en supprimant la production des cytokines inflammatoires (Fraser *et al.*, 2010). En plus, C1q peut induire l'augmentation de la production de l'IL-10 anti-inflammatoire, l'inhibition du facteur de transcription NF- κ B inflammatoire (Fraser *et al.*, 2007) et la modulation de l'interféron α (Santer *et al.*, 2010 ; Lood *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que C1q peut contribuer à l'environnement tolérogène global développé au cours de l'élimination des cellules apoptotiques.

De part sa capacité à se fixer aux phagocytes, C1q peut stimuler directement l'expression à leur surface des molécules impliquées dans la phagocytose des cellules apoptotiques, comme Mer et son ligand Gas6 (Galvan *et al.*, 2012). C1q exerce son action sur Mer en

activant l'AMPK (AMP-Activated protein Kinase) dans les macrophages et en engageant le récepteur nucléaire RXR (Galvan *et al.*, 2014). C1q peut aussi diriger la polarisation des macrophages au cours de l'efferocytose et limiter leur activité inflammatoire (Benoit *et al.*, 2012). De la même façon, C1q influence le profil des macrophages en induisant un statut anti-inflammatoire ou M2 (Bohlson *et al.*, 2014). Plusieurs études indépendantes ont analysé l'effet de C1q sur la maturation des cellules dendritiques. Ils ont démontré que C1q inhibe ou limite la différenciation de ces cellules en engageant des récepteurs de leur surface (Hosszu *et al.*, 2010 ; Son *et al.*, 2012). Ces trois dernières observations concernent l'implication de C1q dans la modulation de la différenciation des phagocytes et constituent une preuve de plus de la fonction tolérogène de cette molécule au cours de l'efferocytose.

L'ensemble de ces données montre que C1q est une molécule-clé qui contribue à l'homéostasie tissulaire au cours de l'efferocytose en favorisant la phagocytose des cellules apoptotiques d'un côté et en modulant la réponse inflammatoire associée de l'autre côté. Le développement des pathologies auto-immunes (notamment la glomérulonéphrite et le lupus érythémateux disséminé) chez les souris et l'homme déficients en C1q (Botto *et al.*, 1998 ; Pickering *et al.*, 2000) confirme la contribution significative de C1q dans la modulation des réponses auto-immunes (Bohlson *et al.*, 2007).

Dans la figure 6 sont représentés les différents mécanismes par lesquels C1q contribue à l'élimination des cellules apoptotiques.

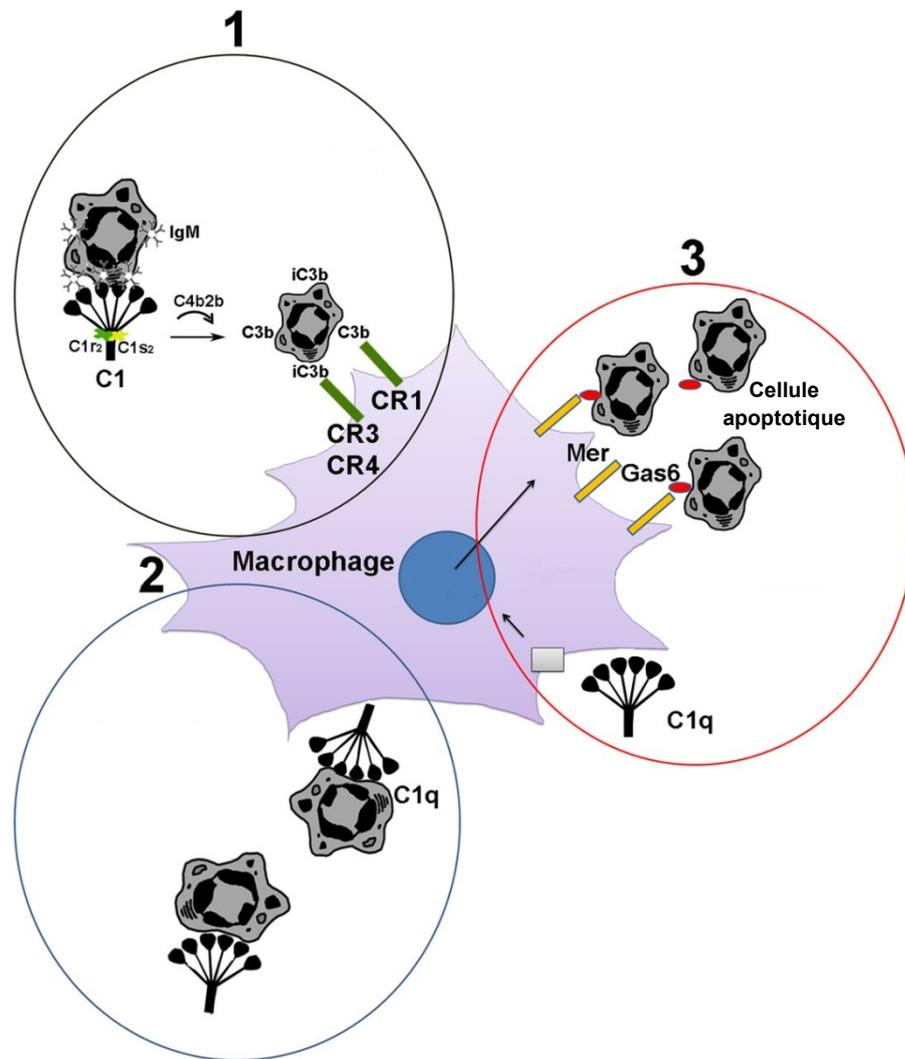


Figure 6. Modèle illustrant les différentes voies de contribution de C1q à l'efferocytose.

C1q favorise la phagocytose des cellules apoptotiques selon au moins 3 mécanismes : le mécanisme 1 dépend de la voie classique du complément où des opsonines du complément comme iC3b et C3b déposées à la surface de la cellule apoptotique sont reconnues par leurs récepteurs CR à la surface du phagocyte ; 2 représente le C1q comme une molécule pontante liant des molécules exposées spécifiquement à la surface de la cellule apoptotique d'une part et ses récepteurs présents à la surface du phagocyte d'autre part ; Un troisième mécanisme (3) décrit récemment montre que C1q peut induire directement l'expression de certaines molécules impliquées dans l'élimination des cellules apoptotiques à la surface du phagocyte comme la tyrosine kinase Mer et la molécule pontante Gas6 (d'après Galvan *et al.*, 2012). Cette dernière action de C1q sur Mer est médiée par l'activation de l'AMPK et le récepteur nucléaire RXR (Galvan *et al.*, 2014).

I.2.2.3 Interactions de C1q et activation du complément

Comme nous avons pu le constater dans les 2 paragraphes précédents, l'interaction de C1q avec des ligands de nature variée peut moduler l'activation du système du complément. Les détails moléculaires de cette modulation restent encore à décrypter. En se basant sur les données structurales de la molécule C1q et des protéases C1r et C1s, Gaboriaud *et al.*, ont proposé un modèle hypothétique présenté dans la figure 7, pour expliquer cette différence de réponse. D'après ce modèle, les localisations différentes des sites de reconnaissance des ligands seraient responsables de l'activation ou pas du complexe C1 (Gaboriaud *et al.*, 2012). En effet, les sites de liaison de la PS et de l'ADN, signaux « eat-me » reconnus par C1q à la surface des cellules apoptotiques, situés dans la sous-unité C, seraient positionnés sur la face interne de la tête globulaire de C1q. En revanche, le site de liaison correspondant aux IgG a été proposé dans une région différente, au niveau de la sous unité B dans la partie externe de la molécule C1q (Gaboriaud *et al.*, 2003). Selon ce même modèle (figure 7), un mouvement vers l'extérieur des tiges du C1q est nécessaire pour altérer sa configuration « de repos » et déclencher l'activation de C1. De cette manière, la fixation des IgG sur la partie externe de gC1q devrait activer efficacement C1, alors que l'interaction de l'ADN et de la PS avec leurs sites de liaison interne, serait incapable de générer un signal d'activation notamment dans le cas où ces molécules sont associées ensemble à la surface de la cible (Gaboriaud *et al.*, 2012). On peut donc imaginer que la fixation de C1q sur ses ligands à la surface des cellules apoptotiques limite l'activation du complément et contribue ainsi à la modulation de la réponse inflammatoire.

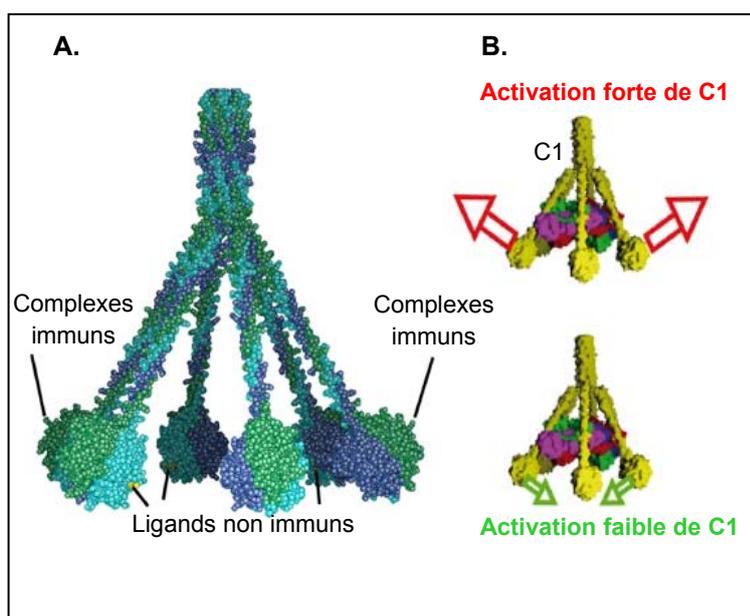


Figure 7. Modèle hypothétique de l'activation de C1 en fonction des sites de liaison situés dans le domaine globulaire de C1q.

A. Les sites de liaison des complexes immuns contenant les IgG sont localisés dans la partie extérieure du domaine globulaire de C1q, tandis que les sites de liaison des ligands non immuns du soi seraient localisés sur la face interne de ce domaine ; B. La fixation des complexes immuns sur leurs sites de liaison active le complexe C1 constitué de la molécule de C1q (en jaune), 2 copies de C1r (en rouge et en vert), et 2 copies de C1s (en violet et en bleu). En revanche, la reconnaissance des ligands non immuns limite l'activation de C1q (d'après Gaboriaud *et al.*, 2012).

I.3 Calréticuline

En 1974, Thomas Ostwald et David Maclennan ont isolé à partir du réticulum sarcoplasmique du lapin, une protéine capable de se lier avec une haute affinité au calcium, qu'ils ont nommée HABP (High Affinity Calcium Binding Protein) (Ostwald et Maclennan, 1974). Quinze ans plus tard, les techniques de biologie moléculaire ont permis d'identifier la séquence en acides aminés (a.a) de cette protéine qui sera désormais appelée calréticuline (CRT) en référence à sa capacité de liaison avec le Ca^{2+} (cal-) et sa localisation dans le réticulum endoplasmique (-réticuline) (Smith et Koch, 1989 ; Fliegel *et al.*, 1989). Le gène codant pour la CRT est localisé sur les chromosomes 19 et 8 chez l'homme et la souris respectivement (Gelebart *et al.*, 2005). L'organisation génomique et la séquence en a.a de la CRT remarquablement conservées au cours de l'évolution suggèrent que cette protéine joue un rôle essentiel dans la physiologie cellulaire (Johnson *et al.*, 2001). En plus de sa présence dans le RE, la CRT a été détectée dans le noyau (Burns *et al.*, 1994), à la surface de beaucoup de cellules de mammifères (Arosa *et al.*, 1999; Sadasivan *et al.*, 1996 ; White *et al.*, 1995) et dans la matrice extracellulaire (Somogyi *et al.*, 2003). Les études réalisées au cours des 20 dernières années ont révélé la complexité fonctionnelle de cette protéine, qui est maintenant connue pour ses multiples rôles à l'intérieur et à l'extérieur du RE, dans des conditions physiologiques et pathologiques. La déficience en CRT provoque des altérations du développement cardiaque et est donc létale à l'âge embryonnaire (Guo *et al.*, 2002 ; Mesaeli *et al.*, 1999).

I.3.1 Structure de la CRT

La calréticuline est une protéine soluble de 46 kDa qui joue le rôle de chaperonne pour les protéines N-glycosylées dans le RE. La séquence complète de la CRT humaine contient un peptide signal d'adressage dans le RE de 17 a.a suivi de 400 a.a linéairement répartis sur 3 domaines : le domaine N-terminal, le domaine P et le domaine C-terminal (Michalak *et al.*, 2009). Mais visuellement, on peut distinguer seulement 2 domaines sur la structure : un domaine P et un domaine globulaire. La séquence linéaire ainsi que le modèle cristallographique de la CRT sont représentés dans la figure 8.

Pendant longtemps, aucune donnée cristallographique de la CRT n'a été obtenue et les modèles proposés ont été élaborés à partir de données de RMN (résonance magnétique nucléaire) et grâce à la structure de la calnexine (CNX), une autre chaperonne du RE, de séquence homologue. En effet, cela est dû à la difficulté de cristalliser la protéine complète provoquée notamment par la nature flexible de son domaine P et de l'extension C-terminale.

En 2011, notre groupe a pu résoudre la structure cristallographique du domaine globulaire N-terminal à une haute résolution (1.55 Å) en produisant une forme tronquée de la CRT où le domaine P et des résidus C-terminaux ont été enlevés (Chouquet *et al.*, 2011).

Le domaine globulaire N-terminal de la CRT humaine se présente comme pour ses homologues de la calnexine et de la CRT de souris sous forme d'un repliement de type « Jelly-roll » résultant de l'assemblage de 2 feuillets β anti-parallèles, un convexe et un concave (Chouquet *et al.*, 2011). Il contient un pont disulfure (Andrin *et al.*, 2000), un site de liaison à haute affinité pour le Ca^{2+} (Kozolov *et al.*, 2010) et un site de type lectine qui, avec le domaine P, est responsable de la fonction chaperonne de la CRT (Leach *et al.*, 2002 ; Kapoor *et al.*, 2004).

Le domaine globulaire s'étend en une structure en épingle contenant des séquences répétées riches en proline, appelée le domaine P (Schrag *et al.*, 2001 ; Ellgaard *et al.*, 2001). La structure du domaine P a été déduite à partir des données de RMN pour la CRT et par cristallographie aux rayons X pour la CNX. Le domaine P est doté d'une flexibilité structurale (Michalak *et al.*, 2009) et fixe également le calcium avec une haute affinité ($\text{KD} = 1 \mu\text{M}$) (Bakch et Michalak, 1991). Des sites d'interaction de la CRT et de la CNX avec d'autres co-chaperonnes comme l'ERp57 et la cyclophiline B sont localisés à l'extrémité de ce domaine (Frickel *et al.*, 2002 ; Kozolov *et al.*, 2010).

Le domaine P se réinsère par son extrémité finale dans le domaine globulaire qui se termine par une hélice α C-terminale. Ce domaine C est riche en résidus acides (acide aspartique et acide glutamique), d'où son appellation de domaine acide, ce qui lui confère de nombreuses charges négatives permettant la liaison au Ca^{2+} avec une grande capacité mais une faible affinité (Bakch et Michalak, 1991). En effet, il peut lier jusqu'à 50% du Ca^{2+} trouvé dans le RE (Michalak *et al.*, 2009). Le domaine C contient aussi le motif KDEL hautement conservé (Lys-Asp-Glu-Leu) responsable de la rétention de la CRT dans le RE (Gold *et al.*, 2010).

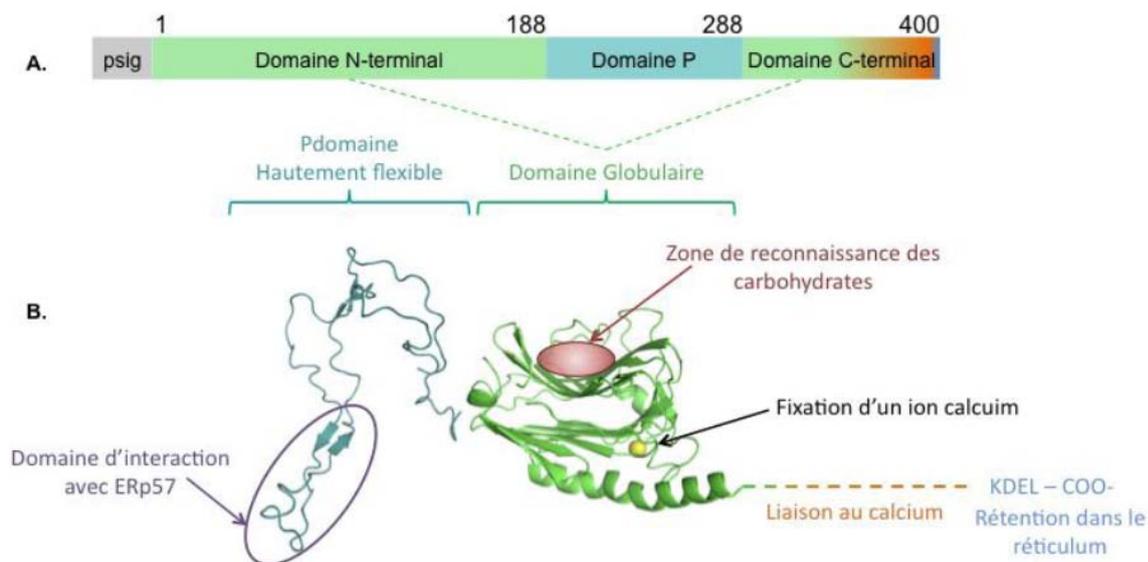


Figure 8. Structures linéaire et tridimensionnelle de la calréticuline.

A. Structure linéaire de la CRT représentant les 3 domaines N, P et C ; B. Modèle structural 3D de la calréticuline et localisation des sites fonctionnels. Le domaine globulaire est obtenu à partir des données de cristallographie aux rayons X, et le domaine P est représenté à partir de son homologie avec le même domaine de la calnexine (adapté de Chouquet *et al.*, 2011 ; Thèse Verneret 2012).

I.3.2 Modifications post-traductionnelles de la CRT

Plusieurs études, pour la plupart récentes, ont démontré que la CRT peut subir des modifications post-traductionnelles. En effet, la CRT peut être arginylée par une arginyltransférase. Sous cette forme, la CRT peut augmenter la susceptibilité à l'apoptose quand elle est présente à la surface cellulaire (Decca *et al.*, 2007 ; Sambrooks *et al.*, 2012). La CRT existe aussi sous forme citrullinée capable de moduler la réponse immunitaire dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde (Ling *et al.*, 2010 ; 2007). Les 2 formes arginylée et citrullinée de la CRT ont été détectées à l'extérieur de la cellule où elles exercent des fonctions biologiques spécifiques (Wiersma *et al.*, 2015). En plus et même si sous sa forme physiologique normale, la CRT n'est pas glycosylée, une forme glycosylée a été observée dans la lignée myéloïde tumorale HL60 (Denning *et al.*, 1997). Des études récentes ont démontré que la CRT peut être phosphorylée et que la CRT phosphorylée peut réguler la stabilité de l'ARNm du récepteur AT1 (Angiotensin receptor I) dans les cellules VSMC (Vascular Smooth Muscle Cells) (Mueller *et al.*, 2008) et l'élimination des cellules apoptotiques (Byrne *et al.*, 2013).

I.3.3 Fonctions de la CRT

Bien que la CRT ait un signal d'adressage et une séquence KDEL de rétention dans le RE, elle a été retrouvée à l'extérieur du RE, dans des compartiments intracellulaires, extracellulaires et à la surface des cellules, où elle peut réguler plusieurs processus biologiques importants (Michalak *et al.*, 2009). Ainsi, la CRT, une protéine classiquement reconnue comme résidente du RE, est devenue aujourd'hui un acteur critique régulant plusieurs processus physiologiques et pathologiques comme la cicatrisation, la réponse immune, la fibrose et le cancer (Gold *et al.*, 2010). La figure 9 représente les différents rôles que peut jouer la CRT à l'intérieur et à l'extérieur du RE.

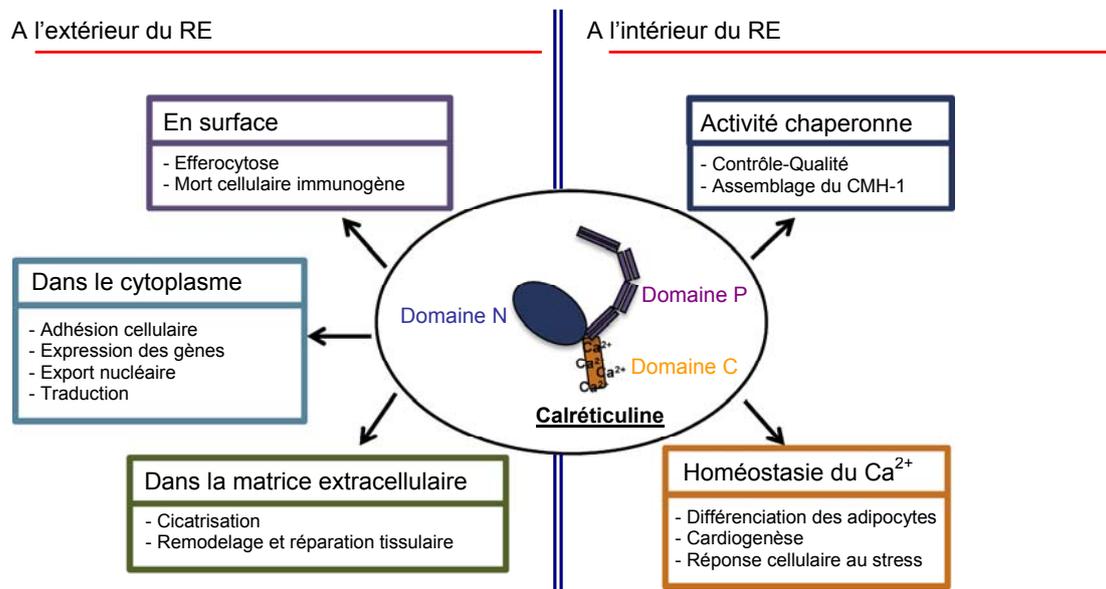


Figure 9. Différents rôles de la CRT à l'intérieur et à l'extérieur du RE.

La CRT est une protéine multifonctionnelle détectée dans plusieurs localisations intra- ou extra-RE où elle contribue à différents processus biologiques (d'après Wang *et al.*, 2012).

I.3.3.1 Chaperonne/Contrôle-Qualité

Dans le RE, la CRT et la CNX sont des chaperonnes. Elles forment, en collaboration avec la protéine disulfide isomérase ERp57, le cycle CRT/CNX responsable du bon repliement et du contrôle-qualité des glycoprotéines nouvellement synthétisées (Michalak *et al.*, 2009). Au cours de ce cycle, des glucosidases du RE enlèvent successivement 2 des 3 résidus glucose des protéines N-glycosylées nouvellement synthétisées, permettant ainsi la génération des protéines monoglycosylées capables de lier les chaperonnes CNX et CRT. La glycoprotéine subit ensuite des cycles répétés de repliement et de glycosylation-déglycosylation jusqu'à l'atteinte de sa conformation structurale native. La liaison CRT/CNX avec la protéine « cliente » s'achève quand le résidu glucose terminal est enlevé par une glucosidase. A la fin de ce cycle, les protéines bien repliées empruntent la voie sécrétoire, alors que les protéines mal-repliées qui n'ont pas été corrigées seront éliminées par la voie ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) (Benham, 2012). De ce fait, la déficience en CRT est associée à l'altération du contrôle-qualité des protéines provoquant l'accumulation et l'export des protéines mal-repliées (Molinari *et al.*, 2004). La CRT, par sa fonction chaperonne, favorise avec la CNX l'assemblage des complexes CMH de classe I et la rétention des complexes incomplètement assemblés dans le RE (Elliott et Williams, 2005 ; Michalak *et al.*, 2009). Dans des fibroblastes déficients en CRT, les molécules CMH-I ont un export du RE anormalement rapide, un chargement peptidique inefficace et une reconnaissance altérée des cellules T (Gao *et al.*, 2002).

En plus de sa fonction de chaperonne, la CRT joue un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie du Ca^{2+} au sein du RE. Le Ca^{2+} qui est une molécule de signalisation impliquée dans des processus de développement et cellulaires variés, est majoritairement stocké dans le RE à l'intérieur de la cellule (Michalak *et al.*, 2009). La CRT, à elle seule, est capable de lier près de 50% de cette réserve calcique dans le RE (Nakamura *et al.*, 2001). Cette liaison se fait avec une grande capacité et faible affinité au niveau du domaine acide C de la CRT, et dans un site de liaison à haute affinité situé dans le domaine P de la protéine (Baksh et Michalak, 1991). Par conséquent, la surexpression de CRT provoque un stock élevé de Ca^{2+} intracellulaire (Bastianutto *et al.*, 1995 ; Mery *et al.*, 1996 ; Arnaudeau *et al.*, 2002), alors qu'une déficience cellulaire en CRT réduit la capacité de stockage du Ca^{2+} dans le RE (Mesaeli *et al.*, 1999 ; Guo *et al.*, 2001).

I.3.3.2 Rôle de la CRT dans l'apoptose et la phagocytose

Les études effectuées au cours de ces quinze dernières années, ont révélé un rôle essentiel de la CRT dans l'apoptose et l'élimination des cellules apoptotiques.

L'explication de la contribution de la CRT à l'apoptose reposait initialement sur sa capacité à réguler le calcium dans le RE. Dans des conditions normales, les ions Ca^{2+} cyclent en permanence entre le RE et la mitochondrie. Ils sont pompés dans le RE par des ATPases SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase) et y sortent par des canaux IP3R (Inositol 1,4,5-trisPhosphate Receptor). Le passage d'un signal de vie à un signal de mort dépend de l'amplitude du Ca^{2+} mitochondrial qui, à son tour, dépend largement du contenu du RE en Ca^{2+} maintenu par la balance entre le pompage et la libération de Ca^{2+} (Demaurex et Distelhorst, 2003). Scorrano *et al.* ont démontré que le transfert du Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie est requis pour l'initiation de la mort cellulaire programmée par certains stimuli d'apoptose (Scorrano *et al.*, 2003). Plusieurs études ont mis en évidence la capacité de la CRT à moduler les récepteurs IP3R et les ATPases SERCA (Mesaeli *et al.*, 1999 ; Camacho et Lechleiter, 1995 ; John *et al.*, 1998 ; Lim *et al.*, 2008).

En 2000, le groupe de Nakamura a étudié l'effet de la surexpression et de la déficience en CRT sur la résistance et la sensibilité de la cellule à l'apoptose. Ils ont trouvé que les cellules surexprimant la CRT sont plus sensibles à l'apoptose et présentent une libération élevée du cytochrome c de la mitochondrie. Au contraire, les cellules déficientes en CRT sont significativement plus résistantes à l'apoptose, une résistance corrélée avec une baisse de cytochrome c libéré et de l'activité de la caspase 3. Ainsi, les changements dans l'environnement luminaire du RE provoqués par l'altération spécifique de l'expression de la CRT modulent la libération du cytochrome c et l'activité des caspases durant la stimulation de l'apoptose. Ce groupe a finalement suggéré qu'il y a une communication entre le RE et la mitochondrie, impliquant probablement les ions calcium, qui peut jouer un rôle dans la sensibilité cellulaire vis-à-vis de l'apoptose (Nakamura *et al.*, 2000). En plus, Pinton *et al.* ont reporté que le calcium libérable du RE est important au cours de l'apoptose induite par le céramide et que la surexpression de la CRT favorise ce type d'apoptose (Pinton *et al.*, 2001). Sous des conditions de stress oxydatif induit par le H_2O_2 , les cellules myocardiques surexprimant la CRT sont hautement susceptibles à l'apoptose à cause de la perturbation de l'homéostasie calcique (Ihara *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été obtenus par Lim et ses collègues qui ont démontré que la surexpression de CRT altère l'homéostasie du Ca^{2+} et provoque l'apoptose dans les cardiomyocytes matures (Lim *et al.*, 2008). L'ensemble de ces données montre qu'il y a une relation dépendante du calcium entre la surexpression de la CRT et la sensibilité à l'apoptose.

L'homéostasie calcique dans le RE peut aussi jouer sur l'expression en surface de la CRT. Une étude récente a démontré que le traitement des cellules par un agent qui supprime le Ca^{2+} du RE, la thapsigargine, provoque l'expression de la CRT à la surface cellulaire. De plus, les cellules traitées par cet agent sont mieux phagocytées par les cellules dendritiques dérivant de la moelle osseuse (Peters et Raghavan, 2011). Ces résultats et d'autres présentés dans le paragraphe suivant montrent la contribution de la calréticuline membranaire à l'apoptose et à l'élimination des cellules apoptotiques.

Les conditions de localisation de la CRT à la surface cellulaire restent jusqu'à présent énigmatiques. Mais il est évident que, par cette localisation, des arguments sont ajoutés à la multifonctionnalité de cette protéine.

A la surface du phagocyte, la CRT en association avec le récepteur CD91 constitue un récepteur pour la partie collagène du C1q et les membres de la famille des collectines. Ces molécules sont capables de reconnaître et de lier parallèlement la cellule apoptotique favorisant ainsi son ingestion (Ogden *et al.*, 2001 ; Vandivier *et al.*, 2002). En plus, la liaison de C1q et de la MBL au complexe CRT/CD91 stimule l'initiation de la phagocytose des cellules apoptotiques par le processus de macropinocytose (Ogden *et al.*, 2001).

Le groupe de Peter Henson a révélé un autre rôle de la CRT de surface dans l'efferocytose dû cette fois à sa présence à la surface des cellules apoptotiques. Ce groupe a démontré qu'au cours de l'apoptose, la CRT augmente et est redistribuée à la surface des cellules dans des zones pouvant contenir de la phosphatidylsérine PS. En plus, la pré-incubation des cellules apoptotiques avec des anticorps bloquants dirigés contre la CRT de surface provoque la réduction significative de leur ingestion par les phagocytes. De la même façon, des cellules MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) CRT^{-/-} apoptotiques ne sont pas aussi efficacement éliminées que les MEF sauvages. Ainsi, les auteurs de cette publication ont pu conclure que la CRT est le second ligand général de reconnaissance ou signal « eat-me » après la PS, de la surface des cellules apoptotiques et que son mode d'action est probablement dépendant du récepteur CD91/LRP présent à la surface des phagocytes (Gardai *et al.*, 2005).

Cependant, la CRT est aussi présente à la surface des cellules vivantes, pourquoi n'induit-elle pas alors leur élimination? Un mécanisme de prévention a été proposé dans cette étude et est représenté dans la figure 10. Le signal « don't eat-me » CD47 présent à la surface des cellules non apoptotiques, interagit avec la glycoprotéine transmembranaire SIRP α à la surface du phagocyte empêchant ainsi la phagocytose des cellules viables. Au cours de l'apoptose, l'expression de CD47 est altérée ou perdue à la surface des cellules apoptotiques ce qui provoque l'absence de l'activation du SIRP α du phagocyte. L'analyse de

la surface des cellules apoptotiques a montré que CD47 se trouve dans des zones éloignées des patchs CRT/PS (Gardai *et al.*, 2005).

Le groupe de Fricker a récemment démontré que l'exposition de la CRT à la surface des neurones apoptotiques ou viables est requise pour leur phagocytose *via* le récepteur LRP de la surface des microglies activées (Fricker *et al.*, 2012). En effet, la phagocytose des neurones vivants ou apoptotiques par les microglies, des macrophages résidents du cerveau, peut être bénéfique ou nuisible au cours de diverses pathologies cérébrales.

La calréticuline exposée à la surface des cellules apoptotiques est aussi la cible de la molécule de pontage C1q. Des études de notre laboratoire ont démontré que C1q interagit avec la CRT *in vitro* (Païdassi *et al.*, 2011) et que cette interaction est aussi valide dans un contexte cellulaire, notamment à la surface des cellules HeLa apoptotiques précoces (Verneret *et al.*, 2014). Ces points seront détaillés dans un paragraphe ultérieur.

Dans le tableau 2 sont représentées les différentes molécules pouvant interagir avec la CRT au cours de l'efferocytose.

A la surface de la cellule mourante	Molécules intermédiaires	A la surface du phagocyte
PS ^{1;2;3}	C1q ^{6;7;8}	CD91 ^{1;6;8}
ERp57 ⁴	MBL ⁶	SREC-1 ¹¹
CD91 ⁵	SPA ; SPD ⁸	SRA ^{12;13}
	Ficoline 2 ⁹ ; Ficoline 3 ^{9;10}	

Tableau 2. Liste des molécules de la surface de la cellule mourante, de l'espace intermédiaire et de la surface du phagocyte avec lesquelles la CRT peut interagir.

1 : Gardai *et al.*, 2005 ; 2 : Tarr *et al.*, 2010 ; 3 : Païdassi *et al.*, 2011 ; 4 : Panaretakis *et al.*, 2009 ; 5 : Garg *et al.*, 2012 ; 6 : Ogden *et al.*, 2001 ; 7 : Verneret *et al.*, 2014 ; 8 : Vandivier *et al.*, 2002 ; 9 : Kuraya *et al.*, 2005 ; 10 : Honoré *et al.*, 2007 ; 11 : Berwin *et al.*, 2004 ; 12 : Berwin *et al.*, 2003 ; 13 : Duo *et al.*, 2014.

L'implication de la CRT dans l'élimination des cellules apoptotiques a été également vérifiée dans des systèmes non mammaliens. Chez la drosophile, Kuraishi et ses collègues ont initialement remarqué que la phagocytose des cellules apoptotiques est indépendante de la PS, le premier signal « eat-me » des cellules apoptotiques des mammifères. De manière intéressante, ils ont trouvé que la CRT présente à la surface des cellules vivantes change de profil, mais pas de taux, après l'induction de l'apoptose et se présente sous forme d'agrégats à la membrane cellulaire. En outre et comme pour les résultats obtenus par Gardai *et al.*

(Gardai *et al.*, 2005), la phagocytose des cellules apoptotiques a été inhibée par des anticorps anti-CRT. Ces résultats ont permis d'identifier la CRT comme le principal marqueur de la phagocytose des cellules apoptotiques chez la drosophile (Kuraishi *et al.*, 2007).

Un autre aspect de la contribution de la CRT à la phagocytose peut être associé à sa description comme un constituant des coupes phagocytaires et des phagosomes. Müller-Taubenberger *et al.* ont démontré que les phagocytes professionnels de l'amibe *Dictyostellium* doublement mutés pour la CRT et la CNX phagocytent significativement moins bien des particules de levures comparativement aux cellules contrôles. Ils ont associé cela à une diminution de la formation des coupes phagocytaires remarquée dans ces cellules (Müller-Taubenberger *et al.*, 2001). D'autres résultats obtenus dans des phagocytes mammaliens comme les neutrophiles et les macrophages ont confirmé la présence de la CRT au niveau des coupes phagocytaires et des phagosomes (Stendahl *et al.*, 1994 ; Garin *et al.*, 2001 ; Shui *et al.*, 2008).

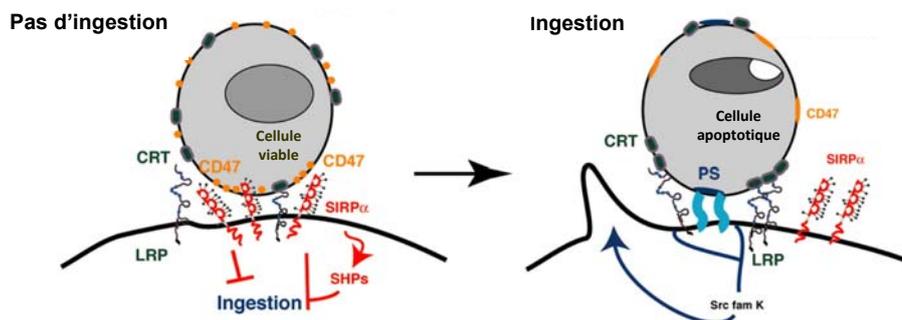


Figure 10. Modifications survenant à la surface des cellules apoptotiques.

Bien que la CRT pouvant engager le récepteur LRP soit disponible à la surface des cellules viables, la phagocytose de ces cellules est inhibée grâce à la voie de signalisation SIRPα/CD47. Après l'induction de l'apoptose, la voie SIRPα/CD47 n'est plus active, la CRT augmente à la surface des cellules et devient distribuée sous forme de patches, proches de la PS et éloignés du CD47, pour mieux stimuler LRP à la surface de l'efferocyte (d'après Gardai *et al.*, 2005).

I.3.3.3 Immunogénicité de la CRT de surface

Dans une série d'études menée par le groupe de Guido Kroemer, l'exposition de la CRT à la surface des cellules cancéreuses a été particulièrement ciblée. C'est le premier groupe qui a décrit le caractère immunogène de cette CRT responsable du développement d'une immunité anti-tumorale. En effet, l'induction de la mort cellulaire immunogène dans les

cellules cancéreuses est une stratégie prometteuse de la chimiothérapie parce qu'elle contribue à l'éradication des cellules chimiorésistantes et des cellules souches cancéreuses (Obeid *et al.*, 2007a). Ce type de mort a été effectivement observé en traitant des cellules tumorales par des molécules de la famille chimiothérapeutique des anthracyclines comme la mitoxantrone. Sous l'action de ces molécules, la CRT est transloquée à la surface cellulaire, une translocation très rapide qualifiée de « pré-apoptotique » comme elle précède l'exposition de la PS. Ainsi, une forte corrélation a été établie entre l'immunogénicité des cellules tumorales traitées par les anthracyclines et l'exposition de la CRT à leur surface. De ce fait, le pré-traitement de ces cellules par des anticorps neutralisants anti-CRT ou par siARN spécifique de la CRT est capable d'inhiber leur phagocytose par les cellules dendritiques. D'une manière intéressante, un agent chimiothérapeutique non immunogène comme l'étoposide et la mitomycine c peut devenir immunogène quand il est combiné avec la CRT recombinante (Obeid *et al.*, 2007a). Des résultats similaires ont été également observés en réponse aux radiations ionisantes γ et UVC (Obeid *et al.*, 2007b). L'ensemble de ces données a démontré que l'exposition précoce de la CRT à la surface des cellules tumorales favorise leur prise en charge par les cellules dendritiques préparant ainsi la présentation efficace des antigènes tumoraux spécifiques aux lymphocytes T cytotoxiques (Obeid *et al.*, 2007b). De plus, des cellules tumorales syngéniques traitées par des anthracyclines et des radiations ionisantes *in vitro*, et injectées *in vivo* chez des souris immunocompétentes, peuvent générer une vaccination anti-tumorale. Les souris sont ainsi protégées contre une ré-injection des cellules tumorales (du même type) viables. Cet effet protecteur dépend directement de la CRT exposée à la surface des cellules traitées (Obeid *et al.*, 2007a ; 2007b). La figure 11 illustre l'exposition immunogène de la CRT à la surface des cellules cancéreuses traitées par certains agents en absence de tout autre adjuvant.

Il a aussi été reporté que le traitement des cellules tumorales par une forme recombinante du ligand de récepteur de mort TRAIL induit l'exposition de la CRT à leur surface et provoque leur mort immunogène (Panaretakis *et al.*, 2009). De part son interaction directe avec TRAIL, la CRT pourrait alors réguler son effet pro-immunogène au cours de l'immunité anti-tumorale (de Bruyn *et al.*, 2015).

Koberlik *et al.* ont récemment démontré que la CRT exogène (recombinante) peut renforcer la réponse anti-tumorale induite par la thérapie photodynamique. Elle joue ainsi le rôle d'un adjuvant responsable du contrôle de la tumeur (Koberlik *et al.*, 2015). De plus, les effets anti-cancéreux bénéfiques du melphalan, un agent chimiothérapeutique utilisé dans le traitement des mélanomes, peuvent être davantage augmentés par un traitement combinatoire reconstituant la CRT de surface qui est faiblement transportée à la surface des cellules de mélanome traitées par cet agent (Dudek-Peric *et al.*, 2015).

La mobilisation du système immunitaire en réponse à l'exposition de la CRT à la surface des cellules cancéreuses a conduit à reconnaître cette protéine comme l'un des signaux de danger DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) les plus importants (Garg *et al.*, 2014).

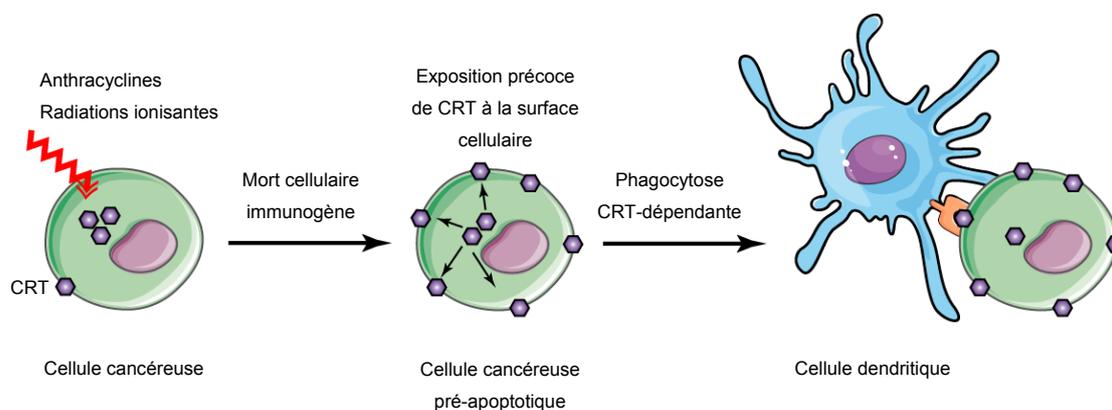


Figure 11. Exposition immunogène de la CRT à la surface des cellules cancéreuses.

L'induction de la mort immunogène des cellules cancéreuses par les anthracyclines et des radiations ionisantes provoque la translocation pré-apoptotique (avant la PS) de la CRT à leur surface. Cette exposition rapide de CRT permet l'élimination efficace des cellules cancéreuses par les cellules dendritiques. Ainsi, la différence entre la mort cellulaire immunogène ou non immunogène est déterminée par la présence ou l'absence de la CRT de surface des cellules tumorales (adapté de Bruyn *et al.*, 2015).

I.3.3.4 Effet immunomodulateur de la CRT soluble

La CRT soluble peut aussi avoir un effet immunomodulateur. Un fragment recombinant N-terminal de la CRT a été décrit comme un inducteur puissant de l'activation et de la maturation des lymphocytes B et des macrophages. Il est aussi capable de déclencher *in vitro* et *in vivo* la commutation isotypique des lymphocytes B sans l'aide des cellules T (Hong *et al.*, 2010). Récemment, Duo *et al.* ont reporté que la CRT recombinante complète sous sa conformation auto-oligomérisée stimule la production des cytokines TNF α et IL-6 par les macrophages *via* l'activation de la voie de signalisation MAPK/NF- κ B dépendante du récepteur « scavenger » SRA (Duo *et al.*, 2014). D'autres études ont, au contraire, démontré que la CRT soluble est incapable de déclencher, seule, la maturation et l'activation des cellules dendritiques et la production des cytokines pro-inflammatoires (Obeid *et al.*, 2007a ; Bak *et al.*, 2008 ; Peters et Raghavan, 2011). Il est important de noter ici que chez les patients souffrant de l'arthrite rhumatoïde et du lupus érythémateux, le taux de CRT sérique est anormalement élevé (Hong *et al.*, 2010).

L'implication de la CRT « immunostimulante » dans un processus immunotolérant qui est l'efferocytose reste difficile à expliquer. Son effet immunogène peut être contrebalancé par la réponse immunitaire anti-inflammatoire induite par ses partenaires comme C1q et PS, ce qui pourrait favoriser finalement un environnement tolérogène caractéristique de l'efferocytose.

I.3.3.5 Mécanismes de translocation de la CRT à la surface cellulaire

L'exposition de la CRT à la surface cellulaire est importante pour l'élimination des cellules apoptotiques et l'induction de la mort cellulaire immunogène (MCI) des cellules cancéreuses. Mais le processus exact par lequel cette exposition se fait n'est pas encore bien élucidé. Il dépend probablement de l'âge apoptotique durant lequel l'exposition a lieu. L'état apoptotique de la cellule peut être décrit en 3 stades : i) stade pré-apoptotique où la PS n'est pas encore externalisée et la membrane plasmique est encore intacte, ii) stade apoptotique précoce caractérisé par l'externalisation de la PS et l'absence de la perméabilisation de la membrane et iii) stade apoptotique moyen à tardif accompagné de la perméabilisation de la membrane plasmique. Ainsi, l'exposition de la CRT à la surface cellulaire peut suivre des voies différentes en fonction du stade d'apoptose mais aussi de l'inducteur d'apoptose. Certaines voies peuvent également coexister (Krysko *et al.*, 2012).

Au cours de la MCI, l'exposition de la CRT précède, dans plusieurs cas, l'exposition de la PS et l'apparition des signes morphologiques caractéristiques de l'apoptose (Obeid *et al.*, 2007a). A ce stade pré-apoptotique, il a été démontré qu'après le traitement des cellules cancéreuses par les anthracyclines, la chaperonne ERp57 dirige la translocation de la CRT (Panaretakis *et al.*, 2008 ; Obeid, 2008). De façon intéressante, la translocation de la CRT et de l'ERp57 est accompagnée de la phosphorylation de PERK et de son substrat eIF2 α , reflétant ainsi l'implication d'une réponse au stress du RE. Un pool de CRT qui a transité dans l'appareil de Golgi est secrété finalement par une voie d'exocytose SNARE-dépendante (Panaretakis *et al.*, 2009). Cependant, Garg *et al.* ont remarqué que la CRT exposée d'une manière PERK-dépendante à la surface des cellules qui ont subi une thérapie photodynamique à l'hypericine, n'est pas associée à ERp57. Par contre, ils ont trouvé que la CRT pourrait être ancrée avec le récepteur CD91 à la surface des cellules cancéreuses subissant la mort cellulaire immunogène (Garg *et al.*, 2012). Toutefois, la translocation de la CRT induite par la mitoxantrone et l'hypericine a été bloquée par la Brefeldine A, un inhibiteur du transport antérograde des protéines du RE vers l'appareil de Golgi (Garg *et al.*, 2012 ; Panaretakis *et al.*, 2009). L'ensemble de ces données démontre que la réponse au stress du RE et la voie sécrétoire sont requises pour l'exposition pré-apoptotique de la CRT

qui peut avoir lieu selon différentes voies en fonction de la thérapie utilisée (Wiersma *et al.*, 2015).

En addition au stress du RE, la formation des réactifs oxygénés (ROS) et la réduction des taux du calcium dans le RE peuvent aussi favoriser l'exposition de la CRT à la surface des cellules. En effet, la plupart des thérapies induisant la MCI provoquent aussi la formation des ROS (Wiersma *et al.*, 2015). L'incubation des cellules cancéreuses CT26 traitées par des anthracyclines ou des radiations, avec des « scavengers » des ROS, est capable de provoquer l'inhibition de l'apoptose et de l'exposition de la CRT à la surface cellulaire (Panaretakis *et al.*, 2009). De plus, la déléition du Ca^{2+} du RE par le traitement avec la thapsigargine des cellules, induit l'expression de surface et la sécrétion de la CRT avec d'autres chaperonnes (Peters et Raghavan, 2011).

Dans certains cas, une réponse apoptotique spécifique est aussi essentielle pour induire l'exposition de CRT en plus du stress du RE. De cette manière, l'activation de la caspase 8 est nécessaire pour la translocation du complexe CRT/ERp57 à la surface des cellules traitées à la mitoxantrone (Panaretakis *et al.*, 2009), ce qui n'est pas le cas pour le traitement à l'hypericine (Garg *et al.*, 2012). Ainsi, le stress du RE et la production des ROS sont tous les 2 impliqués dans la translocation de la CRT, tandis que des stimuli supplémentaires comme l'activation des caspases ou l'altération du Ca^{2+} du RE sont essentiels en fonction de la stratégie thérapeutique utilisée (Wiersma *et al.*, 2015).

A un stade précoce d'apoptose, une relation a été établie entre l'exposition de la CRT et celle de la PS à la surface des cellules. En effet, la CRT peut être externalisée en association avec la PS sous forme de « clusters » ponctués suite à l'inhibition de l'aminophospholipide translocase qui maintient la PS du côté cytosolique de la membrane (Tarr *et al.*, 2010). L'association de la CRT à la surface cellulaire avec la PS externalisée a été reportée pour les cellules rendues apoptotiques par des radiations UV (Gardai *et al.*, 2005).

Finalement, certains types de cellules apoptotiques peuvent exposer la CRT à leur surface lors du trafic général des protéines du RE et du Golgi à leur surface (Franz *et al.*, 2007 ; Krysko *et al.*, 2012).

Les voies moléculaires impliquées dans l'exposition de la CRT au cours des différents stades d'apoptose sont représentées sur la figure 12.

Les données présentées ci-dessus traitent de l'exportation de la CRT à la surface des cellules apoptotiques. Ici se pose la question sur l'origine et les voies par lesquelles la CRT est exposée à la surface des phagocytes qui est, elle aussi, impliquée dans l'efferocytose.

Les éléments de réponse restent jusqu'à présent rares. Des études récentes ont révélé un rôle de la voie TLR/Btk dans la régulation de l'exposition de la CRT et de sa co-localisation avec CD91 à la surface des phagocytes (Byrne *et al.*, 2013 ; Feng *et al.*, 2015). La kinase Btk (Bruton's tyrosine kinase) est décrite pour sa fonction, en aval de multiples TLRs (Toll-Like Receptors), dans la régulation des réponses immunitaires dans les cellules myéloïdes. Elle participe aussi à la régulation « positive » de l'élimination des cellules apoptotiques *via* le complexe CRT/CD91. En effet, la stimulation du TLR7 induit l'interaction entre Btk et CRT, ce qui facilite la phosphorylation de CRT *via* Btk. Cette modification de la CRT permet la régulation de son trafic vers la surface des cellules myéloïdes où elle peut co-localiser avec CD91 et interagir avec les opsonines comme C1q pour faciliter l'efferocytose (Byrne *et al.*, 2013). De plus, la voie TLR/Btk joue un rôle particulièrement important dans l'exposition de la CRT à la surface des macrophages engagés dans l'élimination des cellules tumorales (Feng *et al.*, 2015).

Il reste intéressant de mentionner que la voie par laquelle la CRT est associée à la surface de la plupart des cellules mammaliennes non apoptotiques est rarement étudiée. Une hypothèse lancée sur ce sujet propose que la CRT libérée par la fraction des cellules mortes existantes dans une population cellulaire, puisse s'attacher à la surface des cellules viables (Ghiran *et al.*, 2003). Des études plus avancées seront nécessaires pour éclaircir ce point.

La présence à l'extérieur du RE du peptide KDEL (de rétention dans le RE) de la CRT reste un point ambigu. Alors que le groupe de Tarr a trouvé que la CRT de surface perd ce peptide (Tarr *et al.*, 2010), Garg et ses collègues ont remarqué que la CRT est exportée à la surface cellulaire sans que son signal KDEL soit clivé (Garg *et al.*, 2012). Des études sont nécessaires afin d'élucider la forme sous laquelle la CRT se présente à la surface cellulaire qui pourrait dépendre des stimuli initiaux.

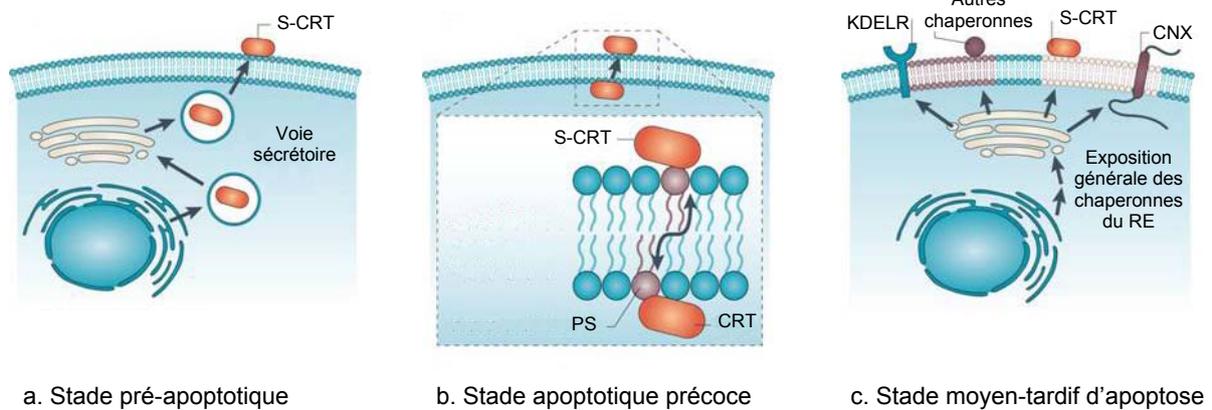


Figure 12. Voies d'exposition de la CRT à la surface cellulaire à différents stades d'apoptose.

L'exposition pré-apoptotique de la CRT à la surface cellulaire est principalement dépendante de la voie sécrétoire (partie a). A un stade précoce d'apoptose, la CRT peut être exposée en association avec la PS sous certaines conditions (partie b). En addition, les cellules apoptotiques précoces qui font partie d'une population évoluant essentiellement vers une apoptose tardive peuvent exposer la CRT lors du trafic général des protéines du RE ou de l'appareil de Golgi à la surface des cellules (partie c) (d'après Krysko *et al.*, 2012). S-CRT : Calréticuline de surface ; PS : Phosphatidylsérine.

I.4 Projet de thèse

I.4.1 Résultats à la base du projet

L'interaction entre CRT et C1q fut la cible de plusieurs études de notre laboratoire. L'observation initiale que la CRT est le récepteur de la partie collagène du C1q a été complétée par des données de SPR (Surface Plasmon Resonance) et de microscopie électronique. En effet, on a démontré à l'aide de ces 2 techniques que les têtes globulaires de C1q sont capables, elles-aussi, d'interagir avec la CRT. En plus, les 2 types d'interaction (queue collagène-CRT, gC1q-CRT) s'effectuent *via* le domaine globulaire de la CRT (Païdassi *et al.*, 2011). Ces résultats sont en accord avec le rôle de « pont » associé à C1q qui peut ainsi, par ses différentes parties, reconnaître la CRT exposée de part et d'autre de la synapse efferocytaire. Des données de FRET obtenues récemment ont permis de mettre en évidence l'interaction directe *in cellulo* entre gC1q et CRT exposée à la surface des cellules HeLa apoptotiques précoces (Verneret *et al.*, 2014). De façon intéressante, cette interaction semble être importante pour la phagocytose puisque la diminution de l'expression de la CRT par siARN provoque l'altération de l'effet positif de C1q observé sur le taux de phagocytose (Verneret *et al.*, 2014).

Toutefois, l'association de la CRT à d'autres partenaires reconnus eux aussi par C1q fait penser à un jeu complexe d'interactions où différentes molécules interagissent entre elles au cours des différents stades de l'efferocytose. C'est le cas par exemple de la phosphatidylsérine, un partenaire commun de la CRT et du C1q à la surface de la cellule apoptotique, et du récepteur CD91 associé à la CRT et reconnu par C1q à la surface du phagocyte. L'altération de ces interactions multimoléculaires peut être liée au développement des maladies autoimmunes. Ainsi, un défaut dans la reconnaissance des neutrophiles apoptotiques *via* une voie dépendante du complexe CRT/CD91/C1q a été associé avec la maladie autoimmune du lupus érythémateux (Donnelly *et al.*, 2006). D'autres molécules peuvent être aussi proposées comme par exemple le récepteur « scavenger » SREC-I connu comme récepteur d'endocytose de la CRT (Berwin *et al.*, 2004) et dont l'interaction avec C1q au cours de l'élimination des cellules apoptotiques a fait le sujet d'une étude récente (Ramirez-Ortiz *et al.*, 2013). Il est donc clair, en se basant sur ces données, que différents complexes peuvent entrer en jeu durant l'efferocytose même si les règles et le « timing » des différentes interactions ne sont toujours pas élucidés.

Dans la figure 13 est représenté un modèle d'une synapse efferocytaire où l'on peut voir l'interaction entre C1q et la CRT.

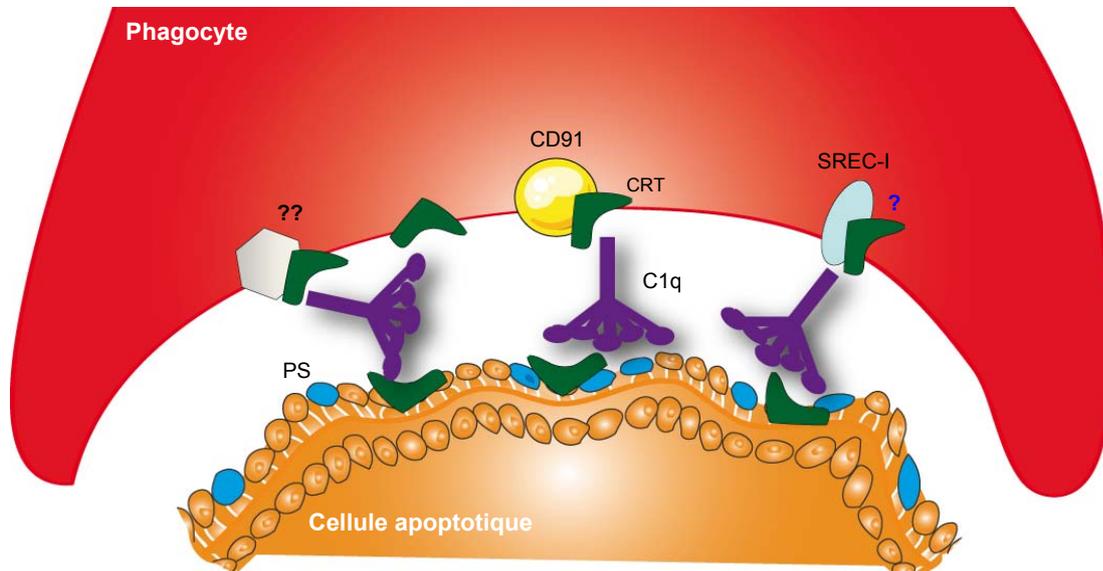


Figure 13. Coopération entre C1q et CRT au sein de la synapse efferocytaire.

La CRT est présente à la surface du phagocyte et à la surface de la cellule apoptotique. Suite à l'induction de l'apoptose, la CRT augmente et est redistribuée à la surface de la cellule apoptotique où elle peut être associée à la PS. La molécule de pontage C1q est capable de reconnaître cette CRT et d'interagir de l'autre côté avec celle située, en association avec CD91, à la surface du phagocyte. Le récepteur SREC-I impliqué, lui aussi, dans l'élimination des cellules apoptotiques *via* C1q, est un récepteur d'endocytose de la CRT, ce qui pourrait suggérer une implication possible (ressemblant à celle de CD91/CRT à la surface de l'efferocyte) du complexe CRT/SREC-I dans l'élimination des cellules apoptotiques. Le point d'interrogation bleu indique que l'interaction n'est pas encore démontrée (dans ce contexte). D'autres co-récepteurs de la CRT non identifiés encore (??) pourraient exister à la surface du phagocyte et contribuer à l'efferocytose *via* C1q.

I.4.2 Objectifs de mon travail de thèse

Les travaux de ma thèse sont dans la continuité du projet du laboratoire commencé il y a presque dix ans. Le but de ce projet consiste à mieux comprendre les interactions moléculaires des collagènes de défense (C1q, MBL et ficolines) au cours des différentes étapes de l'élimination des pathogènes et des cellules apoptotiques de l'hôte. Ainsi, plusieurs partenaires de C1q exposés à la surface des cellules apoptotiques dès les stades précoces (sans perméabilisation de la membrane) ont pu être caractérisés. Il s'agit notamment de l'ADN, la phosphatidylsérine, la GAPDH et la calréticuline. De plus, un signal d'interaction par FRET entre C1q et CRT à la surface des cellules HeLa apoptotiques précoces a été obtenu juste avant mon arrivée au laboratoire, et fut par conséquent le point de base de mon projet de thèse.

En continuité avec ces travaux, les premiers objectifs de ma thèse ont consisté à l'étude de l'exposition de la CRT à la membrane cellulaire et de son interaction avec son partenaire, le C1q, au cours des temps très précoces de l'apoptose. En effet, l'interaction de la CRT décrite pour son immunogénicité avec la molécule anti-inflammatoire C1q pourrait contribuer à l'environnement tolérogène associé à l'efferocytose. De plus, la coopération possible entre ces 2 molécules à un stade apoptotique précoce pourrait éviter l'entrée de la cellule dans un stade de nécrose inflammatoire.

Dans un premier temps, je me suis focalisée sur l'étude de l'interaction CRT/C1q à la surface des cellules aux stades les plus précoces de l'apoptose. Compte tenu du rôle important de C1q dans le maintien de la tolérance durant l'efferocytose, les interactions précoces peuvent apporter probablement une contribution essentielle. Pour se rapprocher plus de la conformation « physiologique » des membranes cellulaires, j'ai utilisé un modèle cellulaire ne nécessitant pas d'étape de trypsination en particulier pour les analyses en cytométrie et les tests fonctionnels. En effet, la modification de la surface cellulaire pourrait changer l'expression de la CRT surtout que le mode d'ancrage de cette protéine à la surface n'est pas encore bien connu.

Au cours de mes études, j'ai mis en évidence que la CRT est relarguée à partir des cellules. De façon intéressante, il apparaît que ce relargage est en relation avec l'évolution de l'état d'apoptose. Comme nous venons de le voir, plusieurs études ont démontré que la CRT peut jouer un rôle immunomodulateur. Ainsi, je me suis intéressée dans la suite des travaux aux fonctions de l'interaction C1q/CRT mais aussi à l'influence de la CRT extracellulaire sur les macrophages et les récepteurs phagocytaires mis en jeu.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1 Biologie cellulaire

II.1.1 Lignées et culture cellulaire

Les expériences sont effectuées en utilisant 3 lignées cellulaires différentes qui sont les cellules THP1, Jurkat et J774. Ces cellules sont cultivées dans une étuve thermostatée à 37 °C sous atmosphère humide à 80% et en présence de 5% de CO₂. Les milieux de culture appelés « complets » sont supplémentés avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco) préalablement décomplémenté et un mélange d'antibiotiques (pénicilline 3 U/ml, streptomycine 3 µg/ml, Invitrogen). La décomplémentation du SVF est réalisée par chauffage pendant 20 minutes à 56 °C, elle permet d'inactiver les protéines du complément.

Les cellules sont régulièrement contrôlées pour vérifier l'absence de contamination par des mycoplasmes à l'aide du kit « Myco Alert Sample Kit » (Lonza) et ne sont utilisées que si le résultat du test est négatif.

La viabilité cellulaire est également vérifiée par comptage au bleu de trypan et les expériences sont réalisées sur une population cellulaire présentant moins de 5% de mortalité.

Les cellules THP1 sont des cellules de la lignée myélomonocytaire humaine isolée à partir du sang d'un patient atteint d'une leucémie monocyttaire aiguë (Tsuchiya *et al.*, 1980). Elles sont cultivées en suspension dans du milieu RPMI-1640 GlutaMAX complet (Invitrogen) et entretenues 2 fois par semaine par dilution à une concentration de 2×10^5 à 5×10^5 cellules par ml.

Les cellules Jurkat sont des lymphocytes T issus du sang d'un patient atteint d'une leucémie lymphoblastique aiguë (Schneider *et al.*, 1977). Ces cellules en suspension sont repiquées 2 fois par semaine à une concentration de 2×10^5 à 5×10^5 cellules par ml dans du milieu RPMI-1640 complet.

Les cellules J774 sont des macrophages dérivés d'un réticulosarcome de souris (Ralph *et al.*, 1975). Ces cellules adhérentes sont cultivées dans du milieu DMEM complet (Invitrogen). Une fois arrivées à environ 80% de confluence, elles sont repiquées à une concentration de 3×10^5 cellules par ml. Le repiquage s'effectue en détachant les cellules préalablement lavées

avec du PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, sans calcium, sans magnésium ; Gibco) à l'aide d'une solution de trypsine EDTA en PBS (Invitrogen). L'action de la trypsine est ensuite arrêtée en ajoutant du milieu contenant du SVF. Les cellules sont récoltées puis comptées sur une lame de Malassez avant d'êtreensemencées à la concentration désirée.

II.1.2 Induction de l'apoptose

Deux millions de cellules Jurkat sont incubées dans 1 ml de milieu RPMI complet dans un puits d'une plaque de culture de 12 puits. Plusieurs puits sont remplis en fonction du nombre de cellules nécessaire pour chaque expérience. La plaque est ensuite déposée sous une lampe UV (lampe portative double longueur d'onde de Fischer Bioblock Scientific VL-6.MC) et les cellules sont irradiées à une longueur d'onde de 312 nm pendant 9 minutes (dose = 1000 mJ/cm²). Les cellules sont ensuite remises en culture pendant différentes périodes. Les conditions d'irradiation ont été préalablement optimisées au laboratoire par des études préliminaires.

A la suite de l'irradiation, les cellules rentrent en apoptose mais avec une certaine hétérogénéité au niveau de la population. La proportion de cellules viables, apoptotiques précoces, ou en nécrose secondaire est évaluée en cytométrie à l'aide du test Annexine V/PI développé ultérieurement.

II.1.3 Transfection des cellules

La transfection consiste à introduire des acides nucléiques, par de nombreuses techniques physiques et chimiques, à l'intérieur des cellules. Cette méthode a en général pour objectifs : i) exprimer une protéine absente ou modifiée dans les cellules transfectées (transfection d'ADN), ou ii) diminuer ou inhiber l'expression d'une protéine existante (transfection de siARN). Les cellules peuvent être transfectées transitoirement pour des études à court terme, ou d'une manière stable pour des analyses à court et très long terme.

Afin d'étudier l'implication de la calréticuline endogène dans l'apoptose et l'élimination des cellules apoptotiques, nous avons transfecté transitoirement les cellules Jurkat par des petits ARN interférents ou siARN dirigés spécifiquement contre la CRT. La technologie de l'ARN interférent est l'une des technologies les plus importantes de la biologie moderne car elle permet d'analyser les effets fonctionnels directs de la répression d'un gène spécifique dans les systèmes mammaliens.

Son principe consiste brièvement à introduire un ARN double brin dans les cellules. Cet ARN va interagir de manière spécifique avec la ribonucléase Dicer qui va provoquer sa fragmentation totale. Un des brins va être éliminé tandis que l'autre va être utilisé comme un

guide par le complexe multiprotéique RISC (RNA-Induced Silencing Complex) pour trouver et détruire l'ARNm ciblé ayant une séquence complémentaire. Le résultat se traduit par la répression de l'expression générale du gène désigné (Pour revue Dorsett et Tuschl, 2004). La séquence de l'ARNi ciblant l'ARNm de la calréticuline (Harada *et al.*, 2006) ainsi que celle du contrôle correspondant à la séquence complémentaire inverse sont présentées dans le tableau 3. Le protocole d'obtention de ces séquences a été optimisé dans notre laboratoire et est détaillé dans l'article de la référence (Païdassi *et al.*, 2011).

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

Tableau 3. Séquences des ARNi utilisés pour la transfection des cellules Jurkat.

Deux méthodes sont utilisées pour transférer les cellules Jurkat par les ARNi : la lipofection et l'électroporation.

i) La lipofection

Dans cette technique, le matériel génétique est empaqueté dans des vésicules de liposomes artificielles qui vont interagir avec la membrane de la cellule cible et faciliter l'entrée de l'ARNi. L'agent transfectant que nous avons utilisé est la « Lipofectamine RNAimax » (Invitrogen). Cette méthode de transfection a été utilisée dans notre laboratoire pour diminuer l'expression de la calréticuline par siARN CRT dans les cellules HeLa (Païdassi *et al.*, 2011 ; Verneret *et al.*, 2014). Nous avons appliqué cette même technique pour transférer les cellules Jurkat par les mêmes siARN. Pour résumer, l'ARNi est dilué à différentes concentrations (10 nM ; 50 nM et 100 nM) dans 500 µl de milieu Optimem (Gibco). La lipofectamine (4 µl) est ensuite ajoutée dans les différents tubes et le mélange est incubé pendant 20 minutes à température ambiante en homogénéisant régulièrement. Ce mélange est finalement ajouté aux cellules qui seront remises en culture pendant 72 heures dans du milieu RPMI contenant du SVF 10% mais en absence d'antibiotiques. Après 72 h, l'expression totale de la CRT est systématiquement évaluée par Western Blot à partir du lysat cellulaire total comme cela est expliqué dans les paragraphes qui suivent.

ii) *L'électroporation*

L'électroporation consiste à exposer les cellules à une brève décharge électrique qui va provoquer la formation de petits pores dans leur membrane plasmique. Le matériel génétique pénètre ainsi à travers ces pores à l'intérieur des cellules. Plusieurs paramètres peuvent intervenir dans l'efficacité de la transfection par cette technique comme l'intensité et la durée de la décharge électrique, ce qui nécessite des étapes d'optimisation avant d'atteindre le résultat voulu.

Nous avons utilisé le système d'électroporation BTX (Electro Cell manipulator 600) pour transférer les cellules Jurkat. Pour cela, 4×10^6 cellules sont reprises dans 200 μ l de milieu RPMI contenant 10% de SVF (sans antibiotiques) et les ARNi CRT ou contrôle, puis transvasées dans une cuvette d'électroporation de 2 mm. La cuvette est ensuite déposée dans l'électroporateur et les cellules sont soumises à une décharge électrique avant d'être remises en culture dans 10 ml de milieu sans antibiotiques pendant 48 ou 72 h. Dans le tableau 4 sont représentés les différents paramètres que nous avons testés au cours de ces expériences.

Concentration de siARN (nM)	500	250	100	250	250	100	100
Incubation après électroporation (h)	72	48	48	72	72	72	72
Voltage (V)	130	200	230	230	250	200	230
Capacitance (μ F)	1050	300	300	300	300	300	300
Résistance (Ω)	720	720	720	720	720	720	720
Durée de la décharge (ms)	20	3.3	3	3.2	3	3.5	3.1

Tableau 4. Différentes conditions testées pour la transfection des siARN CRT par électroporation.

II.2 Analyses de la fluorescence

II.2.1 Marquage par des protéines fluorescentes

Pour l'analyse de la fixation des têtes globulaires de C1q et de la calréticuline sur les cellules, les protéines purifiées sont couplées aux fluorophores cyanine 3 et Alexa 488 respectivement selon les protocoles recommandés dans les kits « Cy3 Ab Labeling Kit » (Amersham - GE Healthcare) et « Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit » (Invitrogen).

Les gC1q fluorescentes sont incubées avec des cellules Jurkat préalablement fixées par une solution de paraformaldéhyde PFA 4% diluée dans du PBS (10 minutes à température ambiante). Pour le cas de la CRT fluorescente, elle est ajoutée dans le milieu des cellules vivantes non fixées.

II.2.2 Marquage par immunofluorescence

L'immunofluorescence est basée sur une réaction antigène-anticorps visualisée à l'aide d'une molécule fluorescente. L'antigène recherché peut être ciblé de façon directe par un anticorps primaire couplé à un fluorophore, c'est le cas des marqueurs de surface (CD11c, CD11b et CD14) que nous avons étudiés à la surface des macrophages. Pour le reste des expériences, l'immunomarquage est effectué de façon indirecte, c.à.d. la protéine étudiée est reconnue par un anticorps primaire qui va être ensuite détecté par l'intermédiaire d'un deuxième anticorps « secondaire » qui, lui, est couplé à un fluorophore.

Dans le cas où la fluorescence va être analysée par cytométrie, les cellules macrophages THP1 sont détachées de leur support par une solution de trypsine-EDTA, puis immunomarcuées pour la protéine ou les protéines désirée(s).

Pour l'analyse par microscopie, la procédure est différente en fonction du type cellulaire. Pour les cellules Jurkat, toutes les étapes du marquage décrites dans la suite du paragraphe sont effectuées dans un tube eppendorf. A la fin du marquage, un volume de 100 µl contenant au moins 70 000 cellules est déposé sur une lamelle de verre qui est ensuite centrifugée pendant 5 minutes (1500 rpm) pour permettre la déposition des cellules.

Quant aux cellules THP1, leur différenciation sous l'action du PMA en macrophages adhérents est directement effectuée dans des puits d'une lame Millicell EZ (Merck Millipore). Après 48 h, les cellules sont lavées et marquées. Avant d'incuber ces cellules avec les anticorps, les récepteurs de la partie Fc des anticorps (FcR) sont saturés à l'aide du kit « FcR blocking reagent » selon les recommandations du fournisseur (MACS).

Les étapes de l'immunomarquage sont les mêmes pour les 2 types de cellules. Après un lavage en PBS, les cellules sont fixées au PFA 4% puis saturées avec une solution de BSA 1% (Bovine Serum Albumin) dans du PBS. Lorsque cela est nécessaire, 10 µg de C1q ou de gC1q dilués dans le tampon de saturation sont incubés avec les cellules pendant 45 minutes à température ambiante. L'anticorps primaire dilué à la concentration recommandée par le fabricant est ensuite ajouté pour un temps d'incubation de 45 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois au PBS avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire « fluorescent » pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Le montage des échantillons est réalisé avec du milieu contenant du DAPI pour la visualisation des noyaux cellulaires (Vectachield Mounting Medium, Vector Laboratories). A la fin, les lamelles sont scellées avec du vernis à ongle et les lames conservées à 4 °C jusqu'à leur visualisation en microscopie.

Si l'on souhaite marquer l'actine, les cellules fixées sont perméabilisées dans une solution de triton 0.1% diluée dans du PBS, pendant 10 minutes à température ambiante.

Les différents anticorps utilisés sont listés dans le tableau 7 à la fin de la partie « matériels et méthodes ».

II.2.3 Analyse par cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de caractériser individuellement, quantitativement et qualitativement des cellules isolées, entraînées à grande vitesse par un système fluïdique devant un faisceau lumineux.

Les cellules doivent être mises en suspension avant d'être entraînées par un système de centrage hydrodynamique afin d'être excitées une par une avec un faisceau lumineux constitué le plus souvent par un rayon laser. Les signaux optiques émis par la cellule sont ensuite focalisés et sélectionnés par différents circuits optiques composés d'une alternance de miroirs et de filtres, puis acheminés et collectés par des systèmes de détection, les photomultiplicateurs. Les photomultiplicateurs transforment les signaux optiques recueillis en impulsions électriques qui vont être par la suite traitées par un système électronique dans le but de les rendre exploitables par l'opérateur.

L'intensité des différents signaux optiques collectés corrèle avec des propriétés des cellules analysées. La lumière diffusée renseigne sur la morphologie et la structure cellulaire. Quand elle est mesurée dans l'axe du rayon incident, elle reflète la taille des cellules (FSC : forward scatter). Sous un angle droit, la mesure (SSC : side scatter) correspond à la complexité de la structure intracellulaire de la cellule (réfringence du cytoplasme, morphologie, forme du noyau). La mesure concerne aussi la fluorescence émise par la cellule. Cette fluorescence peut être spontanée, mais elle est le plus souvent, apportée à la cellule par un fluorophore.

Le fluorophore absorbe l'énergie du laser et réémet l'énergie absorbée sous forme de photons à une longueur d'onde plus élevée.

Ce procédé d'analyse multiparamétrique s'effectue à une grande vitesse de l'ordre de plusieurs milliers d'évènements par seconde. Les données associées aux distributions de paramètres sont calculées par un ordinateur qui représente les résultats sous forme mono- (histogramme) ou bi-paramétrique (cytogramme).

Toutes les acquisitions sont effectuées sur le cytomètre MACSQuant VYB (Miltenyi Biotec) de la plateforme de l'imagerie cellulaire M4D de l'IBS. Ce cytomètre est équipé de 3 lasers et permet d'obtenir des mesures dans 8 canaux de fluorescence en plus des 2 canaux de diffusion FSC et SSC. La liste des fluorophores et leurs canaux de détection respectifs sont représentés dans le tableau 5.

Au cours de l'acquisition, une sélection est définie à l'aide du cytogramme FSC/SSC afin d'éliminer les débris cellulaires de l'analyse. La population ainsi définie sera ensuite analysée pour ses différents paramètres (fluorescence et morphologie).

Les données enregistrées sont traitées à l'aide du logiciel MacsQuant.

Laser (nm)	Filtre (nm)	Canal	Fluorophore ou paramètre
405	425-475	V1	VioBlue ; DAPI
	500-550	V2	Pacific Orange
488	500-550	B1	GFP, FITC ; AlexaFluor 488
	589-639	B2	PI ; YFP
561	579-593	Y1	PE
	605-625	Y2	Mcherry ; TexasRed
	655-730	Y3	APC
	>750	Y4	PE-Vio770

Tableau 5. Configuration optique du cytomètre MACSQuant.

II.2.4 Analyse par microscopie

Les cellules marquées sont observées soit au microscope optique à épi-fluorescence (Olympus et Perkin-Elmer), soit au microscope confocal (Olympus et Andor) de la plateforme M4D de l'IBS. Les images enregistrées sont traitées à l'aide du logiciel Volocity.

II.3 Analyses fonctionnelles

II.3.1 Analyse de l'apoptose

Après leur irradiation, les cellules Jurkat sont remises en culture pendant différentes périodes d'incubation. La caractérisation et la quantification de l'apoptose est effectuée à l'aide du double marquage AV/PI (Annexine V/Propidium Iodide) sur la base des instructions du kit « Annexin V-FITC Kit » (MACS Miltenyi Biotec). L'annexine V couplée au fluorophore FITC permet la détection directe de la phosphatidylsérine exposée à la surface des cellules apoptotiques. La molécule fluorescente PI est un agent intercalant de l'ADN qui ne peut traverser que les membranes cellulaires perméabilisées. Son utilisation permet ainsi de distinguer les cellules qui ont perdu leur intégrité membranaire. Les cellules doublement marquées sont analysées en cytométrie et les résultats sont présentés sous forme d'un dot-plot comme dans l'exemple de la figure 14. L'utilisation conjointe des 2 marqueurs Annexine V et PI permet de différencier 3 sous-populations principales au sein de la population cellulaire totale en fonction de leur état d'apoptose :

- Population AV- PI- : Cellules viables ;
- Population AV+ PI- : Cellules en apoptose précoce ;
- Population AV+ PI+ : Cellules en apoptose tardive ou nécrose secondaire

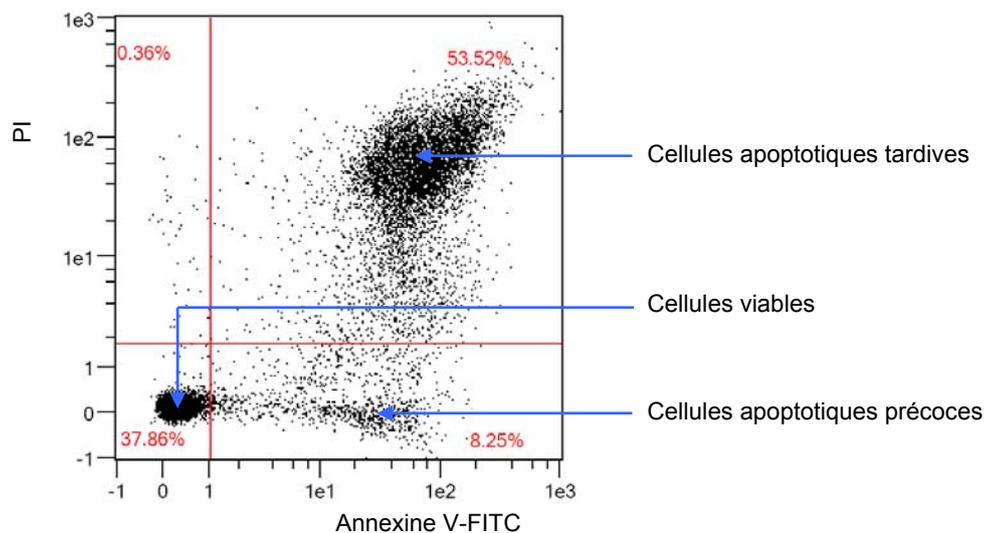


Figure 14. Analyse de l'apoptose des cellules Jurkat irradiées.

Dot-plot obtenu en cytométrie en flux après l'analyse des cellules Jurkat irradiées aux UV doublement marquées pour l'Annexine V et le PI. Trois sous-populations principales sont ainsi caractérisées, elles sont indiquées par des flèches bleues sur la figure.

II.3.2 Tests de phagocytose

II.3.2.1 Phagocytose des cellules apoptotiques

Les expériences de phagocytose sont divisées en 4 étapes principales :

1. la préparation des phagocytes ;
2. la préparation des cellules apoptotiques ;
3. la coculture d'efferocytose ;
4. la mesure du taux de phagocytose.

1. Préparation des phagocytes

Cette étape commence par le marquage des monocytes THP1 en rouge à l'aide du kit PKH26 ($\lambda_{\text{ex-max}} \sim 551 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em-max}} \sim 567 \text{ nm}$) (Sigma). A la fin du marquage, 50 000 cellules sont incubées pendant 48 heures dans des puits d'une plaque de culture de 24 puits contenant chacun 500 μl de milieu RPMI complet et 10 nM de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). Sous l'action du PMA, les monocytes THP1 arrêtent de proliférer, commencent à adhérer et se différencient en macrophages dotés d'une capacité importante de phagocytose (Auwerx, 1991 ; Qin, 2012).

2. Préparation des cellules apoptotiques

Avant de les rendre apoptotiques, les cellules Jurkat sont marquées en vert à l'aide du kit PKH67 ($\lambda_{\text{ex-max}} \sim 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em-max}} \sim 502 \text{ nm}$) (Sigma). Elles sont ensuite irradiées et remises en culture pour des durées différentes selon le stade apoptotique souhaité.

3. Coculture d'efferocytose

30 minutes avant de mélanger les cellules apoptotiques avec les phagocytes, elles sont incubées les unes ou les autres avec les protéines d'intérêt selon les concentrations suivantes : 100 $\mu\text{g/ml}$ de C1q purifié à partir du sérum humain ou 1 $\mu\text{g/ml}$ de CRT recombinante. Les cellules Jurkat sont ensuite ajoutées dans le milieu (complet) des macrophages THP1 (induits 48 h au PMA) en respectant un ratio de 5/1 ou 10/1 (Jurkat/THP1) et l'ensemble est incubé pendant 1 h à 37 °C pour permettre la phagocytose. Après 1 h, le surnageant est jeté, les macrophages sont lavés 2 fois avec du PBS, avant d'être récoltés par trypsination et analysés en cytométrie. Des contrôles sont effectués pour chaque condition en pré-traitant les phagocytes avec 20 μM de cytochalasine D (CytD), une toxine inhibitrice de l'activité phagocytaire (Elliott et Winn, 1986). Les mesures effectuées en CytD sont donc le reflet du phénomène de simple contact entre les cellules.

4. Mesure du taux de phagocytose

L'échantillon analysé en cytométrie contient des macrophages THP1, cibles de notre étude, et de nombreuses cellules Jurkat qui ont pu résister aux lavages. Les différences structurales et morphologiques existantes entre ces 2 types cellulaires permettent de les distinguer facilement en dot-plot de FSC/SSC comme cela est représenté dans la figure 15.A. Ainsi, les cellules THP1 différenciées qui sont plus volumineuses et de structure plus complexe correspondent au nuage de la partie supérieure tandis que les Jurkat sortent dans la partie inférieure. De cette manière, l'étude de fluorescence est réalisée exclusivement sur la population THP1 encerclée par une fenêtre rouge dans la figure 15.A.

Les cellules THP1 initialement fluorescentes dans le canal Y1 grâce à leur marquage au PKH26 vont acquérir la fluorescence verte (canal B1) des cellules Jurkat qu'elles auront phagocytées. De cette manière, le taux de phagocytose est calculé en prenant en compte le pourcentage des cellules THP1 doublement fluorescentes en Y1 et B1 par rapport à la totalité de la population THP1 fluorescente en Y1 (Y1 et Y1+B1). Le taux obtenu est finalement corrigé en supprimant le taux obtenu en présence de l'inhibiteur de phagocytose CytD. Le calcul du taux de phagocytose se fait alors selon la formule suivante :

Taux de phagocytose =

$$\left[\frac{\text{Nombre de THP1 doublement marqués}}{\text{Nombre total de THP1}} \times 100 \right] - \left[\frac{\text{Nombre de THP1 doublement marqués}}{\text{Nombre total de THP1}} \times 100 \right]_{\text{CytD}}$$

Ce taux est ensuite rapporté en index de phagocytose afin d'obtenir la variation par rapport à la condition contrôle :

$$\text{Index de phagocytose} = \frac{\text{Taux de phagocytose}}{\text{Taux de phagocytose contrôle}}$$

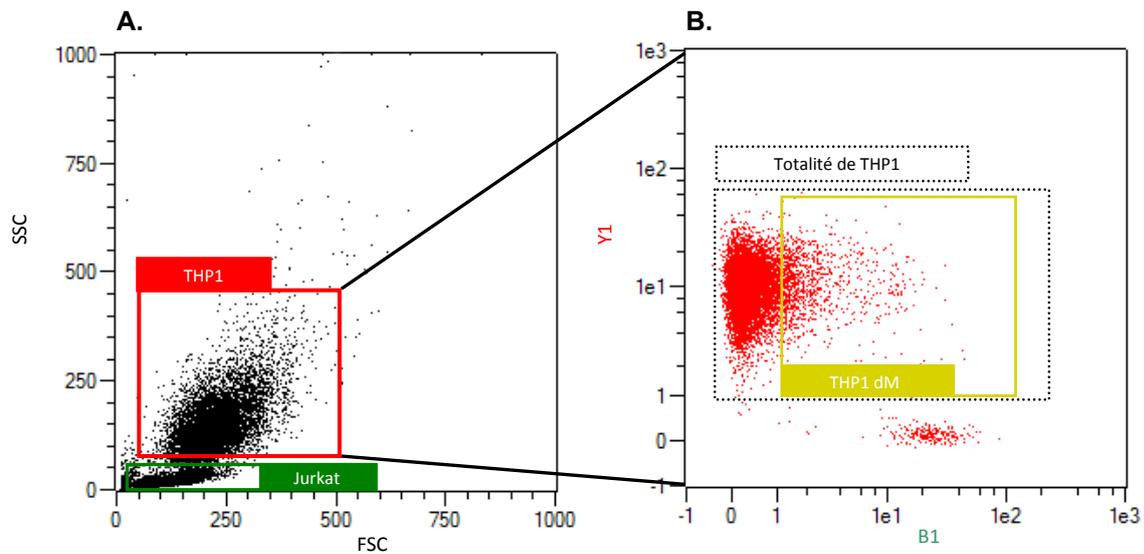


Figure 15. Analyse de la phagocytose des cellules Jurkat irradiées.

L'analyse du profil FSC/SSC des cellules en cytométrie en flux (A) permet de distinguer les 2 types cellulaires suivants : les cellules THP1 phagocytes présentes dans le cadran rouge, et les cellules Jurkat phagocytées dans le cadran vert. Les cellules THP1 sont ensuite analysées pour leur fluorescence en Y1 et B1 (B) afin d'évaluer le pourcentage des cellules doublement marquées (rectangle jaune) par rapport à la totalité des cellules THP1 (rectangle pointillé). Ainsi le taux de phagocytose peut être calculé. dM : doublement marqué.

II.3.2.2 Phagocytose des billes

Des expériences de phagocytose ont été également effectuées avec des billes de latex fluorescentes rouges de 2 μm de diamètre ($\lambda_{\text{ex}} \sim 575 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} \sim 610 \text{ nm}$) (Sigma L3030). Pour cela, 50 000 cellules THP1 différenciées (comme pour le cas de la phagocytose des cellules apoptotiques) non marquées sont incubées avec 10 μl de billes dans un volume final de 500 μl de RPMI complet pendant 1 heure à 37 °C. Les cellules sont ensuite lavées, récoltées par trypsination puis analysées en cytométrie.

Au cours de l'analyse en cytométrie, la différence de taille (FSC) entre les billes et les cellules permet de distinguer facilement les 2 populations (figure 16.A). Une fenêtre est ainsi dessinée pour définir spécifiquement les cellules THP1, qui seront par la suite analysées pour leur fluorescence rouge dans le canal Y1 (figure 16.B).

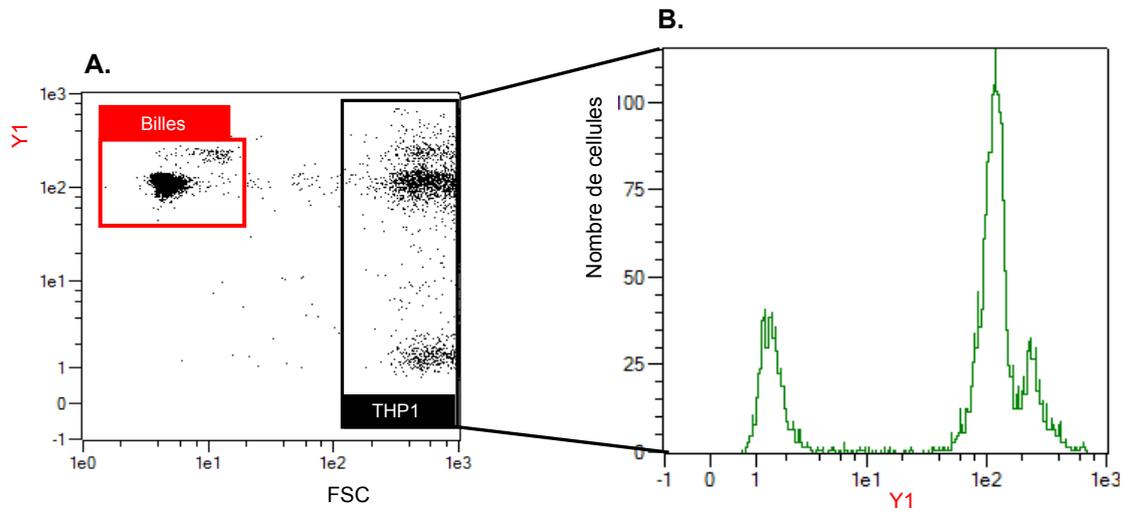


Figure 16. Analyse de la phagocytose des billes.

Les macrophages THP1 non marqués sont mélangés avec les billes fluorescentes et incubés pendant 1 h pour permettre la phagocytose. Ils sont ensuite analysés en cytométrie en flux afin d'évaluer le taux d'internalisation. Dans la partie A est montré un dot-plot où les billes (rectangle rouge) et les THP1 (rectangle noir) sont séparés en fonction de leur taille FSC et de leur fluorescence Y1. Dans la partie B est représenté l'histogramme correspondant à la fluorescence des cellules THP1 dans le canal Y1 où est détectée la fluorescence des billes.

II.3.3 Test de migration

La migration cellulaire est analysée à l'aide du test standard de blessure. Ce test simple consiste à créer « une rayure » à l'aide d'une pointe de pipette dans une monocouche cellulaire et à capturer ensuite des micrographes au début et à des intervalles réguliers au cours de la fermeture de la blessure afin de comparer ces images et quantifier le taux de migration des cellules. Ce test est effectué sur les cellules adhérentes J774 de souris. 10^6 cellules sont incubées dans des puits d'une plaque de culture de 12 puits, 24 heures avant l'ajout des protéines d'intérêt. Après 24 h, les cellules sont lavées, la blessure est créée et le milieu contenant ou pas la CRT est ajouté. Des images de la blessure sont ensuite capturées en microscopie à T0 (juste après la création de la blessure) et 40 heures après, T40 (40 heures d'incubation avec ou sans $1 \mu\text{g/ml}$ de CRT). Les aires de la blessure à T0 et T40 sont ensuite calculées à l'aide du logiciel Image J et le pourcentage de fermeture de la blessure est estimé selon la formule suivante :

$$\text{Aire normalisée de la blessure à T0} - \text{Aire normalisée de la blessure à T40}$$

II.3.4 Test de prolifération

Pour étudier la prolifération des cellules, le test MTT (Promega) est utilisé. 5000 cellules sontensemencées dans 100 µl de milieu de culture complet en présence ou pas de la protéine d'intérêt dans des puits d'une plaque de culture de 96 puits. Après 72 h, le test MTT est réalisé, en ajoutant dans le milieu des cellules un produit contenant du sel de tetrazolium. Ce sel est converti par les cellules vivantes en formazan facilement détectable à une absorbance de 570 nm avec un lecteur de plaques. L'absorbance est mesurée après 4 h environ, elle est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes dans le puits.

II.4 Analyses biochimiques

II.4.1 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

- Préparation des échantillons

Afin de dénaturer les protéines, les échantillons à analyser sont incubés avec un volume équivalent de Laemmli (Sigma) concentré 2X pendant 5 min à 95 °C. Un témoin de poids moléculaires prêt à l'emploi est utilisé comme référence (Prestained Protein Ladder Plus 06P-0211, Euromedex), il contient des protéines de masses moléculaires définies colorées en bleu ou en rouge permettant de suivre la migration.

- Préparation du gel d'électrophorèse

Les échantillons protéiques sont ensuite séparés en fonction de leur masse moléculaire à l'aide de la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium). Pour cela, la quantité voulue de protéines est déposée sur un gel de polyacrylamide constitué d'un gel de concentration [3% acrylamide (p/v) ; 125 mM Tris-HCl ; 0,1% SDS (p/v) ; 0,04% persulfate d'ammonium (p/v) ; 0,4% TEMED (v/v) ; pH 6,8] et d'un gel de séparation dont le pourcentage d'acrylamide est fonction de la masse molaire des protéines à séparer [10% acrylamide (p/v) ; 375 mM Tris-HCl ; 0,1% SDS (p/v) ; 0,025% persulfate d'ammonium (p/v) ; 0,2% TEMED (v/v) ; pH 8,8].

La migration s'effectue à l'aide d'un appareil d'électrophorèse C.B.S Scientific Co. (Dual Vertical Mini-Gel unit) dans un tampon de migration constitué de : 25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 0,1% SDS (p/v) sous une tension constante de 150 Volts.

Quand la migration est achevée, le gel est récupéré pour être ensuite utilisé pour le transfert des protéines sur membrane.

II.4.2 Techniques de transfert sur membrane

Deux types de transfert sont employés en fonction de la nature de l'analyse réalisée :

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

Transfert sur membrane de nitrocellulose

Les protéines contenues dans le gel de migration sont électrotransférées à l'aide d'un appareil de transfert BioRad (Mini Transfert Blot), à 100 Volts pendant 1 h à température ambiante ou à 12 Volts durant une nuit à 4 °C. Le transfert est réalisé sur une membrane de nitrocellulose 0,45 µm (Whatman) dans un tampon de transfert contenant 25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 20% éthanol (v/v).

A la fin du transfert, les bandes contenant les protéines transférées sont visualisées en colorant la membrane d'une façon réversible par une solution de rouge Ponceau 0.2% (Sigma). La membrane est ensuite rincée à l'eau distillée puis immergée dans une solution de saturation [PBS ; 0,1% Tween 20 (p/v) ; 5% lait écrémé en poudre (p/v)] durant 1 h à température ambiante ou durant une nuit à 4 °C. Après l'étape de saturation, la membrane est incubée à 4 °C sur la nuit en présence de l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation avant d'être lavée 3 fois (lavages de 10 min) avec une solution de lavage PBS-Tween [PBS ; 0,1% Tween 20 (p/v)]. La membrane est ensuite mise en présence de l'anticorps secondaire couplé à l'enzyme HRP (Horseradish Peroxydase) dilué dans la solution de saturation pendant 1 h à température ambiante.

Après trois lavages avec du PBS-Tween, la révélation s'effectue par chimioluminescence à l'aide du kit « Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent » de GE Healthcare et du système ChemiDoc MP de Bio-RAD.

Transfert sur membrane de PVDF

Dans le cas où les protéines sont destinées à l'analyse de la séquence N-terminale, le transfert se fait sur une membrane de PVDF (Problott), préalablement immergée dans du méthanol pur. Le transfert est réalisé comme cela est décrit dans le paragraphe précédent mais 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 par 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 le séquençage N-terminal (plateforme Séquençage NTER de l'IBS).

II.4.3 Préparation des protéines d'intérêt

II.4.3.1 Préparation des protéines cellulaires

Préparation des lysats cellulaires

Les cellules Jurkat correspondant à chaque condition sont lavées une fois au PBS puis centrifugées pendant 5 minutes à 320 g. Les culots cellulaires sont ensuite incubés en présence du tampon de lyse (Triton 1%, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM en PBS ; pH 7,4) contenant des inhibiteurs de protéases (Roche) pendant 1 h sur la glace. Les agrégats non solubles sont éliminés en centrifugeant les échantillons à 16000 g pendant 30 min à 4 °C et les surnageants sont finalement dosés à l'aide du kit « QuantiPro BCA Assay Kit » (Sigma) avant d'être aliquotés et conservés à -80 °C.

Préparation de protéines membranaires

Des protéines membranaires sont préparées à partir des cellules THP1 différenciées. Pour cela, 12 boîtes de Pétri (10 cm de diamètre) contenant chacune 10x10⁶ cellules THP1 dans 10 ml de milieu de culture RPMI complet et 10 nM de PMA sont incubées pendant 48 h à 37 °C. Après 48 h, les cellules devenues adhérentes sont lavées au PBS puis récoltées par grattage dans un tampon hypotonique composé de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases (Roche). Les cellules de toutes les boîtes sont réunies et incubées 20 min sur la glace dans le tampon hypotonique. L'étape suivante consiste à éclater mécaniquement les cellules en les broyant avec un système de mortier et de pilon de type Potter. Les homogénats obtenus sont centrifugés pendant 10 min à 4 °C à 3000 g, ce qui permet de séparer les cellules non cassées et les noyaux sédimentés dans le culot, des membranes et des organites cellulaires qui seront contenus dans le surnageant. Le surnageant est ensuite ultra-centrifugé à 220 000 g pendant 30 min à 4 °C pour culotter les membranes cellulaires qui sont par la suite solubilisées pendant 30 min sur la glace dans le tampon PBS, Triton X-100 1%, contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases. La fraction contenant les protéines membranaires est finalement obtenue par ultracentrifugation à 220 000 g pendant 30 min à 4 °C. Les protéines membranaires sont ensuite dosées, aliquotées et congelées à -80 °C jusqu'à utilisation.

Précipitation de protéines des surnageants cellulaires

Deux millions de cellules Jurkat sont mises en suspension dans 1 ml de RPMI non complet (sans SVF) dans un puits d'une plaque de 12 puits puis irradiées sous UVB pendant 9 minutes avant d'être incubées à 37 °C. Les milieux de culture sont récupérés à 30 minutes ou 120 minutes après l'irradiation, centrifugés pendant 5 minutes à 320 g pour culotter les cellules. Les surnageants sont ensuite traités avec un volume équivalent d'acide trichloroacétique (TCA) 50% (v/v) et laissés une nuit à 4 °C pour précipiter les protéines. Après centrifugation à 16000 g pendant 30 min à 4° C, les protéines contenues dans le culot sont lavées à l'acétone et reprises par du Laemmli 2X afin d'être finalement analysées par Western Blot.

II.4.3.2 Purification du C1q plasmatique et de ses têtes globulaires

La protéine C1q que j'ai utilisée au cours de mon travail est purifiée dans le laboratoire à partir du sérum humain selon la méthode établie par Arlaud *et al.* (Arlaud *et al.*, 1979). Les têtes globulaires sont préparées à partir de ce C1q purifié selon l'article de la référence (Tacet-Delorme *et al.*, 2001).

II.4.3.3 Purification de la calréticuline recombinante

La calréticuline recombinante humaine entière utilisée pour les différentes expériences présentées dans ce manuscrit était déjà disponible dans le laboratoire (figure 17). Elle a été produite par transformation des cellules Rosetta 2 (DE3) par le plasmide approprié. La protéine produite contenant un HAT tag du côté N-terminal, est purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de Nickel-Sepharose. Elle est ensuite éluée par un gradient d'imidazole avant d'être purifiée davantage par filtration sur gel (Chouquet *et al.*, 2011).



Figure 17. Représentation schématique des différents domaines de la calréticuline humaine recombinante entière (Païdassi *et al.*, 2011).

II.4.3.4 Détermination de la concentration des protéines purifiées

La concentration des protéines purifiées est obtenue à 280 nm en se basant sur la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon LC$ où A est l'absorbance mesurée à 280 nm ; ϵ est le coefficient d'extinction molaire en $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; C est la concentration en mol.l^{-1} et L est la longueur du trajet optique, par convention $L = 1 \text{ cm}$.

Les coefficients d'extinction molaire ϵ sont calculés à l'aide de l'outil ProtParam d'Expasy (<http://web.expasy.org/protparam/>). Les coefficients d'extinction spécifiques E (0,1%) déterminés en utilisant la formule suivante : $E (0,1\%) = \epsilon 280\text{nm}/M$ où M est la masse molaire de la protéine, permettent de calculer directement la concentration de la protéine.

Les coefficients d'extinction molaire et les masses molaires expérimentales des protéines sont rassemblés dans le tableau 6.

Protéine	ϵ 280nm ($\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	Masse molaire (Da)	E 0.1%
CRT recombinante	81 735	49 431 ¹	1.65
C1q	312 324	459 300 ²	0.68
gC1q	33 600	48 000 ³	0.70

Tableau 6. Coefficients d'extinction molaire et masses molaires des protéines purifiées.

1 : Païdassi *et al.*, 2011 ; 2 : Arlaud *et al.*, 1979 ; 3 : Reid and Edmondson, 1984.

II.5 Analyse des interactions protéiques

II.5.1 Mesure de FRET

La technique de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) permet de mettre en évidence l'interaction entre deux molécules fluorescentes directement au niveau de la cellule. Son principe repose sur un transfert non radiatif d'énergie entre un fluorophore donneur d'énergie et un autre accepteur. Plusieurs conditions sont nécessaires pour que le transfert d'énergie puisse avoir lieu :

1. La proximité entre le donneur et l'accepteur : la distance doit être inférieure à 10 nm ;
2. L'orientation spatiale des molécules doit être appropriée ;
3. Le recouvrement spectral : le spectre d'émission du donneur doit recouvrir au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur.

Couple donneur/accepteur

Pour étudier l'interaction entre la calréticuline endogène et C1q ou ses têtes globulaires à la surface des cellules Jurkat, ces 2 protéines sont immunomarquées à l'aide des anticorps primaires reconnus par des anticorps secondaires couplés aux fluorophores Alexa 488 et cyanine 3 respectivement. Ce couple de fluorophores constitue un bon outil pour l'étude de l'interaction protéique comme le spectre d'émission du donneur qui est l'A488 chevauche bien avec le spectre d'absorption du récepteur Cyan 3 (figure 18).

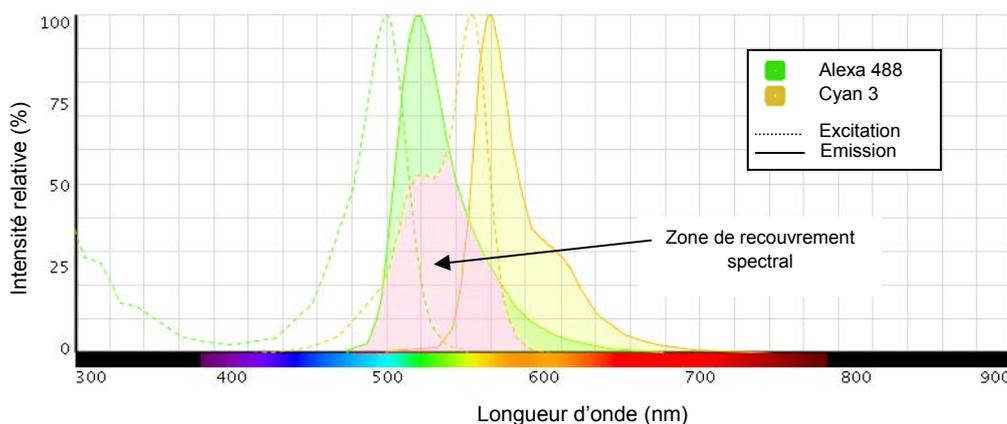


Figure 18. Spectres de fluorescence du couple donneur/accepteur utilisé pour le FRET.

Les spectres d'excitation et d'émission du donneur Alexa 488 et de l'accepteur Cyan 3 ainsi que la zone de recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'excitation de l'accepteur nécessaires pour le FRET sont représentés (Fluorescence Spectra Viewer - Lifetechnologies).

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer le transfert d'énergie et caractériser l'interaction protéique. Dans notre étude, nous avons utilisé la méthode de FRET par photoblanchiment de l'accepteur en microscopie confocale. Cette méthode nous a permis auparavant de mettre en évidence l'interaction entre CRT et gC1q à la surface des cellules HeLa apoptotiques (Verneret *et al.*, 2014). Elle consiste à éteindre la fluorescence de l'accepteur par une exposition prolongée à une source lumineuse et à mesurer les intensités de fluorescence de l'accepteur et du donneur avant et pendant le photoblanchiment. Si ces 2 molécules sont suffisamment proches ($d < 10$ nm), le transfert d'énergie qui avait lieu entre elles avant le photoblanchiment s'arrête après la destruction de fluorescence de l'accepteur et l'intensité du donneur devrait donc augmenter. Une seule mesure peut être effectuée sur une zone de co-localisation en raison de la destruction des fluorophores par l'excitation continue.

Obtention d'un signal de FRET

Les cellules Jurkat doublement immunomarquées (CRT endogène - C1q ou gC1q) sont analysées en microscopie confocale. Les mesures de FRET sont effectuées sur des zones où la CRT et C1q/gC1q sont co-localisés (coefficient de Pearson entre 0.7 et 1). Le coefficient de Pearson est un outil très utilisé en microscopie pour quantifier la co-localisation (Barlow *et al.*, 2010). Sa valeur peut varier de 1 à -1. Une valeur de 1 correspond à une corrélation parfaite entre les deux paramètres étudiés, une valeur de 0 signifie une absence de corrélation, les variables sont alors dites indépendantes, et enfin une valeur de -1 signifie une corrélation inverse parfaite c.à.d. une exclusion des deux signaux.

Le signal de FRET a été obtenu par photoblanchiment graduel de l'accepteur à une longueur d'onde de 560 nm à 10-20% d'intensité du laser répété au minimum une dizaine de fois après chaque acquisition.

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

II.5.2 Analyse par overlay

Nous avons utilisé cette technique afin d'identifier la/les protéine(s) membranaires avec lesquelles la calréticuline peut interagir. Dans ce but, une CRT biotinyllée est préparée à l'aide du kit « EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin » (Thermo Scientific) à partir de la CRT recombinante.

Les protéines membranaires préparées réduites sont déposées puis séparées sur un gel de polyacrylamide 10% SDS. Elles sont ensuite électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est ensuite rincée avec la solution de rinçage (PBS-tween 0.1% (p/v)) puis saturée dans le tampon de saturation (PBS ; 0,1% Tween 20 (p/v) ; 3% BSA) pendant une heure à température ambiante. Après un rinçage rapide, la biotine endogène est bloquée par incubation de la membrane en présence de la streptavidine (Streptavidin/Biotin Blocking Kit ; Vector laboratories) diluée dans le tampon de rinçage pendant 10 min à température ambiante. La membrane est ensuite rincée 2 fois avant d'être incubée avec de la biotine (Streptavidin/Biotin Blocking Kit - Vector laboratories) pendant 10 min à température ambiante. Après 2 lavages, elle est incubée avec la CRT recombinante biotinyllée diluée dans la solution de rinçage pendant 2 h à température ambiante. Cette étape est suivie de 3 rinçages de 10 minutes et de l'incubation de la membrane en présence de la streptavidine-HRP (Thermo Scientific Pierce High Sensitivity Streptavidin-HRP) diluée au 1/10000 dans du PBS-tween 0.1% pendant 1 h à température ambiante. La membrane est lavée 3 fois et les sites de liaison de la CRT sont ensuite détectés par révélation à l'aide

du kit « Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent » de GE Healthcare et du système ChemiDoc MP de Bio-RAD.

II.6 Analyse statistique

Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du test Student *t* apparié après avoir vérifié la distribution normale des données par l'outil Box Plot ou le test de Shapiro-Wilk. Chaque expérience analysée est répétée au moins 3 fois. La différence est considérée comme significative si la valeur de *p* est inférieure à 5%. Trois niveaux de significativité sont représentés : * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Anticorps	Type	Référence	Fournisseur	WB	IF
Primaires	IgY polyclonaux de poulet anti-CRT Nter Humaine	PA1-902A	Thermo Scientific		1/250
	Contrôle isotypique IgY polyclonaux de poulet	003-000-003	Jackson Immunoresearch		1/250
	IgG monoclonaux de souris anti-CRT humaine	SPA-601	StressGen	1/1000	
	IgG monoclonaux de souris anti-CD91 humain	MA1-35976	Thermo Scientific		1/250
	IgG polyclonaux de chèvre anti-SREC-I humain	AF2409	R&D Systems		1.25 µg/ml
Primaires couplés au fluorophore PE (Phycoérythrine)	IgG1k monoclonaux de souris anti-CD11c clone 3.9	12-0166	eBiosceinces		5 µl
	Contrôle isotypique IgG1k de souris clone 3.6.2.8.1	12-4714	eBiosceinces		5 µl
	IgG2a monoclonaux de souris anti-CD14 clone RMO52	A07764	Beckman Coulter		20 µl
	Contrôle isotypique IgG2a de souris clone 7T4-1F5	A09142	Beckman Coulter		20 µl
	IgG2b monoclonaux de souris anti-CD11b clone M1/70.15.11.5	130-081-201	MACS		10 µl
	Contrôle isotypique IgG2b de souris clone IS6-11E5.11	130-098-875	MACS		10 µl
Secondaires couplés à HRP	Ac de chèvre anti-IgG de lapin	3053-1	Epitomics	1/12500	
	Ac de lapin anti-IgG de souris	A-9044	Sigma	1/10000	
	Ac d'âne anti-IgG de chèvre	6420-05	Southern Biotech	1/8000	
Secondaires couplés à un fluorophore	Polyclonaux de chèvre anti-Lapin couplés Cyan 3	111-165-144	Jackson Immunoresearch		1/250
	Polyclonaux d'âne anti-poulet couplés Dylight 488	703-486-155	Jackson Immunoresearch		1/200
	Polyclonaux de chèvre anti-souris couplés Cyan 3	115-165-166	Jackson Immunoresearch		1/250
	Polyclonaux d'âne anti-poulet couplés Cyan 3	703-165-155	Jackson Immunoresearch		1/200
	Polyclonaux de lapin anti-chèvre couplés Cyan 3	C2821	Sigma		1/300

Tableau 7. Liste des anticorps utilisés.

WB : Western Blot ; IF : ImmunoFluorescence. Dans le cas des volumes, le volume final du test est de 100 µl.

III. RESULTATS

III.1 Temps précoce d'apoptose

L'élimination des cellules apoptotiques à un stade précoce d'apoptose est essentielle. Elle permet, en effet, d'éviter l'entrée des cellules dans une phase de nécrose secondaire et protège ainsi contre l'inflammation. Des données récentes de la littérature ont mis en évidence le rôle « eat-me » de la calréticuline exposée à la surface des cellules apoptotiques (Gardai *et al.*, 2005), une exposition pré-apoptotique dans le cas de la mort immunogène des cellules cancéreuses (Obeid *et al.*, 2007a). Partant de ces remarques, et encouragés par les résultats de notre laboratoire sur l'interaction directe de la CRT et de C1q à la surface des cellules HeLa apoptotiques précoces (Verneret *et al.*, 2014), nous avons étudié l'expression de la CRT à la surface cellulaire à des temps très précoces d'apoptose.

Ainsi, dans cette première partie des résultats, nous avons suivi à des temps très précoces d'apoptose la variation de l'exposition de CRT, la fixation de C1q à la surface cellulaire et l'influence de C1q sur la phagocytose. Nous avons également cherché à démontrer une interaction précoce entre ces 2 molécules après la stimulation de l'apoptose.

III.1.1 Modèle cellulaire et inducteur d'apoptose

Parce que la surface cellulaire est la partie concernée par notre étude, nous avons choisi de travailler avec les cellules Jurkat qui poussent en suspension. L'utilisation d'un tel modèle permet d'éviter l'étape de détachement obligatoire pour les cellules adhérentes qui peut modifier, voire détériorer, l'intégralité de la face externe de la membrane plasmique.

Pour induire l'apoptose, les cellules Jurkat sont traitées aux radiations ultraviolettes B (UVB). Dans ces conditions, les cellules sont opsonisées spécifiquement par C1q *via* ses têtes globulaires, et l'interaction CRT/C1q a été démontrée (Korb et Ahearn, 1997 ; Navratil *et al.*, 2001 ; Païdassi *et al.*, 2011 ; Verneret *et al.*, 2014).

III.1.2 Comparaison de l'exposition membranaire de la CRT et de la PS

La translocation de l'aminophospholipide phosphatidylsérine (PS) du feuillet interne de la bicouche membranaire à son feuillet externe est l'altération la plus universellement remarquée à la surface des cellules apoptotiques (Fadok *et al.*, 1992 ; 2000). En effet, l'exposition de la PS est une caractéristique emblématique permettant de définir une cellule comme apoptotique (Fadok *et al.*, 1998 ; Ravichandran, 2010). Le test commun permettant de distinguer les cellules apoptotiques des non apoptotiques est d'ailleurs basé sur la capacité de l'Annexine V (AV), une protéine de liaison des phospholipides, à lier avec une haute affinité la PS en présence des concentrations physiologiques de Ca^{2+} (Gardai *et al.*, 2006).

Après leur irradiation aux UVB, les cellules Jurkat sont remises en culture pendant de courtes périodes de 30 minutes (IR 30') ou 120 minutes (IR 120'). Le stade d'apoptose est ensuite évalué par marquage à l'AV et au PI (Propidium Iodide) comme cela est décrit en matériels et méthodes.

Les cellules IR 30' et IR 120' ainsi que les cellules N IR (non irradiées) sont parallèlement immunomarquées afin d'analyser l'expression de la CRT à leur surface.

L'analyse du stade apoptotique des différentes conditions présentée dans les figures 19.A et 19.B, montre que l'apoptose n'est détectée par le test AV/PI que 2 h après l'irradiation. Si l'on définit phénotypiquement l'apoptose par l'apparition de la PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique, on peut considérer alors que les cellules IR 30' se trouvent dans un état pré-apoptotique étant donnée l'absence du marquage AV de leur surface. En effet, Leur profil AV PI est presque identique à celui des cellules N IR. En revanche, environ 60% des cellules entrent dans une phase précoce d'apoptose pour un temps d'incubation plus long après l'irradiation (IR 120'). Cette phase d'apoptose est définie par la translocation de la PS (AV+) et la conservation de l'intégrité membranaire (PI-). Il est important de mentionner ici que le pourcentage de cellules doublement positives (AV+ PI+) est quasiment identique pour les 3 conditions comme on peut le constater sur la figure 19.A. Ces résultats suggèrent que cette population correspond aux cellules mortes initialement présentes dans le lot cellulaire utilisé.

L'étude de l'expression de la CRT à la surface des cellules Jurkat représentée dans la figure 19.C montre qu'environ 34% des cellules N IR expriment la CRT à leur surface. Seulement 30 minutes après l'induction de l'apoptose, le pourcentage de la population CRT+ double (74%) puis diminue après 120 minutes (54%). L'intensité du signal reflétée par la moyenne

de fluorescence est quasiment la même entre les cellules N IR et les IR 30' tandis qu'elle diminue légèrement pour les cellules IR 120'.

En se basant sur l'ensemble de ces résultats, on peut conclure que la CRT augmente très rapidement à la surface des cellules après l'irradiation, à un stade qu'on peut qualifier de pré-apoptotique en raison de l'absence de l'externalisation de la PS. Les micrographes obtenus par microscopie à épi-fluorescence pour les cellules IR 30' (figure 19.D) doublement marquées pour la PS et la CRT confirment ces résultats.

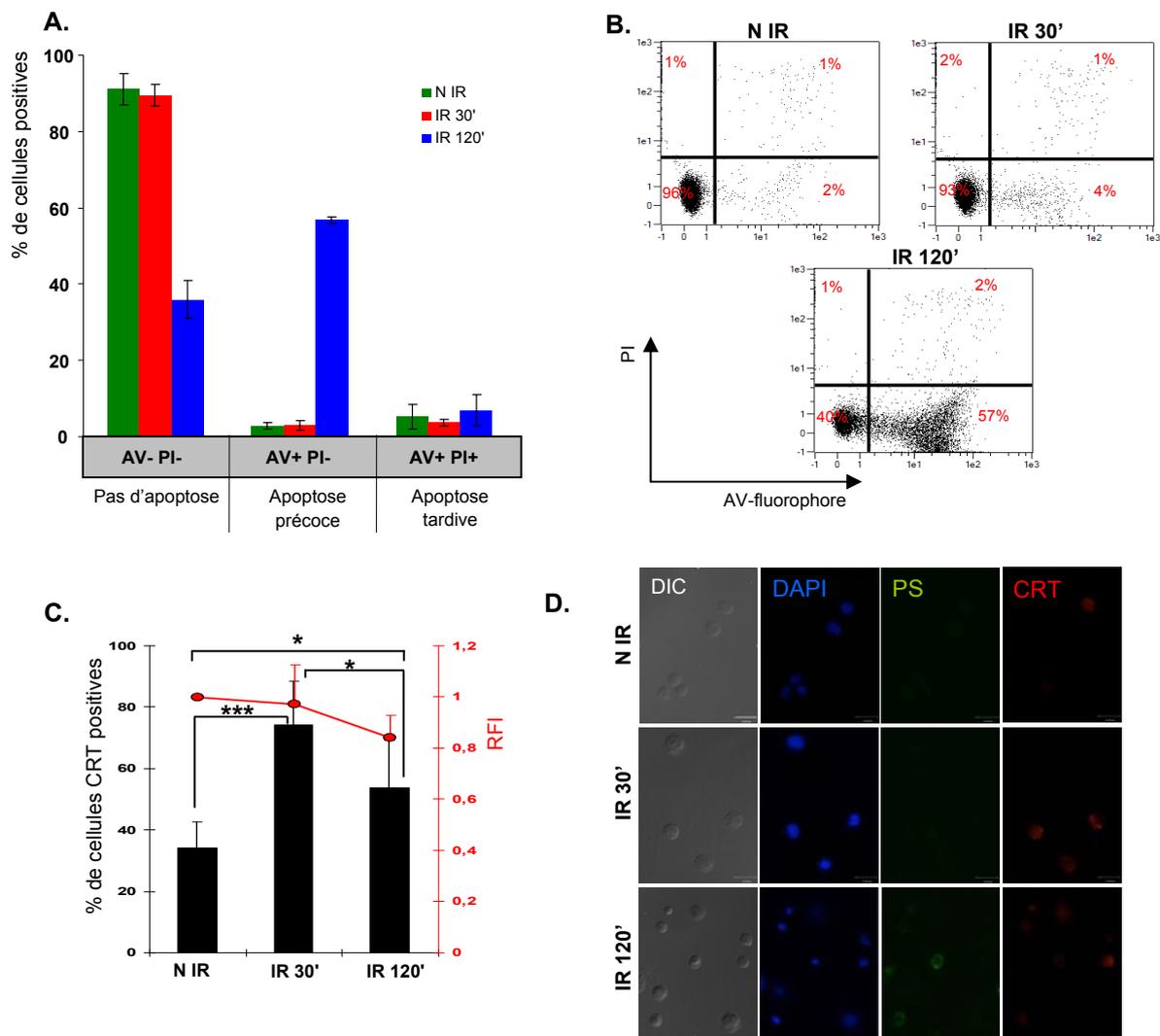


Figure 19. Analyse comparative de l'exposition de la PS et de la CRT à la surface des cellules à des temps très précoces d'apoptose.

A. Analyse par cytométrie de l'apoptose des cellules Jurkat N IR, IR 30' et IR 120' à l'aide du double marquage AV-FITC/PI. Des dot-plot AV/PI représentatifs sont montrés en B. La partie C montre le pourcentage des cellules positives pour la CRT de surface et les moyennes de fluorescence relative (RFI), analysés par cytométrie après l'immunomarquage des cellules pour la CRT (N = 4 ; valeurs \pm SD ; Test Student t : * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$). La partie D représente des micrographes de microscopie à épi-fluorescence pour les cellules N IR, IR 30' et IR 120' doublement marquées pour la PS (en vert : AV-FITC) et la CRT (en rouge : anticorps secondaire couplé à la Cyan 3). Des contrôles isotopiques IgY de poulet non montrés sont effectués (barre d'échelle = 16 μ m).

III.1.3 Fixation de C1q

Les études bibliographiques relatives à « l'âge » apoptotique des cellules reconnues par C1q concernent principalement des stades précoces et tardifs où l'on peut détecter la PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Ainsi, les travaux de Liang *et al.* et de Nauta *et al.* ont démontré que C1q se fixe essentiellement sur la surface des cellules apoptotiques tardives AV+ PI+ (Liang *et al.*, 2014 ; Nauta *et al.*, 2002). Des résultats de notre laboratoire ont mis en évidence que la fixation de C1q concerne aussi la surface des cellules apoptotiques précoces AV+ PI- *via* ses têtes globulaires (Païdassi *et al.*, 2011 ; Verneret *et al.*, 2014). Ces données ne permettent donc pas d'établir une conclusion claire et ne concernent en aucun cas la fixation de C1q à un stade d'apoptose précédant l'exposition de la PS.

Compte tenu de l'expression membranaire rapide de la calréticuline après l'induction de l'apoptose, il était intéressant de vérifier la capacité de son partenaire C1q à opsoniser la surface cellulaire au stade pré-apoptotique de 30 minutes où la PS n'est pas encore exposée. Pour cela, les cellules N IR, IR 30' et IR 120' sont incubées en présence des têtes globulaires de C1q (gC1q) couplées à la cyanine 3. La fixation des gC1q à la surface cellulaire est ensuite évaluée par cytométrie en flux et les résultats obtenus sont montrés dans la figure 20.

Comme nous pouvons le remarquer sur la figure, la fixation de gC1q est observée sur des cellules Jurkat N IR tandis que le reste de la population cellulaire reste négatif. Rapidement après l'irradiation (IR 30'), le pourcentage des cellules positives augmente, une augmentation accompagnée d'une diminution parallèle de la population négative. Pour le cas des cellules IR 120', la fixation des gC1q diminue jusqu'à atteindre un niveau presque égal à celui observé pour les N IR.

L'analyse de ces données permet de constater que le profil de fixation de C1q au stade très précoce de 30 minutes suit la même tendance que celui de l'exposition de la CRT, un argument fort pour aller rechercher une co-localisation entre les 2 molécules à la surface cellulaire et une éventuelle interaction.

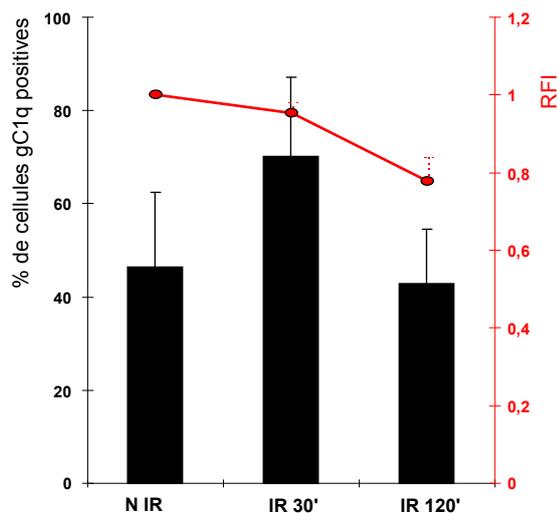


Figure 20. Analyse de la fixation des gC1q à la surface des cellules non irradiées et apoptotiques précoces.

Les cellules N IR, IR 30', IR 120' incubées avec 10 µg de gC1q couplées à la cyanine 3 sont analysées pour leur fluorescence en cytométrie en flux. Les pourcentages des cellules gC1q positives ainsi que les valeurs de la moyenne de fluorescence relative RFI (en rouge) sont montrés (N = 3 ; valeurs ±SD).

III.1.4 Co-localisation entre CRT et C1q

Les expériences précédentes montrent que la calréticuline augmente à un temps pré-apoptotique à la surface cellulaire et que C1q, *via* ses régions globulaires, se fixe aux cellules au même stade. C1q étant susceptible d'interagir avec de nombreux motifs membranaires, j'ai cherché à détecter par microscopie confocale la co-localisation spécifique de C1q avec la CRT exposée à la surface des cellules IR 30'. Dans ce but, des cellules Jurkat IR 30' ont été doublement immunomarquées pour la CRT de surface et pour C1q. Les micrographes présentés dans la figure 21 montrent clairement la présence des zones où les 2 protéines sont co-localisées à la surface cellulaire. Toutefois, certains points de co-localisation sont aussi détectés sur les cellules N IR et les cellules IR 120' (montrés et étudiés dans le paragraphe suivant).

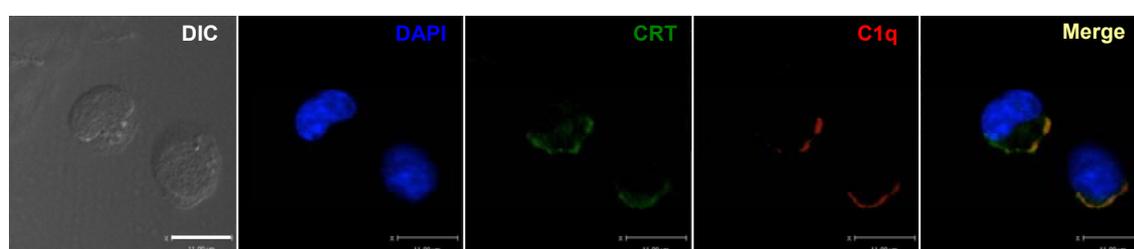


Figure 21. Double marquage CRT/C1q de la surface des cellules IR 30'.

Trente minutes après leur irradiation, les cellules Jurkat sont lavées, fixées au PFA 4%, puis incubées avec 100 µg/ml de C1q pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite immunomarquées pour la CRT de surface et C1q par des anticorps primaires spécifiques puis des anticorps secondaires couplés à l'A488 et la Cyan 3 respectivement. Les cellules sont finalement visualisées en microscopie confocale (barre d'échelle = 11 µM).

III.1.5 Etude par FRET de l'interaction entre CRT et C1q

III.1.5.1 Mise au point du protocole

La technique de FRET permet de mesurer le transfert d'énergie qui peut avoir lieu entre deux molécules fluorescentes suffisamment proches (cf. paragraphe II.5.1). Notre groupe a réussi, en utilisant cette technique, à démontrer une interaction directe entre la CRT et les têtes globulaires de C1q à la surface des cellules HeLa apoptotiques précoces 6 h après l'irradiation (Verneret *et al.*, 2014). A ce stade d'apoptose, les cellules sont majoritairement AV+ PI- c.à.d. la PS est exposée sur le côté externe de leur membrane plasmique qui est encore intègre (non perméabilisée). J'ai voulu vérifier l'existence d'une telle interaction sur les cellules Jurkat utilisées dans cette étude.

Bien que le FRET CRT/C1q ait été mis au point précédemment, le changement du modèle cellulaire a nécessité de nouvelles optimisations. L'application du protocole précédent établi sur des cellules adhérentes (HeLa) pour des cellules en suspension (Jurkat) n'a pas permis d'obtenir un signal de FRET. C'est seulement en provoquant l'adhérence des cellules Jurkat que j'ai réussi à détecter l'interaction entre CRT et C1q. Pour arriver à ce but, je me suis basée sur une observation fortuite que j'ai faite au cours de mon expérience avec la culture des cellules Jurkat. En effet, j'ai remarqué que quand ces cellules sont incubées dans un milieu non complet (sans sérum de veau fœtal), elles adhèrent sur leur boîte de culture. Le fait de détecter du FRET uniquement dans le cas où les cellules sont en état d'adhérence évoque qu'il y a un paramètre en relation avec l'adhérence qui pourrait favoriser l'interaction entre les molécules étudiées. J'ai appliqué cette méthode pour faire adhérer les cellules sur la lame de microscopie avant d'effectuer l'immunomarquage.

La surface des cellules Jurkat IR 30' est ensuite doublement immunomarkuée à l'aide des anticorps primaires spécifiques pour la CRT endogène exposée et pour le C1q total ou ses gC1q fixé(es). L'anticorps secondaire ciblant l'anticorps primaire anti-CRT est couplé au fluorophore Alexa 488, alors que l'anticorps secondaire ciblant l'anti-C1q est couplé à la cyanine 3 (figure 22). L'interaction entre les molécules étudiées est vérifiée en microscopie confocale par la méthode de FRET par photoblanchiment de l'accepteur. Cette méthode détaillée dans la partie « matériels et méthodes » consiste à « détruire » la fluorescence de l'accepteur qui est la Cyan 3 dans notre cas à l'aide d'un laser à forte puissance. Si les 2 fluorophores sont suffisamment proches ($d < 10$ nm), la fluorescence du donneur doit augmenter puisque son énergie ne peut plus exciter l'accepteur qui a été photoblanchi. Il est important de noter ici que l'utilisation des anticorps primaire et secondaire peut augmenter la distance entre les molécules d'intérêt ce qui va probablement affecter l'efficacité du FRET.

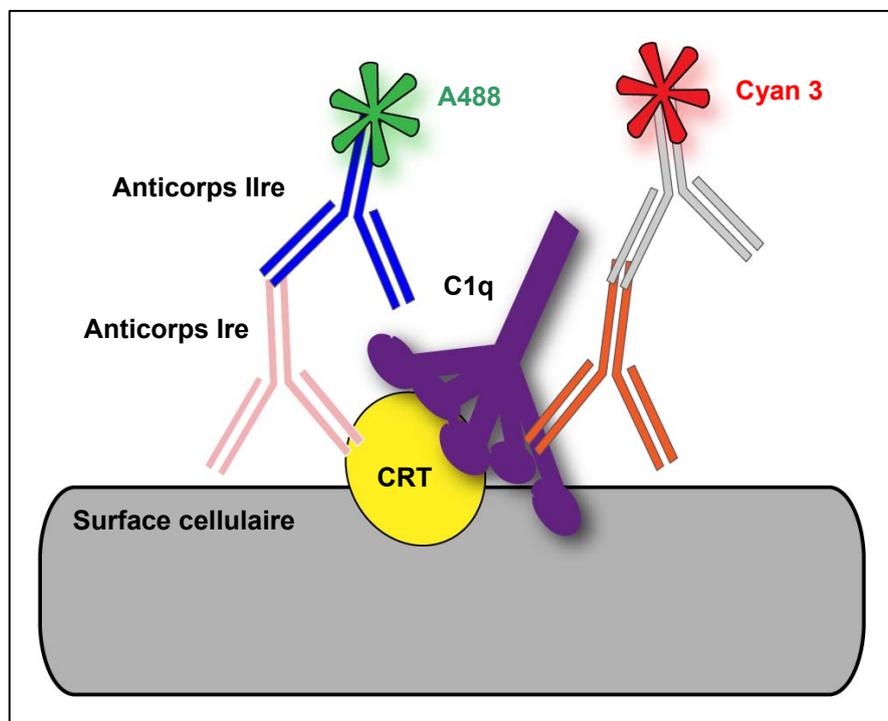


Figure 22. Schéma représentant la stratégie d'immunomarquage utilisée pour tester le FRET entre la CRT et C1q.

Pour détecter l'interaction entre la CRT et le C1q ou ses têtes globulaires à la surface des cellules Jurkat, ces cellules sont rendues apoptotiques par irradiation puis incubées pendant 30 ou 120 minutes à 37 °C. Les cellules sont ensuite lavées, fixées et incubées avec C1q (ou gC1q) pour être ensuite immunomarquées pour le C1q et la CRT de surface à l'aide des anticorps primaires spécifiques et des anticorps secondaires couplés à l'Alexa 488 pour la CRT et à la cyanine 3 pour le C1q (ou gC1q).

III.1.5.2 Détection de l'interaction CRT/C1q

L'interaction de la CRT précocement exposée à la surface des cellules IR 30' est étudiée avec les têtes globulaires isolées de C1q puis vérifiée avec la molécule complète de C1q. Les résultats de la variation de l'intensité de fluorescence correspondant à la CRT au cours du photoblanchiment des gC1q (ou C1q total) sont représentés dans la figure 23.

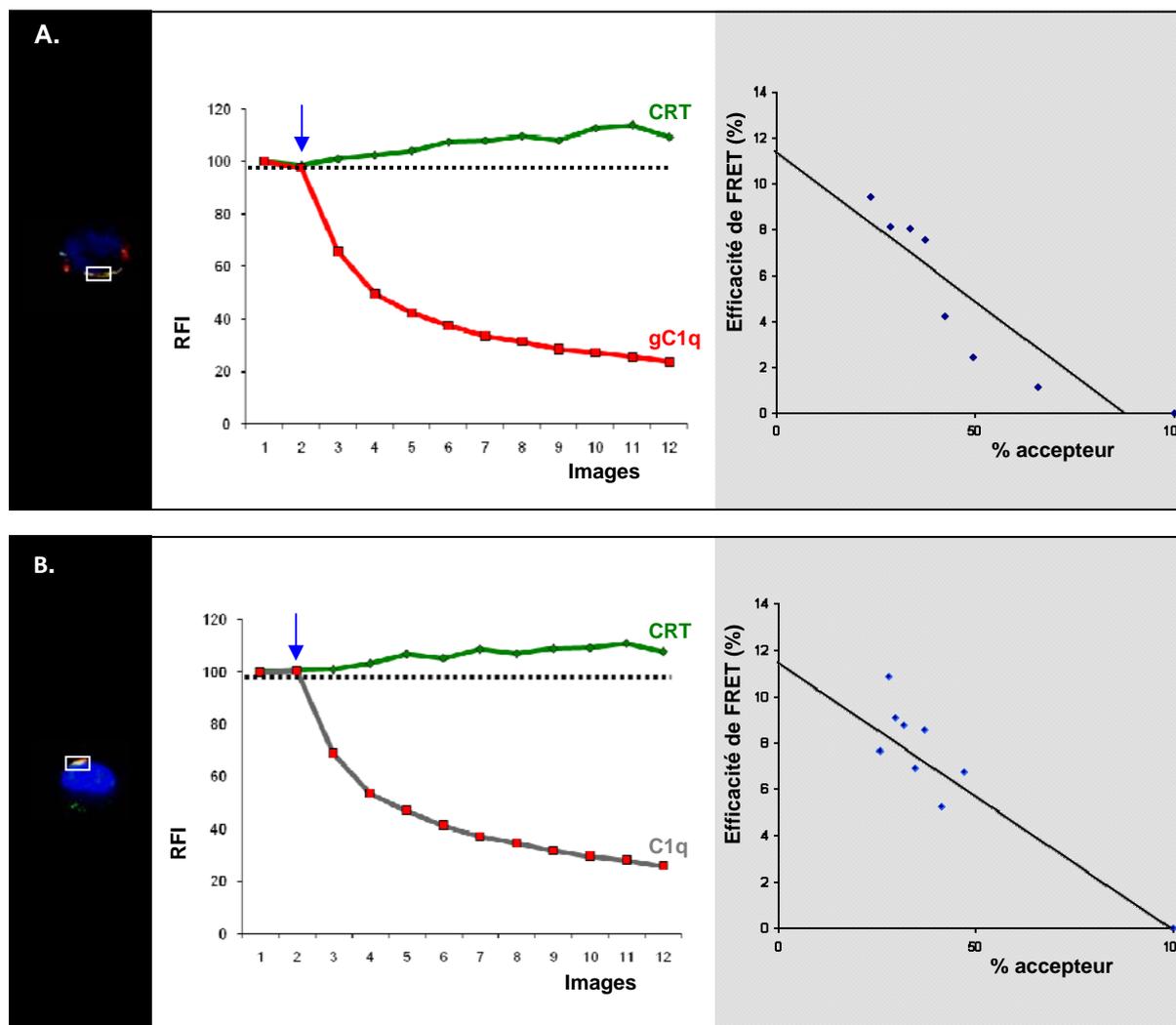


Figure 23. Analyse de l'interaction de la CRT et des têtes globulaires de C1q (ou C1q) à la surface des cellules IR 30' pré-apoptiques.

Après la définition d'une zone de co-localisation (encadrée par un rectangle) CRT/gC1q (A) ou CRT/C1q (B) à la surface des cellules IR 30', l'accepteur (Cyan 3) est graduellement photoblanchi et les intensités de fluorescence (RFI) du donneur et de l'accepteur sont parallèlement mesurées. Les courbes du milieu représentent la variation de l'intensité normalisée de fluorescence (RFI) de l'A488 (en vert) et de la Cyan 3 (en rouge pour les gC1q et en gris pour C1q) après le déclenchement du photoblanchiment (flèche bleue). A droite est représentée l'efficacité du FRET qui correspond au pourcentage d'augmentation de l'intensité du donneur exprimée en fonction du pourcentage de l'intensité normalisée de fluorescence de l'accepteur.

Comme le montre cette figure, la dégradation de la fluorescence de l'accepteur (gC1q) provoquée par son photoblanchiment, est accompagnée d'une augmentation parallèle de l'intensité de fluorescence enregistrée pour le donneur (CRT). Ces données reflètent le transfert d'énergie ayant lieu entre les 2 fluorophores et permettent donc de conclure qu'il y a une interaction entre la CRT et la partie globulaire de C1q à ce temps pré-apoptotique. L'efficacité de FRET maximale apparente pour ce point est d'environ 12% (figure 23.A), cela signifie que quand l'intensité de fluorescence de l'accepteur sera totalement détruite, celle du donneur augmentera de 12% par rapport à sa valeur initiale (juste avant le photoblanchiment).

Même si les régions globulaires de C1q sont la partie de la molécule connue pour interagir avec la surface des cellules en apoptose, il m'est apparu important de vérifier si nous pouvions observer le même type de signal avec la protéine entière, puisque c'est celle que l'on trouve en situation physiologique. L'augmentation de la fluorescence de la CRT après le photoblanchiment du C1q représentée sur la figure 23.B permet de confirmer les données obtenues pour les têtes globulaires. L'efficacité maximale calculée du FRET correspond à peu près à celle obtenue pour les gC1q, c.à.d. 12%.

L'ensemble de ces résultats indique que la CRT exposée à un temps pré-apoptotique à la surface des cellules Jurkat irradiées, interagit avec C1q *via* ses têtes globulaires.

Des sites de co-localisations CRT/gC1q détectés également à la surface des cellules N IR non apoptotiques, pourraient pourtant suggérer que l'interaction détectée à 30 minutes n'est pas forcément liée à l'apoptose. Pour vérifier cela, j'ai effectué des analyses de FRET au niveau de ces sites. Comme le montre la figure 24.A, aucun changement de l'intensité de fluorescence de la CRT n'a été induit par le photoblanchiment des gC1q. Cela indique que ces molécules n'interagissent pas ou très peu à la surface des cellules N IR et que l'interaction obtenue pour les cellules IR 30' dépend bien de l'apoptose.

J'ai ensuite cherché à vérifier si l'interaction observée pour les cellules immunomarquées 30 minutes après l'irradiation est aussi valide pour les cellules apoptotiques précoces IR 120'. Les expériences de FRET réalisées dans cette dernière condition n'ont pas mis en évidence un transfert d'énergie entre la CRT et les gC1q, comme l'illustre le graphe de la figure 24.B.

En se basant sur l'ensemble de ces données, nous pouvons conclure que la CRT exposée à la surface des cellules Jurkat interagit avec C1q *via* ses régions globulaires à un stade très précoce d'apoptose où la PS n'est pas encore transloquée sur le feuillet membranaire externe. Cette interaction précoce a été aussi observée sur les cellules HeLa apoptotiques qui ne présentent pas de structures caractéristiques en « blebs » (Verneret *et al.*, 2014). Par contre, ces dernières cellules sont majoritairement positives pour la PS ce qui n'est pas le cas de nos cellules Jurkat IR 30' pour lesquelles le FRET est détecté. Au contraire, nous

n'avons pas pu observer une interaction sur les cellules Jurkat IR 120' qui sont à 60% positives pour la PS. Cette différence de réponse peut être due au niveau d'apoptose dans lequel les cellules se trouvaient au moment de l'étude. En effet, les cellules HeLa ont été analysées 6 h après l'irradiation tandis que les Jurkat sont analysées après seulement 2 h. En plus, chaque modèle cellulaire pourrait développer une réaction spécifique vis-à-vis du stimulus de l'apoptose qui serait en relation étroite avec les molécules qu'il exprime et les voies de signalisation déclenchées.

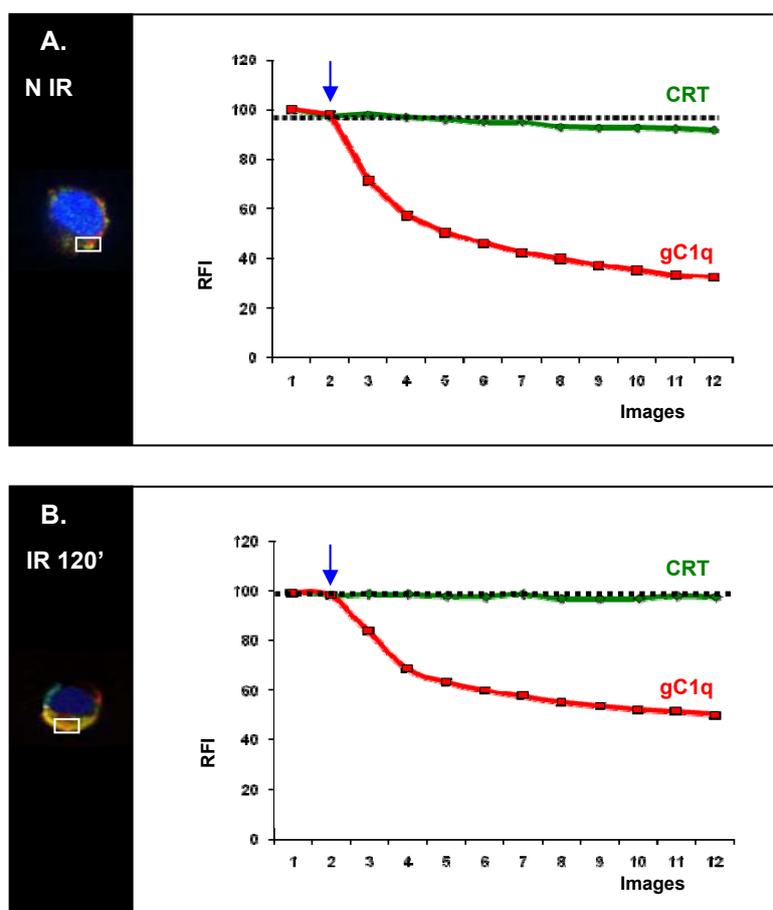


Figure 24. Analyse par FRET de l'interaction entre la CRT et les têtes globulaires de C1q à la surface des cellules N IR (A) et IR 120' (B).

III.1.6 Effet de C1q sur la phagocytose

III.1.6.1 Optimisation du test de phagocytose

Dans le but d'analyser l'effet de C1q sur la phagocytose des cellules apoptotiques, il a été nécessaire de mettre au point un test de phagocytose adapté aux cellules Jurkat. Les conditions de ce test développé sur la base des expériences précédemment effectuées au laboratoire sont détaillées dans la partie « matériels et méthodes ». Quatre modifications/améliorations ont été principalement apportées :

- Adaptation à un modèle de cellules apoptotiques non adhérentes : travailler avec un modèle de cellules en suspension comme les Jurkat présente l'avantage de préserver l'intégrité de la membrane cellulaire en évitant une étape de trypsination ;
- Optimisation du ratio cellule apoptotique/phagocyte : un ratio 5/1 ou 10/1 est celui qui nous a permis d'obtenir le meilleur taux de phagocytose ;
- L'utilisation d'une concentration de 100 µg/ml de C1q proche de sa concentration physiologique (70-160 µg/ml ; Hosszu *et al.*, 2012) a également amélioré l'efficacité du test ;
- Miniaturisation du test : les expériences sont réalisées avec moins de cellules dans des plaques multi-puits (12 ou 24 puits) grâce à l'utilisation du nouveau cytomètre mis à disposition à l'IBS qui a l'avantage d'être moins coûteux, plus rapide et capable d'analyser un faible nombre de cellules.

III.1.6.2 Effet de C1q sur la phagocytose des cellules pré-apoptotiques

A l'aide de ce test de phagocytose, nous avons pu déterminer l'effet de C1q sur la phagocytose des cellules Jurkat irradiées par les cellules phagocytaires THP1 différenciées en macrophages sous l'action du PMA.

Les résultats des expériences de phagocytose illustrés sur la figure 25 démontrent que l'opsonisation des cellules pré-apoptotiques IR 30' avec du C1q augmente significativement leur phagocytose par les cellules THP1. Malgré leur stade apoptotique caractérisé par l'absence du signal PS de leur surface, les cellules IR 30' sont significativement ($p = 0.009$) mieux phagocytées que les cellules contrôles non irradiées (augmentation d'environ 24%). En ce qui concerne les cellules apoptotiques précoces IR 120', qui présentent à 60% la PS à leur surface (figure 19.A), leur phagocytose en absence de C1q est nettement plus importante que celle des cellules IR 30' (index de phagocytose = 2.26 contre 1.24 pour les

IR 30'). Toutefois, la présence de C1q n'a pas d'effet significatif ($p = 0.26$) dans cette condition même si la tendance est à la hausse.

Ces résultats signifient que l'opsonisation des cellules à un stade pré-apoptotique par le C1q favorise leur phagocytose avant même l'apparition du premier signal « eat-me » de l'apoptose (PS).

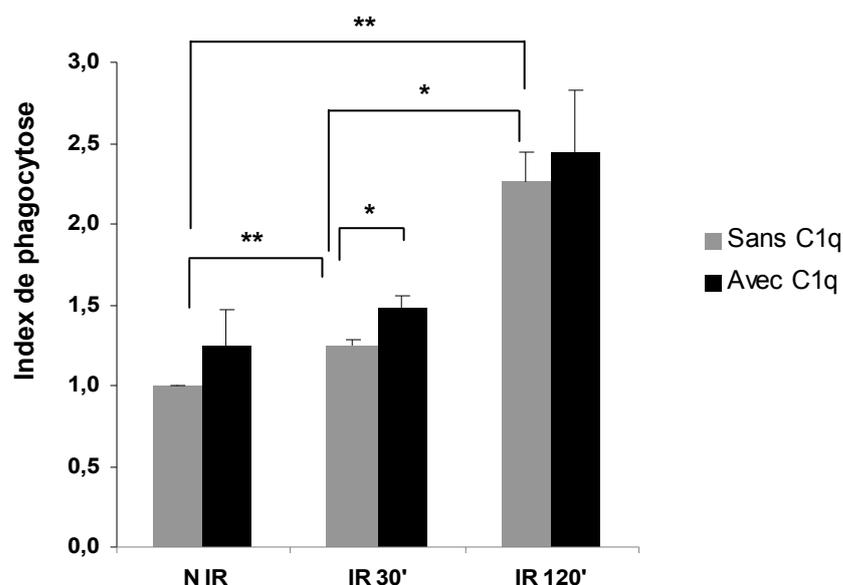


Figure 25. Effet de C1q sur la phagocytose des cellules IR 30' et IR 120'.

Les cellules Jurkat IR 30' et IR 120' marquées en vert ont été incubées en présence ou pas de 100 $\mu\text{g/ml}$ de C1q. Après 30 minutes, les cellules sont mélangées avec les cellules THP1 induites marquées en rouge en respectant un ratio de 5/1. Les cellules sont incubées ensemble à 37 °C pendant une heure pour permettre l'ingestion, puis analysées en cytométrie en flux. L'index de phagocytose est obtenu en considérant les cellules N IR comme la condition contrôle. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes \pm SD. Les différences sont analysées pour leur significativité à l'aide du Test Student t (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

III.1.6.3 Effet de la diminution de l'expression de la CRT endogène

Ayant vérifié l'effet de C1q sur la phagocytose des cellules à un stade pré-apoptotique, j'ai ensuite voulu savoir si cela pouvait dépendre de l'interaction C1q/CRT. Dans ce but, nous avons essayé par différentes méthodes de diminuer l'expression de la CRT dans les cellules Jurkat afin de regarder par la suite si cette diminution affecte l'effet de C1q sur la phagocytose comme cela a été précédemment montré sur les cellules HeLa.

Nous avons d'abord utilisé la transfection transitoire à l'aide de la lipofectamine par des siARN spécifiques de CRT. Cette stratégie a déjà été testée avec succès pour les cellules

HeLa dans notre laboratoire (Verneret *et al.*, 2014). Mais dans le cas des Jurkat qui sont des cellules difficilement transfectables (Jordan *et al.*, 2008), cette technique n'a engendré aucune conséquence sur leur profil d'expression de CRT (résultats non montrés).

En se basant ensuite sur des données bibliographiques proposant l'électroporation comme méthode de transfection pour ce type de cellules (Cortès *et al.*, 2002 ; Zheng *et al.*, 2006 ; Son *et al.*, 2012), nous avons décidé de tester le système électroporateur BTX. Les résultats obtenus à l'issu de ce type de transfection n'ont pas montré d'effet significatif sur l'expression de CRT (résultats non montrés).

Comme les techniques de transfection n'ont pas abouti, j'ai essayé comme alternative la stratégie des anticorps bloquants dirigés contre la CRT de surface. En effet, plusieurs groupes ont pu décrire, en utilisant cette méthode, l'implication de la CRT de surface dans la phagocytose des cellules apoptotiques (Gardai *et al.*, 2005 ; Obeid *et al.*, 2007a ; Kuraishi *et al.*, 2007). Les résultats de la pré-incubation des cellules Jurkat IR 30' et IR 120' avec des anticorps bloquants anti-CRT sur leur phagocytose par les cellules THP1 sont malheureusement pour la plupart incohérents. Ils ne permettent pas de conclure clairement au sujet de l'effet de la CRT de surface sur l'augmentation de phagocytose en présence de C1q au stade pré-apoptotique (résultats non montrés).

III.1.7 Conclusion

Les résultats présentés dans cette partie démontrent que l'exposition de la CRT à la surface des cellules a lieu très rapidement après l'induction de l'apoptose, seulement 30 minutes après l'irradiation et que cette exposition précède la translocation de la PS vers le feuillet externe de la membrane. A ce stade pré-apoptotique, C1q est capable de lier la surface cellulaire, d'interagir avec la CRT et d'augmenter la phagocytose des cellules pré-apoptotiques. La diminution de la CRT de surface à un temps précoce d'apoptose (IR 120') corrèle avec une baisse de fixation de C1q ou des gC1q, une absence de l'interaction CRT/gC1q et une moindre efficacité/absence d'effet de C1q sur la phagocytose. Cela signifie que C1q peut intervenir dans l'efferocytose à un temps très précoce après la stimulation de l'apoptose avant même que la cellule n'entre en apoptose « visible », et suggère que l'interaction avec la CRT qui est rapidement exposée, peut être importante.

III.2 Calréticuline extracellulaire

Bien que notre objectif initial n'était pas l'étude du mécanisme par lequel la calréticuline s'expose à la surface des cellules apoptotiques, l'analyse « quantitative » de la CRT contenue dans les surnageants de culture parallèlement à celle exprimée en surface nous a permis tout de même d'apporter quelques éléments de compréhension intéressants sur ce sujet. C'est en analysant les résultats de la cinétique de l'expression de la calréticuline à la surface des cellules, présentée dans la première partie des résultats (figure 19.B), que nous nous sommes aperçus que l'augmentation très rapide observée 30 minutes après l'irradiation (IR 30') est suivie d'une baisse significative lorsque l'analyse est faite 2 h après (IR 120'). Cette « perte » de CRT à la surface cellulaire pourrait être la conséquence de son relargage dans le milieu de culture.

Dans cette deuxième partie des résultats, nous avons commencé par vérifier cette hypothèse. Ensuite, nous nous sommes intéressés à la calréticuline présente dans le milieu extracellulaire dans une situation d'apoptose : sa fixation aux phagocytes, son effet sur leur biologie et sur l'efficacité de la phagocytose.

III.2.1 Les cellules apoptotiques précoces relarguent leur CRT

Afin de confirmer le relargage de la CRT dans le milieu extracellulaire à partir de la membrane des cellules, j'ai analysé la quantité de CRT présente dans le milieu de culture des cellules en condition d'apoptose.

Les cellules Jurkat sont rendues apoptotiques par irradiation aux UVB (cf. matériels et méthodes). Les surnageants de culture sont ensuite récoltés à 30 et 120 minutes et analysés pour leur teneur en CRT par Western blot. Parallèlement, la CRT de surface des cellules en apoptose a été analysée par immunofluorescence et cytométrie en flux. Des mesures de l'état d'apoptose (test AV/PI) ont également été effectuées afin de s'assurer que dans toutes nos conditions aucune nécrose significative ne pouvait influencer sur les résultats (environ 5% de signal AV+ PI+ ; figure 19.A).

Les résultats présentés dans la figure 26 dressent le profil de la CRT dans les surnageants aux temps d'incubation 30' et 120' après irradiation. Deux contrôles ont été faits pour cette expérience :

- le contrôle T0 : Après l'ajout du milieu (non complet) sur les cellules, ces dernières sont immédiatement centrifugées afin de récupérer et d'analyser le surnageant. Le résultat de T0 reflète, pour l'essentiel, le niveau de CRT en

provenance des cellules mortes normalement présentes dans une population cellulaire ;

- le contrôle N IR 120' qui permet de contrôler le relargage extracellulaire de CRT en absence d'inducteur d'apoptose. Les cellules sont incubées pendant 2 h à 37 °C puis centrifugées avant récupération du surnageant.

En comparant l'expression à la surface de la CRT (figure 26.A) à sa détection dans le milieu extracellulaire (figure 26.B), on peut remarquer que :

- i. la CRT est détectée dans le surnageant des cellules N IR qui l'expriment également à leur surface ;
- ii. l'augmentation de CRT à la surface observée 30' après irradiation corrèle avec sa diminution dans le milieu de culture ;
- iii. la diminution de CRT de surface 120' après irradiation est accompagnée de l'augmentation de sa teneur dans le surnageant.

Ces résultats signifient que la CRT est normalement relarguée par les cellules N IR, et suggèrent que son augmentation rapide à la surface des cellules IR 30' peut être due, au moins en partie, à un processus de rétention. En effet, 30 minutes après l'irradiation, le signal de surface a significativement augmenté (statistiques de la figure 19.B), tandis que l'intensité de la CRT du surnageant est revenue presque égale à celle du niveau de base T0. Cela semble indiquer que les cellules, en situation d'apoptose très précoce, relarguent moins de CRT que lorsqu'elles sont N IR. La CRT retenue à la membrane cellulaire est ensuite fortement libérée par les cellules apoptotiques précoces IR 120' dans le milieu de culture, comme le montre l'augmentation de l'intensité de CRT dans le surnageant de culture et sa diminution significative à la surface cellulaire (figures 26.B et 19.B). En comparant les figures des cellules N IR et IR 120', nous pouvons remarquer que la CRT détectée dans le milieu des cellules IR 120' est nettement plus importante que lorsque les cellules n'ont pas été irradiées (augmentation de 84% de l'intensité de la bande). Pour autant, le signal de CRT de surface reste significativement supérieur à celui des cellules N IR (comparaison des courbes bleue et rose de la figure 26.A).

Ces données suggèrent que l'augmentation de la CRT dans le milieu environnant peut être la conséquence de l'augmentation préalable de son exposition et de sa rétention transitoire à la surface des cellules.

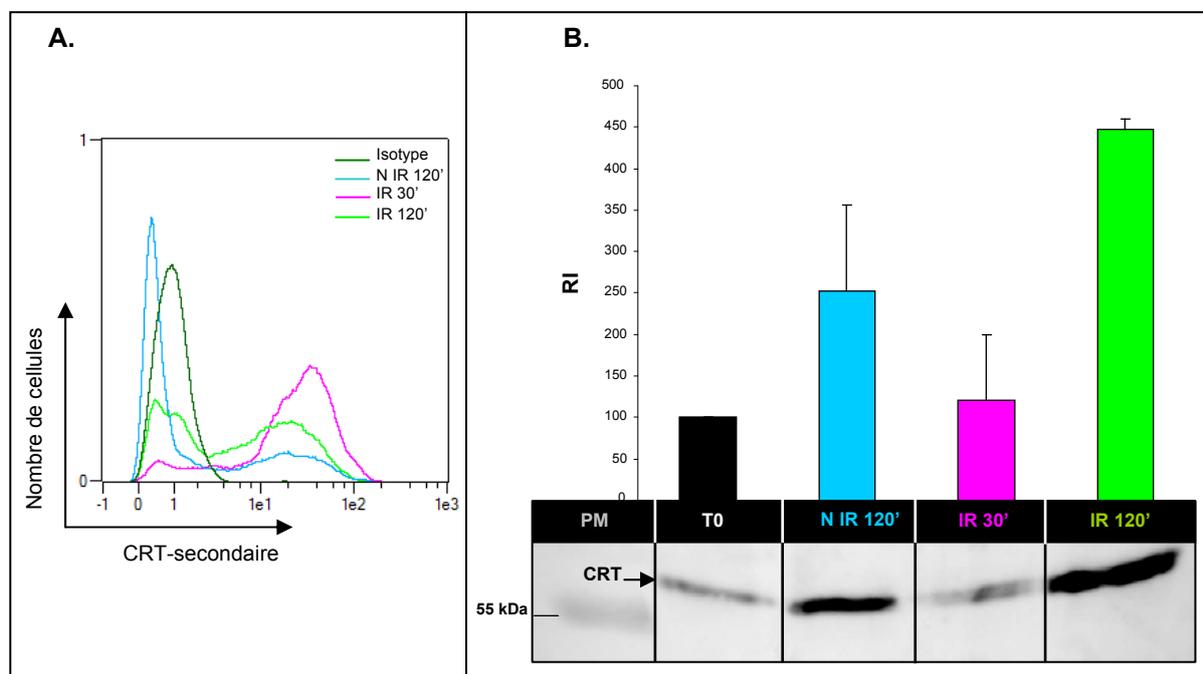


Figure 26. Analyse de la CRT à la surface des cellules et relarguée dans le milieu de culture.

La partie A est un histogramme représentatif de la cinétique de l'expression de la CRT à la surface des cellules IR 30', IR 120' et les non irradiées contrôles, analysée par cytométrie en flux (N = 4). Les surnageants de culture d'un même nombre de cellules sont récupérés et analysés par Western Blot afin de détecter la présence de CRT (B). Les intensités relatives des bandes (RI) sont quantifiées à l'aide du logiciel Image J et les résultats sont représentés sous formes d'histogrammes \pm SD (au-dessus de chaque bande) après normalisation des valeurs par rapport au contrôle T0 (B). PM = Poids Moléculaire.

III.2.2 Effets de la CRT extracellulaire sur la biologie des phagocytes

III.2.2.1 La fonction de phagocytose

La détection d'une CRT extracellulaire relarguée spécifiquement à partir des cellules apoptotiques précoces pose la question de son implication sous cette forme soluble dans le processus de phagocytose.

Dans un premier temps, l'influence de la CRT exogène libre sur l'activité phagocytaire des macrophages a été vérifiée. Pour cela, j'ai utilisé la forme recombinante humaine complète de cette protéine (CRTr).

III.2.2.1.a La capacité d'induire la phagocytose des billes

Nous avons commencé par étudier l'effet de la CRT recombinante sur la phagocytose des billes de latex « vierges », c.à.d. non traitées, par les cellules THP1 différenciées en macrophages sous l'action du PMA. Pour cela, les macrophages THP1 pré-incubés ou non en présence de 1 µg/ml de CRTr sont mis en contact avec 10 µl de billes de latex fluorescentes pendant 1 heure à 37 °C pour favoriser l'internalisation. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux afin d'estimer le pourcentage de phagocytose. Des contrôles en présence de cytochalasine D sont parallèlement effectués.

Les résultats obtenus sont représentés sous forme d'histogrammes dans la figure 27. Chaque histogramme comprend une succession de pics, et chaque pic supplémentaire correspond à une bille de plus internalisée par les cellules. De cette façon, les cellules qui ont internalisé une bille sont représentées dans le premier pic, celles qui ont internalisé 2 billes correspondent au deuxième pic et ainsi de suite. Comme le montre la figure 27.c, les histogrammes des 2 conditions, avec et sans CRTr, sont parfaitement superposables. Cela veut dire que la pré-incubation des macrophages en présence de CRT exogène n'a pas d'effet sur leur capacité intrinsèque à phagocyter.

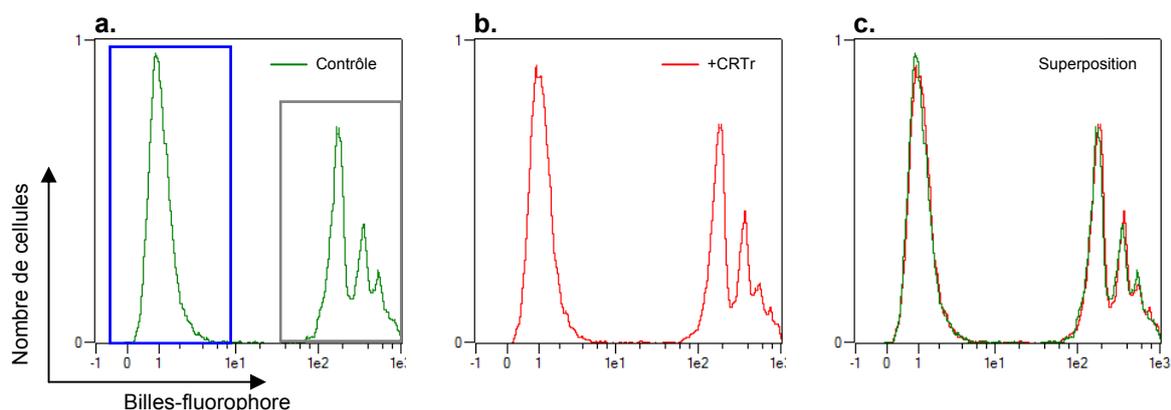


Figure 27. Effet de la CRT exogène recombinante sur la capacité des macrophages à phagocyter des billes.

Les histogrammes a et b représentent l'internalisation de billes fluorescentes par les macrophages THP1 en absence (courbe verte) ou en présence (courbe rouge) de 1 $\mu\text{g/ml}$ de CRT respectivement (le cadran bleu correspond aux cellules qui n'ont pas internalisé de billes, et le cadran gris à celles qui ont internalisé). L'histogramme c est obtenu en superposant les histogrammes a et b.

III.2.2.1.b La capacité d'induire la phagocytose des cellules apoptotiques

Comme la capacité des phagocytes à internaliser des billes non traitées n'a pas été modifiée par la CRT exogène, l'étape suivante a consisté à étudier le cas des cellules apoptotiques. En effet, les cellules apoptotiques, contrairement aux billes, disposent à leur surface des molécules qui peuvent être impliquées dans les processus de reconnaissance et de phagocytose comme les signaux « eat-me ».

La détection de la CRT dans le milieu des cellules IR 120' nous a conduits à nous interroger sur sa capacité à fixer les phagocytes mais aussi à « refixer » les cellules apoptotiques. De ce fait, j'ai analysé l'effet de la CRT soluble (recombinante) sur les phagocytes (macrophages THP1) et sur les cellules apoptotiques (Jurkat). J'ai choisi le point d'apoptose IR 120' car la CRT est fortement relarguée dans cette condition (figure 26.B). Pour cela, et avant de mettre en contact les cellules apoptotiques précoces et les phagocytes, les cellules sont incubées, ou non, les unes ou les autres en présence de 1 $\mu\text{g/ml}$ de CRT. La suite de l'expérience est effectuée comme précédemment et l'index de phagocytose est calculé en considérant les cellules non traitées par la CRT comme contrôles. La fixation directe de la CRT recombinante sur les cellules Jurkat ou THP1 a été parallèlement contrôlée (dans les

mêmes conditions que la phagocytose) à l'aide d'une forme fluorescente de CRTr couplée à l'Alexa 488 (CRTr-A488).

Pour le cas des cellules Jurkat, comme l'indique l'histogramme A de la figure 28, il n'y a pas de fixation significative de CRTr-A488 sur ces cellules. Ce résultat justifie en quelque sorte l'absence de variation du taux de phagocytose quand les Jurkat sont pré-traitées par la CRT exogène (figure 28.B).

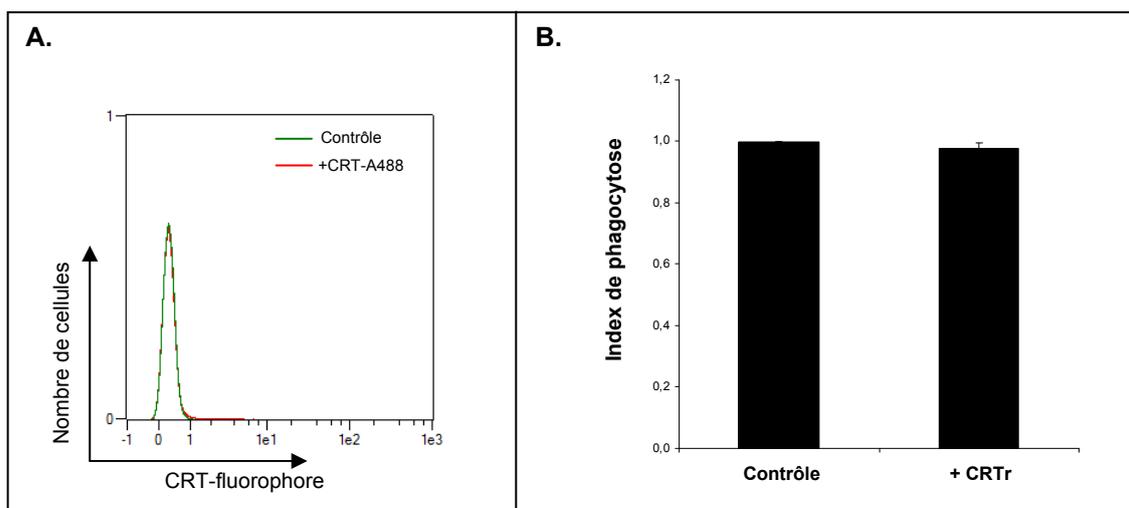


Figure 28. Analyse de la fixation de la CRT exogène sur les cellules Jurkat IR 120' et son effet sur leur phagocytose.

L'histogramme A représente la fixation de la CRT exogène fluorescente (5 µg/ml de CRTr-A488) par les cellules Jurkat IR 120' analysée par cytométrie. Dans le graphique B sont illustrés les index de phagocytose obtenus après avoir traité ou pas (contrôle) des cellules Jurkat IR 120' avec de la CRTr (1 µg/ml) pendant 30 minutes avant de les mélanger avec les macrophages THP1 pour permettre la phagocytose (N = 3).

J'ai ensuite recherché à vérifier si la CRT exogène pouvait avoir un effet en interagissant directement avec les phagocytes. Pour cela, des expériences similaires ont été effectuées en rajoutant cette fois la CRT_r sur les macrophages THP1.

Contrairement aux résultats obtenus pour les Jurkat, la CRT_r-A488 se fixe significativement sur les cellules THP1 comme le montre l'histogramme A de la figure 29. Cette fixation corrèle avec une diminution significative du taux de phagocytose lorsque les phagocytes sont pré-traités avec la CRT_r (figure 29.B).

Les résultats obtenus montrent que la CRT exogène est capable de lier spécifiquement la surface des phagocytes et non pas celle des cellules en apoptose. Elle provoque ainsi une diminution du taux de phagocytose quand elle est seulement en contact avec les phagocytes. Ces résultats peuvent s'expliquer par la présence à la membrane des macrophages, de ligands pouvant interagir avec la forme exogène de CRT. Cela suggère que l'effet de la CRT relarguée dans le milieu de culture en provenance des cellules apoptotiques est réservé exclusivement aux cellules phagocytaires cibles.

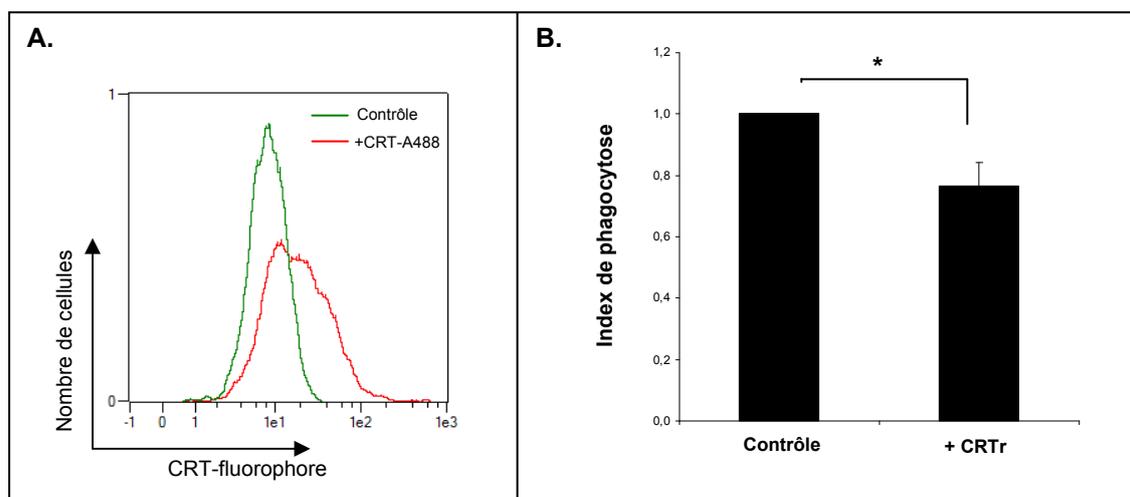


Figure 29. Analyse de la fixation de la CRT exogène sur les macrophages THP1 et son effet sur la phagocytose.

L'histogramme A représente la fixation de la CRT_r-A488 sur les macrophages THP1 analysée de la même manière que pour les cellules Jurkat (figure 28.A). Le graphique B montre l'effet de la CRT exogène sur la phagocytose quand elle est incubée avec les macrophages THP1. Pour cela, les macrophages sont pré-incubés avec 1 µg/ml de CRT_r puis mis en contact avec les Jurkat apoptotiques IR 120'. Les valeurs représentées correspondent aux moyennes obtenues pour 3 expériences indépendantes ±SD, Test Student *t* (* $p \leq 0.05$).

III.2.2.2 La morphologie

Après avoir montré l'influence « rapide » de la CRT exogène sur l'efficacité des phagocytes à reconnaître/ingérer les cellules apoptotiques, l'étape suivante a consisté à étudier l'impact de sa présence prolongée sur la morphologie des phagocytes et sur plusieurs de leurs aspects fonctionnels.

Nous avons commencé par rechercher par microscopie optique à regarder s'il y a une différence de phénotype entre les cellules THP1 traitées 48 heures au PMA puis incubées pendant 24 heures dans un milieu contenant 1 $\mu\text{g/ml}$ de CRTr et les cellules témoins qui n'ont pas été mises en présence de CRTr. Les photos des cellules capturées après 24 heures présentées dans la figure 30.A montrent que les cellules témoins présentent, pour la plupart, une forme arrondie ou faiblement allongée. En revanche, une partie importante des THP1 incubés en présence de CRTr présente une forme étalée. En se basant sur cette différence morphologique, les cellules étalées sont ensuite quantifiées et les résultats sont illustrés sous forme de graphique dans la figure 30.B. Ces résultats démontrent que la proportion des cellules étalées est 3 fois plus importante en présence de CRTr qu'en l'absence de CRTr (10% pour le contrôle contre environ 30% pour + CRTr).

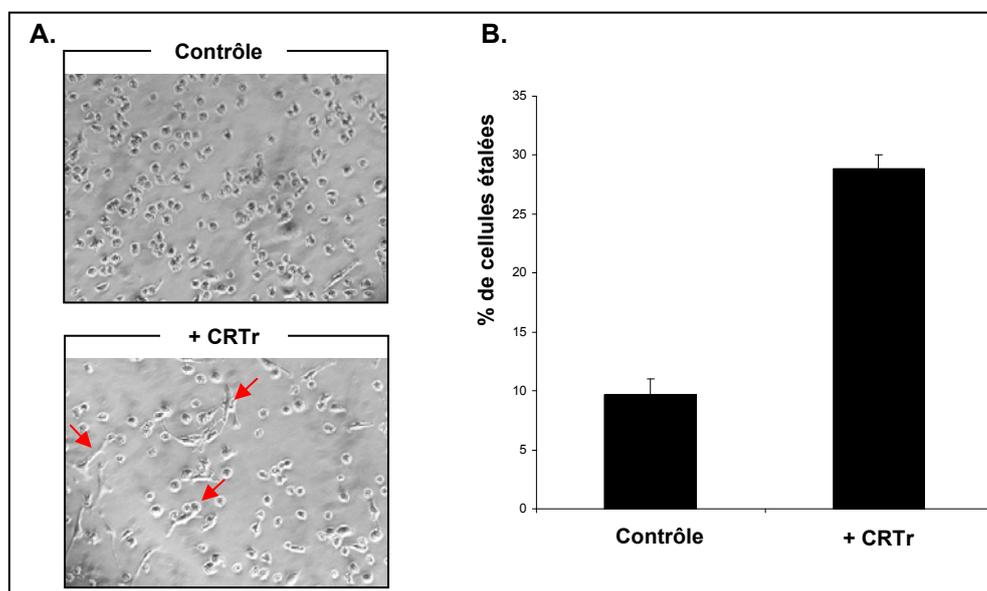


Figure 30. Changements morphologiques des phagocytes THP1 matures provoqués par l'ajout de CRTr dans leur milieu.

Les cellules THP1 différenciées sont incubées en présence de CRTr pendant 24 h puis observées et photographiées à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase. Les flèches rouges indiquent les cellules présentant une forme étalée (A). A droite (B), le pourcentage des cellules étalées est présenté sous forme d'histogramme, il a été obtenu en comptant, pour chaque condition, les cellules allongées sur un ensemble de 300 cellules au total, de 2 expériences indépendantes (valeurs \pm SD).

III.2.2.3 La migration

Le phénotype étalé des cellules THP1 observé en présence de CRT_r peut être associé à un effet de cette protéine sur la migration. La migration cellulaire est un processus complexe qui se traduit par l'étalement des cellules, mécanisme qui nécessite la polymérisation du réseau d'actine pour former les extensions membranaires, la perturbation des contacts focaux existants et la formation de nouveaux contacts focaux (Stossel, 1994 ; Young *et al.*, 2009). Une étude intéressante publiée en 2008 a mis en évidence un rôle biologique de la CRT exogène dans la cicatrisation des plaies grâce à sa capacité à stimuler significativement la migration cellulaire (Nanney *et al.*, 2008). Nous avons décidé par conséquent d'étudier l'influence de la CRT_r sur ce processus, surtout qu'au cours du phénomène de l'efferocytose les cellules phagocytaires sont recrutées et peuvent migrer vers le site de l'apoptose.

Nous avons comparé le profil de l'actine en présence ou en absence de CRT_r en marquant les cellules avec de la phalloïdine fluorescente. Les macrophages de la figure 31.A confirment le profil étalé des cellules THP1 en présence de CRT_r mis en évidence dans l'expérience précédente (figure 30) et montrent que dans cette condition, ces cellules développent des extensions membranaires riches en actine, ce qui n'est pas le cas des cellules contrôles.

J'ai ensuite voulu évaluer l'effet de la CRT_r sur la migration à l'aide du test standard de blessure (cf. matériels et méthodes). Ce test n'a pas pu être appliqué pour les cellules THP1 induites 48 heures au PMA en raison de la forte hétérogénéité de la population (culture peu confluente ne permettant pas de définir avec précision les bords de la blessure). De ce fait, j'ai utilisé un modèle de macrophages murins (lignée J774) qui sont des macrophages « naturellement » adhérents. Des images de la blessure capturées sous microscopie à T0 (juste après la création de la blessure) et 40 heures après, T40 (40 heures d'incubation avec ou sans 1 µg/ml de CRT_r) sont présentées dans la figure 31.B. Les aires de la blessure à T0 et T40 sont ensuite calculées à l'aide du logiciel Image J et le pourcentage de la fermeture de la blessure est calculé selon la méthode expliquée dans la partie « matériels et méthodes ».

Comme le montre l'histogramme de la figure 31.B, le pourcentage de la fermeture de la blessure est presque 2 fois plus important en présence de CRT_r (88% contre 48% pour le contrôle), ce qui signifie que la CRT exogène recombinante est capable d'augmenter et de favoriser la migration cellulaire. Il est important de noter que cet effet ne peut pas être dû à un effet de la CRT recombinante sur la prolifération des cellules J774 car ce point a été contrôlé à l'aide du test MTT et aucune variation n'a été remarquée (résultats non montrés).

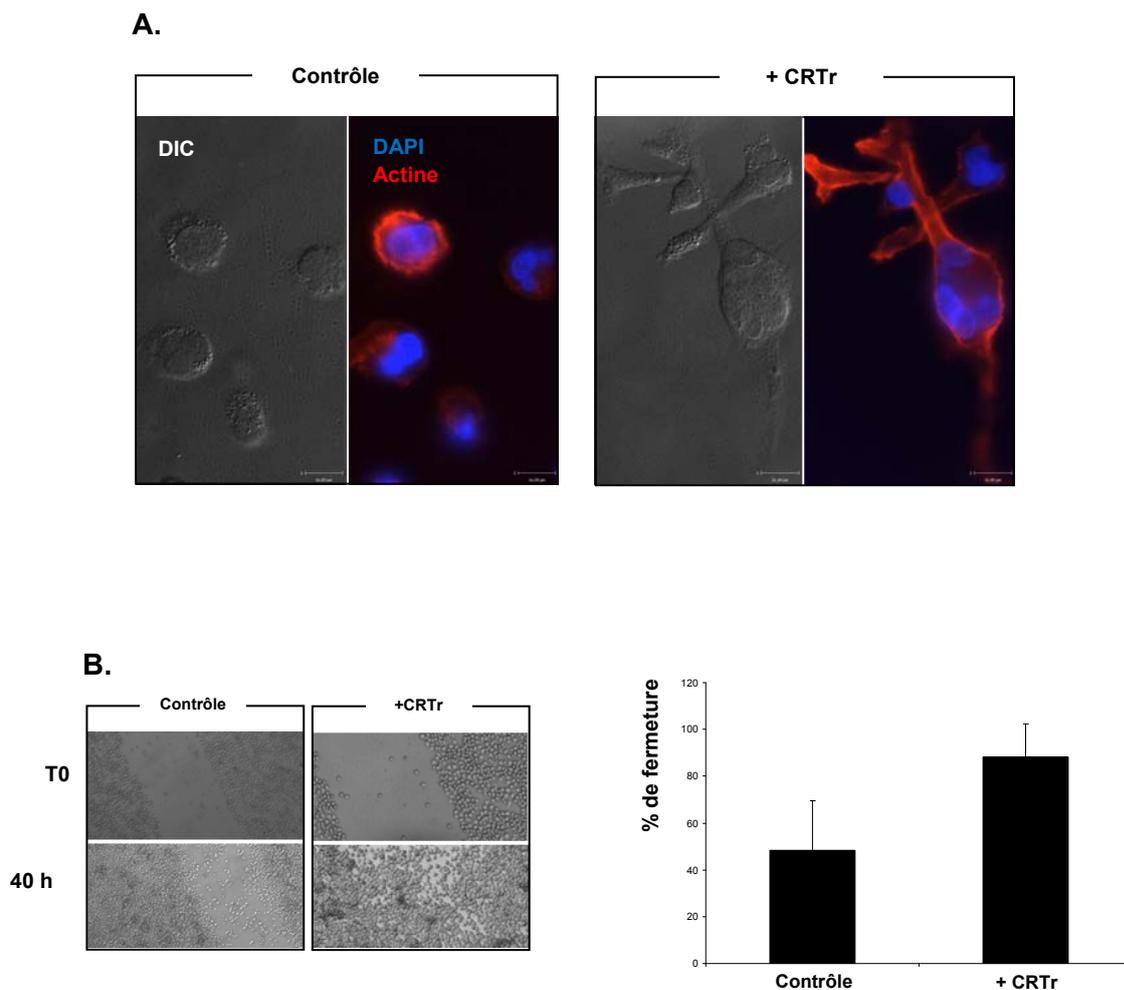


Figure 31. Effet de la calréticuline exogène sur la migration cellulaire.

A. Les cellules THP1 induites au PMA incubées avec la CRTr sont marquées pour l'actine puis visualisées à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence ; B. représente le test de blessure effectué sur les macrophages J774 en présence ou pas de 1 µg/ml de CRTr. Dans la partie gauche, il s'agit d'une image représentative de la différence entre la fermeture de la blessure entre le contrôle et + CRTr. L'aire de la blessure est mesurée à T0 et après 40 h, et le pourcentage de fermeture est calculé et représenté (valeurs ±SD) sur l'histogramme de la partie droite (N = 2 en duplicate).

III.2.2.4 La différenciation

Sous l'action du PMA, les cellules monocytaires THP1 se différencient et présentent une expression importante de marqueurs de surface comme CD11c, CD11b, et CD14 caractéristiques des macrophages (Prieto *et al.*, 1994 ; Shwende *et al.*, 1996). L'effet observé de la CRTr sur la morphologie et la migration des macrophages THP1 induits pourrait suggérer que la CRT exogène influence leur différenciation. Pour vérifier cela, après 48 h de traitement au PMA, les cellules THP1 sont incubées en présence de CRTr (1 µg/ml ou 2 µg/ml) pendant 24 h avant d'être analysées pour l'expression des 3 marqueurs CD11b, CD11c et CD14.

1. CD11b

CD11b correspond à la chaîne α M qui s'associe en hétérodimère avec CD18 pour former l'intégrine α M β 2 connue aussi sous le nom de CR3 (Complement Receptor 3). Elle est exprimée par les cellules myéloïdes et impliquée dans plusieurs réponses cellulaires comprenant la phagocytose, le chimiotactisme et la migration (Solovjov *et al.*, 2005).

La figure 32.A montre que le profil de CD11b qui est fortement exprimé à la surface de la totalité des cellules THP1 induites ne change pas en présence de CRTr.

2. CD11c

CD11c est une molécule de surface exprimée par les cellules myéloïdes, les lymphocytes, les cellules NK et les cellules dendritiques. CD11c est aussi connu comme la sous-unité α x qui forme avec CD18 l'intégrine α x β 2. Le complexe CD11c/CD18 est le récepteur du composant iC3b du complément et est aussi impliqué dans l'adhésion cellulaire (Singh-Jasuja *et al.*, 2013).

Le traitement des macrophages THP1 avec la CRTr induit une légère diminution dose-dépendante de CD11c de surface (figure 32.B).

3. CD14

CD14 est une glycoprotéine membranaire ancrée par GPI (glycosylphosphatidylinositol) considérée comme un marqueur des cellules myéloïdes (Thomas *et al.*, 2013). CD14 est un PRR (Pattern Recognition Receptor) de l'immunité innée pouvant lier différents ligands et moduler la réponse inflammatoire en fonction de son ligand. Ainsi, CD14 est un récepteur pro-inflammatoire du LPS et d'autres motifs microbiens *via* son association fonctionnelle avec des partenaires de signalisation comme TLR4/MD-2 (Jersmann, 2005 ; Thomas *et al.*,

2013). En revanche, il peut favoriser aussi l'élimination silencieuse des cellules apoptotiques qu'il est capable de reconnaître (Devitt *et al.*, 1998 ; Devitt et Marshall, 2011).

Selon les résultats présentés dans la figure 32.C, une grande partie (environ 85%) de notre population de macrophages THP1 exprime fortement CD14 à sa surface. L'incubation de ces cellules en présence de CRTTr n'affecte pas le pourcentage de la population CD14 positives mais influe sur le signal d'expression c.à.d. sur la moyenne de fluorescence de cette population. Cela signifie qu'en présence de CRTTr, les macrophages CD14+ expriment encore plus de CD14 à leur surface.

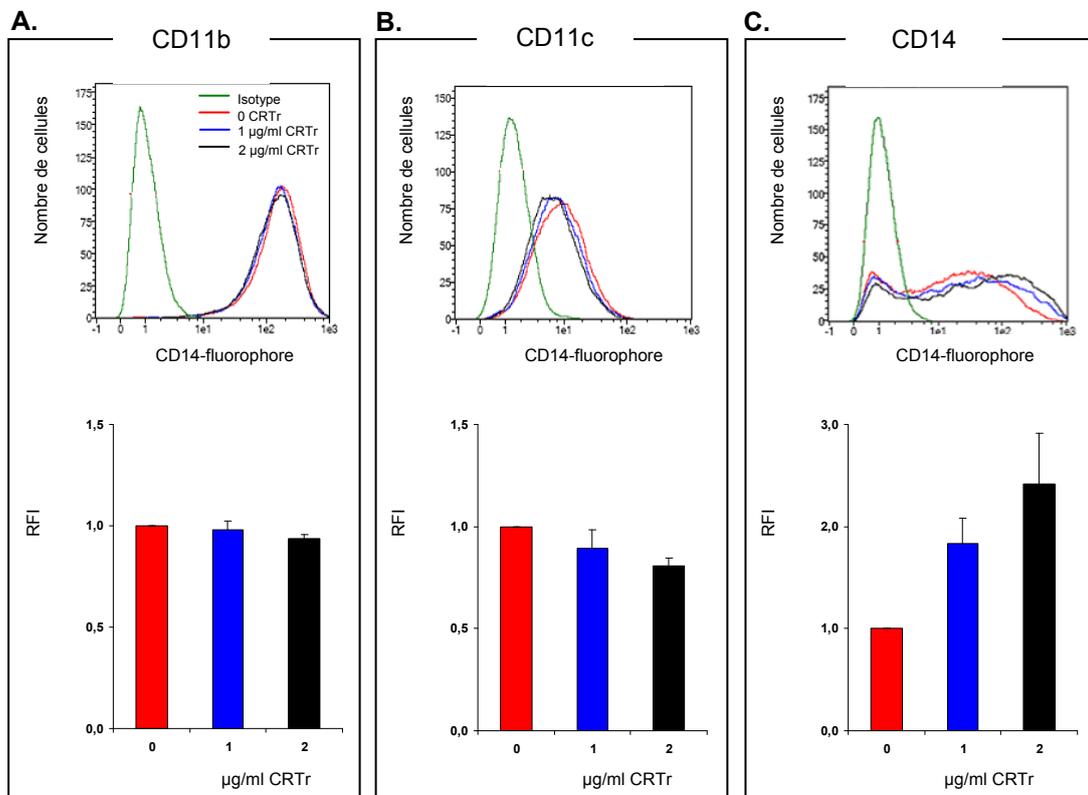


Figure 32. Effet de CRTTr sur les marqueurs CD11b, CD11c et CD14 de la surface des macrophages.

L'expression de 3 marqueurs de surface, CD11b (A), CD11c (B) et CD14 (C), est vérifiée à l'aide des anticorps primaires directement couplés au fluorophore PE. Les macrophages THP1 sont analysés en cytométrie en flux après leur incubation pendant 24 h avec 1 µg/ml ou 2 µg/ml de CRTTr. La partie supérieure de chaque rectangle correspond à la superposition des courbes obtenues avec les 3 conditions (0 ; 1 ; 2 µg/ml de CRTTr). La partie inférieure représente l'histogramme des moyennes des intensités de fluorescence normalisées \pm SD (N = 3).

III.2.2.5 La différenciation des monocytes

La question se pose donc de l'effet de la calréticuline sur la différenciation des cellules THP1. J'ai donc vérifié si la CRT exogène était capable de modifier la différenciation des monocytes THP1. Pour cela, les monocytes THP1 ont été incubés avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de CRTr pendant 24 h avant d'être analysés en cytométrie pour l'expression en surface de CD14 et de CD11c (marqueurs modifiés en présence de CRTr dans le cas des macrophages). Comme on le voit dans la figure 33, les THP1 monocytes non différenciés n'expriment pas ou très peu de CD14 et de CD11c. En présence de CRTr, ce signal n'est pas modifié.

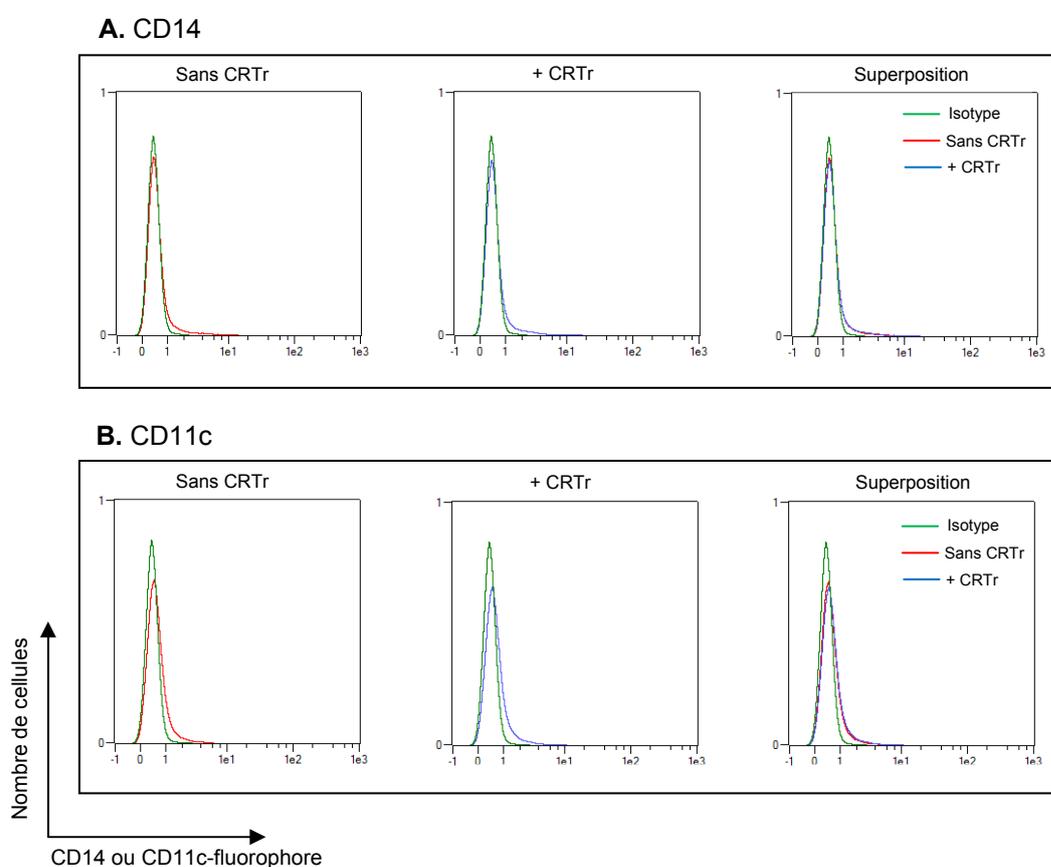


Figure 33. Effet de la CRT exogène sur les marqueurs de surface CD14 et CD11c des monocytes THP1.

La partie A représente les histogrammes de l'expression de CD14 à la surface des THP1 monocytes traités ou non avec de la CRTr. Dans la partie B, c'est l'expression de CD11c qui est étudiée à la surface de ces cellules.

III.2.2.6 La prolifération des monocytes

Une autre possibilité était que la CRT puisse moduler la prolifération des monocytes. Pour étudier cela, les cellules monocytes THP1 ont été incubées pendant 72 h avec des concentrations croissantes de CRT_r allant de 0.01 à 1 µg/ml. Après 72 h, le test MTT est réalisé (cf. matériels et méthodes).

Les résultats illustrés sur le graphique de la figure 34 reflètent une augmentation dose-dépendante du nombre de cellules en présence de CRT_r. Une réponse maximale est obtenue pour une concentration de 1 µg/ml où le nombre de cellules est environ 30% plus important par rapport aux cellules contrôles non traitées. On peut déduire ainsi que la CRT exogène favorise la prolifération des monocytes non différenciés de façon dose-dépendante.

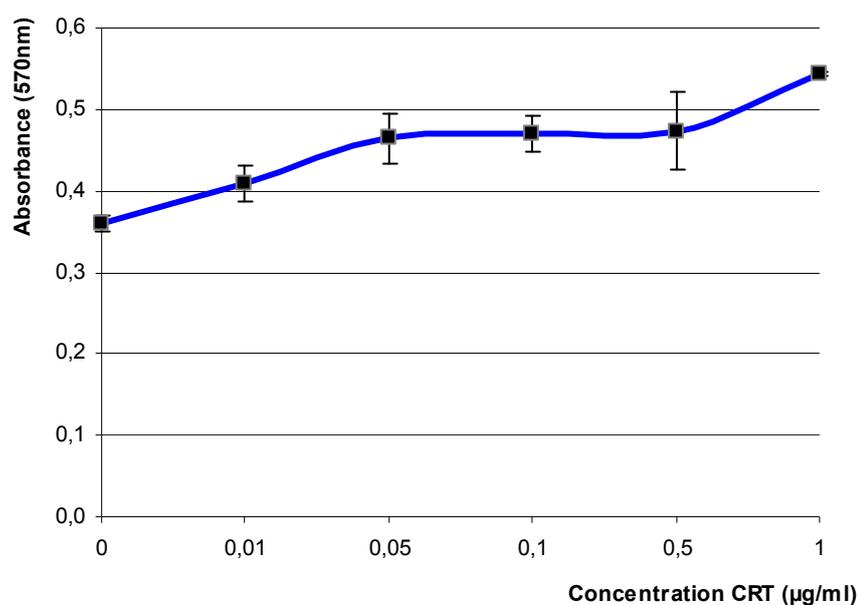


Figure 34. Effet de la CRT exogène sur la prolifération des monocytes THP1.

Les THP1 non différenciés sont incubés avec des concentrations croissantes de CRT_r. Après 72 h, le test MTT est réalisé sur ces cellules et la DO à 570 nm est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

III.2.3 Conclusion

Dans la première partie des résultats, la CRT détectée rapidement à la surface cellulaire suite à l'induction de l'apoptose, nous a conduits à analyser sa présence dans le milieu extracellulaire. Nos expériences montrent que la CRT accumulée à la membrane est relarguée dans le milieu lorsque l'apoptose des cellules se développe. Cela suggère un processus de rétention/accumulation membranaire précoce et transitoire de la protéine. La CRT soluble extracellulaire pouvant potentiellement agir sur les cellules environnantes au cours de l'efferocytose, j'ai analysé cela en utilisant de la CRT recombinante.

Les analyses effectuées ont permis de démontrer que la CRT exogène :

- se fixe spécifiquement sur les macrophages THP1 et non pas sur les cellules apoptotiques précoces ;
- diminue la phagocytose des cellules apoptotiques précoces par les macrophages.
- modifie la morphologie des macrophages en induisant un phénotype étalé ;
- augmente la migration des macrophages ;
- induit l'augmentation de l'expression du récepteur membranaire CD14 par les macrophages et non pas par les monocytes non différenciés ;
- favorise la prolifération des monocytes.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que la CRT extracellulaire, peut moduler certaines fonctions des phagocytes, et ceci pourrait dépendre de leur stade de différenciation.

III.3 Fixation et internalisation de la CRT exogène par les phagocytes

Les études effectuées sur les voies d'exposition de la calréticuline concernent pour la plupart la surface des cellules apoptotiques (cf. paragraphe I.3.3.5). Cependant, la CRT est retrouvée de l'autre côté de la synapse efferocytaire, à la surface des phagocytes où elle contribue avec CD91 à l'efferocytose (Ogden *et al.*, 2001 ; Vandivier *et al.*, 2002). L'origine et le mécanisme d'exposition de la CRT des phagocytes restent jusqu'à présent énigmatiques. Des travaux très récents ont décrit l'implication de la voie TLR/Btk dans son exportation à la membrane des cellules myéloïdes (Byrne *et al.*, 2013 ; Feng *et al.*, 2015). On ne peut toutefois pas exclure qu'elle peut provenir, au moins en partie, du milieu extracellulaire.

Comme vu précédemment, la CRT recombinante rajoutée dans le milieu de culture se fixe aux macrophages et en module certaines fonctions. J'ai donc cherché à valider les observations faites avec la CRT_r purifiée en utilisant les milieux conditionnés des cellules apoptotiques.

III.3.1 Analyse de la CRT des macrophages incubés avec des surnageants des cellules apoptotiques

Les macrophages THP1 sont mis en contact avec les surnageants de culture des cellules Jurkat IR 120' (contenant le taux le plus fort de CRT exogène) ou les surnageants des cellules N IR récoltés également à 2 h. Des cellules THP1 sont parallèlement incubées avec du milieu de culture « neuf » comme contrôle. Après 1 h d'incubation (à 37 °C), la teneur en CRT de surface est analysée par cytométrie.

Les résultats illustrés sur la figure 35 démontrent qu'environ 25% de la population THP1 exprime initialement la CRT à sa surface. Cette proportion augmente significativement à la suite de l'incubation avec les surnageants des cellules Jurkat N IR. L'utilisation de surnageants issus de cellules en apoptose accroît encore la population de macrophages fortement positive pour la CRT de surface (figure 35).

L'analyse des intensités de fluorescence (courbe rouge) montre que l'incubation des cellules avec des surnageants « non irradiés » ou « apoptotiques » ne modifie pas le signal, celui-ci étant cependant supérieur au contrôle. Cela signifie que les macrophages incubés avec un milieu enrichi en CRT ont plus de CRT à leur surface. Toutefois, l'intensité de fluorescence est la même dans le cas des surnageants de cellules N IR et apoptotiques, alors que le

nombre de cellules CRT-positives augmente. Cela semble indiquer que les cellules positives commencent à être saturées en CRT en présence de surnageant IR 120'.

Ces observations corrélient avec la teneur en CRT détectée dans les milieux de culture (figure 26) et suggèrent qu'une partie de la CRT présente à la surface des macrophages peut provenir du milieu conditionné.

Cependant, les surnageants cellulaires ne contiennent pas seulement de la CRT. Il est donc possible que d'autres facteurs présents dans ces surnageants, provoquent, avec ou sans la participation de la CRT, l'augmentation de la CRT à la surface des macrophages. Pour cette raison, j'ai poursuivi les expériences en utilisant de la CRT recombinante fluorescente purifiée.

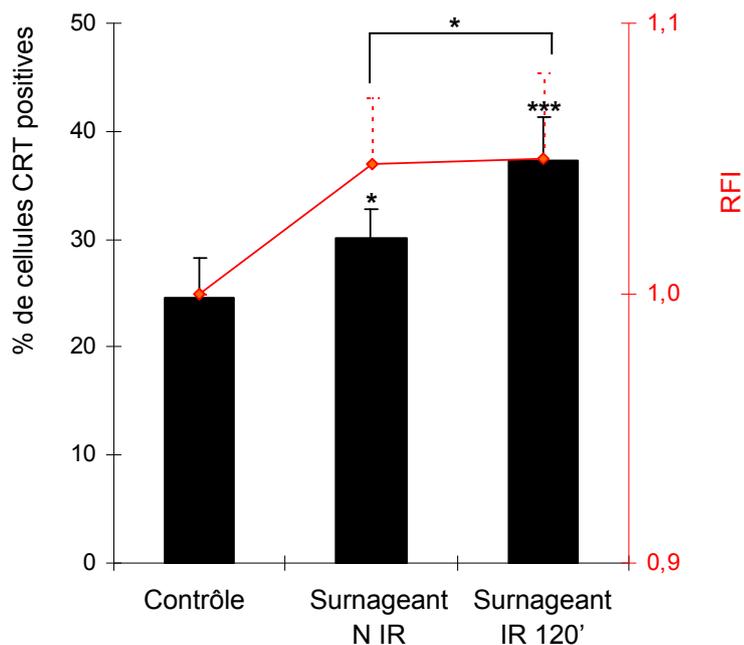


Figure 35. Analyse de la CRT de surface des macrophages mis en contact avec des milieux conditionnés.

Les cellules THP1 induites sont incubées avec le surnageant des cellules Jurkat N IR ou celui des IR 120' puis immunomarquées et analysées en cytométrie pour leur CRT de surface. Le contrôle correspond à la condition où les phagocytes sont incubés avec un volume égal à celui des surnageants mais en milieu RPMI « neuf ». Sur l'axe des ordonnées de gauche est représenté le pourcentage des cellules THP1 positives pour la CRT de surface et sur celui de droite (courbe rouge) est représentée la moyenne de l'intensité de fluorescence relative (RFI) de la population CRT+ pour chaque condition. Les valeurs représentées correspondent aux moyennes \pm SD de 3 expériences indépendantes, Test Student t (* $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$).

III.3.2 Fixation de la CRT recombinante sur les macrophages

La CRT recombinante pleine échelle produite au laboratoire a été couplée au fluorophore A488 (CRTr-A488). Cette CRT est ajoutée dans le milieu des macrophages THP1 qui sont ensuite incubés à 4 °C pour détecter le signal de surface ou à 37 °C pour vérifier une éventuelle internalisation. Après 30 minutes d'incubation, les cellules sont analysées en cytométrie afin d'évaluer leur fluorescence verte correspondante à la CRTr-A488.

Comme l'illustrent les histogrammes de la figure 36, la CRTr-A488 peut se fixer à la surface des macrophages (4 °C) même si le signal est faible (Moyenne de fluorescence MFI = 11 contre 9 pour le contrôle sans CRTr-A488 ; histogrammes 36.a et 36.b). Quant au signal obtenu à 37 °C, il est significativement plus important (figure 36.c). Il correspond en effet à presque le triple du signal contrôle (MFI = 25). Cela peut refléter une internalisation importante de la CRT par les macrophages qui pourrait impliquer des récepteurs endocytiques comme CD91.

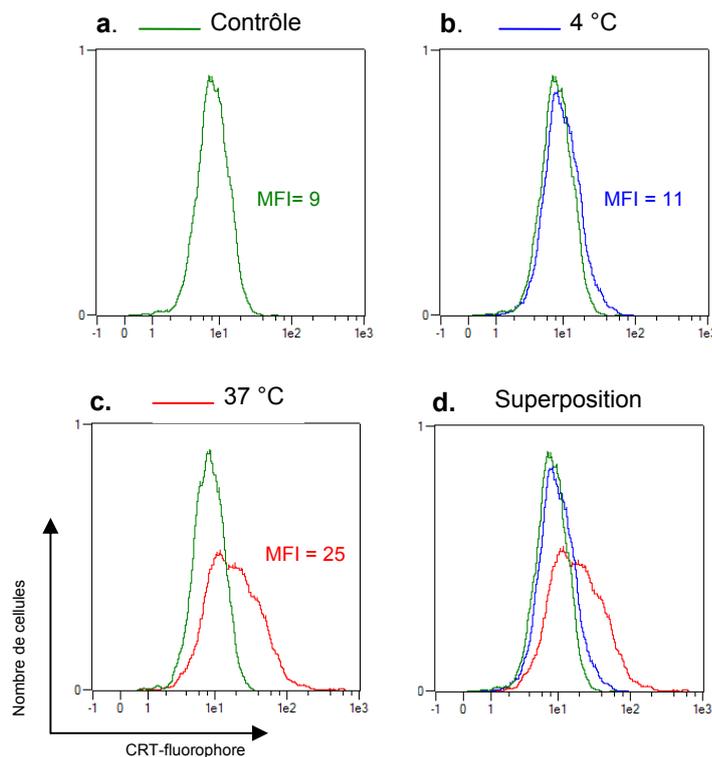


Figure 36. Comparaison de la fixation de la CRTr-A488 par les macrophages à 4 °C et à 37 °C.

Les macrophages THP1 sont incubés en présence de 5 µg/ml de CRTr-A488 à 4 °C ou à 37 °C pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite analysées directement en cytométrie. La moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) est indiquée pour chaque condition.

III.3.3 Internalisation de la CRT exogène par les macrophages

La différence significative observée entre le signal de fixation de la CRTr-A488 par les macrophages à 4 °C et à 37 °C pose la question du mécanisme par lequel cette protéine est internalisée par les phagocytes. L'analyse des cellules THP1 qui ont internalisé de la CRTr fluorescente en microscopie confocale révèle, d'une manière intéressante, la présence de larges vésicules vertes intracellulaires indiquées par des flèches blanches sur la figure 37. Le diamètre moyen de ces vésicules d'environ 3.2 µm ainsi que leur forme plus ou moins circulaire pourraient évoquer un mécanisme d'endocytose par macropinocytose (Fujii *et al.*, 2013). En effet, la macropinocytose appelée aussi « cell drinking » est définie comme l'absorption non spécifique des molécules solubles, nutriments et antigènes. C'est un processus dépendant de l'actine qui commence par la formation des « ruffles » membranaires donnant ensuite lieu à de larges vésicules endocytiques appelées « macropinosomes » distinctes des autres types de vésicules endocytiques par leur large diamètre mesurant entre 0.2 à 5 µm et leur structure (pour revue Liu et Roche, 2015).

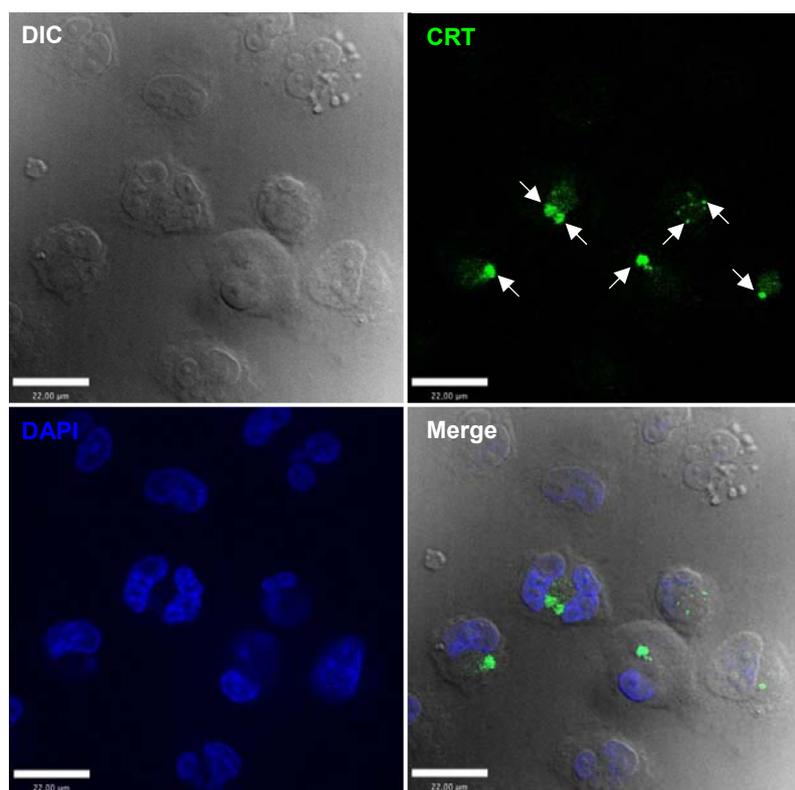


Figure 37. Etude de l'internalisation de la CRT exogène par les macrophages THP1.

Après leur incubation avec 10 µg/ml de CRTr-A488 à 37 °C pendant 1 h, les cellules THP1 induites sont lavées, fixées au PFA 4% pour être finalement visualisées en microscopie confocale.

Pour confirmer qu'il s'agit bien d'une internalisation par macropinocytose, nous avons eu recours à 2 inhibiteurs utilisés spécifiquement pour étudier ce processus : l'amiloride EIPA (Ethylisopropylamiloride) et la cytochalasine D (Fujii *et al.*, 2013 ; Koivusalo *et al.*, 2010). Ces 2 inhibiteurs agissent directement ou indirectement pour bloquer la polymérisation d'actine indispensable au cours de la macropinocytose.

Ainsi, les cellules THP1 induites au PMA sont pré-traitées avec de la cytochalasine D ou de l'EIPA, avant d'être incubées en présence de la CRTr-A488. L'analyse en cytométrie de la fluorescence des cellules représentée dans la figure 38 montre que la cytochalasine D (figure 38.c) et l'EIPA (figure 38.d) sont capables, tous les deux, d'inhiber significativement l'absorption de la protéine fluorescente par les cellules. Cela se traduit par une diminution de plus de 50% de la moyenne de fluorescence dans les 2 conditions par rapport à celle obtenue avec les cellules non traitées (figure 38.b). Ces résultats confirment l'observation faite en microscopie et démontrent que l'internalisation de la CRT exogène dans les macrophages s'effectue bien selon un mécanisme de macropinocytose.

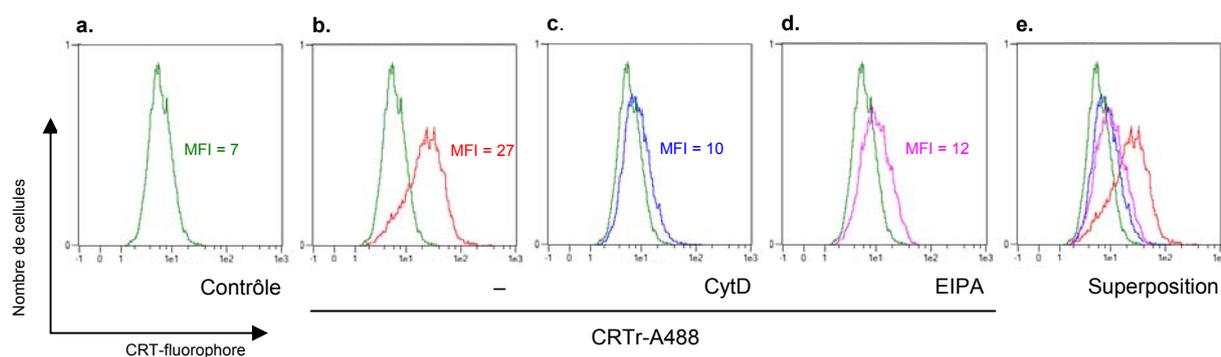


Figure 38. Analyse de l'internalisation de la CRT exogène par les macrophages traités par la cytochalasine D et l'EIPA.

Les phagocytes différenciés THP1 sont incubés avec 20 μ M de cytochalasine D (CytD) ou 100 μ M d'EIPA pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite mises en contact avec 10 μ g/ml de CRTr-A488 pendant 1 h à 37 °C. Les résultats de l'absorption de la CRT fluorescente représentés sous forme d'histogrammes sont obtenus en cytométrie. La moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) est indiquée pour chaque condition. Le contrôle correspond aux cellules qui n'ont pas été incubées avec de la CRTr-A488.

Dans le but de déterminer une éventuelle contribution des récepteurs endocytiques dans l'internalisation de la CRT exogène, nous avons étudié le rôle du co-récepteur CD91 associé à la CRT au niveau de la membrane des phagocytes.

Pour cela, j'ai commencé par vérifier l'expression de CD91 à la surface de notre modèle de macrophages THP1. Comme l'illustre l'histogramme A de la figure 39, la majorité de ces cellules exprime significativement CD91 à leur membrane.

J'ai effectué ensuite des expériences pour inhiber la fixation de la CRT exogène en utilisant soit un anticorps spécifique anti-CD91 soit la protéine recombinante RAP (Related-Associated Protein), une chaperonne capable de lier étroitement CD91 et d'inhiber sa liaison avec ses ligands (Bu, 1998). Différentes conditions de blocage ont été testées (changement de concentration, température), sans pouvoir pour autant détecter une variation nette de la fixation de CRT ni avec l'anticorps anti-CD91, ni avec la protéine RAP (résultats non montrés). Des analyses de co-localisation CD91/CRT-A488 en microscopie confocale ont été également effectuées et les sites de co-localisation observés entre les 2 molécules semblaient très rares (figure 39.B).

Ces résultats suggèrent que la fixation/internalisation de la CRT exogène par les phagocytes dans nos conditions ne dépendrait probablement pas du récepteur CD91. Cette fixation pourrait alors impliquer d'autres récepteurs potentiels comme par exemple SREC-1, un récepteur endocytique connu de la calréticuline (Berwin *et al.*, 2004).

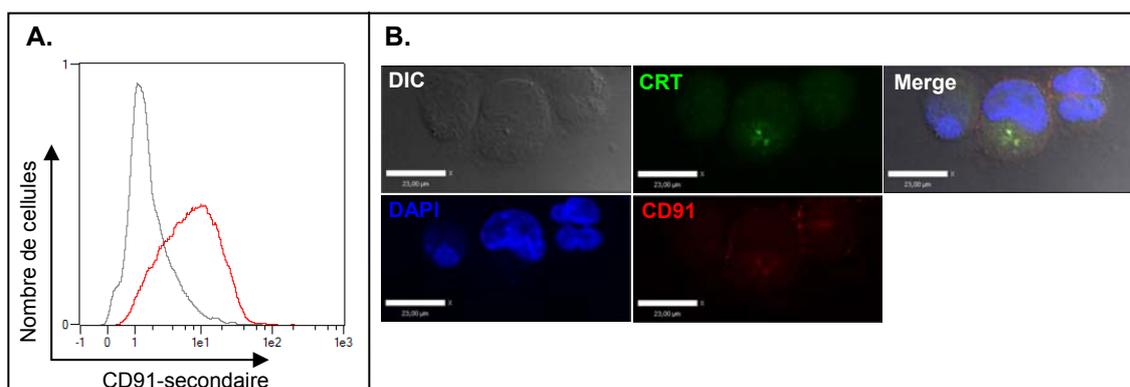


Figure 39. Expression de CD91 sur les macrophages THP1 et comparaison de sa localisation avec celle de la CRT exogène.

A. Vérification par cytométrie de l'expression de CD91 (courbe rouge) à la surface des macrophages THP1. Le contrôle est effectué en absence de l'anticorps primaire anti-CD91 (courbe grise). B. Comparaison par microscopie confocale de la localisation de CD91 et de la CRT exogène dans les macrophages THP1. Pour cela, ces cellules sont immunomarquées par un anticorps primaire anti-CD91 et un secondaire couplé à la cyanine 3. La CRT-A488 (10 µg/ml) est ajoutée lors de l'incubation avec l'anticorps secondaire. Toutes les étapes sont effectuées sur la glace et les cellules sont fixées par la solution de PFA 4% à la fin du marquage.

III.3.4 Conclusion

Les résultats présentés dans cette partie montrent que les cellules phagocytaires sont capables de lier et d'internaliser la CRT d'origine externe, d'une manière probablement indépendante du récepteur CD91.

L'accumulation de la calréticuline dans de larges vésicules endocytaires à l'intérieur des macrophages ainsi que l'inhibition de son internalisation en présence de deux molécules spécifiques (la cytochalasine D et l'EIPA), suggèrent fortement qu'il s'agit d'un mécanisme de macropinocytose.

IV. Discussion et perspectives

Les travaux effectués au cours de cette thèse contribuent à la compréhension de l'implication de la calréticuline exposée à la surface des cellules en apoptose dans l'élimination de ces cellules par phagocytose.

IV.1 L'exposition en surface de la calréticuline est un signal « pré-apoptotique »

Dans la première partie des résultats, l'expression de la CRT à la surface cellulaire à un stade précoce d'apoptose a été étudiée. Après irradiation aux UVB des cellules, nous avons démontré que la CRT est très rapidement exposée à la membrane cellulaire, une exposition qui précède la translocation de la phosphatidylsérine sur le feuillet membranaire externe, changement emblématique associé à l'apoptose. Cette observation est en accord avec le résultat obtenu par le groupe de Kroemer après avoir traité des cellules cancéreuses par des anthracyclines (Obeid *et al.*, 2007a). Henson et ses collègues, qui étaient les premiers à avoir décrit la fonction « eat-me » de la CRT de surface ont, en revanche, démontré que la CRT augmentant à la surface des cellules apoptotiques est redistribuée, d'une manière non exclusive, dans des zones contenant de la PS. Ils ont suggéré ainsi un rôle combiné de ces 2 molécules au cours de l'efferocytose (Gardai *et al.*, 2005). L'interaction entre ces 2 molécules est certainement bien réelle puisqu'elle a été observée et mesurée *in vitro* et *in vivo* (Païdassi *et al.*, 2011 ; Tarr *et al.*, 2010). On a même proposé un rôle de la PS dans la translocation de la CRT sur la membrane des cellules apoptotiques (Tarr *et al.*, 2010). Toutefois, dans nos conditions pré-apoptotiques, il existe un décalage temporel entre l'augmentation de l'une et de l'autre à la membrane cellulaire. Cela indique donc que l'interaction de la PS avec la CRT n'est pas un processus exclusif pour sa translocation à la surface.

D'une manière intéressante, l'analyse de la teneur en CRT des surnageants cellulaires (dans la partie 2 des résultats) a révélé que l'augmentation significative au temps pré-apoptotique peut être expliquée, au moins en partie, par le fait que la CRT nouvellement exposée à la surface des cellules récemment irradiées (IR 30') y est retenue transitoirement. Cette dernière conclusion repose sur la détection fortuite de la CRT dans le milieu conditionné des cellules N IR dont le niveau diminue significativement lorsque l'on analyse le surnageant des

cellules dont l'apoptose vient tout juste d'être induite. L'origine et la fonction de la CRT du milieu des cellules viables restent difficiles à expliquer. Cette situation a été déjà mentionnée dans quelques études de la bibliographie sans pouvoir, pour autant, justifier comment et pourquoi elle a eu lieu (Garg *et al.*, 2012 ; Patel *et al.*, 1999).

Quant à la rétention rapide de la CRT après irradiation, elle peut être expliquée par le fait que l'apoptose pourrait modifier ou moduler la disponibilité de certains acteurs membranaires avec lesquels la CRT peut interagir et qui sont capables de la retenir en surface. Une étude très récente a démontré que CD91, co-récepteur connu de la CRT à la surface des phagocytes, est exprimé à la surface des cellules épithéliales cancéreuses du colon CT26 et aussi des cellules CHO (cellules épithéliales-ressemblantes) (Garg *et al.*, 2012). Les auteurs de cette publication ont trouvé, d'une manière intéressante, que CD91 exprimé par ces cellules contribue à l'ancrage de la CRT à leur membrane. On peut donc suggérer que la CRT s'accroche à la membrane des cellules viables en association avec une/un entité/récepteur comme CD91 ou d'autres encore non définis dont l'expression est modulée par l'apoptose.

IV.2 C1q favorise la phagocytose des cellules pré-apoptotiques *via* son interaction précoce avec la calréticuline

L'exposition très rapide de la calréticuline à la surface cellulaire après l'induction de l'apoptose devrait probablement avoir un rôle dans le processus de l'efferocytose. Pour vérifier cela, des tentatives de diminution de l'expression cellulaire totale de CRT des cellules Jurkat par siARN ainsi que des expériences de blocage par des anticorps spécifiques anti-CRT ont été employées. Les données obtenues n'ont malheureusement pas permis de tirer de conclusions cohérentes.

Toutefois, la technique de siARN ciblant la CRT a été préalablement utilisée avec succès par notre équipe mais sur des cellules HeLa. On a pu démontrer ainsi que les cellules apoptotiques précoces et tardives pour lesquelles l'expression de la CRT est diminuée sont significativement moins phagocytées par les macrophages. De plus, dans le cas des cellules apoptotiques précoces, la diminution de la CRT anéantit l'effet positif de C1q sur la phagocytose (Verneret *et al.*, 2014). La relation de cause à effet déduite de l'étude des cellules HeLa n'est pas une preuve directe de l'implication de la CRT dans la phagocytose car en absence de CRT, C1q peut interagir avec d'autres molécules comme la PS par exemple. En outre, le modèle HeLa précoce nécessitant une trypsination peut modifier l'état des cellules par rapport aux conditions physiologiques. Il était donc important de vérifier sur

le modèle de cellules non adhérentes que C1q et CRT pouvaient interagir directement, que cela était dépendant de l'apoptose et voir si cela était corrélé avec une éventuelle évolution de la phagocytose.

Dans ce but, des expériences de fixation de C1q à la surface cellulaire, des tests de phagocytose ainsi que des essais d'interaction CRT/C1q *in cellulo* par FRET ont été effectués. Les données collectées à l'issue de ces différentes approches permettent de tirer les conclusions suivantes :

1. C1q est capable de se fixer à la surface des cellules IR 30' et d'augmenter significativement leur phagocytose ;
2. C1q se co-localise et interagit directement selon les analyses en FRET avec la CRT fortement exprimée à la surface des Jurkat IR 30' ;
3. La diminution de la quantité de CRT de surface à un temps relativement plus avancé d'apoptose (IR 120') va de pair avec la diminution de fixation de C1q et corrèle avec une perte de signal de FRET. Cela indique que l'efficacité de l'interaction entre les 2 molécules diminue.

Ces résultats suggèrent un rôle très précoce de C1q dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules en début d'apoptose. Ce rôle peut être dû, au moins en partie, à l'interaction rapide de C1q avec le signal « eat-me » CRT significativement exposée à la membrane cellulaire. Toutefois, des données de la littérature décrivent l'implication spécifique de C1q dans la fixation et l'élimination des cellules en apoptose tardive (nécrose secondaire) (Liang *et al.*, 2014 ; Nauta *et al.*, 2002). Dans tous les cas, même si l'on suppose que C1q se fixe significativement plus sur les cellules apoptotiques tardives, il semble comme nous l'avons démontré dans cette étude, que sa fixation sur les cellules en apoptose précoce est bien réelle et a une contribution fonctionnelle très importante. Un autre argument en faveur de l'implication précoce de C1q est l'augmentation significative à la surface cellulaire de ses ligands comme la CRT, la PS, l'ADN et aussi son interaction avec la CRT au cours du stade précoce d'apoptose (Verneret *et al.*, 2014). De plus, une étude intéressante a démontré que des auto-anticorps anti-C1q purifiés à partir du sérum des patients souffrant du lupus érythémateux ciblent préférentiellement le C1q lié à la surface des cellules apoptotiques précoces (Bigler *et al.*, 2009). Toutes ces observations confirment l'action précoce de C1q au cours du développement de l'apoptose, sans pour autant exclure son implication possible aux stades plus avancés.

Un rôle aussi précoce du couple CRT/C1q peut contribuer à l'efficacité de l'efferocytose et tout particulièrement à sa rapidité (prise en charge très précoce des cellules de soi altéré). En effet, l'interaction CRT/C1q permettrait le « nettoyage » des cellules en voie d'apoptose avant que les structures de ces cellules soient irrémédiablement touchées avec le risque du

déversement des composants et pourrait ainsi protéger contre le développement des maladies auto-immunes. Mais pour être efficace, cette interaction nécessite en même temps la présence à proximité de phagocytes capables d'intervenir aussitôt pour procéder à la reconnaissance et à l'élimination. Ici, peut être évoqué le rôle des cellules avoisinantes ou phagocytes non professionnels qui seraient disponibles à proximité du site de l'apoptose.

Concernant la réponse cytokinique vis-à-vis des cellules apoptotiques très précoces, Kurosaka *et al.* ont décrit une réponse macrophagique neutre dans le cas des cellules exposant très faiblement la PS à leur membrane externe (Kurosaka *et al.*, 2003). Il serait intéressant à ce sujet d'étudier comment l'interaction CRT/C1q pourrait jouer dans le contrôle de la réponse inflammatoire au cours de l'efferocytose. En effet, la CRT exposée à la surface des cellules cancéreuses est décrite comme un signal immunogène pré-apoptotique capable de potentialiser la réponse immunitaire alors que C1q est caractérisé par son rôle anti-inflammatoire au cours de la phagocytose des cellules apoptotiques (cf. introduction). Ainsi, l'augmentation au stade pré-apoptotique de la fixation de C1q pourrait contrebalancer un éventuel rôle inflammatoire de la CRT, ce qui pourrait finalement favoriser un environnement tolérogène au cours de l'élimination. Des analyses de la production de cytokines par les phagocytes en contact avec les Jurkat IR 30' seront importantes pour confirmer cette hypothèse.

IV.3 La calréticuline est relarguée par les cellules apoptotiques

La deuxième partie du travail a été consacrée à l'étude de la calréticuline extracellulaire, sa fixation/internalisation par les phagocytes et son influence sur plusieurs de leurs fonctions. La CRT sous forme extracellulaire est détectée en quantité significativement plus importante dans le milieu conditionné des cellules apoptotiques précoces IR 120' en comparaison avec le milieu dans lequel se sont développées des cellules N IR. Conjointement, j'ai observé que la quantité de CRT à la surface des cellules IR 120' est moindre qu'au temps 30 minutes après l'irradiation. Cela suggère que la CRT initialement retenue à la surface cellulaire se décroche/est relarguée.

En apparence contradiction avec nos résultats concernant la CRT, Basu et ses collègues ont proposé que les cellules nécrotiques et non pas les cellules apoptotiques, libèrent de la CRT et des HSPs (Heat Shock Proteins) dans leur milieu conditionné (Basu *et al.*, 2000). Les auteurs de cette publication ont montré, d'une manière intéressante, que les HSPs étaient capables d'interagir, *via* la voie NF- κ b, avec les APCs (Antigen presenting cells) et de provoquer la sécrétion des cytokines par les macrophages et l'expression des molécules de

présentation d'antigène et de co-stimulation par les cellules dendritiques (Basu *et al.*, 2000). La CRT fait partie de la même famille à laquelle appartiennent les HSPs qui est la famille des protéines chaperonnes caractérisée par sa capacité à stimuler les cellules immunitaires (Berwin *et al.*, 2004). Il est donc possible que la CRT, comme pour le cas des HSPs, puisse moduler la réponse des macrophages. Cela a été démontré par plusieurs études qui ont mis en évidence le rôle immunogène de la CRT et sa capacité à influencer sur la sécrétion des cytokines par les phagocytes (cf. introduction). Dans une étude effectuée dans notre laboratoire sur les cellules HeLa, la déficience en CRT a induit des effets antagonistes sur la production de certaines cytokines par les macrophages (Verneret *et al.*, 2014).

IV.4 La calréticuline extracellulaire module les fonctions du macrophage

Au vu de sa présence dans les surnageants de culture de nos cellules apoptotiques, il était intéressant d'étudier l'impact de la CRT exogène sur les phagocytes. En utilisant plusieurs approches cellulaires, nous avons démontré que la CRT exogène peut moduler plusieurs fonctions du macrophage comme la phagocytose, la migration, la prolifération et la différenciation.

La CRT exogène recombinante ajoutée dans le milieu des macrophages THP1 se fixe significativement sur ces cellules. En plus, elle provoque la diminution de l'efficacité d'internalisation vis-à-vis des cellules apoptotiques précoces. Cela n'a été observé que pour la phagocytose des cellules apoptotiques. En effet, si on les remplace par des billes de latex « vierges », aucune variation du taux d'internalisation n'est déduite.

Afin de savoir si cette CRT exogène peut agir directement sur la cellule apoptotique, les cellules ont été incubées avec de la CRT soluble. Cela n'a engendré aucun effet sur leur phagocytose par les macrophages. Cette dernière conclusion corrobore avec l'absence de la fixation de la CRT exogène par les cellules apoptotiques. Ainsi, quand les macrophages sont pré-incubés avec de la CRT, l'effet obtenu est probablement dû à la fixation de cette molécule sur des motifs de la surface phagocytaire impliqués dans la reconnaissance et l'ingestion des cellules apoptotiques. Occupés par la CRT exogène, les récepteurs ne pourraient plus reconnaître et interagir avec la CRT ou d'autres motifs à la surface de la cellule apoptotique et le taux d'internalisation tend par conséquent à diminuer. Cela est cohérent avec le modèle proposé par le groupe de Henson illustré sur la figure 10 de l'introduction qui montre une interaction en *trans* entre la CRT de surface de la cellule apoptotique et le récepteur CD91 de la surface du phagocyte. Ainsi, l'éventuelle occupation du CD91 à la surface du phagocyte par la CRT que nous avons « artificiellement » ajoutée,

pourrait inhiber son interaction avec la CRT « naturellement » exprimée par la cellule apoptotique.

Dans le cas d'une incubation prolongée des phagocytes différenciés avec de la CRT exogène, des modifications morphologiques ont pu être relevées. Le développement des extensions membranaires riches en actine a été observé. Cela est cohérent avec un effet de la CRT dans l'activation de la migration cellulaire. Cet effet a été mesuré par un test de blessure effectué sur les macrophages J774. Ces résultats sont en accord avec plusieurs données de la bibliographie qui mettent en évidence l'implication de la calréticuline dans différentes étapes de la migration cellulaire (Coppolino *et al.*, 1997 ; Kwon *et al.*, 2000 ; Coppolino et Dedhar, 2000 ; McDonnell *et al.*, 1996 ; White *et al.*, 1995 ; Goicoechea *et al.*, 2000). Récemment, Nanney et ses collègues ont reporté l'implication de la CRT exogène dans la cicatrisation des blessures due, en partie, à sa capacité à stimuler la migration cellulaire (Nanney *et al.*, 2008). Dans cette même étude, les auteurs ont déduit que l'implication de la calréticuline dans le mécanisme de cicatrisation vient aussi de son influence sur la prolifération cellulaire. En se basant sur ces données, nous avons étudié la prolifération cellulaire en présence de la forme soluble de CRT.

Le test de prolifération réalisé sur les monocytes THP1 montre une augmentation significative de leur nombre en présence de CRT_r par rapport au contrôle. Ces résultats confirment ceux obtenus par Nanney et ses collègues pour les mêmes cellules (Nanney *et al.*, 2008). Cependant, l'incubation des macrophages matures J774 avec la CRT_r n'a pas d'effet sur leur prolifération. Il semble donc que l'effet de la CRT soit différent en fonction de l'état de différenciation de la cible.

L'effet différentiel de la CRT exogène selon l'état de différenciation du phagocyte est également observé sur le profil du marqueur CD14 à la surface des THP1 induits ou non. En effet, la stimulation au PMA des monocytes THP1, n'exprimant pas le récepteur CD14, induit leur différenciation en macrophages et l'expression significative de cette molécule à leur membrane. D'une manière intéressante, l'ajout de la calréticuline recombinante dans le milieu de culture des macrophages THP1 amplifie significativement cette expression tandis qu'il ne provoque aucune variation dans le cas des monocytes THP1. Par conséquent, si la CRT à elle seule ne semble pas induire la différenciation des phagocytes, elle peut la moduler.

CD14 fait partie des récepteurs PPRs définis par leur capacité à reconnaître les motifs PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) des microbes et aussi les motifs ACAMPs des cellules apoptotiques (Pour revue Jeannin *et al.*, 2008). Plusieurs études de la littérature démontrent la contribution de CD14 à l'élimination des cellules apoptotiques (Thomas *et al.*, 2013 ; Devitt *et al.*, 1998). Toutefois, les données concernant les ligands qu'il est capable de reconnaître à la surface de ces cellules restent très rares. L'implication de la PS a été

analysée et il semble que CD14 ne fonctionne pas préférentiellement comme un récepteur pour cette molécule (Devitt *et al.*, 2003). De même, l'interaction du signal « eat-me » ICAM-3 de la surface des cellules apoptotiques avec CD14 a été examinée sans que les auteurs puissent conclure définitivement sur le rôle de cette interaction dans la phagocytose (Thomas *et al.*, 2013). Hong et ses collègues ont récemment révélé qu'un fragment recombinant de la CRT (N-terminal) est un stimulateur puissant des lymphocytes B et des macrophages *via* la voie TLR-4/CD14 (Hong *et al.*, 2010). Ils ont démontré une interaction par ELISA entre ce fragment de CRT et une protéine de fusion recombinante contenant CD14. C'est la seule donnée bibliographique concernant la relation CRT/CD14 que j'ai pu relever dans la littérature. En prenant en considération nos résultats et ceux de la littérature, on peut suggérer que la voie par laquelle CD14 de la surface des phagocytes intervient dans l'élimination des cellules apoptotiques pourrait inclure la calréticuline des cellules apoptotiques. En plus, le fait que la PS ne soit pas un ligand pour CD14 pose la question de l'état apoptotique de la cellule reconnue par ce récepteur. Dans le cas où il s'agirait d'une phase très précoce d'apoptose, la CRT serait alors un bon « candidat » si on prend en considération nos résultats et ceux d'Obeid (Obeid *et al.*, 2007a) la définissant comme un signal pré-apoptotique.

L'analyse des effets de la calréticuline extracellulaire sur les macrophages suggère qu'ils peuvent impliquer des voies dépendantes du récepteur CD14. Les conséquences de l'interaction entre la CRT soluble et les phagocytes, concernent leur migration, leur prolifération et aussi leur différenciation.

Pour compléter ces travaux, nous avons comme perspective d'analyser la sécrétion des cytokines par les macrophages incubés avec de la CRT recombinante. Les données bibliographiques sur ce sujet sont parfois divergentes : alors que Duo *et al.* ont démontré la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages traités par la CRT soluble *via* l'activation de la voie NF- κ B (Duo *et al.*, 2014), d'autres études ont, au contraire, reporté l'absence de la production de ce type de cytokines par les BMDCs (Bone Marrow-derived Dendritic Cells) (Peters et Raghavan, 2011 ; Krysko et Vandenabeele, 2008) et la production d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) par les lymphocytes B (Hong *et al.* 2013). Cette différence dans la réponse des cellules immunitaires peut être due à la nature de la CRT utilisée mais aussi au type de phagocyte. L'utilisation par exemple d'une forme recombinante tronquée de CRT (fragment N-terminal) provoque la production du TNF α par les macrophages et stimule l'activation et la maturation des lymphocytes B (Hong *et al.*, 2010). De plus, des modifications post-traductionnelles peuvent être aussi responsables de l'immunogénicité de la calréticuline (Wiersma *et al.*, 2015). Une forme citrullinée de la CRT détectée chez les patients souffrant de l'arthrite rhumatoïde, est capable de potentialiser les réponses immunes (Ling *et al.*, 2013 ; 2010). De ce fait, il était important de vérifier sous

quelle forme est relarguée la CRT de nos cellules apoptotiques précoces. Cette partie du travail principalement effectuée par Pascale Tacnet de notre laboratoire, a consisté à caractériser par plusieurs techniques la CRT relarguée dans le milieu des cellules apoptotiques précoces (séquençage N-terminal, Spectrométrie de masse MALDI TOF et Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem). La bande correspondante à la CRT est découpée après migration sur gel des protéines précipitées du surnageant puis analysée par ces différentes techniques. Les résultats obtenus à l'issue de ces analyses sont encore incomplets à cause de la présence d'un mélange protéique riche au niveau de la bande ciblée qui rend l'analyse difficile. Nous attendons encore de pouvoir purifier la CRT des surnageants par immunoprécipitation ou par d'autres techniques afin de la séparer des autres protéines « contaminantes » et de faciliter les analyses qui suivent. Néanmoins, sans avoir pu caractériser avec précision la nature de la CRT du milieu, l'analyse des peptides issus de la digestion trypsinique de la protéine semble confirmer l'absence de la partie C-terminale contenant le peptide KDEL, séquence connue pour la rétention de la protéine dans le RE.

IV.5 La calréticuline interagit avec le macrophage

L'incubation des macrophages avec la calréticuline extracellulaire conduit i) à sa liaison en surface et ii) à son internalisation.

IV.5.1 A la recherche des partenaires de surface

Bien que la présence de la calréticuline à la surface des phagocytes soit bien établie, son origine et le mécanisme de son exposition restent jusqu'à présent, malgré quelques efforts (cf. Introduction), mystérieux. Ce n'est pas le cas de la CRT exposée à la surface des cellules en apoptose où plusieurs voies ont tout de même été proposées (cf. introduction). Selon les données présentées dans la partie 3 des résultats, la CRT exogène ajoutée dans le milieu de culture est capable de se fixer sur la surface des macrophages THP1. Or la quantité de CRT augmente dans le milieu extracellulaire des cellules apoptotiques précoces, on peut suggérer par conséquent qu'une partie de la CRT présente à la membrane des phagocytes pourrait provenir de la fixation de celle relarguée par les cellules en apoptose. Une hypothèse serait donc que la CRT des macrophages soit d'origine extracellulaire.

En revanche, les cellules Jurkat en apoptose précoce ainsi que les N IR (résultats non montrés) n'ont pas la capacité de fixer la CRT exogène ajoutée dans leur milieu. Quelles sont donc les molécules susceptibles de fixer la CRT à la surface du macrophage? J'ai commencé évidemment par étudier le récepteur CD91 très cité pour son association avec la

CRT à la surface des phagocytes. L'incubation des macrophages THP1 avec des ligands spécifiques de CD91 (anticorps anti-CD91 ; RAP) pouvant entrer en compétition avec la CRT exogène n'a pas modifié la fixation de la protéine sur ces cellules. Il était donc difficile de conclure sur le rôle de CD91. Pour expliquer ce résultat, nous avons pensé que CD91 pourrait être déjà « occupé » et saturé par la CRT endogène « initialement » exprimée par les macrophages. Cependant, le double marquage membranaire CRT/CD91 effectué sur ces cellules (figure 40) ne montre pas, ou très peu, de co-localisation entre les 2 molécules. Ces résultats suggèrent que la fixation de la CRT exogène se fait probablement par des voies essentiellement indépendantes de CD91 dans mes conditions. Il se peut aussi que lorsque les cellules sont en situation de phagocytose, les choses changent et des modifications dans l'expression et aussi la disponibilité des molécules de surface se produisent. Quoiqu'il en soit, l'interaction entre CRT et CD91 à la surface du phagocyte, reposant à la base sur des expériences de compétition, n'est pas toujours évidente (Ogden *et al.*, 2001 ; Walters et Berwin, 2005). Ainsi, l'hypothèse concernant la fixation de C1q sur le complexe CRT/CD91 au cours de l'efferocytose a été récemment remise en question par des données d'ELISA et de SPR démontrant l'interaction directe entre C1q et CD91 indépendamment de la CRT (Duus *et al.*, 2010).

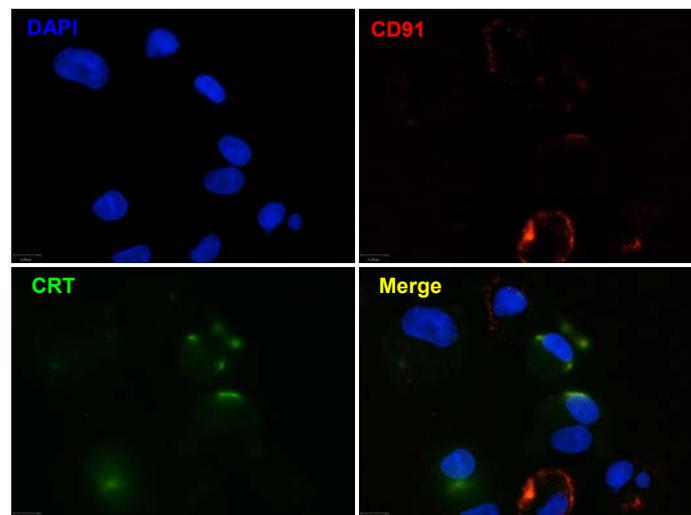


Figure 40. Double marquage CRT endogène/CD91 de la surface des macrophages THP1.

Les cellules THP1 différenciées sont doublement immunomarquées par des anticorps primaires puis des anticorps secondaires couplés à l'A488 et la Cyan 3 pour leur expression respective en surface de CRT endogène et de CD91. Elles sont visualisées en microscopie à épi-fluorescence.

Dans le but d'identifier les partenaires de la CRT exprimés à la surface des macrophages THP1, nous avons effectué des expériences d'overlay entre la CRT recombinante que nous avons biotinylée et les protéines extraites à partir de la membrane plasmique de ces cellules (cf. Matériels et Méthodes). La révélation à la streptavidine-HRP des sites de fixation de la CRT sur la membrane de PVDF contenant les protéines membranaires, montre plusieurs bandes, comme on peut le voir sur la figure 41. Ces bandes ont été ensuite découpées puis analysées par séquençage N-terminal afin de déterminer l'identité des protéines concernées. Nous n'avons pu obtenir de résultat que pour le séquençage de la bande indiquée par une flèche verte sur la figure, qui a révélé la présence de l'enzyme glycolytique GAPDH à ce niveau. A ce stade, il pouvait s'agir d'une détection fortuite due à une contamination. Cependant, des travaux précédents du laboratoire et d'autres équipes, ayant démontré la présence de la GAPDH à la surface cellulaire, les analyses ont été poursuivies (Terrasse *et al.*, 2012 ; Raje *et al.*, 2007). Des études d'interaction par SPR (sur appareil Biacore) réalisées récemment confirment l'interaction entre la CRT et la GAPDH, recombinantes purifiées (résultats non montrés). Cela fait de la GAPDH un partenaire potentiel de la CRT à la surface des macrophages. Il sera donc intéressant de mener des études sur l'interaction CRT/GAPDH (co-localisation, FRET) *in cellulo* (à la surface cellulaire) et sur le rôle et l'implication de cette interaction dans l'efferocytose. Pour le reste des bandes indiquées par des flèches rouges, le séquençage n'a pas donné de résultat à cause de la présence d'un mélange protéique complexe au niveau de chaque bande. Pour cela, il sera nécessaire dans des études futures d'utiliser des méthodes de séparation protéiques plus efficaces comme l'électrophorèse bidimensionnelle afin de mieux purifier les molécules concernées.

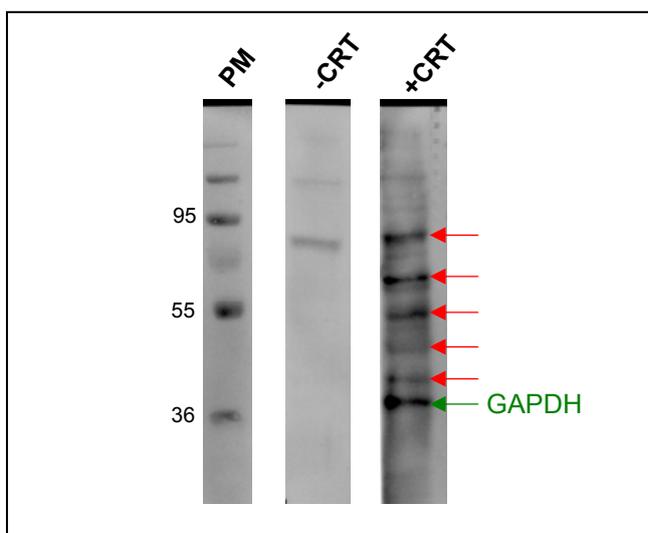


Figure 41. Interaction entre la CRT et les protéines membranaires du macrophage.

200 µg d'extrait protéique membranaire des macrophages THP1 sont déposés sur un gel polyacrylamide 10% puis transférés sur une membrane PVDF (cf. matériels et méthodes). La membrane est ensuite incubée avec 5 µg de CRT recombinante biotinylée puis avec de la streptavidine-HRP afin de révéler les protéines interagissant avec la CRT. Les protéines correspondantes indiquées par les flèches sont récupérées puis analysées par séquençage N-terminal. Un contrôle est effectué en absence de CRT (-CRT). Les flèches rouges indiquent les protéines des bandes que le séquençage n'a pas pu identifier et la flèche verte indique la protéine identifiée. PM : poids moléculaires.

Dans le cadre du projet du laboratoire ayant pour but d'identifier les partenaires de C1q au cours de l'efferocytose, le récepteur « scavenger » SREC-I a été produit sous forme recombinante par Catherine Wiker-Planquart. SREC-1 récemment décrit pour sa contribution *via* C1q à l'élimination des cellules apoptotiques a également été décrit comme pouvant interagir avec la CRT en tant que récepteur endocytique (Ramirez-Ortiz *et al.*, 2013 ; Berwin *et al.*, 2004). Nous l'avons testé pour son interaction avec la CRT par SPR. A l'issue de ces expériences (réalisées par Catherine Wiker-Planquart et Nicole Thielens), les résultats ont confirmé que ces 2 protéines interagissent bien ensemble, avec une affinité de l'ordre de 353 nM (figure 42). Pour compléter ces données, il est nécessaire de mener des expériences *in cellulo* pour s'assurer que cette interaction peut prendre place à la surface du phagocyte.

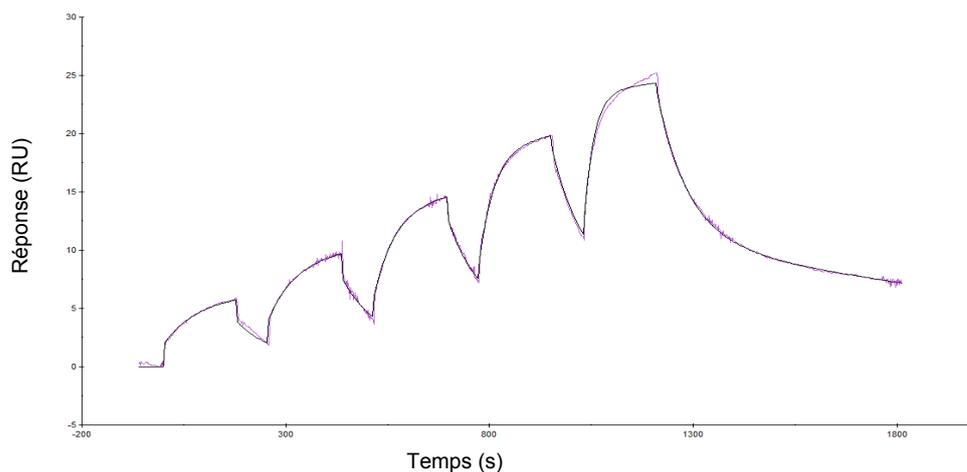


Figure 42. Analyse cinétique de l'interaction entre CRT et SREC-1.

Sensogrammes obtenus par SPR de l'interaction entre les protéines recombinantes CRT et SREC-I. Cinq concentrations croissantes de CRT (0.15 ; 0.3 ; 0.6 ; 1.2 et 2.4 μ M) sont injectées successivement sur la puce où 1845 RU de SREC-I ont été préalablement immobilisées. L'ajustement des données est effectué selon le modèle de ligand hétérogène ou « two state reaction » et est représenté en violet ($K_D = 353$ nM ; $\chi^2 = 0.06$). RU : unité de résonance ; s : seconde.

IV.5.2 Endocytose par macropinocytose

Le marquage des macrophages THP1 incubés avec de la CRT fluorescente à 37 °C reflète un processus d'endocytose. L'examen sous microscope du signal correspondant à la CRT internalisée par les cellules ainsi que l'utilisation de différentes molécules inhibitrices ont démontré qu'il s'agit précisément d'une endocytose par macropinocytose. Il est à noter que la macropinocytose a été décrite comme un mécanisme utilisé par les cellules phagocytaires lors de l'internalisation des cellules apoptotiques (cf. paragraphe I.1.2.4 de l'introduction). Ogden et ses collègues ont démontré que C1q opsonisant les cellules apoptotiques est capable d'induire leur élimination par macropinocytose *via* son interaction avec le complexe CRT/CD91 de la surface des phagocytes (Ogden *et al.*, 2001). De plus, la CRT exogène a été impliquée dans la stimulation de ce processus *via* son interaction avec CD91 de la surface du phagocyte et l'activation ultérieure de la petite protéine GTPase Rac-1 (Gardai *et al.*, 2005). L'implication de Rac-1 est très bien établie au cours de l'élimination des cellules apoptotiques chez l'homme et chez le nématode (cf. paragraphe I.1.2.3). En se basant sur ces données bibliographiques et sur nos résultats, on peut suggérer que la calréticuline venue d'une source extérieure, soluble ou fortement redistribuée à la surface des cellules apoptotiques, peut activer la macropinocytose dans les macrophages. D'une manière intéressante, les cellules présentatrices d'antigènes internalisent par l'intermédiaire de ce processus leurs antigènes présents dans le liquide extracellulaire avant de les traiter et de les présenter en association avec les molécules du CMH aux cellules T (Fuji *et al.*, 2013). On peut donc imaginer que la CRT extérieure, notamment celle « décorant » la surface des cellules en apoptose, est reconnue comme un antigène par les phagocytes, ce qui peut conduire à l'activation du mécanisme de macropinocytose, le traitement et le chargement des peptides issus des cellules apoptotiques et leur éventuelle présentation aux cellules immunitaires. Il est important de mentionner ici que la CRT est impliquée dans le trafic des antigènes auxquels elle s'associe vers les voies de cross-présentation dans les cellules présentatrices d'antigènes (Berwin *et al.*, 2004).

La voie de macropinocytose est paradoxalement utilisée par de nombreux pathogènes pour pénétrer à l'intérieur de leurs hôtes (Mercer et Helenius, 2009 ; Kerr et Teasdale, 2009 ; Lim et Gleeson, 2011). Cela rappelle les travaux du groupe de Ferreira (Ramirez *et al.*, 2011) qui ont récemment démontré que le parasite *Trypanosma cruzi*, responsable de la maladie de Chagas, se sert de la calréticuline présente à sa surface pour infecter et envahir les cellules hôtes. Le parasite mime par sa propre CRT la propriété « eat-me » de la CRT de surface des cellules apoptotiques ce qui provoque l'augmentation de son infectiosité et aide à la propagation de la maladie.

Il est donc possible que la CRT de la surface des particules, pathogènes ou cellules apoptotiques, puisse participer à leur internalisation dans la cellule cible en induisant un processus de macropinocytose. Dans le cadre de l'efferocytose, ce mode d'internalisation connu pour s'achever dans les 20 minutes suivant son initiation dans les macrophages (Fujii *et al.*, 2013), cadrerait avec la rapidité de l'élimination des cellules apoptotiques au cours de l'efferocytose.

IV.5.3 Mot de la fin ...

Les travaux de recherche menés au cours de ces dernières années ont fait de la calréticuline, la protéine chaperonne du réticulum endoplasmique, une molécule complexe de part son implication dans beaucoup de fonctions cellulaires. Les différents résultats obtenus au cours de ma thèse ne sont qu'une preuve de plus de la multifonctionnalité et de la multidisciplinarité de la CRT qui est présente à la surface cellulaire mais aussi dans le milieu extérieur. J'ai rassemblé l'ensemble de ces résultats dans un schéma récapitulatif racontant en quelque sorte l'histoire que nous a délivrée l'étude de la calréticuline au cours de l'efferocytose (figure 43).

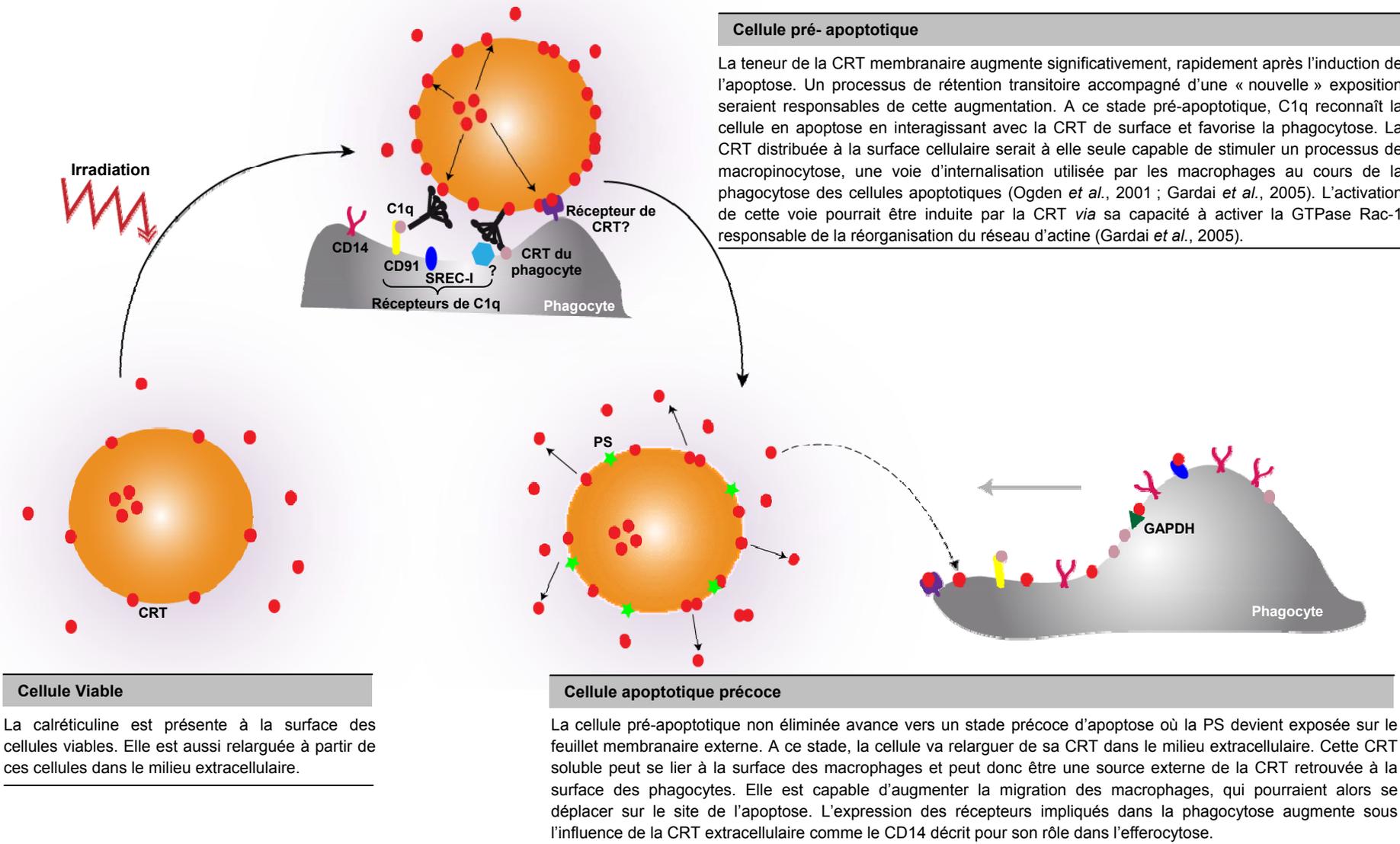


Figure 43. Modèle hypothétique des rôles de la calréticuline dans la phagocytose des cellules apoptotiques très précoces.

Annexe

Publication

Verneret M, Tacnet-Delorme P, **Osman R**, Awad R, Grichine A, Kleman JP, Frchet P. Relative contribution of C1q and apoptotic cell-surface calreticulin to macrophage phagocytosis. *J Innate Immun.* 2014;6(4):426-434. doi:10.1159/000358834.

Congrès

Osman R, Tacnet-Delorme P, Kleman JP, Frchet P. Early contribution of C1q and Calreticulin to the recognition and elimination of apoptotic cells. FEBS EMBO 2014 Conférence 30 aout – 4 septembre, Paris.

Relative Contribution of C1q and Apoptotic Cell-Surface Calreticulin to Macrophage Phagocytosis

Mélanie Verneret^{a-c} Pascale Tacnet-Delorme^{a-c} Rim Osman^{a-c} Rida Awad^{a-c}
Alexei Grichine^d Jean-Philippe Kleman^{a-c} Philippe Frchet^{a-c}

^aInstitut de Biologie Structurale (IBS), Immune Response to Pathogens and Altered Self (IRPAS) Group,
^bCNRS and ^cCEA, DSV, and ^dOptical Microscopy – Cell Imaging Platform, Institut Albert Bonniot, Inserm U823,
Université Grenoble Alpes, Grenoble, France

Key Words

C1q · Calreticulin · Phagocytosis · Apoptotic cells · Interleukins

Abstract

C1q has been shown to recognize apoptotic cells, to enhance their uptake and to modulate cytokine release by phagocytes and thus promote immune tolerance. Surface-exposed calreticulin (CRT), known as a C1q receptor, is also considered to be an early eat-me signal that enhances the phagocytosis of apoptotic cells and is capable of eliciting an immunogenic response. However, the molecular mechanisms that trigger these functions are not clear. We hypothesized that CRT and C1q might act together in these processes. We first showed, by means of fluorescence resonance energy transfer (FRET), that CRT interacts with the C1q globular region at the surface of early apoptotic cells. Next, we pointed out that knockdown of CRT on early apoptotic HeLa cells impairs the enhancement effect of C1q on their uptake by THP-1 monocyte-derived macrophages. Furthermore, a deficiency of CRT induces contrasting effects on cytokine release by THP-1 macrophages, increasing interleukin (IL)-6

and monocyte chemotactic protein 1/CCL2 and decreasing IL-8. Remarkably, these effects were greatly reduced when apoptotic cells were opsonized by C1q, which counterbalanced the effect of the CRT deficiency. These results demonstrate that CRT-C1q interaction is involved in the C1q bridging function and they highlight the particular ability of C1q to control the phagocyte inflammatory status, i.e. by integrating the molecular changes that could occur at the surface of dying cells.

© 2014 S. Karger AG, Basel

Introduction

The well-known complement component C1q [1–4] was described in the last decade for its role in the recognition and removal of apoptotic cells. C1q acts as an opsonin and, by itself, facilitates the uptake of unwanted self-cells by phagocytes [5–9]. Numerous studies have also shown that C1q, which is predominantly synthesized by macrophages and dendritic cells, influences the phagocyte ‘status’ by modulating its differentiation and regulating its cytokine expression [5, 6, 10–12]. Accord-

ingly, mutations in C1q and C1q deficiency are linked to systemic lupus erythematosus autoimmune disease. In addition, genetic variants of C1q are associated with the development of rheumatoid arthritis [9, 13, 14]. The binding of C1q to the apoptotic cell surface is a multi-molecular event which has not yet been completely deciphered. We and others have characterized a number of the molecules that mark the apoptotic cell and serve as C1q ligands via interaction with its globular regions (C1qGR), such as phosphatidylserine (PS) [15], DNA [16, 17], annexins [18], GAPDH [19] and calreticulin (CRT) [20]. To add complexity, some of these molecules have been shown to interact, e.g. PS with CRT or annexins [20–22]. How these interactions modulate apoptotic cell uptake and/or the immune response initiated by the phagocyte is a major question that needs to be solved in order to understand the fragile balance between tolerance and immunogenicity. Recently characterized as an early eat-me signal that enhances the phagocytosis of apoptotic cells [23], surface-exposed CRT (ectoCRT) has been known for a long time to be associated with CD91 at the phagocyte surface and serves as a C1q collagen tail coreceptor, although the consequence of this interaction is still not clear [24, 25]. The way CRT plays out its functions on each side of the phagocytic synapse has still to be elucidated. Interestingly, recent studies have revealed the immunogenic consequences of CRT exposure at the surface of dying cells, and have demonstrated that CRT could trigger an immunogenic response in reaction to proapoptotic/anticancer drugs [26]. The apparent opposite effects of C1q viewed as tolerogenic correlated to the immunosuppressive behavior of apoptotic cells and of CRT mostly described as immunogenic are open to question. They prompted us to examine the combined effect of both proteins on the phagocyte response to apoptotic cells. In a previous study, we demonstrated that CRT binds with a high affinity to C1qGR but also to PS, which is well-recognized by C1q at the surface of early apoptotic cells. Notably, CRT knockdown obtained by specific siRNA, reducing exposure of CRT at the surface of HeLa cells, induces an increase of apoptotic cell binding to C1q [20].

In order to gain insight into the mutual effect of C1q and ectoCRT on the uptake of apoptotic cells, we examined the direct C1qGR-CRT interaction at the surface of apoptotic HeLa cells and measured how full-length C1q (used as an opsonin) and CRT impact the phagocytosis mediated by THP-1-derived macrophages and their cytokine profile.

Materials and Methods

Media, Reagents and Antibodies

Glutamax Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), RPMI 1640, penicillin/streptomycin, trypsin-EDTA, phosphate-buffered saline (PBS) and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) were purchased from Invitrogen. The fetal calf serum was obtained from Dutscher. Dimethyl sulfoxide (DMSO), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), cytochalasin D and lipopolysaccharide (LPS; from *Escherichia coli* 055:B5) were purchased from Sigma-Aldrich. PA1-902A, a chicken polyclonal antibody directed against the N-terminus of CRT, was obtained from Affinity Bioreagents. SPA-601, a mouse monoclonal antibody against CRT, was from Stressgen and rabbit polyclonal antibodies directed against human C1q were from the Immune Response to Pathogens and Altered-Self Group (Institut de Biologie Structurale, Grenoble). Alexa-488-conjugated donkey anti-chicken IgY and cyanine-3-conjugated goat anti-rabbit IgG were from Jackson ImmunoResearch. C1q and C1qGRs were purified from human serum and were prepared and quantified as described previously [27].

Cell Culture, Apoptosis Induction and THP-1 Differentiation

HeLa cells (American Type Culture collection, No. CCL2) were grown in Glutamax DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, penicillin (2.5 U/ml) and streptomycin (2.5 µg/ml) at 5% CO₂. THP-1 cells (American Type Culture collection, No. TIB-202) were cultivated in RPMI supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, penicillin (2.5 U/ml) and streptomycin (2.5 µg/ml) at 5% CO₂. The cells were regularly tested for *Mycoplasma* contamination (Mycoalert detection kit, Lonza). The apoptosis of HeLa cells cultured at 60–80% confluence was induced by UVB irradiation (1,000 mJ/cm²) at 312 nm in fresh DMEM as previously described [15]. Cells were then incubated for the indicated times at 37°C and 5% CO₂. Measurement of early/late apoptosis was performed by flow cytometry using the Annexin V-FITC kit (MACS Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Up to 6 h after the UV irradiation, the cell population was considered to be early apoptotic as propidium iodide labeling had not increased significantly at this time point. Early apoptotic cells harvested 4 or 6 h after UV irradiation were used for the phagocytosis assay and the fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis, respectively. Late apoptotic cells were obtained 20 h after the UV irradiation. To induce the differentiation of THP-1 monocyte cells to macrophages, the cells were treated with 10 nM PMA for 72 h [28, 29]. Evaluation of cell phenotypes was performed by standard flow cytometry using fluorochrome-conjugated antibodies against the cell surface markers CD14, CD11b, CD11c, CD54 and HLA-DR. The appropriate fluorochrome-conjugated isotype control antibodies were used as negative controls. Fluorochrome-conjugated antibodies were obtained from eBioscience for anti-CD11c and anti-CD14. Anti-CD11b, anti-CD54 and anti-HLA-DR were from BD Pharmingen. Flow cytometry data were analyzed with a FACScan flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences) or Flowing software (Turku Center for Biotechnology, Finland).

RNA Interference

Cells were transfected with siRNA as described previously [20]. Briefly, HeLa cells were transfected with lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) by siRNA specific for CRT or by its complementary

inverse sequence as a control at a final concentration of 10 nM. Forty-eight hours after each transfection, cells were systematically assessed for their CRT content by Western blotting of total cell lysate using mouse anti-CRT monoclonal antibody SPA-601 (1:1,000). As demonstrated previously [20], siRNA CRT treatment induces a decrease of 49–79% in surface-exposed CRT (i.e. it corresponds to a lower surface exposure of CRT of about 2- to 5-fold depending on the variability observed after transient cell transfections).

Confocal Microscopy and FRET Quantification

Cells were washed in PBS and fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde at 37°C (EM Grade, Electron Microscopy Science). HeLa cells were then incubated with C1qGR or C1q (10 µg/ml) in PBS-1% BSA for 1 h at room temperature. CRT and bound C1qGR were then detected by indirect immunofluorescence with the PA1-902A chicken polyclonal anti-CRT antibody at 10 µg/ml and a rabbit polyclonal anti-C1q antibody was diluted 1:100. Bound antibodies were visualized with Alexa-488-conjugated donkey anti-chicken IgY and cyanine-3-conjugated goat anti-rabbit IgG; both secondary antibodies were diluted 1:200. Cells were mounted on glass slides with Vectashield HardSet solution (Vector Laboratories) and were visualized with a laser confocal fluorescence microscope LSM 710 (Zeiss) using a Plan-Apochromat 63×/1.4 oil with a 512 × 512 pixels scan. The efficiency of FRET is measured as a relative increase in donor fluorescence (Alexa-488) following the specific photobleaching of the acceptor fluorophore, which is cyanine-3. Several photobleaching steps with moderate laser power were performed and the data obtained were extrapolated by the linear regression fit to a zero-acceptor point in order to get more reliable estimation of FRET efficiency, independent of the degree of acceptor photobleaching or local variations of pixel intensities. The analysis of the fluorescence intensity of the fluorophore and the FRET efficiency were evaluated with the Volocity software (Perkin Elmer). Control FRET experiments using the antibodies (i.e. anti-C1q and anti-CRT plus the secondary-conjugated antibodies) in the absence of C1qGR showed no colocalization. In addition, the use of secondary antibodies alone in the presence of C1qGR indicated that none of the secondary antibodies interacted nonspecifically.

Uptake of Apoptotic Cells

The protocol was adapted from Fraser et al. [5]. HeLa cells were labeled with CFSE as follows: they were washed twice and then resuspended at 1×10^6 cells/ml in PBS and incubated with 5 µM CFSE at 37°C for 15 min. The remaining CFSE was quenched with DMEM-10% FCS, and the cells were then washed 3 times before the induction of apoptosis or siRNA transfection. Prior to phagocytosis, live or apoptotic HeLa cells were preincubated with 0 or 25 µg/ml C1q in RPMI 1640-10% FCS for 30 min at 37°C, washed and then added to THP-1-derived macrophages at a ratio of 1:1. The cells were then placed in contact for 1 h at 37°C and 5% CO₂ after centrifugation for 5 min at 300 g. After incubation, cells were harvested with 0.25% trypsin/EDTA. The trypsin reaction was stopped with medium containing 10% FCS. Cells were pelleted by centrifugation at 300 g for 5 min, washed with PBS and resuspended in PBS-1% BSA for staining. THP-1 macrophages were stained with mouse anti-human CD11c-phycoerythrin (PE) or mouse IgG1-PE isotype control for 1 h on ice. The cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room tem-

perature, and then resuspended in PBS before FACS analysis. Phagocytosis was calculated as the percent of the double CFSE and CD11c-PE-labeled cells in the THP-1 macrophage population (CD11c-PE-positive cells). Phagocytosis negative controls performed at 4 or 37°C in the presence of 5 µM of cytochalasin (to block the uptake) showed ≤5% of the double CFSE and CD11c-PE-labeled cells.

Quantification of Cytokine Release

Cells were treated essentially according to the uptake assays described above, but unlabeled live or apoptotic HeLa cells were used. After the uptake of apoptotic cells, phagocytic cells were washed with PBS and resuspended in RPMI 1640-10% FCS. Supernatants were harvested for cytokine analysis 18 h after the phagocytosis assay (and in some conditions, after the addition of 30 ng/ml LPS), centrifuged to remove cellular debris and stored at -80°C until analysis. Cytokine production was analyzed in the same sample using a BD Cytometric Bead Array (BD Biosciences) for the detection of interleukin (IL)-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, tumor necrosis factor-alpha (TNFα) and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1/CCL2) [30]. Analyses were performed at the Etablissement Français du Sang, Grenoble.

Results

The C1q Globular Regions and Calreticulin Interact at the Surface of Early Apoptotic Cells

We developed a FRET strategy to detect C1qGR interaction with endogenous ectoCRT. With our approach, exogenous C1qGR and cell-surface CRT were detected using specific antibodies. Analyses were performed on viable and UV-treated apoptotic HeLa cells. FRET was evaluated after acceptor photobleaching (Cy-3 dye, C1qGR labeling) by measuring donor fluorescence increase (Alexa-488 dye, CRT labeling). Representative images of C1qGR-CRT colocalization areas detected on early apoptotic cells (6 h after UV irradiation) and the corresponding FRET efficiency curves are shown in figure 1. On cells without visible membrane bleb, a significant FRET efficiency of about 6–12% was measured on all colocalization areas. The presence of a FRET signal, in spite of the spacing created by the antibodies, indicates the close proximity of the fluorophores and the direct interaction of the labeled proteins. An example of C1qGR and CRT colocalization and the corresponding FRET analysis (displaying a FRET efficiency of about 8%) is shown in figure 1a. Interestingly, for cells displaying the characteristic surface blebs (fig. 1b), which indicates that cells are in a more advanced stage of apoptosis, the result was heterogeneous. Indeed, some patches presented a FRET-positive signal similar to that observed previously (fig. 1a), but for most of the areas, no FRET signal could

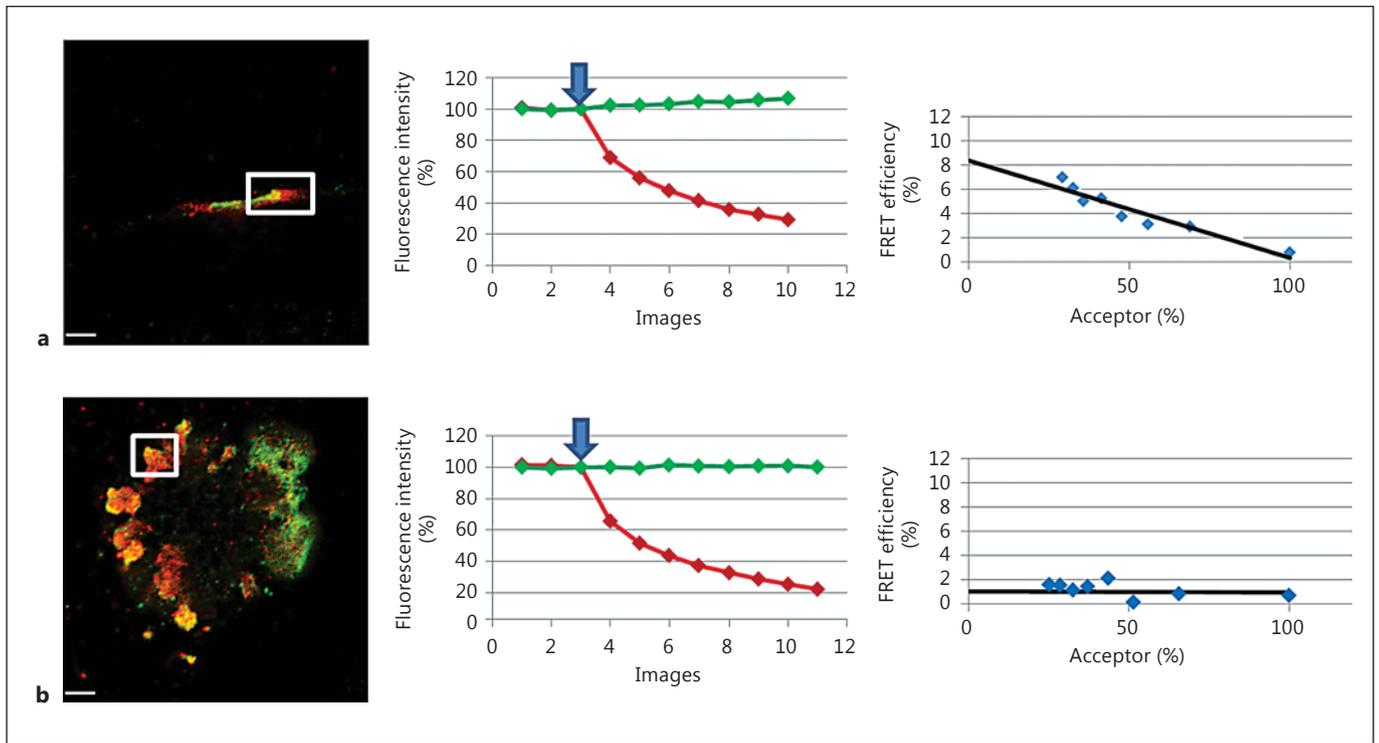


Fig. 1. FRET study of C1qGR and CRT at the surface of apoptotic HeLa cells. FRET efficiency was estimated by photobleaching of the acceptor dye (Cy-3) on nonpermeabilized cells incubated with C1qGR and immunolabeled for CRT (Alexa-488) and C1qGR (Cy-3) as described in Materials and Methods. **a** Apoptotic cell without visible membrane bleb. **b** Apoptotic cell with characteristic membrane blebs. Regions used for the acceptor photobleaching

and FRET analysis are shown. Bars: 5 μ m. Middle: curves corresponding to the normalized fluorescence intensities of both dyes (Cy-3 in red and Alexa-488 in green) expressed as a percent of the signal measured before the gradual photobleaching started (blue arrow). Right: FRET efficiency (percent of acceptor fluorescence intensity increase) is expressed as a function of the percent of the normalized acceptor fluorescence intensity.

be detected (fig. 1b). This suggests that C1qGR-CRT interaction is mostly a feature of the earlier stages of apoptosis.

Downregulation of Calreticulin on Apoptotic Cells Impacts Their Uptake and the C1q Effect on Phagocytosis

In order to analyze the CRT effect on the uptake of apoptotic HeLa cells by macrophages, we measured the capacity of PMA-stimulated THP-1 cells to phagocytose siRNA-treated HeLa cells. siRNA-CRT treatment induced a very efficient knockdown of CRT (fig. 2), resulting in a decrease in the amount of surface CRT of about 2- to 5-fold when compared to control cells (as determined previously after biotinylation of cell-surface proteins [20]). Viable or apoptotic HeLa cells labeled with CFSE and partially depleted for CRT were submitted to differentiated THP-1. The percentage of CD11c-positive

macrophages, which had engulfed HeLa cell(s), was determined by flow cytometry as described in Materials and Methods. To assess specifically the effect of C1q on phagocytosis, and because its globular regions alone do not promote cell-cell bridging, whole C1q (25 μ g/ml) was used to opsonize apoptotic HeLa cells prior to the macrophage-target cell contact. As illustrated for a representative experiment (fig. 2), HeLa cells were efficiently engulfed by THP-1 macrophages and the phagocytosis increased with the development of apoptosis. CRT-deficient apoptotic cells (siRNA CRT) were significantly less engulfed than control siRNA-treated cells (siRNA ct), at either an early or a late stage of apoptosis (i.e. 4 or 20 h after UV irradiation). As expected from the published data [5], C1q only slightly but specifically enhanced the phagocytosis of early apoptotic cells. Remarkably, this was not observed for CRT-deficient cells. In our assays, C1q had no effect on the phagocytosis of late apoptotic cells.

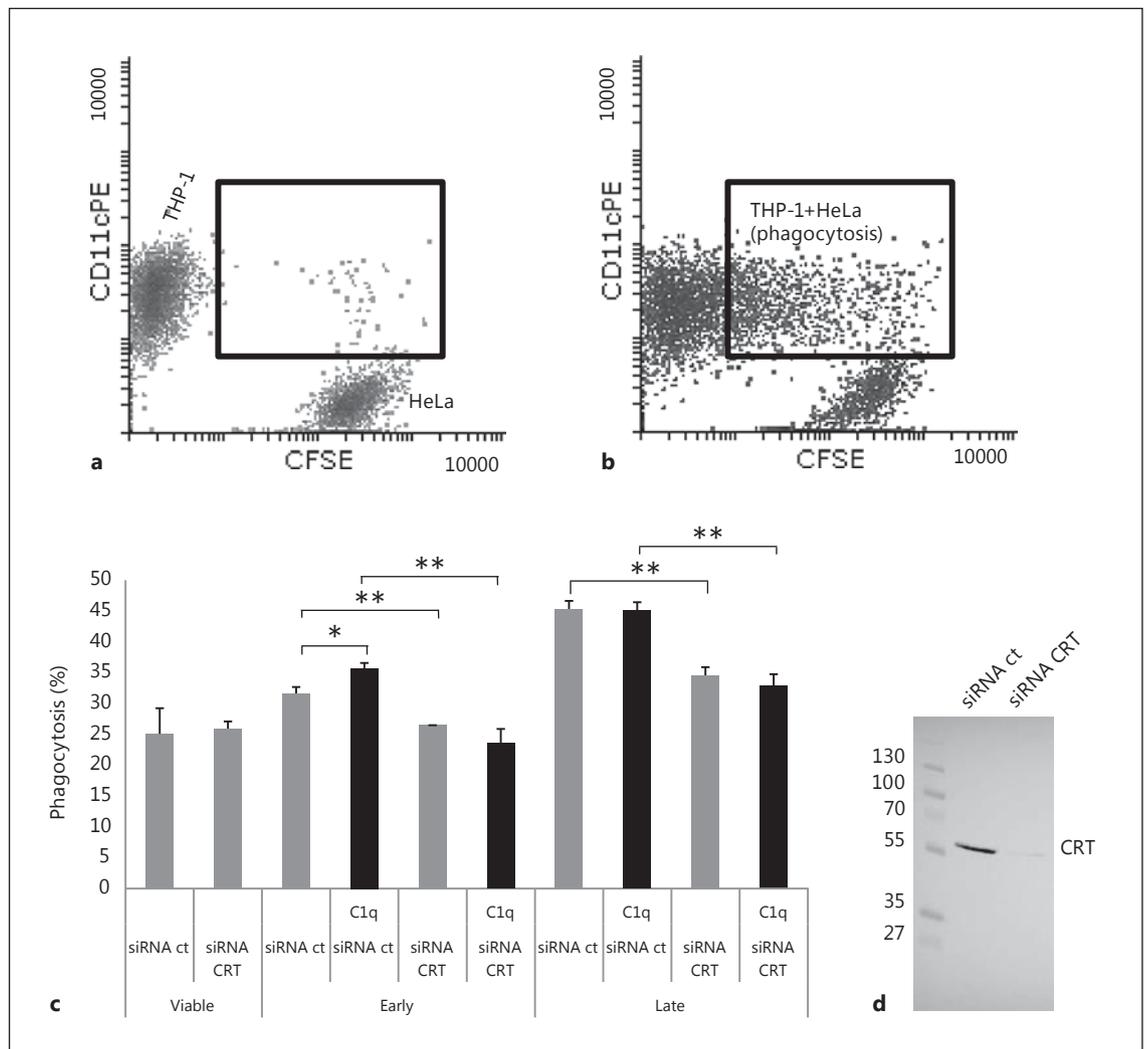


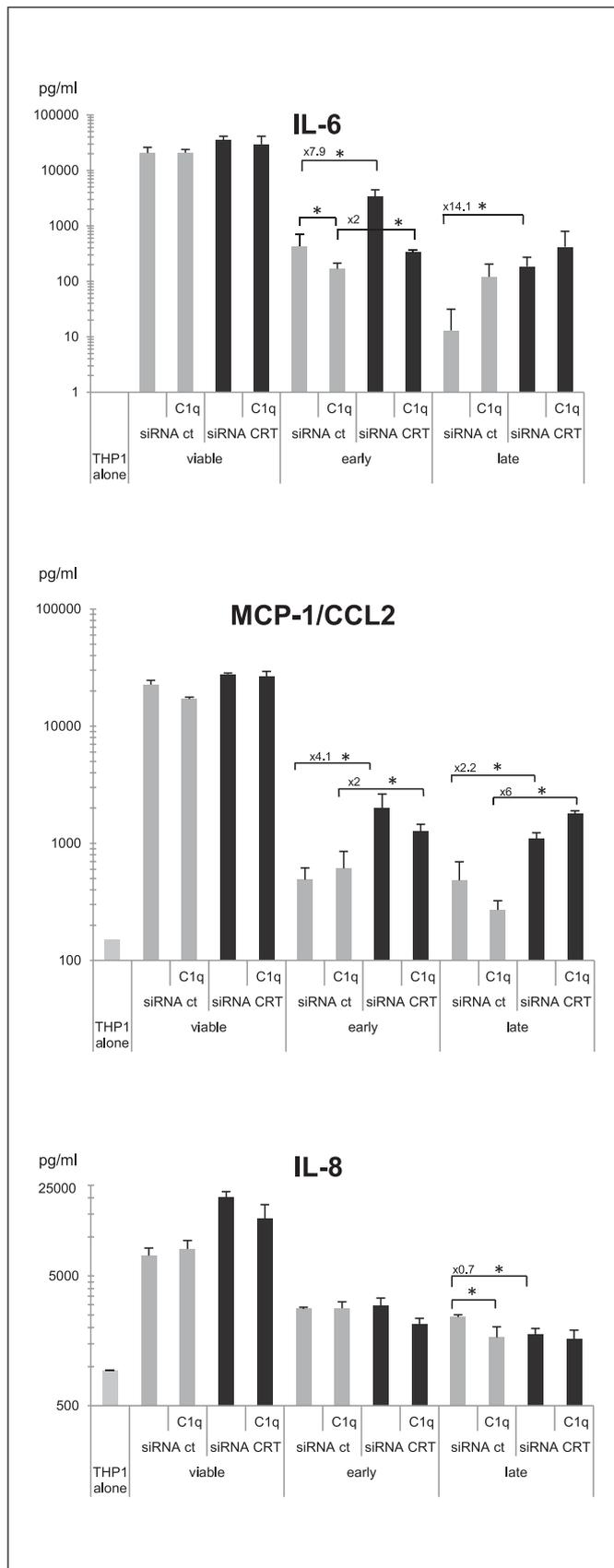
Fig. 2. Effect of CRT deficiency and of exogenous C1q on the uptake of early and late apoptotic cells. Early or late apoptotic HeLa cells labeled with CFSE, opsonized or not with C1q (25 μ g/ml), were incubated with PMA-treated THP-1 cells at a ratio of 1:1 for 1 h at 37°C. THP-1 macrophages were labeled with an anti-CD11c-PE antibody just prior to flow cytometry analysis. **a** Dot-plot of a negative control phagocytosis performed at 4°C (negative control). **b** Dot-plot of the phagocytosis at 37°C (corresponding to late apoptotic CRT-deficient cells). **a, b** Inset shows macrophages that

had engulfed HeLa cells (double-labeled cells). **c** Phagocytosis is expressed as the percent of the double-labeled cells in the macrophage population (i.e. CD11c-positive cells). Data are the mean \pm SD of triplicates of a representative experiment of 5. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, ANOVA 1-way test. **d** Representative SDS-PAGE analysis and immunoblotting of CRT expressed on siRNA-treated HeLa cells; 20 μ g of soluble proteins were analyzed. The molecular mass markers (expressed in kilodaltons) are shown.

C1q and CRT Act Together in Regulating the Cytokine Profile

As it has already been shown that apoptotic cells, C1q and CRT have immunomodulatory effects on phagocytic cells, we next investigated IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, MCP-1/CCL2 and TNF α cytokine production in our model. This analysis was performed under sterile conditions (i.e. in the absence of a microorganism com-

ponent) to avoid the influence of other cytokine modulating factors. Under these conditions, IL-10 and TNF α were not detected, and IL-1 α , IL-1 β and IL-12 were only detected at a low level (data not shown). In contrast, the proinflammatory IL-6, IL-8 and MCP-1/CCL2 cytokines were efficiently produced and modulated by THP-1 macrophages after incubation with HeLa cells. As a result of the uptake of viable HeLa cells (fig. 2), THP-1 cells im-



pressively enhanced the production of IL-6, MCP-1/CCL2 and IL-8 (fig. 3). When apoptotic cells were engulfed, these increases were significantly reduced. In addition, efficient CRT knockdown obtained by siRNA CRT treatment (fig. 2d) clearly reduced this anti-inflammatory effect by increasing the release of IL-6 and MCP-1/CCL2 but not IL-8 (fig. 3). Indeed, concentrations of IL-6 and MCP-1/CCL2 were 7.9- and 4.1-fold higher for siRNA CRT early apoptotic cells, compared to siRNA ct cells. Similarly, increases were also observed for late apoptotic cells (14.1- and 2.2-fold for IL-6 and MCP-1/CCL2, respectively). When early apoptotic cells were first opsonized by exogenous C1q, the differences between siRNA CRT and siRNA ct conditions were clearly of a lesser extent for both IL-6 and MCP-1/CCL2 cytokine levels. This suggests that the presence of C1q could compensate for the CRT deficiency. If IL-8 release was not affected by CRT on early apoptotic cells (fig. 3), it nevertheless significantly decreased following the uptake of late apoptotic CRT-deficient cells (i.e. late siRNA CRT vs. late siRNA ct cells). Interestingly, the level of IL-6 was differentially modulated by C1q, depending on the CRT expression on the early apoptotic cells (fig. 4a). The decrease of IL-6 was noticeably more marked for CRT-deficient cells than for control cells. No significant change was observed in response to the uptake of late apoptotic cells. To the contrary, the effect on IL-8 level was observed only for macrophages fed with late apoptotic cells, but, opposite to what we measured for IL-6, C1q affected the level of IL-8 in the phagocytosis of control cells more efficiently than that of CRT-deficient cells (fig. 4b). Finally, the emblematic IL-10 anti-inflammatory cytokine was only produced after LPS-stimulation of THP-1. Even under this condition, the level of IL-10 remained weak and appeared unaffected by CRT and C1q. The same observation was made for TNF α (data not shown).

Fig. 3. Cytokines released from THP-1 macrophages during the uptake of CRT-deficient apoptotic cells. Cytokine production of PMA-treated THP-1 monocytes was analyzed using BDBiosciences Cytometric BeadArray in the supernatant of macrophages fed with early or late apoptotic cells deficient or not for CRT (i.e. siRNA CRT or siRNA ct cells). When indicated, early or late apoptotic cells were opsonized by C1q. Supernatants were collected 18 h after the phagocytosis assay. Data are the average concentrations \pm SD from measurements of 3 independent experiments. * $p \leq 0.05$, Student t test. Control cytokine levels produced by THP-1 alone or fed with viable cells are shown. Fold modulation of the cytokines released in the siRNA CRT versus siRNA ct conditions is reported when differences were statistically significant.

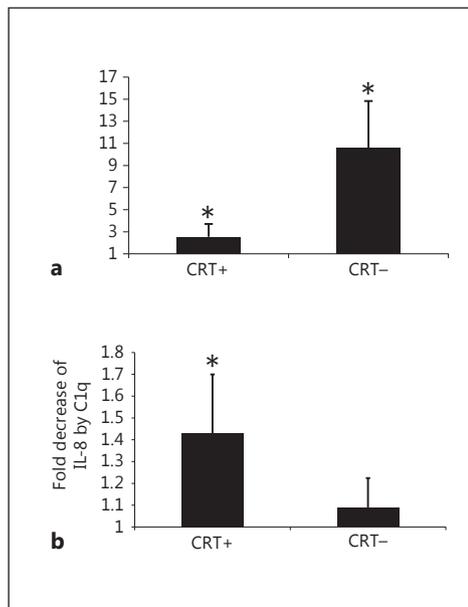


Fig. 4. C1q modulation of IL-6 and IL-8 released from macrophages during the uptake of apoptotic cells. Cytokine levels were measured by analysis of the supernatant of differentiated THP-1 macrophages and fed with early (IL-6) or late (IL-8) apoptotic cells as described for figure 3. Selected results of figure 3 are expressed as fold difference in cytokine concentration (**a** IL-6 and **b** IL-8) compared to control levels from phagocytes, which had ingested apoptotic cells in the absence of C1q. Data are plotted as average fold decreases \pm SD from 3 experiments. * $p \leq 0.05$ (C1q-treated levels vs. control levels in the absence of C1q, Student t test). CRT+ = siRNA control-treated cells; CRT- = siRNA CRT-treated cells.

Discussion

The C1q globular region binds with high affinity to purified CRT and C1qGR partially colocalizes with ectoCRT at the surface of apoptotic cells; this raises the possibility that CRT and C1q act together to modulate the phagocytosis event by their interaction at the apoptotic cell surface. Accordingly, we have previously demonstrated that PS is a common C1q and CRT partner and that CRT knockdown increased C1q binding to apoptotic cell binding, possibly via its interaction with PS [20]. Here, we focused on C1q/CRT interactions that occur at the apoptotic cell surface and their effect on the phagocyte function. We first demonstrated by FRET that C1qGR binds directly to CRT exposed at the apoptotic cell surface, and our observation suggests that this interaction could be dependent on the apoptotic stage. Secondly, we analyzed the consequence of CRT deficiency on the uptake of the cells undergoing apoptosis by THP-1

macrophages. As expected from reports showing that CRT could be an early eat-me signal in the uptake of apoptotic cells, we have shown that CRT-deficient apoptotic HeLa cells were, in effect, less engulfed than control cells. We also observed that CRT deficiency abolished the C1q enhancement of the phagocytosis of early apoptotic cells. This result is logically supported by the direct CRT-C1q interaction and provides evidence that CRT is a C1q ligand involved in the C1q enhancement of apoptotic cell uptake at the early stage of apoptosis. However, together with our previous observation that reducing surface CRT exposure on early apoptotic cells induces a significant increase of C1q binding [20], this indicates that the presence of C1q at the cell surface is not sufficient for its bridging function. This also underlines that functions supported by C1q are dependent on the accessibility of its ligands on the apoptotic cell, and suggests that binding events could modulate responses triggered by C1q. To get an insight into C1q function in signaling and its possible partnership with ectoCRT in this process, we have quantified cytokines released from phagocytic THP-1 macrophages. Our findings indicated that, if apoptotic cell engulfment has anti-inflammatory consequences as IL-6, MCP-1/CCL2 and IL-8 levels are dramatically reduced, CRT deficiency on apoptotic cells induces contrasting effects on cytokine production, increasing IL-6 and MCP-1/CCL2 and decreasing IL-8. We conclude that CRT exposed at the apoptotic cell surface led to a downregulation of the expression of IL-6/MCP-1 and an upregulation of IL-8, thus suggesting that the global inflammatory response triggered by CRT is a complex equilibrium. Moreover, this should be dependent on the phagocyte differentiation. Interestingly, MCP-1/CCL2 and IL-6, which are among the most prevalent cytokines in the tumor microenvironment, have been shown to promote the survival of mononuclear cells and induce anti-inflammatory M2-type macrophage polarization [31]. Their downregulation mediated by CRT exposed at the surface of dying cells could be in favor of a more efficient immunogenic response. Remarkably, when apoptotic cells were opsonized by C1q, the CRT deficiency effects were greatly reduced, either with an IL-6 increase or an IL-8 decrease. Besides, we showed that C1q differentially modulated IL-6 and IL-8 releases by THP-1 macrophages during the phagocytosis of normal or CRT-deficient cells. Its anti-inflammatory effect is significantly higher on CRT-deficient cells with regard to the IL-6 release and is more efficient on normal cells for the IL-8 release (fig. 4), thus counterbalancing the effect of the CRT deficiency (fig. 3). It should be noted that C1q is also known to enhance IL-8

production by human umbilical vein endothelial cells in a CRT-dependent way [32]. Accordingly, we have observed that C1q enhances the production of IL-8 and IL-6 by HeLa cells (data not shown). This represents <1.5% of the amount of cytokines measured during phagocytosis and could thus not significantly influence our conclusion.

In this study, we focused on the C1q/CRT interaction at the apoptotic cell surface known to be mediated by the C1q globular region. We analyzed how this impacts on the phagocyte response. However, it should be kept in mind that CRT is also present at the macrophage surface, and it was proposed to act with CD91 as a coreceptor of the collagen tail of C1q. The functional consequence of this interaction is still unclear and needs further elucidation.

In our opinion, a key element is likely the C1q/PS/CRT partnership. Indeed, PS which is well-known for being linked to the anti-inflammatory effects triggered by apoptotic cells [33], interacts with both CRT and C1q. Our previous study suggested that surface CRT level could modulate C1q/PS binding, thus possibly modifying PS recognition by other phagocyte receptors and bridging molecules, and consequently affecting the downstream signaling events. To add complexity, other serum PS-binding molecules have been shown to regulate C1q func-

tion such as factor H and beta 2-glycoprotein 1 [34, 35], suggesting that they could also modulate interaction with CRT and the global inflammatory responses.

In conclusion, our observations highlight the crucial role of C1q in tissue homeostasis in controlling the inflammatory phagocyte status. Most notably, our data emphasize the dual role of C1q on uptake and on signaling events during the elimination of apoptotic cells. We are convinced that the versatile binding properties of C1q are a key element at the disposal of the phagocyte for integrating the subtle modifications which appear on its prey.

Acknowledgments

We thank David Laurin and Caroline Aspard from the Etablissement Français du Sang, Grenoble for their help on cytokine detection, Françoise Lacroix from the IBS platform of the Partnership for Structural Biology and the Institut de Biologie Structurale in Grenoble for assistance and access to the epifluorescence microscope facility and Sarah Ancelet for purification of C1q and its globular regions. We are grateful to Nicole Thielens for her critical reading of the manuscript and for her helpful assistance.

M.V. was supported by a PhD grant from University Joseph Fourier-Grenoble and R.A. and R.O. by PhD grants from provinces of South and North Lebanon, respectively. This work was supported in part by the French National Research Agency (ANR-09-PIRI-0021), Association Espoir and GEFLUC (Isère).

References

- 1 Gaboriaud C, Frachet P, Thielens NM, Arlaud GJ: The human C1q globular domain: structure and recognition of non-immune self ligands. *Front Immunol* 2011;2:92.
- 2 Korb LC, Ahearn JM: C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol* 1997;158:4525–4528.
- 3 Navratil JS, Watkins SC, Wisnieski JJ, Ahearn JM: The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. *J Immunol* 2001;166:3231–3239.
- 4 Nayak A, Ferluga J, Tsolaki AG, Kishore U: The non-classical functions of the classical complement pathway recognition subcomponent C1q. *Immunol Lett* 2010;131:139–150.
- 5 Fraser DA, Laust AK, Nelson EL, Tenner AJ: C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *J Immunol* 2009;183:6175–6185.
- 6 Fraser DA, Pisalyaput K, Tenner AJ: C1q enhances microglial clearance of apoptotic neurons and neuronal blebs, and modulates subsequent inflammatory cytokine production. *J Neurochem* 2010;112:733–743.
- 7 Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS: Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a008748.
- 8 Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Arlaud GJ, Frachet P: How phagocytes track down and respond to apoptotic cells. *Crit Rev Immunol* 2009;29:111–130.
- 9 Lu JH, Teh BK, Wang L, Wang YN, Tan YS, Lai MC, Reid KB: The classical and regulatory functions of C1q in immunity and autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 2008;5:9–21.
- 10 Castellano G, Woltman AM, Schlagwein N, Xu W, Schena FP, Daha MR, van Kooten C: Immune modulation of human dendritic cells by complement. *Eur J Immunol* 2007;37:2803–2811.
- 11 Benoit ME, Clarke EV, Morgado P, Fraser DA, Tenner AJ: Complement protein C1q directs macrophage polarization and limits inflammatory activity during the uptake of apoptotic cells. *J Immunol* 2012;188:5682–5693.
- 12 Ghebrehwet B, Hosszu KK, Valentino A, Peerschke EI: The C1q family of proteins: insights into the emerging non-traditional functions. *Front Immunol* 2012;3:52.
- 13 Walport MJ, Davies KA, Botto M: C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology* 1998;199:265–285.
- 14 Trouw LA, Daha N, Kurreeman FA, Bohringer S, Goulielmos GN, Westra HJ, Zhernakova A, Franke L, Stahl EA, Levarht EW, Stoeken-Rijsbergen G, Verduijn W, Roos A, Li Y, Houwing-Duistermaat JJ, Huizinga TW, Toes RE: Genetic variants in the region of the C1q genes are associated with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2013;173:76–83.
- 15 Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehwet B, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Frachet P: C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *J Immunol* 2008;180:2329–2338.
- 16 Elward K, Griffiths M, Mizuno M, Harris CL, Neal JW, Morgan BP, Gasque P: CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *J Biol Chem* 2005;280:36342–36354.

- 17 Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Lunardi T, Arlaud GJ, Thielens NM, Frachet P: The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition. *FEBS Lett* 2008;582:3111–3116.
- 18 Martin M, Leffler J, Blom AM: Annexin A2 and A5 serve as new ligands for C1q on apoptotic cells. *J Biol Chem* 2012;287:33733–33744.
- 19 Terrasse R, Tacnet-Delorme P, Moriscot C, Perard J, Schoehn G, Vernet T, Thielens NM, Di Guilmi AM, Frachet P: Human and pneumococcal cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins are both ligands of human C1q protein. *J Biol Chem* 2012;287:42620–42633.
- 20 Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Verneret M, Gaboriaud C, Houen G, Duus K, Ling WL, Arlaud GJ, Frachet P: Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition. *J Mol Biol* 2011;408:277–290.
- 21 Tarr JM, Young PJ, Morse R, Shaw DJ, Haigh R, Petrov PG, Johnson SJ, Winyard PG, Eggleton P: A mechanism of release of calreticulin from cells during apoptosis. *J Mol Biol* 2010;401:799–812.
- 22 Gerke V, Moss SE: Annexins: From structure to function. *Physiol Rev* 2002;82:331–371.
- 23 Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM: Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 2005;123:321–334.
- 24 Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, Henson PM: C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 2001;194:781–795.
- 25 Donnelly S, Roake W, Brown S, Young P, Naik H, Wordsworth P, Isenberg DA, Reid KB, Eggleton P: Impaired recognition of apoptotic neutrophils by the C1q/calreticulin and CD91 pathway in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006;54:1543–1556.
- 26 Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Metivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccosanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G: Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007;13:54–61.
- 27 Tacnet-Delorme P, Chevallier S, Arlaud GJ: 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* 2001;167:6374–6381.
- 28 Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P: Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol* 1996;59:555–561.
- 29 Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y: Potentiation by human serum of anti-inflammatory cytokine production by human macrophages in response to apoptotic cells. *J Leukoc Biol* 2002;71:950–956.
- 30 Varro R, Chen R, Sepulveda H, Apgar J: Bead-based multianalyte flow immunoassays: the cytometric bead array system. *Methods Mol Biol* 2007;378:125–152.
- 31 Roca H, Varsos ZS, Sud S, Craig MJ, Ying C, Pienta KJ: CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J Biol Chem* 2009;284:34342–34354.
- 32 van den Berg RH, Faber-Krol MC, van Wetering S, Hiemstra PS, Daha MR: Inhibition of activation of the classical pathway of complement by human neutrophil defensins. *Blood* 1998;92:3898–3903.
- 33 Huynh ML, Fadok VA, Henson PM: Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 2002;109:41–50.
- 34 Tan LA, Yu B, Sim FC, Kishore U, Sim RB: Complement activation by phospholipids: the interplay of factor H and C1q. *Protein Cell* 2010;1:1033–1049.
- 35 Tan LA, Yang AC, Kishore U, Sim RB: Interactions of complement proteins C1q and factor H with lipid A and *Escherichia coli*: further evidence that factor H regulates the classical complement pathway. *Protein Cell* 2011;2:320–332.

Références

- Albert, M. L. *et al.* Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells *via* alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **188**, 1359–1368 (1998a).
- Albert, M. L., Sauter, B. & Bhardwaj, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**, 86–89 (1998b).
- Andrin, C. *et al.* Expression and purification of mammalian calreticulin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **20**, 207–215 (2000).
- Arlaud, G. J., Sim, R. B., Duplaa, a M. & Colomb, M. G. Differential elution of Clq, Clr and CIs from human CI bound to immune aggregates. Use in the rapid purification of CI subcomponents. *Mol. Immunol.* **16**, 445–450 (1979).
- Arnaudeau, S. *et al.* Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J. Biol. Chem.* **277**, 46696–46705 (2002).
- Arosa, F. A., de Jesus, O., Porto, G., Carmo, A. M. & de Sousa, M. 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**, 16917–16922 (1999).
- Auwerx, J. The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* **47**, 22–31 (1991).
- Bak, S. P., Amiel, E., Walters, J. J. & Berwin, B. Calreticulin requires an ancillary adjuvant for the induction of efficient cytotoxic T cell responses. *Mol. Immunol.* **45**, 1414–1423 (2008).
- Baksh, S. & Michalak, M. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains. *J. Biol. Chem.* **266**, 21458–21465 (1991).
- Balasubramanian, K. & Schroit, A. J. Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 701–734 (2003).
- Barlow, A. L., Macleod, A., Noppen, S., Sanderson, J. & Guérin, C. J. Colocalization analysis in fluorescence micrographs: verification of a more accurate calculation of pearson's correlation coefficient. *Microsc. Microanal.* **16**, 710–724 (2010).
- Bastianutto, C. *et al.* Overexpression of calreticulin increases the Ca²⁺ capacity of rapidly exchanging Ca²⁺ stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function. *J. Cell Biol.* **130**, 847–855 (1995).
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M. & Srivastava, P. K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int. Immunol.* **12**, 1539–1546 (2000).
- Benham, A. M. Protein secretion and the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).

- Benoit, M. E., Clarke, E. V, Morgado, P., Fraser, D. a & Tenner, A. J. Complement protein C1q directs macrophage polarization and limits inflammasome activity during the uptake of apoptotic cells. *J. Immunol.* 188, 5682–5693 (2012).
- Berwin, B. et al. Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *EMBO J.* 22, 6127–6136 (2003).
- Berwin, B., Delneste, Y., Lovingood, R. V., Post, S. R. & Pizzo, S. V. SREC-I, a type F scavenger receptor, is an endocytic receptor for calreticulin. *J. Biol. Chem.* 279, 51250–51257 (2004).
- Bigler, C., Schaller, M., Perahud, I., Osthoff, M. & Trendelenburg, M. Autoantibodies against complement C1q specifically target C1q bound on early apoptotic cells. *J. Immunol.* 183, 3512–3521 (2009).
- Biro, A., Ling, W. L. & Arlaud, G. J. Complement protein c1q recognizes enzymatically modified low-density lipoprotein through unesterified fatty acids generated by cholesterol esterase. *Biochemistry* 49, 2167–2176 (2010).
- Biró, A. *et al.* Modified low density lipoproteins differentially bind and activate the C1 complex of complement. *Mol. Immunol.* 44, 1169–1177 (2007).
- Blachère, N. E., Darnell, R. B. & Albert, M. L. Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation. *PLoS Biol.* 3, 1070–1078 (2005).
- Bohlsón, S. S., O’Conner, S. D., Hulsebus, H. J., Ho, M.-M. & Fraser, D. a. Complement, C1q, and C1q-Related Molecules Regulate Macrophage Polarization. *Front. Immunol.* 5, 1–7 (2014).
- Bohlsón, S. S., Fraser, D. A. & Tenner, A. J. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Molecular Immunology* 44, 33–43 (2007).
- Botto, M. *et al.* Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat. Genet.* 19, 56–59 (1998).
- Brown, S. *et al.* Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* 418, 200–203 (2002).
- Bu, G. Receptor-associated protein: a specialized chaperone and antagonist for members of the LDL receptor gene family. *Curr. Opin. Lipidol.* 9, 149–155 (1998).
- Burns, K. *et al.* Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature* 367, 476–480 (1994).
- Byrne, J. C. *et al.* Bruton’s tyrosine kinase is required for apoptotic cell uptake *via* regulating the phosphorylation and localization of calreticulin. *J. Immunol.* 190, 5207–15 (2013).
- Camacho, P. & Lechleiter, J. D. Calreticulin inhibits repetitive intracellular Ca²⁺ waves. *Cell* 82, 765–771 (1995).

- Castro, C. N. *et al.* Disease-modifying immunotherapy for the management of autoimmune diabetes. in *NeuroImmunoModulation* 17, 173–176 (2010).
- Cavalluci, V. & D'Amelio, M. in *Apoptosome* (eds. Cecconi, F. & D'Amelio, M.) (Springer, 2010).
- Chen, W., Frank, M. E., Jin, W. & Wahl, S. M. TGF- β released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 14, 715–725 (2001).
- Chouquet, A. *et al.* X-ray structure of the human calreticulin globular domain reveals a peptide-binding area and suggests a multi-molecular mechanism. *PLoS One* 6, 1–9 (2011).
- Chung, E. Y. *et al.* Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity* 27, 952–964 (2007).
- Coppolino, M. G. *et al.* Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* 386, 843–847 (1997).
- Coppolino, M. G. & Dedhar, S. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 32, 171–188 (2000).
- Cortés, M. J., Wong-Staal, F. & Lama, J. Cell surface CD4 interferes with the infectivity of HIV-1 particles released from T cells. *J. Biol. Chem.* 277, 1770–1779 (2002).
- Côté, J. F. & Vuori, K. GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends in Cell Biology* 17, 383–393 (2007).
- de Bruyn, M., Wiersma, V. R., Helfrich, W., Eggleton, P. & Bremer, E. The Ever-Expanding Immunomodulatory Role of Calreticulin in Cancer Immunity. *Front. Oncol.* 5, 1–6 (2015).
- DeCathelineau, A. M. & Henson, P. M. The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays Biochem.* 39, 105–117 (2003).
- Decca, M. B. *et al.* Post-translational arginylation of calreticulin: A new isospecies of calreticulin component of stress granules. *J. Biol. Chem.* 282, 8237–8245 (2007).
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I. & Trombetta, E. S. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630–1634 (2005).
- Demaurex, N. & Distelhorst, C. Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. *Science* (80-). 300, 65–7 (2003).
- Denning, G. M. *et al.* Calreticulin biosynthesis and processing in human myeloid cells: demonstration of signal peptide cleavage and N-glycosylation. *Blood* 90, 372–381 (1997).
- Devitt, A. *et al.* Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392, 505–509 (1998).
- Devitt, A., Pierce, S., Oldreive, C., Shingler, W. H. & Gregory, C. D. CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine. *Cell Death Differ.* 10, 371–382 (2003).

- Devitt, A. & Marshall, L. J. The innate immune system and the clearance of apoptotic cells. *J. Leukoc. Biol.* 90, 447–457 (2011).
- Donnelly, S. *et al.* Impaired recognition of apoptotic neutrophils by the C1q/calreticulin and CD91 pathway in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 54, 1543–1556 (2006).
- Dorsett, Y. & Tuschl, T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 318–329 (2004).
- Dudek-Peri, a. M. *et al.* Antitumor Immunity Triggered by Melphalan Is Potentiated by Melanoma Cell Surface-Associated Calreticulin. *Cancer Res.* 75, 1603–1614 (2015).
- Duo, C.-C. *et al.* Soluble calreticulin induces tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-6 production by macrophages through mitogen-activated protein kinase (MAPK) and NF κ B signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 2916–28 (2014).
- Duus, K. *et al.* Direct interaction between CD91 and C1q. *FEBS J.* 277, 3526–3537 (2010).
- Ellgaard, L. *et al.* NMR structure of the calreticulin P-domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3133–3138 (2001).
- Elliott, J. a. & Winn, W. C. Treatment of alveolar macrophages with cytochalasin D inhibits uptake and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 51, 31–36 (1986).
- Elliott, M. R. *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461, 282–286 (2009).
- Elliott, M. R. & Ravichandran, K. S. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J. Cell Biol.* 189, 1059–1070 (2010).
- Elliott, T. & Williams, A. The optimization of peptide cargo bound to MHC class I molecules by the peptide-loading complex. *Immunological Reviews* 207, 89–99 (2005).
- Erllich, P. *et al.* Complement protein C1q forms a complex with cytotoxic prion protein oligomers. *J. Biol. Chem.* 285, 19267–19276 (2010).
- Erwig, L.-P. & Henson, P. M. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 15, 243–250 (2008).
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L. & Henson, P. M. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 5, 551–562 (1998).
- Fadok, V. A. *et al.* A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85–90 (2000).
- Fadok, V. A. *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148, 2207–2216 (1992).
- Fadok, V. A., De Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M. & Bratton, D. L. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for

- phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276, 1071–1077 (2001).
- Feng, M. *et al.* Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: Roles of TLR and Btk. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 201424907 (2015).
- Fliegel, L., Burns, K., MacLennan, D. H., Reithmeier, R. A. & Michalak, M. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 264, 21522–21528 (1989).
- Frchet, P., Tacnet-Delorme, P., Gaboriaud, C. & Thielens, N. M. in *Autoimmunity Pathogenesis Clinical Aspects and Therapy of Specific Autoimmune Diseases* (InTech, 2015). doi:10.5772/60519
- Franz, S. *et al.* After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. *Cell Death Differ.* 14, 733–742 (2007).
- Fraser, D. A., Arora, M., Bohlson, S. S., Lozano, E. & Tenner, A. J. Generation of inhibitory NFkB complexes and phosphorylated cAMP response element-binding protein correlates with the anti-inflammatory activity of complement protein C1q in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 282, 7360–7367 (2007).
- Fraser, D. A., Pisalyaput, K. & Tenner, A. J. C1q enhances microglial clearance of apoptotic neurons and neuronal blebs, and modulates subsequent inflammatory cytokine production. *J. Neurochem.* 112, 733–743 (2010).
- Frickel, E.-M. *et al.* TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1954–1959 (2002).
- Fricker, M., Oliva-Martín, M. J. & Brown, G. C. Primary phagocytosis of viable neurons by microglia activated with LPS or Aβ is dependent on calreticulin/LRP phagocytic signalling. 1–12 (2012). doi:10.1186/1742-2094-9-196
- Fries, D. M., Lightfoot, R., Koval, M. & Ischiropoulos, H. Autologous apoptotic cell engulfment stimulates chemokine secretion by vascular smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.* 167, 345–353 (2005).
- Fujii, M., Kawai, K., Egami, Y. & Araki, N. Dissecting the roles of Rac1 activation and deactivation in macropinocytosis using microscopic photo-manipulation. *Sci. Rep.* 3, 2385 (2013).
- Gaboriaud, C., Frchet, P., Thielens, N. M. & Arlaud, G. J. The human C1q globular domain: Structure and recognition of non-immune self ligands. *Frontiers in Immunology* 2, (2012).
- Gaboriaud, C. *et al.* 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 (2003).
- Galvan, M. D., Greenlee-Wacker, M. C. & Bohlson, S. S. C1q and phagocytosis: the perfect complement to a good meal. *Journal of Leukocyte Biology* 92, 489–497 (2012).

Galvan, M. D., Hulsebus, H., Heitker, T., Zeng, E. L. & Bohlson, S. S. Complement Protein C1q and Adiponectin Stimulate Mer Tyrosine Kinase-Dependent Engulfment of Apoptotic Cells through a Shared Pathway. *J. Innate Immun.* 6, 780–792 (2014).

Gao, B. *et al.* Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity* 16, 99–109 (2002).

Gao, Y., Herndon, J. M., Zhang, H., Griffith, T. S. & Ferguson, T. A. Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 188, 887–896 (1998).

Gardai, S. J. *et al.* Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123, 321–334 (2005).

Gardai, S. J., Bratton, D. L., Ogden, C. A. & Henson, P. M. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J. Leukoc. Biol.* 79, 896–903 (2006).

Garg, a D., Martin, S., Golab, J. & Agostinis, P. Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation. *Cell Death Differ.* 21, 26–38 (2014).

Garg, A. D. *et al.* A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *The EMBO Journal* 31, 1062–1079 (2012).

Garin, J. *et al.* The phagosome proteome: Insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.* 152, 165–180 (2001).

Gelebart, P., Opas, M. & Michalak, M. Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 260–266 (2005).

Ghebrehiwet, B., Hosszu, K. K., Valentino, A. & Peerschke, E. I. B. The C1q family of proteins: Insights into the emerging non-traditional functions. *Frontiers in Immunology* 3, (2012).

Ghiran, I., Klickstein, L. B. & Nicholson-Weller, A. Calreticulin is at the surface of circulating neutrophils and uses CD59 as an adaptor molecule. *J. Biol. Chem.* 278, 21024–21031 (2003).

Goicoechea, S., Orr, A. W., Pallero, M. A., Eggleton, P. & Murphy-Ullrich, J. E. Thrombospondin mediates focal adhesion disassembly through interactions with cell surface calreticulin. *J. Biol. Chem.* 275, 36358–36368 (2000).

Gold, L. I. *et al.* Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J.* 24, 665–683 (2010).

Golpon, H. A. *et al.* Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth. *FASEB J.* 18, 1716–1718 (2004).

Gozuacik, D. & Kimchi, A. *Autophagy and Cell Death.* 78, 217–245 (2007).

Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 353–363 (2009).

Gude, D. R. *et al.* Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a ‘come-and-get-me’ signal. *FASEB J.* 22, 2629–2638 (2008).

Guo, L. *et al.* COUP-TF1 Antagonizes Nkx2.5-mediated Activation of the Calreticulin Gene during Cardiac Development. *J. Biol. Chem.* 276, 2797–2801 (2001).

Guo, L. *et al.* Cardiac-specific expression of calcineurin reverses embryonic lethality in calreticulin-deficient mouse. *J. Biol. Chem.* 277, 50776–50779 (2002).

Harada, K. *et al.* Calreticulin negatively regulates the cell surface expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 281, 12841–12848 (2006).

Henson, P. M. Dampening inflammation. *Nat. Immunol.* 6, 1179–1181 (2005).

Henson, P. M. & Hume, D. A. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends in Immunology* 27, 244–250 (2006).

Hochreiter-Hufford, A. & Ravichandran, K. S. Clearing the dead: Apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, (2013).

Hoffmann, P. R. *et al.* Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J. Cell Biol.* 155, 649–659 (2001).

Hong, C. *et al.* Functional analysis of recombinant calreticulin fragment 39-272: implications for immunobiological activities of calreticulin in health and disease. *J. Immunol.* 185, 4561–4569 (2010).

Hong, C., Zhang, T. & Gao, X. M. Recombinant murine calreticulin fragment 39-272 expands CD1dhiCD5+ IL-10-secreting B cells that modulate experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Mol. Immunol.* 55, 237–246 (2013).

Honoré, C. *et al.* The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. *Arthritis Rheum.* 56, 1598–607 (2007).

Horvitz, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 59, 1701s–1706s (1999).

Hosszu, K. K., Santiago-Schwarz, F., Peerschke, E. I. B. & Ghebrehiwet, B. Evidence that a C1q/C1qR system regulates monocyte-derived dendritic cell differentiation at the interface of innate and acquired immunity. *Innate Immun.* 16, 115–127 (2010).

Hosszu, K. K. *et al.* Cell surface expression and function of the macromolecular C1 complex on the surface of human monocytes. *Front. Immunol.* 3, (2012).

Huang, F. P. *et al.* A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* 191, 435–444 (2000).

Huynh, M. L. N., Fadok, V. A. & Henson, P. M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* 109, 41–50 (2002).

Ihara, Y., Urata, Y., Goto, S. & Kondo, T. Role of calreticulin in the sensitivity of myocardial H9c2 cells to oxidative stress caused by hydrogen peroxide. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, C208–C221 (2006).

- Ipseiz, N. *et al.* The Nuclear Receptor Nr4a1 Mediates Anti-Inflammatory Effects of Apoptotic Cells. *J. Immunol.* 192, 4852–4858 (2014).
- Jeannin, P., Jaillon, S. & Delneste, Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Current Opinion in Immunology* 20, 530–537 (2008).
- Jersmann, H. P. A., Dransfield, I. & Hart, S. P. Fetuin/alpha2-HS glycoprotein enhances phagocytosis of apoptotic cells and macropinocytosis by human macrophages. *Clin. Sci. (Lond).* 105, 273–278 (2003).
- Jersmann, H. P. Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. *Immunol. Cell Biol.* 83, 462–467 (2005).
- John, L. M., Lechleiter, J. D. & Camacho, P. Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J. Cell Biol.* 142, 963–973 (1998).
- Johnson, S., Michalak, M., Opas, M. & Eggleton, P. The ins and outs of calreticulin: From the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol.* 11, 122–129 (2001).
- Jordan, E. T., Collins, M., Terefe, J., Ugozzoli, L. & Rubio, T. Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells. *J. Biomol. Tech.* 19, 328–334 (2008).
- Kanduc, D. *et al.* Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *International journal of oncology* 21, 165–170 (2002).
- Kang, Y.-H., Urban, B. C., Sim, R. B. & Kishore, U. Human complement Factor H modulates C1q-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *Immunobiology* 217, 455–464 (2012).
- Kapoor, M. *et al.* Mutational analysis provides molecular insight into the carbohydrate-binding region of calreticulin: pivotal roles of tyrosine-109 and aspartate-135 in carbohydrate recognition. *Biochemistry* 43, 97–106 (2004).
- Kennedy, A. D. & Deleo, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunologic Research* 43, 25–61 (2009).
- Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie I. R. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide-Spread Tissue Distribution. *Br. J. Cancer* 26, 239–257 (1972).
- Kerr, M. C. & Teasdale, R. D. Defining macropinocytosis. *Traffic* 10, 364–371 (2009).
- Kim, S. *et al.* Cross Talk between Engulfment Receptors Stabilin-2 and Integrin α 5 β 1 Orchestrates Engulfment of Phosphatidylserine-Exposed Erythrocytes. *Molecular and Cellular Biology* 32, 2698–2708 (2012).
- Kim, S., Elkon, K. B. & Ma, X. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity* 21, 643–653 (2004).
- Kinchen, J. M. *et al.* Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature* 434, 93–99 (2005).
- Kishore, U. & Reid, K. B. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 49, 159–170 (2000).

Klein, M. A. *et al.* Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat. Med.* 7, 488–492 (2001).

Kleinclauss, F. *et al.* Intravenous apoptotic spleen cell infusion induces a TGF-beta-dependent regulatory T-cell expansion. *Cell Death Differ.* 13, 41–52 (2006).

Koivusalo, M. *et al.* Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J. Cell Biol.* 188, 547–563 (2010).

Korb, L. C. & Ahearn, J. M. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J. Immunol.* 158, 4525–4528 (1997).

Korbelik, M., BanÅth, J., Saw, K. M., Zhang, W. & Åeiplys, E. Calreticulin as Cancer Treatment Adjuvant: Combination with Photodynamic Therapy and Photodynamic Therapy-Generated Vaccines. *Front. Oncol.* 5, 1–7 (2015).

Kozlov, G. *et al.* Structural basis of carbohydrate recognition by calreticulin. *J. Biol. Chem.* 285, 38612–38620 (2010).

Kroemer, G. & Levine, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 1004–1010 (2008).

Krysko, D. V *et al.* Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ.* 13, 2011–2022 (2006a).

Krysko, D. V & Vandenabeele, P. From regulation of dying cell engulfment to development of anti-cancer therapy. *Cell Death Differ.* 15, 29–38 (2008).

Krysko, D. V, Brouckaert, G., Kalai, M., Vandenabeele, P. & D’Herde, K. Mechanisms of Internalization of Apoptotic and Necrotic L929 Cells by a Macrophage Cell Line Studied by Electron Microscopy. *J. Morphol.* 258, 336–345 (2003).

Krysko, D. V, D’Herde, K. & Vandenabeele, P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis* 11, 1709–1726 (2006b).

Krysko, D. V *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 860–75 (2012).

Kuraishi, T. *et al.* Identification of calreticulin as a marker for phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* 313, 500–510 (2007).

Kuraya, M., Ming, Z., Liu, X., Matsushita, M. & Fujita, T. Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. *Immunobiology* 209, 689–97 (2005).

Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N. & Kobayashi, Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J. Immunol.* 171, 4672–4679 (2003).

Kwon, M. S. *et al.* Calreticulin couples calcium release and calcium influx in integrin-mediated calcium signaling. *Mol. Biol. Cell* 11, 1433–1443 (2000).

Lauber, K. *et al.* Apoptotic cells induce migration of phagocytes *via* caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113, 717–730 (2003).

- Leach, M. R., Cohen-Doyle, M. F., Thomas, D. Y. & Williams, D. B. Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin. *J. Biol. Chem.* 277, 29686–29697 (2002).
- Liang, Y. Y. *et al.* Serum-dependent processing of late apoptotic cells for enhanced efferocytosis. *Cell Death Dis.* 5, e1264 (2014).
- Lillis, A. P. *et al.* Murine low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP) is required for phagocytosis of targets bearing LRP ligands but is not required for C1q-triggered enhancement of phagocytosis. *J. Immunol.* 181, 364–373 (2008).
- Lim, J. P. & Gleeson, P. A. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and Cell Biology* 89, 836–843 (2011).
- Lim, S. *et al.* Enhanced calreticulin expression promotes calcium-dependent apoptosis in postnatal cardiomyocytes. *Mol. Cells* 25, 390–396 (2008).
- Ling, S., Cheng, A., Pumpens, P., Michalak, M. & Holoshitz, J. Identification of the rheumatoid arthritis shared epitope binding site on calreticulin. *PLoS One* 5, (2010).
- Ling, S., Cline, E. N., Haug, T. S., Fox, D. A. & Holoshitz, J. Citrullinated calreticulin potentiates rheumatoid arthritis shared epitope signaling. *Arthritis Rheum.* 65, 618–626 (2013).
- Ling, S., Pi, X. & Holoshitz, J. The rheumatoid arthritis shared epitope triggers innate immune signaling *via* cell surface calreticulin. *J. Immunol.* 179, 6359–6367 (2007).
- Liu, Z. & Roche, P. a. Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Front. Physiol.* 6, (2015).
- Lockshin, R. A. & Williams, C. M. XXX Programmed cell death - III. Neural control of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J. Insect Physiol.* 11, 601–610 (1965).
- Lood, C. *et al.* C1q inhibits immune complex-induced interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells: a novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Arthritis Rheum.* 60, 3081–3090 (2009).
- Loos, M. Biosynthesis of the collagen-like C1q molecule and its receptor functions for Fc and polyanionic molecules on macrophages. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 102, 1–56 (1983).
- Mangahas, P. M. & Zhou, Z. Clearance of apoptotic cells in *Caenorhabditis elegans*. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 16, 295–306 (2005).
- McDonnell, J. M., Jones, G. E., White, T. K. & Tanzer, M. L. Calreticulin binding affinity for glycosylated laminin. *J. Biol. Chem.* 271, 7891–7894 (1996)
- Melino, G. The Sirens' song. *Nature* 412, 23 (2001).
- Menzies, C. *et al.* Identification of C1q receptor associated surface molecules on the monocyte-like cell line U937. *FASEB J.* 22, (2008).
- Mercer, J. & Helenius, A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* 11, 510–520 (2009).

Mery, L. *et al.* Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca²⁺ storage and decreases store-operated Ca²⁺ influx. *J. Biol. Chem.* 271, 9332–9339 (1996).

Mesaeli, N. *et al.* Calreticulin is essential for cardiac development. *J. Cell Biol.* 144, 857–868 (1999).

Mevorach, D., Mascarenhas, J. O., Gershov, D. & Elkon, K. B. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J. Exp. Med.* 188, 2313–2320 (1998).

Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L. I. & Opas, M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 417, 651–666 (2009).

Molinari, M. *et al.* Contrasting Functions of Calreticulin and Calnexin in Glycoprotein Folding and ER Quality Control. *Mol. Cell* 13, 125–135 (2004).

Monks, J. *et al.* Epithelial cells as phagocytes: apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release. *Cell Death Differ.* 12, 107–114 (2005).

Monks, J., Smith-Steinhart, C., Kruk, E. R., Fadok, V. A. & Henson, P. M. Epithelial cells remove apoptotic epithelial cells during post-lactation involution of the mouse mammary gland. *Biol. Reprod.* 78, 586–594 (2008).

Morelli, A. E. & Larregina, A. T. Apoptotic cell-based therapies against transplant rejection: Role of recipient's dendritic cells. *Apoptosis* 15, 1083–1097 (2010).

Morelli, A. E. *et al.* Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: Dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101, 611–620 (2003).

Mueller, C. F. H. *et al.* Differential phosphorylation of calreticulin affects AT1 receptor mRNA stability in VSMC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370, 669–674 (2008).

Müller-Taubenberger, A. *et al.* Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J.* 20, 6772–6782 (2001).

Nagata, S., Hanayama, R. & Kawane, K. Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* 140, 619–630 (2010).

Nakamura, K. *et al.* Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J. Cell Biol.* 150, 731–740 (2000).

Nakamura, K. *et al.* Functional specialization of calreticulin domains. *J. Cell Biol.* 154, 961–972 (2001).

Nanney, L. B. *et al.* Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am. J. Pathol.* 173, 610–630 (2008).

Nauta, A. J. *et al.* Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur. J. Immunol.* 32, 1726–1736 (2002).

- Navratil, J. S., Watkins, S. C., Wisnieski, J. J. & Ahearn, J. M. The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. *J. Immunol.* 166, 3231–3239 (2001).
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K. & Tavernarakis, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1833, 3448–3459 (2013).
- Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* 13, 54–61 (2007a).
- Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 14, 1848–1850 (2007b).
- Obeid, M. ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin. *J. Immunol.* 181, 2533–2543 (2008).
- Ogden, C. A. *et al.* 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 (2001).
- Oldenborg, P. A. *et al.* Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288, 2051–2054 (2000).
- Ostwald, T. J. & MacLennan, D. H. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 249, 974–979 (1974).
- Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Arlaud, G. J. & Frachet, P. How phagocytes track down and respond to apoptotic cells. *Crit. Rev. Immunol.* 29, 111–130 (2009).
- Païdassi, H. *et al.* C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *J. Immunol.* 180, 2329–2338 (2008).
- Païdassi, H. *et al.* Investigations on the c1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition. *J. Mol. Biol.* 408, 277–290 (2011).
- Panaretakis, T. *et al.* The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ.* 15, 1499–1509 (2008).
- Panaretakis, T. *et al.* Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* 28, 578–590 (2009).
- Patel, J. M. *et al.* Increased expression of calreticulin is linked to ANG IV-mediated activation of lung endothelial NOS. *Am. J. Physiol.* 277, L794–L801 (1999).
- Perruche, S. & Saas, P. L14. Immunomodulatory properties of apoptotic cells. *Presse Med.* 42, 537–543 (2013).
- Perruche, S., Saas, P. & Chen, W. Apoptotic cell-mediated suppression of streptococcal cell wall-induced arthritis is associated with alteration of macrophage function and local regulatory T-cell increase: a potential cell-based therapy? *Arthritis Res. Ther.* 11, R104 (2009).

- Peter, C. *et al.* Migration to apoptotic 'find-me' signals is mediated *via* the phagocyte receptor G2A. *J. Biol. Chem.* 283, 5296–5305 (2008).
- Peter, C., Wesselborg, S., Herrmann, M. & Lauber, K. Dangerous attraction: Phagocyte recruitment and danger signals of apoptotic and necrotic cells. *Apoptosis* 15, 1007–1028 (2010).
- Peter, M. E., Heufelder, a E. & Hengartner, M. O. Advances in apoptosis research. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12736–12737 (1997).
- Peters, L. R. & Raghavan, M. Endoplasmic reticulum calcium depletion impacts chaperone secretion, innate immunity, and phagocytic uptake of cells. *J. Immunol.* 187, 919–931 (2011).
- Pickering, M. C., Botto, M., Taylor, P. R., Lachmann, P. J. & Walport, M. . Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Advances in immunology. Adv. Immunol.* 76, 226–324 (2000).
- Pinton, P. *et al.* The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: Significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J.* 20, 2690–2701 (2001).
- Prieto, J., Eklund, a & Patarroyo, M. Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cellular immunology* 156, 191–211 (1994).
- Pugin, J. *et al.* CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1, 509–516 (1994).
- Pujol-Autonell, I. *et al.* Efferocytosis Promotes Suppressive Effects on Dendritic Cells through Prostaglandin E2 Production in the Context of Autoimmunity. *PLoS One* 8, (2013).
- Qin, Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* 221, 2–11 (2012).
- Raghavan, M., Wijeyesakere, S. J., Peters, L. R. & Del Cid, N. Calreticulin in the immune system: Ins and outs. *Trends in Immunology* 34, 13–21 (2013).
- Raje, C. I., Kumar, S., Harle, A., Nanda, J. S. & Raje, M. The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 3252–3261 (2007).
- Ralph, P., Prichard, J. & Cohn, M. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. *J. Immunol.* 114, 898–905 (1975).
- Ramírez, G., Valck, C., Ferreira, V. P., López, N. & Ferreira, A. Extracellular Trypanosoma cruzi calreticulin in the host-parasite interplay. *Trends in Parasitology* 27, 115–122 (2011).
- Ramirez-Ortiz, Z. G. *et al.* The scavenger receptor SCARF1 mediates the clearance of apoptotic cells and prevents autoimmunity. *Nat. Immunol.* 14, 917–926 (2013).
- Ravichandran, K. S. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J. Exp. Med.* 207, 1807–1817 (2010).

Ravichandran, K. S. Beginnings of a Good Apoptotic Meal: The Find-Me and Eat-Me Signaling Pathways. *Immunity* 35, 445–455 (2011).

Reddy, S. M. *et al.* Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages induces novel signaling events leading to cytokine-independent survival and inhibition of proliferation: activation of Akt and inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J. Immunol.* 169, 702–713 (2002).

Reid, K. B. & Edmondson, J. Location of the binding site in subcomponent C1q for plasma fibronectin. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Suppl.* 284, 11–17 (1984).

Ridley, A. J. Rho family proteins: Coordinating cell responses. *Trends in Cell Biology* 11, 471–477 (2001).

Ryoo, H. D., Gorenc, T. & Steller, H. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the wingless signaling pathways. *Dev. Cell* 7, 491–501 (2004).

Sadasivan, B., Lehner, P. J., Ortmann, B., Spies, T. & Cresswell, P. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103–114 (1996).

Sahu, S. K., Gummadi, S. N., Manoj, N. & Aradhyam, G. K. Phospholipid scramblases: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462, 103–114 (2007).

Sambrooks, C. L., Carpio, M. A. & Hallak, M. E. Arginylated calreticulin at plasma membrane increases susceptibility of cells to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 287, 22043–22054 (2012).

Santer, D. M. *et al.* C1q deficiency leads to the defective suppression of IFN- α in response to nucleoprotein containing immune complexes. *J. Immunol.* 185, 4738–4749 (2010).

Savill, J. S. *et al.* Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* 83, 865–875 (1989).

Schneider, U., Schwenk, H. U. & Bornkamm, G. Characterization of EBV-genome negative ‘null’ and ‘T’ cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* 19, 621–626 (1977).

Schrag, J. D. *et al.* The structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol. Cell* 8, 633–644 (2001).

Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P. & Dieter, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1, 25-dihydroxyvitamin by binding. *J. Leukoc. Biol.* 59, 555–561 (1996).

Scorrano, L. *et al.* BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300, 135–139 (2003).

- Sellar, G. C., Blake, D. J. & Reid, K. B. Characterization and organization of the genes encoding the A-, B- and C-chains of human complement subcomponent C1q. The complete derived amino acid sequence of human C1q. *Biochem. J.* 274 (Pt 2, 481–490 (1991).
- Shui, W. *et al.* Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16952–16957 (2008).
- Singh-Jasuja, H. *et al.* The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering. *Immunobiology* 218, 28–39 (2013).
- Smith, M. J. & Koch, G. L. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J.* 8, 3581–3586 (1989).
- Solovjov, D. A., Pluskota, E. & Plow, E. F. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J. Biol. Chem.* 280, 1336–1345 (2005).
- Somogyi, E., Petersson, U., Hultenby, K. & Wendel, M. Calreticulin - An endoplasmic reticulum protein with calcium-binding activity is also found in the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 22, 179–191 (2003).
- Son, M., Santiago-Schwarz, F., Al-Abed, Y. & Diamond, B. PNAS Plus: C1q limits dendritic cell differentiation and activation by engaging LAIR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2012). doi:10.1073/pnas.1212753109
- Son, M. *et al.* LIME mediates immunological synapse formation through activation of VAV. *Mol. Cells* 33, 407–414 (2012).
- Stendahl, O. *et al.* Redistribution of intracellular Ca²⁺ stores during phagocytosis in human neutrophils. *Science* 265, 1439–1441 (1994).
- Stossel, T. P. The machinery of cell crawling. *Sci. Am.* 271, 54–55,58–63 (1994).
- Stuart, L. M. *et al.* Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J. Immunol.* 168, 1627–1635 (2002).
- Su, H. P. *et al.* Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J. Biol. Chem.* 277, 11772–11779 (2002).
- Tacnet-Delorme, P., Chevallier, S. & Arlaud, G. J. 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 (2001).
- Tarr, J. M. *et al.* A Mechanism of Release of Calreticulin from Cells During Apoptosis. *J. Mol. Biol.* 401, 799–812 (2010).
- Taylor, P. R. *et al.* A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 192, 359–366 (2000).
- Tennant, I. *et al.* Innate recognition of apoptotic cells: novel apoptotic cell-associated molecular patterns revealed by crossreactivity of anti-LPS antibodies. *Cell Death Differ* 20, 698–708 (2013).

- Terrasse, R. *et al.* Human and pneumococcal cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins are both ligands of human C1q protein. *J. Biol. Chem.* 287, 42620–42633 (2012).
- Thomas, L. *et al.* The N-Terminus of CD14 Acts to Bind Apoptotic Cells and Confers Rapid-Tethering Capabilities on Non-Myeloid Cells. *PLoS One* 8, 1–13 (2013).
- Tsuchiya, S. *et al.* Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 171–176 (1980).
- Tsujimoto, Y. & Shimizu, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 2, 1528–1534 (2005).
- Vandivier, R. W. *et al.* Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells *in vivo* and *in vitro*: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J. Immunol.* 169, 3978–3986 (2002).
- Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T., Krysko, D. V, Festjens, N. & Vandenabeele, P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med* 8, 207–220 (2008).
- Verneret, M. Reconnaissance et phagocytose des cellules apoptotiques «Rôle de C1q et de la calréticuline». (Université de grenoble, 2012).
- Verneret, M. *et al.* Relative contribution of C1q and apoptotic cell-surface calreticulin to macrophage phagocytosis. *J. Innate Immun.* 6, 426–434 (2014).
- Voll, R. E. *et al.* Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 350–351 (1997).
- Walters, J. J. & Berwin, B. Differential CD91 dependence for calreticulin and *Pseudomonas* exotoxin-A endocytosis. *Traffic* 6, 1173–1182 (2005).
- Wang, W. A., Groenendyk, J. & Michalak, M. Calreticulin signaling in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 842–846 (2012).
- Weigert, A. *et al.* Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate. *Blood* 108, 1635–1642 (2006).
- White, T. K., Zhu, Q. & Tanzer, M. L. Cell surface calreticulin is a putative mannoside lectin which triggers mouse melanoma cell spreading. *J. Biol. Chem.* 270, 15926–15929 (1995).
- Wiersma, V. R., Michalak, M., Abdullah, T. M., Bremer, E. & Eggleton, P. Mechanisms of Translocation of ER Chaperones to the Cell Surface and Immunomodulatory Roles in Cancer and Autoimmunity. *Front. Oncol.* 5, 1–14 (2015).
- Witko-Sarsat, V., Pederzoli-Ribeil, M., Hirsh, E., Sozzani, S. & Cassatella, M. A. Regulating neutrophil apoptosis: New players enter the game. *Trends in Immunology* 32, 117–124 (2011).
- Wood, W. *et al.* Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* 127, 5245–5252 (2000).

Xu, W. *et al.* IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood* 107, 4930–4937 (2006).

Young, M. P., Febbraio, M. & Silverstein, R. L. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J. Clin. Invest.* 119, 136–145 (2009).

Zheng, L. *et al.* Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3505–3513 (2006).

Zwart, B. *et al.* Complement activation by apoptotic cells occurs predominantly *via* IgM and is limited to late apoptotic (secondary necrotic) cells. *Autoimmunity* 37, 95–102 (2004).

Résumé

L'efferocytose est un phénomène physiologique par lequel des millions de cellules apoptotiques sont efficacement éliminées par phagocytose sans provoquer une réaction inflammatoire. L'efficacité de ce processus nécessite une interaction rapide entre la cellule apoptotique et son phagocyte afin d'éviter l'entrée de la première dans une phase de nécrose secondaire. Cette interaction implique des motifs de la surface des 2 cellules qui peuvent interagir directement ou aussi indirectement *via* des molécules de pontage. Ce dernier rôle est associé à C1q, premier composant du système du complément. En effet, C1q favorise l'élimination des cellules apoptotiques et aussi la réponse tolérogène en interagissant avec des ligands présents de part et d'autre de la synapse efferocytaire. La calréticuline (CRT) de surface fait partie de ces ligands. Initialement connue comme co-récepteur, avec CD91, de la queue collagène de C1q à la surface des phagocytes, la CRT est aujourd'hui décrite comme un signal « eat-me » de la surface des cellules apoptotiques où elle peut aussi interagir avec les têtes globulaires de C1q. Des études récentes ont soulevé le potentiel immunogénique de la CRT, notamment au cours de la mort des cellules cancéreuses. Ainsi, la CRT de surface joue un rôle important dans l'efferocytose même si l'on ne sait pas exactement comment cette protéine chaperonne résidente du réticulum endoplasmique est exposée à la membrane plasmique. Dans un premier temps, j'ai démontré que la CRT augmente à la surface des cellules Jurkat rapidement après l'induction de l'apoptose, à un stade où la phosphatidylsérine, marqueur emblématique de l'apoptose, n'est pas encore détectée. D'une manière intéressante, C1q est capable d'interagir directement avec la CRT exposée à la surface des cellules à ce stade « pré-apoptotique », et de favoriser significativement leur phagocytose par les macrophages THP1. Dans un deuxième temps, j'ai mis en évidence la présence de la CRT dans le milieu extracellulaire et montré qu'elle varie avec l'évolution de l'apoptose. De plus, la CRT soluble est capable d'induire la migration des macrophages THP1, d'augmenter l'expression à leur surface de CD14, récepteur impliqué dans l'efferocytose, et de stimuler la macropinocytose, un processus utilisé par les phagocytes lors de la phagocytose des cellules apoptotiques. Cela suggère que la CRT extracellulaire peut moduler la biologie du phagocyte. Enfin, la CRT exogène peut se lier à la surface des macrophages et peut être ainsi une source externe de la CRT retrouvée à la surface des phagocytes.

Mots clés : efferocytose, apoptose, C1q, réponse tolérogène, calréticuline, signal « eat-me », macrophages.

Abstract

Efferocytosis is a physiological phenomenon whereby millions of apoptotic cells are efficiently removed by phagocytosis without inducing an inflammatory response. The efficiency of this process requires rapid interaction between the apoptotic cell and the phagocyte in order to prevent the entry of the dying cell in a secondary necrosis phase. This interaction involves patterns of the surface of the 2 cells that can interact directly or indirectly *via* bridging molecules. The latter role is associated to C1q, the first component of the complement system. Indeed, C1q promotes the removal of apoptotic cells and the tolerogenic response by interacting with ligands present on either side of the efferocytic synapse. Surface exposed calreticulin (CRT) is one of these ligands. Initially known as the co-receptor, with CD91, to the collagenous tail of C1q on the phagocyte surface, CRT is now described as an "eat-me" signal of the apoptotic cell surface where it can also interact with the globular heads of C1q. Recent data have revealed the immunogenic potential of CRT, especially in the case of cancer cell death. Thus, surface exposed CRT plays an important role in efferocytosis even if it is not fully understood how this endoplasmic reticulum resident-protein gets to the plasma membrane. I firstly demonstrated that CRT increases rapidly on the surface of Jurkat cells after the induction of apoptosis, at a stage where phosphatidylserine, emblematic marker of apoptosis, is not yet detected. Interestingly, C1q is capable of interacting directly with this "pre-apoptotic" cell surface exposed CRT, and promotes significantly the uptake of Jurkat cells by THP1 macrophages at this stage. Secondly, I demonstrated the presence of CRT in the extracellular medium whose content depends on the evolution of apoptosis. Furthermore, soluble CRT induces the migration of THP1 macrophages, increases their surface expression of CD14, a receptor involved in efferocytosis, and stimulates macropinocytosis, a process used by phagocytes during phagocytosis of apoptotic cells. These results suggest that the extracellular CRT can modulate the biology of the phagocyte. Finally, exogenous CRT binds to the surface of macrophages and can therefore be an external source of the CRT found on the phagocyte surface.

Keywords: efferocytosis, apoptosis, C1q, tolerogenic response, calreticulin, "eat-me" signal, macrophages.