



**HAL**  
open science

# Etude de l'organisation et de la dynamique de molécules impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques lors de l'efferocytose

Samy Dufour

► **To cite this version:**

Samy Dufour. Etude de l'organisation et de la dynamique de molécules impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques lors de l'efferocytose. Virologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV005 . tel-04194157

**HAL Id: tel-04194157**

**<https://theses.hal.science/tel-04194157>**

Submitted on 2 Sep 2023

**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 : Virologie - Microbiologie - Immunologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Samy DUFOUR**

Thèse dirigée par **Philippe FRACHET**, MAITRE DE  
CONFERENCE, Université Grenoble Alpes

préparée au sein du **Laboratoire Institut de Biologie Structurale**  
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

**Etude de l'organisation et de la dynamique de  
molécules impliquées dans la reconnaissance  
des cellules apoptotiques lors de l'efferocytose**

**Study of the organization and the dynamic of  
molecules involved in the recognition of  
apoptotic cells during efferocytosis**

Thèse soutenue publiquement le **18 février 2022**,  
devant le jury composé de :

**Monsieur Pierre Emmanuel MILHIET**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Occitanie Est,  
Rapporteur

**Madame Pascale JEANNIN**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,  
Université d'Angers, Rapporteur

**Monsieur Olivier DESTAING**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes, Président

**Madame Sandrine FRABOULET**

MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université Grenoble Alpes,  
Examinatrice





# Table des matières

Table des matières.....	1
Résumé en français .....	4
Résumé en anglais .....	5
Remerciements.....	6
Liste des figures .....	7
Liste des tableaux.....	8
Liste des notations et des symboles .....	9
<b>CHAPITRE I : Introduction</b> .....	11
1 De la mort des cellules par apoptose jusqu'à leur élimination par phagocytose.....	11
1.1 Définition de l'apoptose .....	11
1.2 Rôles physiologiques associés à l'apoptose .....	12
1.3 L'apoptose, un processus ordonné .....	12
1.3.1 Voie intrinsèque .....	13
1.3.2 Voie extrinsèque .....	13
1.4 Modifications cellulaires associées au développement de l'apoptose .....	14
1.4.1 Modifications morphologiques .....	15
1.4.2 Modifications intracellulaires .....	15
1.4.3 Modifications membranaires.....	16
1.4.3.1 Organisation générale de la membrane plasmique d'une cellule viable.....	16
1.4.3.2 Perturbations membranaires de la cellule en apoptose .....	19
1.5 Élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes .....	22
1.5.1 Libération des signaux "find-me" et recrutement du phagocyte.....	22
1.5.2 Reconnaissance de la cellule apoptotique par le phagocyte.....	24
1.5.2.1 Rôle des signaux « don't eat-me » .....	24
1.5.2.2 Exposition des signaux « eat-me ».....	24
1.5.2.3 Récepteurs de l'efférocytose .....	25
1.5.3 Voie de signalisation de l'efférocytose.....	26
1.5.3.1 Voie CED-1, CED-6 et CED-7 .....	26
1.5.3.2 Voie CED-2, CED-5 et CED-12 .....	27
1.5.4 Digestion de la cellule apoptotique et régulation métabolique du phagocyte.....	28
1.5.5 Réponse immunitaire associée à l'efférocytose .....	28
1.5.5.1 Origine et fonction des phagocytes professionnels.....	29
1.5.5.2 Réponse immunitaire en fonction du type de phagocyte.....	30
1.5.5.3 Mort cellulaire immunogénique.....	31
1.6 Dysfonctionnement et subversion de l'efférocytose .....	31
1.6.1 Maladies auto-immunes et chroniques inflammatoires .....	31
1.6.2 Cancer et stratégies thérapeutiques .....	32
2 Rôle des signaux « eat-me » et « don't eat-me » au sein de l'efférosynapse .....	33

2.1	Influence de l'interface cellule-cellule sur les interactions récepteurs-ligands.....	33
2.2	Rôle de la PS, de la CRT, du C1q et de SR-F1 dans l'efférocytose .....	34
2.2.1	La phosphatidylsérine .....	34
2.2.2	La calréticuline.....	35
2.2.3	La protéine du complément C1q.....	37
2.2.4	Le récepteur SR-F1 .....	38
2.3	Fonction du « don't eat-me » CD47.....	40
2.3.1	Régulation et interaction de la protéine CD47 avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ .....	40
2.3.2	Interaction de la protéine CD47 avec le récepteur SIRP $\alpha$ et inhibition de la phagocytose .....	44
3	Objectifs de mon travail de thèse .....	46
3.1	Caractérisation de la distribution de la PS, de la CRT et de CD47 durant l'apoptose.....	46
3.2	Etude de l'interaction entre le récepteur SR-F1 et la protéine C1q .....	46
	<b>CHAPITRE II : Matériels et Méthodes</b> .....	47
1	Biologie moléculaire .....	47
1.1	Création du plasmide pCMV6-AC-SR-F1 .....	48
1.2	Création du plasmide pCMV6-AC.....	49
1.3	Création du plasmide pCMV6-AC-SR-F1-mEos4b .....	49
2	Biologie cellulaire .....	51
2.1	Lignées et culture cellulaire .....	51
2.2	Induction de l'apoptose des cellules HeLa par UVB.....	51
2.3	Transfection des lignées cellulaires.....	52
3	Microscopie de localisation de molécule unique.....	54
3.1	Déroulement du protocole STORM.....	55
3.1.1	Préparation de l'échantillon .....	55
3.1.2	Fixation .....	56
3.1.3	Traitement de l'autofluorescence.....	57
3.1.4	Marquage par immunofluorescence.....	57
3.1.5	Acquisition des données SMLM.....	59
3.1.5.1	Configuration du microscope.....	59
3.1.5.2	Acquisition STORM deux couleurs.....	60
3.1.5.3	Acquisition PALM/STORM deux couleurs.....	62
3.1.5.4	Traitement des images .....	62
3.1.5.5	Post-traitements des données de localisation .....	63
3.1.5.6	Analyse des données de localisation .....	65
3.2	Microscopie de suivi de molécule unique .....	66
3.2.1	Principe de la microscopie de suivi de molécule unique .....	66
3.2.2	Préparation de l'échantillon pour la microscopie de suivi de molécule unique.....	68
3.2.3	Acquisition des données pour la microscopie de suivi de molécule unique une couleur .....	70
3.2.4	Acquisition des données pour la microscopie de suivi de molécule unique deux couleurs.....	70
3.2.4.1	Préparation de la solution de TopFluor PS .....	70

3.2.4.2	Marquage des cellules.....	71
3.2.4.3	Acquisition deux couleurs.....	71
3.2.5	Détection et reconstruction des traces.....	71
3.2.5.1	Traitement des images et extraction des données de localisation.....	71
3.2.5.2	Reconstruction des traces.....	72
3.2.6	Simulation des expériences de microscopie de suivi de molécule unique.....	73
4	Observation par microscopie de fluorescence confocale.....	74
4.1	Marquage des cellules par immunofluorescence.....	74
4.2	Mise en place d'un modèle artificiel de phagocytose.....	75
4.2.1	Marquage de la protéine C1q par couplage amine.....	75
4.2.2	Préparation des billes - C1qA647.....	75
4.2.3	Phagocytose des billes - C1qA647 par les macrophages THP-1.....	76
4.2.4	Quantification de la phagocytose des billes - C1qA647 par microscopie de fluorescence.....	76
<b>CHAPITRE III : Résultats.....</b>		<b>78</b>
1	Etude de la distribution de la PS, de la CRT et de CD47 à la surface des cellules en apoptose.....	78
1.1	Contexte.....	78
1.2	Manuscrit CD47.....	80
1.3	Analyses complémentaires de la dynamique de la protéine CD47 et de ses partenaires.....	115
1.3.1	Comparaison de l'analyse des coefficients de diffusion et des MJD.....	115
1.3.2	Diffusion de la protéine CD47 dans les microvillis.....	118
1.3.3	Diffusion de la protéine CD47 et distribution des intégrines exprimant la chaîne $\beta 1$ .....	118
1.3.4	Diffusion de la protéine CD47 à la surface des cellules JurkaT.....	119
1.3.5	Distribution de la protéine CD47 et du lipide GM1.....	120
1.3.6	Distribution de la protéine CD47 et des intégrines exprimant les chaînes $\beta 1$ et $\beta 3$ .....	121
2	Etude de l'interaction entre le récepteur SR-F1 et la protéine du complément C1q.....	123
2.1	Contexte.....	123
2.2	Article SR-F1.....	124
2.3	Résultats complémentaires : influence de l'interaction entre le récepteur SR-F1 et la protéine du complément C1q.....	144
2.3.1	Impact du récepteur SR-F1 sur la phagocytose de billes recouvertes par la protéine C1q....	144
2.3.2	Distribution du récepteur SR-F1 et la protéine C1q à la surface cellulaire.....	146
<b>CHAPITRE IV : Discussion.....</b>		<b>149</b>
1	Evolution de l'interaction CD47 - SIRP $\alpha$ durant l'apoptose.....	150
2	Rôle de l'interaction de CD47 avec les intégrines.....	152
3	Fonction du récepteur SR-F1 dans l'efferocytose.....	154
4	Rôle du récepteur SR-F1 dans l'adhérence cellulaire.....	155
5	Mots de la fin.....	156
Diffusion scientifique.....		158
Annexes.....		159
Bibliographie.....		165

# Résumé en français

L'élimination par phagocytose des cellules en apoptose (ou efferocytose) est un processus physiologique essentiel de l'immunité. C'est par ce mécanisme que chaque jour, les cellules qui meurent par apoptose sont éliminées par les phagocytes (ex : macrophage). Ce processus est crucial pour le développement, l'homéostasie tissulaire et la résolution de l'inflammation. En effet, l'élimination efficace des cellules apoptotiques est considérée comme un prérequis pour la prévention des maladies auto-immunes et inflammatoires. Une étape clé de l'efferocytose est la formation d'une zone de contact entre le phagocyte et la cellule apoptotique appelée efferosynapse. La réponse immune du phagocyte est coordonnée par les nombreuses molécules qui organisent et régulent cette interface. La cellule apoptotique expose à sa surface des « don't eat-me » et « eat-me » signaux dont l'exposition évolue avec l'apoptose et qui sont reconnus par une grande variété de récepteurs exprimés par les phagocytes. Du fait de cette complexité, l'organisation moléculaire de l'efferosynapse, est encore méconnue. Néanmoins, sa caractérisation est cruciale pour déterminer quels sont les paramètres qui conditionnent la façon dont les signaux exposés par la cellule apoptotique vont être interprétés par le phagocyte. Une partie de mon travail visait à étudier l'organisation des « eat-me » signaux que sont la phosphatidylsérine (PS), la calréticuline (CRT), ainsi que la dynamique du « don't eat-me » signal CD47, à la surface des cellules apoptotiques. Grâce à la microscopie à super résolution, nous avons mis en évidence la clusterisation de la CRT et son exclusion des domaines enrichis en PS au niveau des blebs apoptotiques. L'analyse de la dynamique de la protéine CD47 par suivi de molécule unique a révélé qu'elle est distribuée dans deux populations plus ou moins mobiles, et que la proportion de CD47 de plus forte mobilité augmente à la surface des cellules en apoptose. Enfin, bien que CD47 soit présent à la surface des blebs apoptotiques, il n'est plus reconnu par son récepteur SIRP $\alpha$ . Nos observations ont montré que ce résultat est indépendant de la mobilité de CD47, mais dépend de l'environnement membranaire et, en particulier, de l'intégrité des radeaux lipidiques qui sont déstabilisés durant l'apoptose. Par ailleurs, au niveau du phagocyte, une seconde partie de mon travail de thèse s'est focalisée sur un couple de protéines connues pour intervenir dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques chez la souris : le récepteur SR-F1 et la molécule du complément C1q. Nous nous sommes attachés à examiner le rôle potentiel de leur interaction dans un modèle de macrophage humain. Les analyses ont confirmé que le récepteur SR-F1 humain interagit avec la molécule C1q à la surface des macrophages. Néanmoins, elles ont également montré que sa surexpression à la surface des macrophages altère la phagocytose. Différentes pistes ont été explorées afin d'expliquer cet effet dans notre modèle, comme l'influence de l'expression du récepteur SR-F1 sur la différenciation des macrophages ou son implication dans l'adhérence cellulaire. Ensemble, ces données de microscopie à super résolution sur l'organisation et la dynamique des molécules impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques, constituent les premières briques vers la caractérisation de l'architecture de l'efferosynapse.

Mots clés : Efferocytose, Cellule apoptotique, CD47, SR-F1, microscopie à super résolution

# Résumé en anglais

Efferocytosis is the process of apoptotic cell clearance by phagocytes (e.g. macrophages) and is crucial during the development, tissue homeostasis and resolution of inflammation. Efficient removal of apoptotic cells by phagocytes is considered as a prerequisite for the prevention of autoimmune and inflammatory diseases. A key step of efferocytosis is the constitution of a phagocytic synapse also called efferosynapse between the apoptotic cell and the phagocyte. The immune response of the phagocyte is orchestrated by the numerous molecules that organize and regulate this interface. On the one hand, the apoptotic cell exposes on its surface "don't eat-me" and "eat-me" signals whose exposure evolves with apoptosis development and which are recognized, on the other hand, by a large variety of receptors expressed by phagocytes. Because of this complexity, the molecular organization of efferosynapse is still unknown. Nevertheless, its characterization is crucial to determine the parameters that condition the interpretation of apoptotic cell signals by the phagocyte. Part of my work aimed at studying the organization of the "eat-me" signals phosphatidylserine (PS), calreticulin (CRT), as well as the dynamics of the "don't eat-me" signal CD47, on the surface of apoptotic cells. Using super-resolution microscopy, we demonstrated the clustering of CRT and its exclusion from PS-enriched domains in apoptotic blebs. Analysis of CD47 dynamics by single molecule tracking revealed its distribution in two, more or less mobile populations and showed that the proportion of CD47 with higher mobility increases at the surface of the apoptotic cell. Finally, although CD47 is present on the surface of apoptotic blebs, it is no longer recognized by its receptor SIRP $\alpha$ . Our observations showed that this result is independent of the mobility of CD47, but depends on the membrane environment and in particular, on the integrity of the lipid rafts that are destabilized during apoptosis. Furthermore, the second part of my thesis work focused on a pair of proteins known to be involved at the phagocyte surface in the recognition and elimination of apoptotic cells in the mouse model: the SR-F1 receptor and the complement molecule C1q. We examined the potential role of their interaction in human cells models. The analyses confirmed that the human SR-F1 receptor interacts with the C1q molecule on the surface of human macrophages. However, they also showed that its overexpression on the surface of macrophages impairs phagocytosis. Different avenues were explored to explain this effect in our model, such as the influence of SR-F1 receptor over expression on macrophage differentiation or its involvement in cell adhesion. Together, these details of the organization and dynamics of the molecules involved in the recognition of apoptotic cells by super resolution microscopy, constitute the first building blocks towards the characterization of the architecture of the efferosynapse.

Key words: Efferocytosis, Apoptotic cell, CD47, SR-F1, super resolution microscopy

# Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier Philippe Frachet d'avoir accepté le rôle de directeur de thèse. Je te remercie de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse. Ton optimisme quasi sans faille, ton aide tout au long de ma thèse et tes conseils éclairés, m'ont permis d'avancer et d'évoluer dans le monde complexe et passionnant de la recherche.

J'aimerais également remercier Pascale Tacnet de m'avoir formé à l'expérimentation scientifique au travers d'un partage sans réserve de son expérience de la paillasse. Je te remercie pour ton énergie et ta bonne humeur en toutes circonstances qui ont égayé les journées au laboratoire et ont rendu les échecs beaucoup plus faciles à digérer.

Un grand merci à Dominique Bourgeois de m'avoir suivi tout au long de ma thèse. Ta justesse, ta franchise et ta grande sympathie ont su guider mon parcours de thèse. Je suis également très reconnaissant envers le groupe I2SR et plus particulièrement Virgile Adam, Angela Mantovanel, Martin Byrdin, Jip Wulffele, Joanna Timmins, Salvatore de Bonis, Fabienne Hans et Pierre Vauclare. Je vous remercie tous pour nos moments d'entraides, d'échanges et de partages.

Je tiens par ailleurs à exprimer ma gratitude envers la plateforme M4D et plus spécialement à Jean-Philippe Kleman, Françoise Lacroix, Oleksandr Glushonkov et Rose Laure Indorato. Je vous remercie pour votre disponibilité, vos conseils ainsi que votre aide notable au cours de mes travaux de recherche.

Je voudrais également remercier Nicole Thielens de m'avoir accueilli au début de ma thèse dans le groupe IRPAS. Je te remercie pour ta disponibilité et ta très grande bienveillance. Je tiens par la même occasion à témoigner ma reconnaissance envers toutes les personnes du groupe : Isabelle Bally, Véronique Rossi, Anne Chouquet, Christine Gaboriaud, Jean-Baptiste Reiser et Catherine Wicker-Planquart. Merci pour vos conseils, votre aide et pour les moments que nous avons partagés ensemble.

Je remercie Pascale Jeannin et Pierre Emmanuel Milhiet d'avoir consacré du temps à l'évaluation de mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie aussi Olivier Destaing ainsi que Sandrine Fraboulet d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. J'aimerais également remercier le jury dans sa globalité pour leurs remarques pertinentes, pour notre discussion et pour leurs encouragements.

Je remercie également les différents membres de mon comité de suivi individuel : Arnaud Millet, Cécile Morlot et Laurent Heliot dont les échanges constructifs m'ont permis d'affiner et d'aiguiller la thématique de mon travail de recherche.

Je tiens à remercier aussi chaudement mes camarades de bureau Guillaume Fouët et Fabien Dalonneau pour tous les agréables moments que nous avons passés ensemble. Par la même occasion, je remercie les différents membres du bureau Glob'Alps avec qui j'ai partagé de bons moments.

Enfin, j'aimerais sincèrement remercier mes amis de Grenoble : Manon, Jennyfer, Antoine et Elie, mes amis d'Ardèche, ma famille et Mélodie. Je vous remercie tous pour votre soutien indéfectible, vos encouragements chaleureux et votre aide à toute épreuve qui ont été le moteur de ma motivation tout au long de ma thèse.

# Liste des figures

Figure 1 : Voies de signalisation et modifications emblématiques associées au développement de l'apoptose.....	14
Figure 2 : Etapes morphologiques associées au développement de l'apoptose dans des conditions in vitro.....	15
Figure 3 : Diversité et distribution asymétrique des lipides membranaires.....	17
Figure 4 : Organisation de la membrane plasmique et composition des radeaux lipidiques.....	19
Figure 5 : Mécanismes d'exposition de la PS au niveau du feuillet externe durant l'apoptose. ....	20
Figure 6 : Comparaison de l'organisation membranaire entre une cellule viable et une cellule apoptotique. ....	21
Figure 7 : Description des différentes étapes de l'efferocytose.....	22
Figure 8 : Libération des signaux « find-me » par la cellule apoptotique à l'origine du recrutement du phagocyte. ....	23
Figure 9 : Récepteurs de l'efferosynapse.....	26
Figure 10 : Complexes de signalisation associés à des récepteurs de l'efferocytose à l'origine de l'activation de Rac1.....	27
Figure 11 : Influence de l'environnement cellulaire sur l'interaction récepteur-ligand à l'interface entre deux cellules. ....	34
Figure 12 : Interactions entre les molécules PS, CRT, C1q, SR-F1 et SREC-II. ....	39
Figure 13 : Conformations des intégrines liés à leur activation.....	41
Figure 14 : Influence de la protéine CD47 sur l'activité de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ . ....	43
Figure 15 : Interaction entre la protéine transmembranaire CD47 et le récepteur SIRP $\alpha$ . ....	45
Figure 16 : Carte schématique des plasmides pCMV6-AC-SR-F1-GFP et pCMV6-AC-GFP.....	48
Figure 17 : Caractérisation de l'apoptose des cellules HeLa irradiées aux UVB.....	52
Figure 18 : Principe de la microscopie de détection de molécule unique.....	55
Figure 19 : Augmentation de l'autofluorescence durant le développement de l'apoptose des cellules HeLa.....	57
Figure 20 : Spectres d'absorbance et d'émission des fluorophores Alexa fluor 532 et 647.....	61
Figure 21 : Influence du filtre médian temporel sur la reconstruction des images STORM.....	63
Figure 22 : Paramètres de détection des localisations utilisés dans le plugin ThunderSTORM. ....	63
Figure 23 : Principe de la microscopie de suivi de molécule unique.....	68
Figure 24 : Influence du temps d'incubation sur la densité de marquage de la protéine CD47.....	69
Figure 25 : Comparaison de l'impact du filtre médian temporel et du filtre EVER sur la suppression du bruit de fond. ....	72
Figure 26 : Procédure de segmentation des macrophages et quantification de la phagocytose des billes – C1qA647.....	77
Figure 27 : Distribution des coefficients de diffusion et des MJD mesurés à partir de données expérimentales.....	115
Figure 28 : Distribution des coefficients de diffusion et des MJD mesurés sur des données simulées.....	116
Figure 29 : Distribution des coefficients de diffusion et des MJD mesurés sur des données simulées à partir de différents intervalles de longueur de trace. ....	117
Figure 30 : Distribution de la PS et de la protéine CD47. ....	118
Figure 31 : Distribution des intégrines exprimant la chaîne $\beta_1$ et de la protéine CD47.....	119
Figure 32 : Diffusion de la protéine CD47 à la surface des cellules JurkaT. ....	120
Figure 33 : Distribution relative de la protéine CD47 et du lipide GM1 à la surface des cellules viables et apoptotiques. .	121
Figure 34 : Distribution relative de la protéine CD47 et des intégrines exprimant les chaînes $\beta_1$ et $\beta_3$ .....	122
Figure 35 : Phagocytose des billes - C1qA647 par les macrophages THP-1 MOCK & SR-F1.....	144
Figure 36 : Phénotype des macrophages THP-1 MOCK & SR-F1. ....	145
Figure 37 : Localisation du récepteur SR-F1 et de la protéine C1q à la surface du macrophage THP-1.....	146
Figure 38 : Organisation du récepteur SR-F1 et de la protéine C1q au contact entre le macrophage THP-1 et la lamelle. .	147
Figure 39 : Localisation du récepteur SR-F1 et de la protéine C1q au contact entre la cellule CHO et la lamelle.....	148
Figure 40 : Structures de la protéine CD47, du récepteur SIRP $\alpha$ et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ .....	153

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des différentes amorces utilisées pour la biologie moléculaire.....	47
Tableau 2 : Conditions de réactions utilisées pour la construction du plasmide pCMV6-AC-SR-F1 .....	48
Tableau 3 : Conditions de réactions utilisées pour la construction du plasmide pCMV6-AC.....	49
Tableau 4 : Conditions de réactions utilisées pour la construction du plasmide pCMV6-AC-SR-F1-mEos4b. ...	50
Tableau 5 : Liste des différentes lignées cellulaires.....	51
Tableau 6 : Liste des différents anticorps primaires utilisés pour la microscopie STORM.....	58
Tableau 7 : Liste des différents anticorps secondaires utilisés pour la microscopie STORM. ....	58
Tableau 8 : Composition du tampon STORM. ....	60
Tableau 9 : Liste des différents plugin ImageJ utilisés pour le traitement des données STORM. ....	64
Tableau 10 : Liste des différentes solutions utilisées pour traiter les cellules HeLa. ....	69

# Liste des notations et des symboles

A532, A555, A647	Alexa Fluor 532, 555, 647
Ac-LDL	Acetylated Low Density Lipoprotein
ADN	DeoxyriboNucleic Acid
APAF-1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
BA11	Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1
BF	Bright-field
Billes - C1qA647	Beads coated with C1q labeled by Alexa Fluor 647
BSA	Bovine Serum Albumin
C1qA647	C1q labeled by Alexa Fluor 647
CAD	Caspase-Activated DNase
CD47	Cluster of Differentiation 47
cDC	conventional Dendritic Cell
CRT	Calreticulin
CTB	Cholera Toxin subunit B
CytD	Cytochalasin D
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
DIC	Differential Interference Contrast
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
EGF	Epidermal Growth Factor
eIF2 $\alpha$	eukaryotic translation Initiation Factor 2 $\alpha$
F(ab)	Fragment Antigen Binding
FAK	Focal Adhesion Kinase
GFP	Green Fluorescent Protein
GPCR	G Protein-Coupled Receptor,
GPMV	Giant Plasma Membrane Vesicle
GUV	Giant Unilamellar Vesicle
HMGB1	High Mobility Group Box 1
IAP	Integrin Associated Protein
IgM, IgG, IgY	Immunoglobulin M, G, Y
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif
LPC	Lysophosphatidylcholine
LRP1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
LXR	Liver X Receptor
MAMPs	Microorganism-Associated Molecular Patterns
M $\beta$ CD	Methyl- $\beta$ -cyclodextrin
MBL	Mannose-Binding Lectine
MEGF10	Multiple EGF like domains 10
MFG-E8	Milk Fat Globule-EGF factor 8
MHCI, MHCII	Major Histocompatibility Complex Class I, II
Milieu de culutre LB	Lysogeny broth culture medium
MJD	Mean Jump Distance
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
MSD	Mean Square Displacement
Ox-LDL	Oxydated Low Density Lipoprotein
PAINT	Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topograph
PALM	Photo-Activated Localization Microscopy
pDC	Plasmacytoid Dendritic Cell
PERK	Protein kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PRR	Pattern Recognition Receptors

PS	Phosphatidylserine
PSF	Point Spread Function
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End products
ROCK1	Rho-associated Coiled-coil-containing protein Kinase 1
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
S1PR <sub>1-5</sub>	Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1-5
SHP-1, SHP-2	Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase-1, 2
SIM	Structured Illumination Microscopy
SIRP $\alpha$	Signal-Regulatory Protein alpha
SLE	Systemic Lupus Erythematosus
SMLM	Single Molecule Localisation Microscopy
SP-A, SP-D	Surfactant Protein A, D
SPT	Single Particle Tracking
SR-A1	Scavenger Receptor class A member 1
SR-F1	Scavenger Receptor class F member 1
STED	Stimulated Emission Depletion
STK4	Serine/Threonine-protein Kinase 4
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
TIM1, TIM4	T-cell Immunoglobulin and Mucin domain-containing 1, 4
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
TLR	Toll-Like Receptors
TNFRSF1A, TNFRSF10A, TNFRSF10B	Tumour Necrosis Factor Receptor Superfamily member 1A, 10A, 10B
Treg	Regulatory T Lymphocyte
TSP1	Trombospondine 1
UV	Ultraviolet
WF	Widefield
XKR8	XK-Related protein 8

CHAPITRE

# I

## Introduction

### 1 De la mort des cellules par apoptose jusqu'à leur élimination par phagocytose

#### 1.1 Définition de l'apoptose

En 1972, le terme apoptose du grec : *apo*, « au loin » et *ptosis*, « chute » (faisant référence à la chute des feuilles en automne) fut introduit par Kerr, Wyllie et Currie afin de définir un type particulier de mort cellulaire à l'origine de l'élimination des cellules dans les tissus sains (Kerr et al., 1972). La définition de l'apoptose est alors basée sur des observations morphologiques décrivant la mort des cellules dites « apoptotiques » selon différentes étapes qui suivent un schéma ordonné. Ainsi l'apoptose est décrite comme un processus actif et programmé de destruction cellulaire aux conséquences immunologiques silencieuses. Le terme de « suicide cellulaire » ou de « mort cellulaire programmée » est par ailleurs utilisée pour faire référence à l'apoptose. Après sa découverte, la mort par apoptose a longtemps fait opposition à la mort passive des cellules par nécrose du grec *nekrosis*, « mortification », caractérisée par une rupture de l'intégrité membranaire et par la libération incontrôlée du contenu cellulaire à l'origine d'une réponse inflammatoire. Avec le temps, la classification des cellules mourantes a cependant gagné en complexité et désormais plus de 12 types de mort cellulaire ont été catégorisés [pour revue (Galluzzi et al., 2018)]. Elles se distinguent les unes des autres par leur initiation, les voies de signalisation qu'elles impliquent et leurs conséquences sur l'environnement cellulaire.

Dans la suite de cette introduction, nous nous focaliserons essentiellement sur l'apoptose : de son déclenchement à son élimination au cours du processus appelé efferocytose.

## 1.2 Rôles physiologiques associés à l'apoptose

L'apoptose intervient tout au long de la vie d'un organisme. Dès le développement embryonnaire, sa fonction est particulièrement importante dans la structuration des tissus et des organes. Un exemple emblématique est celui de la formation des doigts qui survient après l'élimination du tissu interdigital dont l'apoptose est en partie responsable (Lindsten et al., 2000). Cependant, même si l'apoptose est impliquée dans le développement d'un grand nombre de tissus, elle n'en est pas pour autant vitale, comme en témoignent la naissance et la survie, malgré la présence de malformations, des souris déficientes dans les protéines nécessaires à son initiation (Ke et al., 2018; Lindsten et al., 2000). Après la naissance, la mort par apoptose joue néanmoins un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie tissulaire [pour revue (Arandjelovic and Ravichandran, 2015)]. En effet, plusieurs tissus sont le théâtre d'une mort cellulaire massive comme le thymus ou encore la moelle osseuse où la grande majorité des lymphocytes meurent et sont éliminés durant le processus de sélection. D'autres cellules du système immunitaire sont en proie au même destin et sont rapidement renouvelées comme les neutrophiles avec une demi-vie de seulement 5.4 jours (Pillay et al., 2010). Les cellules endommagées lors d'un stress, lors d'une infection ou encore après l'assimilation de molécules toxiques déclenchent également leur mort par apoptose, ce qui conduit à leur élimination [pour revue (Singh et al., 2019)].

Le rôle de l'apoptose et son impact sur l'organisme sont étroitement liés au processus par lequel les organismes multicellulaires éliminent ces cellules mourantes. Ce processus se nomme efferocytose et il définit l'élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes. C'est un terme qui trouve son origine dans la racine latine *effero* qui signifie « emporter, mettre de côté, porter dans la tombe, enterrer » (deCathelineau and Henson, 2003). Contrairement à la phagocytose d'éléments étrangers au soi comme, par exemple des pathogènes, qui nécessite une réponse immunitaire inflammatoire, cette phagocytose est normalement anti-inflammatoire et conduit au maintien de la tolérance aux antigènes du soi. Cette différence repose sur la capacité des phagocytes à discriminer une cellule apoptotique d'un pathogène afin d'initier une réponse immune adéquate. Ainsi c'est la nature des cellules apoptotiques et en particulier celle de ses interactions avec les phagocytes qui vont guider la réponse immune et permettre le maintien de l'homéostasie tissulaire.

## 1.3 L'apoptose, un processus ordonné

Afin de mieux définir le processus d'efferocytose, il est nécessaire de rappeler les deux voies de signalisation à l'origine de l'initiation de l'apoptose : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque [pour revue (Bedoui et al., 2020; Galluzzi et al., 2018; Singh et al., 2019)]. D'après les recommandations du comité sur la mort cellulaire de 2018, la voie intrinsèque se définit comme étant « initiée par des perturbations du microenvironnement extracellulaire ou intracellulaire, elle se démarque par le MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization) et est précipitée par les caspases exécutrices, principalement la caspase 3 ». La voie extrinsèque est quant à elle « initiée par des perturbations du microenvironnement extracellulaire, détectées par des récepteurs de la membrane plasmique, propagée par CASP8 et précipitée par les caspases exécutrices, principalement la caspase 3 » (Galluzzi et al., 2018). Comme définies précédemment, ces deux cascades moléculaires aboutissent à l'activation des caspases. Ces protéines sont initialement présentes dans la cellule sous une forme inactive (procaspases) et deviennent actives durant l'apoptose suite à la libération de leur domaine catalytique. On distingue deux catégories de caspase selon leur rôle et leur mode d'activation :

les caspases dites initiatrices et celles exécutrices. Les caspases initiatrices sont recrutées et s'auto-activent au niveau de plateformes protéiques. Elles propagent le signal d'apoptose et entraînent l'activation des caspases exécutrices. Ces dernières sont quant à elles associées à la protéolyse directe et massive des protéines cibles disposant d'un site de clivage.

### 1.3.1 Voie intrinsèque

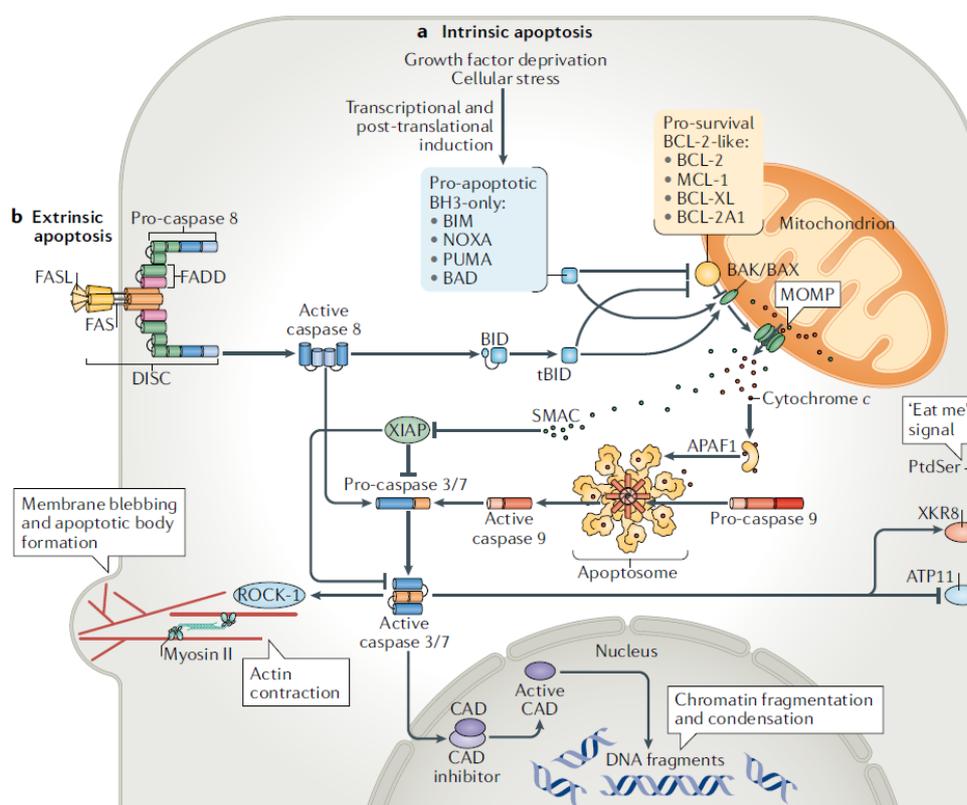
Le déclenchement de la voie intrinsèque survient après un stress dont l'origine peut être variable comme par exemple : la privation de la cellule de facteurs de croissance ou de nutriments, des lésions au niveau de l'ADN, un stress du réticulum endoplasmique ou encore des mitochondries (Figure 1a). Ces perturbations perçues par la cellule vont induire l'augmentation de l'expression, ou directement l'activité au travers de modifications post-traductionnelles, des protéines pro-apoptotiques « BH3-only » (BIM, BID, BAD, BIK, BMF, HRK, NOXA, PUMA). Ces protéines interagissent avec les protéines de la famille BCL-2 (BCL-2, BCL-XL, MCL-1 et BCL-2A1) et inhibent leur effets anti-apoptotiques. En effet, dans des conditions dites physiologiques, les protéines de la famille BCL-2 maintiennent les protéines BAK et BAX dans une forme monomérique inactive. Dès lors que les protéines BCL-2 sont inhibées par les protéines « BH3-only », les protéines BAK et BAX s'oligomérisent dans la membrane extérieure de la mitochondrie ce qui provoque la perméabilisation de celle-ci, un événement appelé MOMP. Cet événement décisif entraîne la libération des protéines mitochondriales dans le cytoplasme comme le cytochrome c. En interagissant avec la protéine APAF-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1), cette protéine de la chaîne de respiration mitochondriale induit la formation de l'apoptosome. La caspase 9, alors sous une forme inactive, est activée par cette plateforme multimérique. Une fois activée, cette caspase initiatrice entraîne ensuite l'activation des caspases effectrices 3 et 7 (Figure 1a). D'autres protéines mitochondriales libérées dans le cytoplasme participent également à l'amplification de l'activation des caspases effectrices. Parmi elles, les protéines SMAC et Omi capables de bloquer l'effet inhibiteur de la protéine XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) sur l'activation des caspases 3 et 7.

### 1.3.2 Voie extrinsèque

La voie extrinsèque se démarque de la voie intrinsèque par son activation qui résulte de l'interaction de récepteurs de mort cellulaire à la surface de la cellule avec leurs ligands (Figure 1b). Ces récepteurs font partie de la famille des récepteurs TNFR (Tumour Necrosis Factor Receptor) et regroupent les récepteurs FasR, TNFRSF1A, TNFRSF10A et TNFRSF10B (Tumour Necrosis Factor Receptor Superfamily member 1A, 10A & 10B). Si l'on prend l'exemple du récepteur FasR, l'interaction avec son ligand FasL lors d'un contact cellulaire, engendre son agrégation. Cette étape permet, au niveau du domaine transmembranaire du récepteur FasR, le recrutement des protéines adaptatrices FADD et de la procaspase 8 à l'origine de la formation d'une plateforme protéique qu'on appelle DISC (Death-Inducing Signaling Complex). C'est au niveau de cette plateforme que va s'opérer l'activation de la caspase 8 au travers de sa dimérisation et son clivage autocatalytique. L'activation de la caspase 8 converge alors vers l'activation des caspases 3 et 7. Cela s'effectue soit directement par le clivage des caspases exécutrices par la caspase 8, ou soit indirectement via la protéine BID. En effet, une fois activée, la caspase 8 clive la protéine BID, une protéine de la famille des protéines « BH3-only ». Cette action a pour effet la libération d'une forme tronquée (tBID) capable à la fois, de stimuler directement l'activation des protéines BAX et BAK, mais aussi d'inhiber les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2, rejoignant ainsi la voie de la signalisation

intrinsèque avec la perméabilisation des mitochondries. En fonction du niveau d'expression de la protéine XIAP, le clivage de la protéine BID est essentiel au déclenchement de l'apoptose chez plusieurs types cellulaires comme les hépatocytes ou les cellules pancréatiques  $\beta$ . On parle alors de cellules de type I. A l'inverse, chez les lymphocytes, l'activation des caspases 3 et 7 par la caspase 8 est suffisante à l'initiation du processus d'apoptose, on parle de cellules de type II (Jost et al., 2009).

Ces deux voies de signalisation aboutissent à l'activation des caspases effectrices. Ces caspases coordonnent graduellement la protéolyse de milliers de protéines, responsables des modifications caractéristiques associées au développement de l'apoptose (Crawford et al., 2013).



**Figure 1 :** Voies de signalisation et modifications emblématiques associées au développement de l'apoptose.

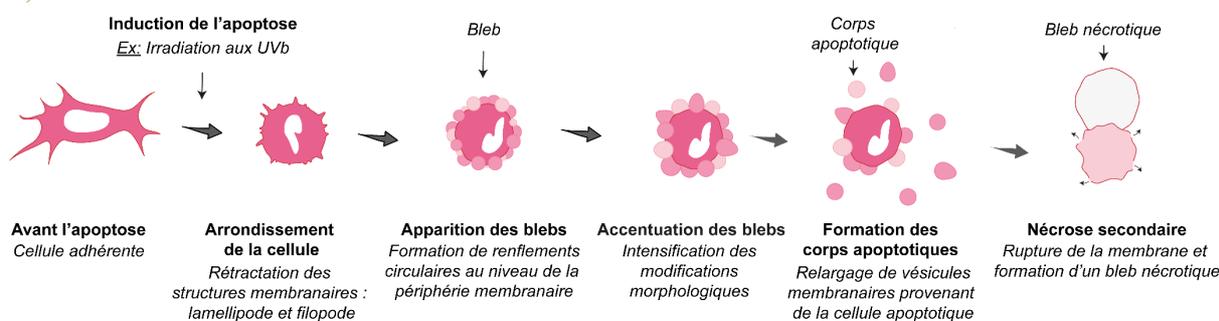
Les deux voies de signalisation intrinsèque (a) et extrinsèque (b), bien que distinctes, convergent à l'activation des caspases 3 et 7 à l'origine de l'initiation de l'apoptose. BAK (BCL2 Antagonist Killer), BAX (BCL2 Associated X), MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization), SMAC (Second Mitochondrial Activator of Caspases), APAF1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1), XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein), FADD (FAS Associated via Death Domain), DISC (Death-Inducing Signalling Complex), BID (BH3-Interacting domain Death agonist), CAD (Caspase-Activated DNase), ROCK1 (Rho-associated Coiled-coil-containing protein Kinase 1), XKR8 (XK-Related protein 8) [Tiré de (Bedoui et al., 2020), Fig.2].

## 1.4 Modifications cellulaires associées au développement de l'apoptose

L'action des caspases initie une réorganisation intracellulaire massive et intervient à tous les niveaux de la cellule, que ce soit au niveau du cytosquelette, du noyau et de l'ADN, des organelles de la cellule (mitochondrie, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi), des machineries de transcription et de traduction mais aussi sur les processus liés à l'adhérence des cellules [pour revue (Taylor et al., 2008)].

### 1.4.1 Modifications morphologiques

Les changements les plus caractéristiques, mais aussi les plus faciles à observer durant l'apoptose, sont les modifications morphologiques. Selon *Tixeria et collaborateurs*, qui ont défini dans le détail les différentes étapes de l'apoptose dans des conditions *in vitro* (Tixeira et al., 2017), la première étape survient dès la rétractation de la cellule. S'ensuit l'arrondissement de la cellule, puis la formation de « blebs » membranaires. Ces structures caractéristiques de l'apoptose correspondent à la formation de renflements circulaires au niveau de la membrane. Ensuite, ces changements morphologiques s'intensifient et deviennent plus dynamiques. Dans certains cas particuliers cette étape est accompagnée de la formation de structures spécifiques : « microtubule spikes », « apoptopodia » ou « beaded-apoptopodia » [pour revue (Atkin-Smith and Poon, 2017)]. Finalement, la cellule se dissocie ce qui engendre la formation de corps apoptotiques. Dans des conditions *in vitro*, si la cellule n'est pas phagocytée, l'intégrité de la membrane jusqu'alors maintenue tout au long du processus, est rompue. Cela provoque la libération chaotique du contenu du cytoplasme dans l'environnement extracellulaire accompagnée de la formation d'un bleb nécrotique, on parle alors de nécrose secondaire (Figure 2).



**Figure 2 :** Etapes morphologiques associées au développement de l'apoptose dans des conditions *in vitro*. [Adapté de (Tixeira et al., 2017), Fig.1a].

### 1.4.2 Modifications intracellulaires

Durant l'apoptose, les modifications morphologiques reposent pour une grande partie sur la désorganisation intracellulaire des composantes de la cellule et en particulier celle du cytosquelette. En effet, le cytosquelette se compose de trois types de polymères : l'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Il a pour rôle principal d'organiser le contenu de la cellule; de la connecter à l'environnement extracellulaire et de coordonner les forces nécessaires à son adhérence et à sa mobilité [pour revue (Fletcher and Mullins, 2010)]. Toutes ces fonctions sont perturbées durant l'apoptose avec la protéolyse d'une partie des protéines qui composent le cytosquelette [pour revue (Taylor et al., 2008)]. L'une des conséquences directes est la rétractation de la cellule et l'apparition des blebs au niveau de la membrane plasmique. Ce changement morphologique est avant tout orchestré par la kinase régulatrice de la dynamique du cytosquelette ROCK1 (Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1). L'activation constitutive de cette kinase par les caspases provoque la contraction des fibres d'actine (Coleman et al., 2001; Sebbagh et al., 2001). A noter donc que ce processus nécessite qu'une partie de l'actine soit encore fonctionnelle et non protéolysée par les caspases (Cotter et al., 1992). En parallèle les microtubules sont également impliqués dans la réorganisation intracellulaire et morphologique de la cellule apoptotique. Ils participent au maintien de l'intégrité membranaire et à la formation des corps apoptotiques (Povea-Cabello et al., 2017).

Ensuite, les connexions qu'entretient la cellule avec l'environnement extracellulaire, grâce entre autres, aux sites d'adhérences de la cellule, sont déstabilisées. En effet, ces sites sont à la fois dépendants de l'intégrité du cytosquelette mais aussi la cible des caspases. Ainsi les protéines FAK (Focal Adhesion Kinase), tensin et le domaine cytoplasmique des intégrines essentiels à l'assemblage de ces structures, sont clivés (Kook et al., 2003; Levkau et al., 1998; Meredith et al., 1998). Ces modifications impactent directement les protéines clés de l'adhérence cellulaire : les intégrines qui voient leur activité diminuer bien que leur expression soit maintenue (Dransfield et al., 1995).

La destruction organisée de la cellule s'accompagne aussi de la fragmentation des principales organelles comme le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi ou encore les mitochondries. Le réticulum endoplasmique ainsi que des fragments du noyau sont exportés et compactés dans les corps apoptotiques grâce à l'action du cytosquelette (Lane et al., 2005; Moss et al., 2006). Avant sa redistribution, l'ADN est condensé sous l'action des histones, comme l'histone 2B. Cette même histone est activée après sa phosphorylation par la kinase MST1 (ou STK4, Serine/Threonine-protein Kinase 4) transloquée au niveau du noyau suite à son clivage par les caspases (Cheung et al., 2003; Ura et al., 2001). L'ADN est ensuite clivé par l'action de la DNase CAD (Caspase-activated DNase), libérée de son inhibiteur ICAD, protéolysé par les caspases.

### 1.4.3 Modifications membranaires

L'ensemble des modifications intracellulaires ont de nombreuses répercussions au niveau de la membrane plasmique. Celle-ci forme une barrière entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire et se positionne comme une interface clé pour l'interaction et la communication de la cellule avec son environnement. Avant d'aborder les différentes modifications membranaires auxquelles est en proie la cellule apoptotique, il est important de résumer l'organisation générale de la membrane d'une cellule viable (par opposition à une cellule apoptotique).

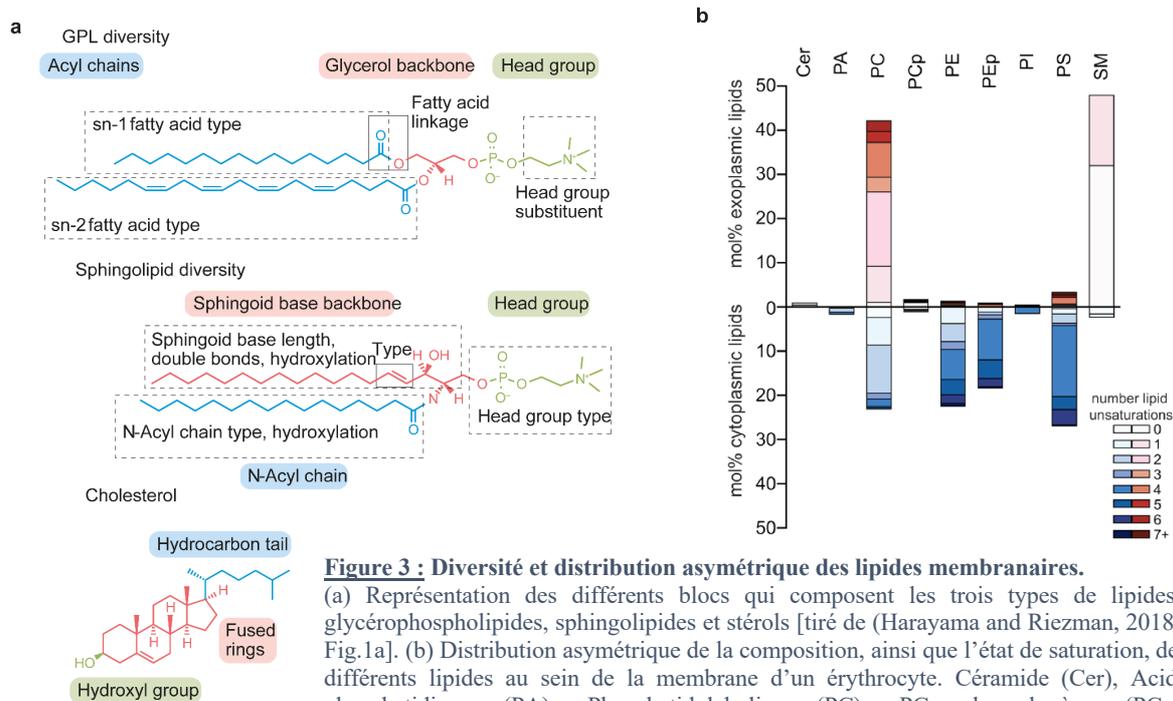
#### 1.4.3.1 Organisation générale de la membrane plasmique d'une cellule viable

- *Composition et propriétés de la membrane plasmique*

La membrane plasmique s'organise autour d'une bicouche lipidique d'une grande diversité, de par sa structure et la nature des molécules qui la composent [pour revue (Harayama and Riezman, 2018)]. Elle est composée en grande partie par des protéines ancrées ou transmembranaires et par des lipides. Si l'on prend l'exemple des érythrocytes, souvent utilisés comme cellules modèles dans l'étude de la membrane et sa composition, les protéines occupent 23% de l'espace membranaire (Dupuy and Engelman, 2008). Les trois principaux types de lipides qui composent la membrane sont : les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stérols. Parmi ces trois classes de lipides, les glycérophospholipides regroupent, par exemple, la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine (PS) ou encore le phosphatidylinositol. La sphingomyéline et les glycosphingolipides sont les représentants majeurs des sphingolipides. Enfin, le cholestérol est l'un des principaux représentants de la famille des stérols. Contrairement aux stérols, les glycérophospholipides et les sphingolipides sont composés d'une queue hydrophobe et d'une tête hydrophile, on dit de ces lipides qu'ils sont polaires. Bien qu'ils partagent des caractéristiques communes, ces deux classes de lipides se différencient, entre autres, par leur queue hydrophobe composée par un diacylglycérol pour les glycérophospholipides et d'une partie céramide pour les sphingolipides

(Figure 3a). Ils se différencient également par la longueur et par l'état de saturation des acides gras qui composent ces parties hydrophobes. De manière générale, les glycérophospholipides tendent à être insaturés (présence de double liaison  $c=c$ ) alors que les sphingolipides tendent à être saturés (absence de double liaison  $c=c$ ), bien que des exceptions existent. Enfin, les sphingolipides présentent la capacité à interagir préférentiellement avec le cholestérol (van Meer et al., 2008).

La composition de la membrane lui confère des propriétés physiques uniques [pour revue (Bernardino de la Serna et al., 2016)], parmi lesquelles, sa fluidité. En effet, les molécules qui la composent peuvent diffuser dans un plan 2D. Elles peuvent ainsi se déplacer, interagir avec des partenaires de part et d'autre de la membrane mais aussi au sein de celle-ci, une caractéristique importante pour la transmission de l'information [pour revue (Jacobson et al., 2019)]. La diffusion des protéines et des lipides dans la membrane plasmique est régulée par des composantes intra et extracellulaires. D'une part, elle est régulée par le cytosquelette et en particulier par l'actine corticale qui se trouve en contact étroit avec le feuillet interne de la membrane [pour revue (Trimble and Grinstein, 2015)]. D'autre part, elle est régulée par les glycocalyx, composés de glycoprotéines, de glycolipides et de sucres qui forment une couche épaisse à la surface de la cellule [pour revue (Möckl, 2020)]. De plus, la distribution lipidique et protéique de cette structure est asymétrique, ce qui signifie que la composition du feuillet interne et externe est différente. Le feuillet externe est enrichi majoritairement par la sphingomyéline et la phosphatidylcholine, alors que le feuillet interne est enrichi par la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine et le phosphatidylinositol (Figure 3b). Cette distribution spécifique de la membrane est coordonnée par l'action de trois types de protéines membranaires : les flippases, les floppases et les scramblases. Les flippases et les floppases assurent respectivement la translocation des lipides du feuillet externe vers le feuillet interne et inversement, alors que les scramblases assurent le transport des lipides de manière bidirectionnelle. De façon similaire, la fluidité et la saturation des lipides sont aussi asymétriques. Ainsi le feuillet externe est plus saturé, plus dense mais aussi moins fluide que le feuillet interne (Lorent et al., 2020) (Figure 3b).



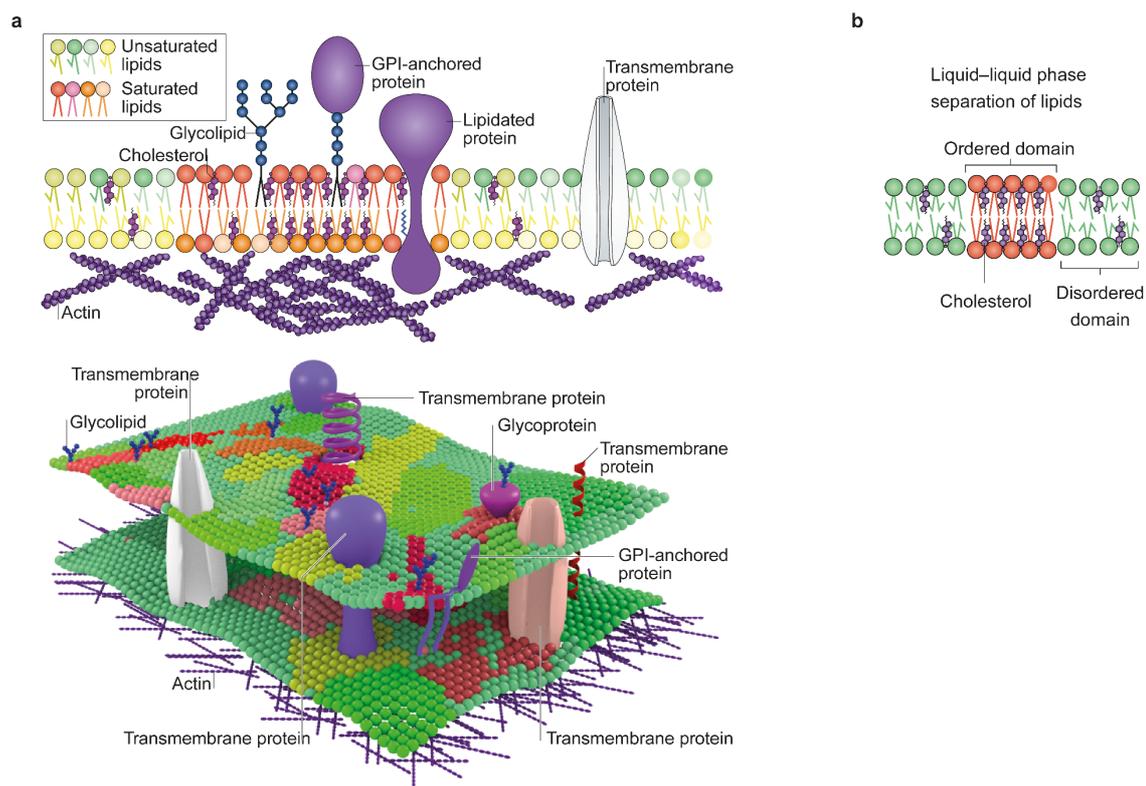
**Figure 3 : Diversité et distribution asymétrique des lipides membranaires.**

(a) Représentation des différents blocs qui composent les trois types de lipides : glycérophospholipides, sphingolipides et stérols [tiré de (Harayama and Riezman, 2018), Fig. 1a]. (b) Distribution asymétrique de la composition, ainsi que l'état de saturation, des différents lipides au sein de la membrane d'un érythrocyte. Céramide (Cer), Acide phosphatidique (PA), Phosphatidylcholine (PC), PC plasmalogène (PCp), Phosphatidylethanolamine (PE), PE Plasmalogen (PEp), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylsérine (PS), Sphingomyéline (SM) [tiré de (Lorent et al., 2020), Fig. 1a].

- *Les radeaux lipidiques*

Une autre des particularités de la membrane plasmique est sa distribution hétérogène, qui s'illustre par la présence de radeaux lipidiques en membrane (Figure 4a). Ces domaines membranaires se définissent comme « *petits (10-200 nm), hétérogènes, hautement dynamiques, enrichis en stérols et sphingolipides sous forme de domaines qui compartimentalisent des processus cellulaires. Ils peuvent être parfois stabilisés au travers d'interactions entre protéines ou entre protéines et lipides pour former de plus grandes plateformes* » (Pike, 2006). Divers processus membranaires sont dépendants des radeaux lipidiques [pour revue (Sviridov and Miller, 2020)]. L'une de leurs fonctions principales est de favoriser à la fois le regroupement de certaines protéines, mais aussi leurs interactions. Ils peuvent également influencer directement la conformation des protéines. C'est le cas des récepteurs GPCR (G Protein-Coupled receptors) ou encore des tétraspanines dont la conformation peut être dépendante de la présence de cholestérol enrichi au niveau de ces plateformes lipidiques (Gimpl, 2016; Zimmerman et al., 2016).

L'existence même des radeaux lipidiques à la surface d'une cellule a longtemps fait l'objet de controverses au sein de la communauté scientifique principalement du fait que, par nature, ce sont des éléments de petites tailles et extrêmement dynamiques limitant ainsi leur observation directe au sein de modèles *in vivo* [pour revue (Levental et al., 2020)]. L'une des méthodes la plus utilisée pour étudier les radeaux lipidiques, est la solubilisation de la membrane avec des détergents à basse température afin d'isoler des fractions membranaires résistantes à l'action des détergents. Ces fractions sont enrichies en sphingolipides, stérols et protéines, et sont supposées isoler les radeaux lipidiques. Cette technique a permis d'apporter les premières preuves en faveur de l'hétérogénéité de la membrane dans la répartition des lipides et des protéines (Yu et al., 1973). Cependant, elles sont fondées sur une observation indirecte de ces structures et les résultats obtenus sont variables selon la température ou le détergent utilisé (Munro, 2003). Pour pallier ce problème des modèles artificiels de membranes ont été développés. Ils reposent sur des vésicules géantes synthétiques (GUV, Giant Unilamellar Vesicle) reconstruites à partir d'un mélange de lipides ou sur la purification de vésicules extraites de membranes de cellules (GPMV, Giant Plasma Membrane Vesicle). Bien qu'elles soient dépourvues d'actine corticale et symétriques dans la distribution lipidique, ces dernières conservent, la diversité lipidique et protéique de la membrane plasmique. Elles permettent, avec les GUV, de visualiser la séparation des lipides en deux phases en fonction de leurs propriétés. Une phase ordonnée, enrichie en lipides saturés et cholestérol, dont les propriétés se rapprochent de celles des radeaux lipidiques. Et une phase désordonnée, plus fluide, moins épaisse, enrichie en lipides insaturés (Figure 4b). Néanmoins, ces modèles ne reflètent pas toute la complexité de la cellule vivante, et l'étude des radeaux lipidiques nécessite des modèles *in vivo*. Cela a été rendu possible, grâce à la mise au point des techniques de microscopie à super résolution capable de résoudre à l'échelle nanométrique l'organisation et la dynamique des molécules à l'échelle de la membrane plasmique. En parallèle, le développement de sondes fluorescentes sensibles à leur environnement lipidique ainsi que d'analogues fluorescents des lipides ont suggéré l'observation *in vivo* des radeaux lipidiques (Komura et al., 2016). Par ailleurs, les paramètres influençant l'affinité d'une protéine pour les radeaux lipidiques commencent à être décrits. Plusieurs critères semblent importants, comme la surface du domaine transmembranaire, sa longueur mais aussi ses modifications post traductionnelles (ex : ajout d'un acide gras aussi appelé palmitoylation) (Lorent et al., 2017).

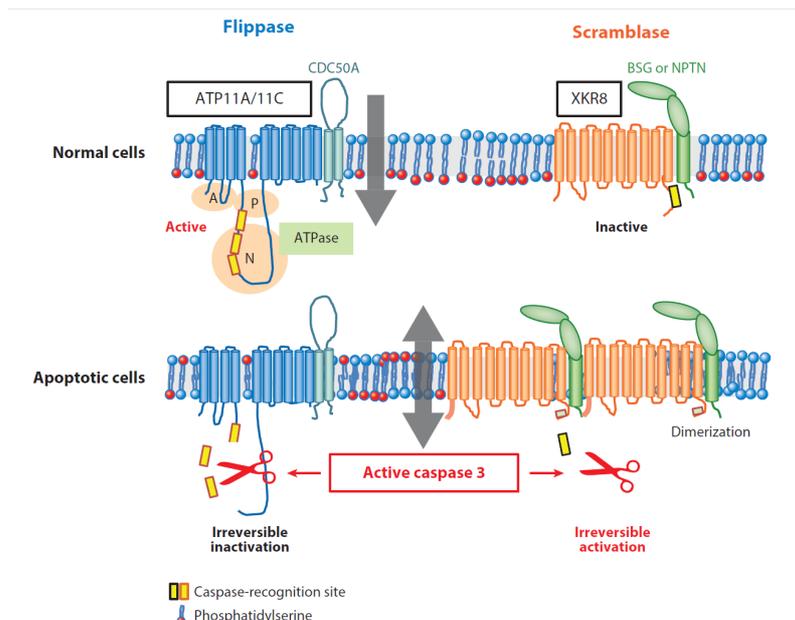


**Figure 4 : Organisation de la membrane plasmique et composition des radeaux lipidiques.**

(a) Distribution hétérogène de la membrane plasmique à la surface d'une cellule viable. (b) Séparation des lipides selon un état ordonné et désordonné en fonction de leur état de saturation et de l'enrichissement local en cholestérol [tiré de (Sezgin et al., 2017), Fig.1a, b & Fig.2a].

#### 1.4.3.2 Perturbations membranaires de la cellule en apoptose

L'action des caspases et des modifications intracellulaires associées, ont un impact profond sur l'organisation générale de la membrane plasmique. L'une des conséquences directes est la perte d'asymétrie caractérisée par l'exposition de la phosphatidylsérine (PS) au niveau du feuillet externe [pour revue (Nagata, 2018)]. Dans des conditions dites « physiologiques », deux flippases de la famille P4 ATPase (l'ATP11A et ATP11C) jouent un rôle prépondérant dans le maintien de la distribution de la PS (Segawa et al., 2014, 2016). Elles sont responsables de la translocation de la PS vers le feuillet interne lorsque celle-ci commute spontanément vers le feuillet externe, même si ce processus est relativement lent (McConnell and Kornberg, 1971). La fonction de ces deux flippases est étroitement liée à la protéine CDC50A qui orchestre leur localisation à la membrane. Durant l'apoptose, ces flippases sont inactivées après leur clivage par les caspases. En parallèle, ce processus est amplifié par l'action des scramblases comme la protéine XKR8. Cette protéine de la famille des protéines XK-related (XKR) a été identifiée comme une scramblase clé dans la suppression de la distribution asymétrique de la PS. Guidée jusqu'à la membrane par les protéines basigine ou neuroplastine (Suzuki et al., 2016), XKR8 entame sa fonction de scramblase après sa dimérisation sous l'action protéolytique des caspases (Suzuki et al., 2013). En conséquence, l'inactivation conjointe des flippases et l'activation des scramblases provoquent la rupture de l'asymétrie membranaire.



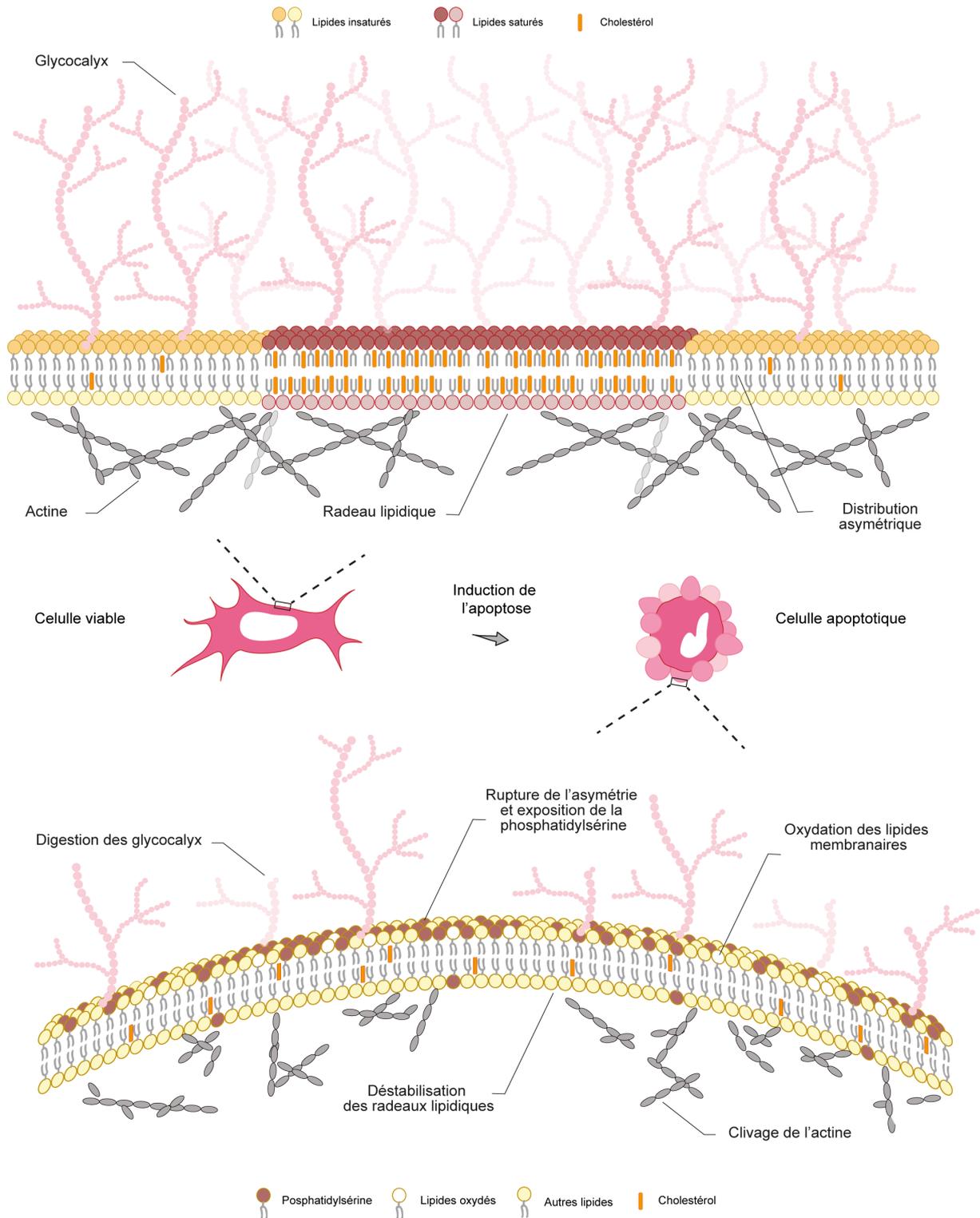
**Figure 5 : Mécanismes d'exposition de la PS au niveau du feuillet externe durant l'apoptose.**

A la surface des cellules viables, les flippases ATP11A/11C guidées à la membrane par CDC50A, assurent le transfert de la PS du feuillet interne vers le feuillet externe. Durant l'apoptose, l'exposition de la PS est coordonnée par l'inactivation des flippases et l'activation de la scramblase XKR8 par les caspases. La scramblase XKR8 est guidée à la membrane par la protéine basigine (BSG) ou neuroplastine (NPTN) [tiré de (Nagata, 2018), Fig.2].

De plus, au cours de l'apoptose, la déstabilisation de l'architecture membranaire est corrélée avec une diminution de la proportion des domaines lipidiques ordonnés, liée à la perturbation des radeaux lipidiques (Pyrshv et al., 2017). Une observation que l'on constate également à la surface des cellules viables lorsqu'elles sont traitées par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD) ou encore l'enzyme sphingomyélinase. Ces deux traitements, visent respectivement à extraire le cholestérol des membranes et à hydrolyser la sphingomyéline : deux lipides clés dans la formation des radeaux lipidiques (Darwich et al., 2012; Pyrshev et al., 2017). En parallèle, les propriétés physiques de la membrane évoluent, celle-ci devient plus fluide (Bailey et al., 2009; Gibbons et al., 2013).

Le déclenchement de l'apoptose, accompagnée de la perméabilisation des mitochondries, entraîne la libération des protéines mitochondriales ainsi que des ROS (Reactive Oxygen Species) propices à l'établissement d'un environnement oxydatif. La phosphatidylsérine est oxydée sous l'action du cytochrome C (Jiang et al., 2004; Tyurin et al., 2014). A noter que l'oxydation des composants de la membrane est aussi un inducteur de l'apoptose [pour revue (Fruhworth and Hermetter, 2008)]. Le déclenchement de l'apoptose entraîne également l'altération des glycocalyx à la surface des corps apoptotiques. Un processus qui implique à la fois, l'exposition au niveau de la membrane d'enzymes glycolytiques, mais aussi l'activation de ces mêmes enzymes, dont la sialidase Neu 1, par les caspases (Bilyy et al., 2012; Ucker et al., 2012).

Ainsi, l'organisation générale de la membrane plasmique évolue à la surface des cellules apoptotiques. Les différentes modifications auxquelles elle est en proie la distingue de la cellule viable (Figure 6). Ce sont ces modifications qui vont initier la reconnaissance de la cellule en apoptose par le phagocyte et entraîner son élimination au cours de l'efferocytose.

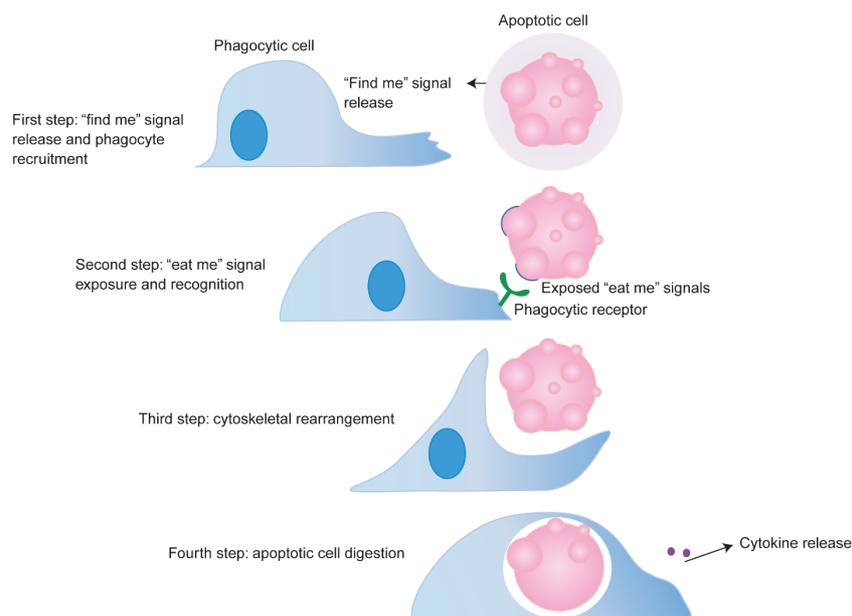


**Figure 6 :** Comparaison de l'organisation membranaire entre une cellule viable et une cellule apoptotique.

Durant l'apoptose, la membrane forme des invaginations membranaires, les radeaux lipidiques sont déstabilisés, l'asymétrie de la membrane est rompue, certains lipides de la membrane sont oxydés et le cytosquelette ainsi que les glycoalyx sont digérés.

## 1.5 Élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes

On peut décomposer l'élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes, appelée l'efferocytose, selon quatre grandes étapes (Figure 7). Premièrement, la cellule apoptotique libère les signaux « find me », à la base du recrutement du phagocyte. Deuxièmement, elle est reconnue suite à l'exposition des signaux « eat-me » exposés à sa surface. Troisièmement, l'interaction des récepteurs du phagocyte avec les signaux « eat-me » de la cellule apoptotique entraîne le réarrangement du cytosquelette et la formation de la coupe phagocytaire à l'origine de l'internalisation de la cellule apoptotique. Cette étape précède, quatrièmement, sa digestion et la libération de cytokines anti-inflammatoires par le phagocyte.



**Figure 7 :** Description des différentes étapes de l'efferocytose.

L'efferocytose se décompose en quatre grandes étapes, avec I/ le recrutement du phagocyte suite à la libération des signaux « find-me » par la cellule apoptotique. II/ La reconnaissance par le phagocyte des signaux « eat-me » exposés par la cellule apoptotique à l'origine de III/ l'initiation du processus de phagocytose dépendant de la réorganisation du cytosquelette. IV/ Suite à son internalisation, la cellule apoptotique est digérée par le phagocyte entraînant la libération de cytokines anti-inflammatoires [tiré de (Hochreiter-Hufford and Ravichandran, 2013), Fig.1].

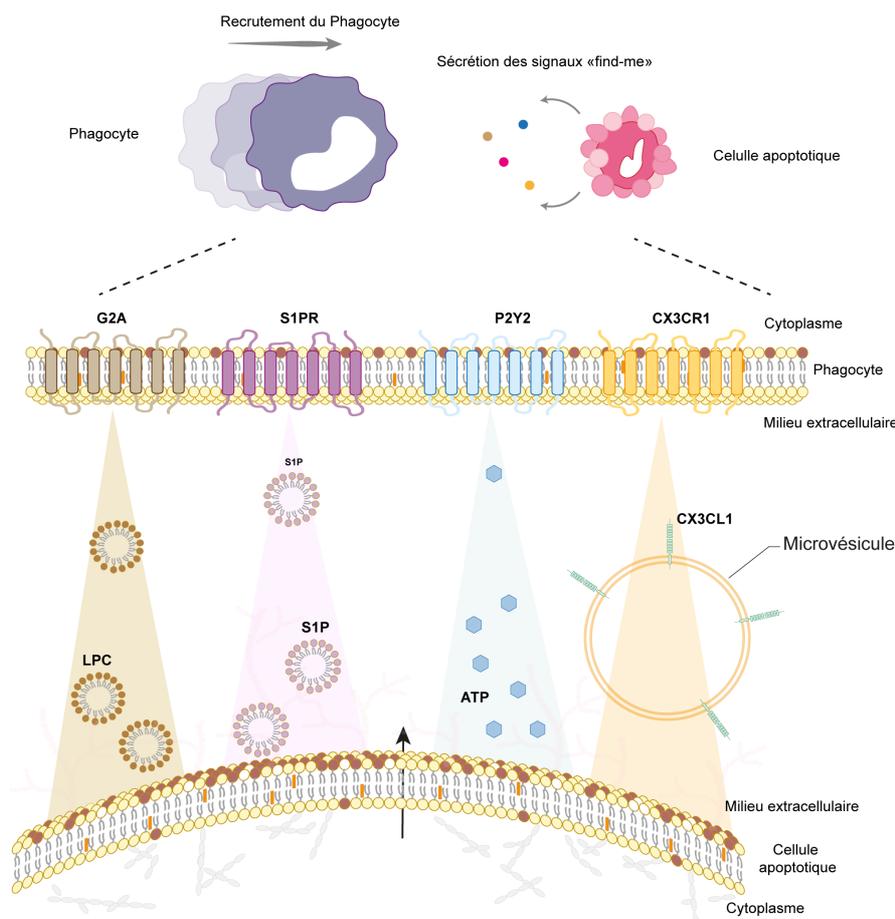
### 1.5.1 Libération des signaux “find-me” et recrutement du phagocyte

Durant la « démolition » ordonnée de la cellule apoptotique, des molécules sont sécrétées dans le milieu extracellulaire et agissent comme des messagers (Figure 8). Elles informent à la fois les cellules environnantes sur l'état apoptotique de la cellule, mais aussi stimulent la migration et le recrutement des phagocytes. Plusieurs types de messagers moléculaires (lipides, chimiokines, nucléotides) ont été identifiés et sont désormais catégorisés comme des signaux « find-me » [Pour revue (Medina and Ravichandran, 2016)]. A noter que l'intégrité membranaire étant maintenue durant le déroulement de l'apoptose, la libération de ces molécules est un processus actif initié par l'activation de transporteurs par les caspases.

Les premières molécules qui ont été identifiées sont des lipides capables de stimuler la migration dirigée (chimiotaxie) des phagocytes. C'est le cas de la lysophosphatidylcholine (LPC), qui lorsqu'elle est libérée dans le surnageant cellulaire par les cellules apoptotiques, stimule le recrutement des phagocytes après avoir été reconnue par le récepteur G2A (Lauber et al., 2003; Peter et al., 2008). De façon similaire, la sphingosine-1-phosphate (S1P), joue également un rôle attractif vis-à-vis des macrophages. Lorsque sa sécrétion par les cellules

apoptotiques augmente, elle est détectée par les récepteurs S1PR<sub>1-5</sub> (Sphingosine-1-phosphate receptor 1-5). A noter que le rôle exact de chacun de ces récepteurs reste à préciser (Gude et al., 2008). L'activation des caspases provoque aussi la libération de nucléotides (ATP et UTP) qui sont détectés par le récepteur P2Y2. Ce couple, représente un acteur important dans le processus de recrutement des phagocytes, puisque la déplétion du récepteur P2Y2 retarde significativement l'élimination des thymocytes apoptotiques par les macrophages chez la souris (Elliott et al., 2009). Finalement, le recrutement des macrophages dans les centres germinatifs, lieux en proie à une forte apoptose des lymphocytes B durant le processus de maturation, est dépendant de la libération de la chimiokine CX3CL1. Elle est sécrétée à la surface de microvésicules et est reconnue par le récepteur CX3CR1 du macrophage. Cependant, il est important de souligner, que même si ce récepteur est essentiel au recrutement des macrophages au niveau du centre germinatif, sa présence n'est pas indispensable à l'élimination des cellules apoptotiques (Truman et al., 2008).

Le rôle de ces molécules dépasse la seule fonction de « find-me ». Par exemple, la chimiokine CX3CL1 stimule également l'expression de la protéine MFG-E8 (Milk Fat Globule-EGF factor 8), une molécule impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques (Miksa et al., 2007). Quant au « find-me » SP1, l'interaction avec son récepteur (S1P<sub>1</sub>) induit l'expression du facteur de transcription PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$ ). Ce dernier est important car il intervient dans la régulation du métabolisme et la réponse immunitaire du phagocyte durant l'efferocytose (Luo et al., 2016).



**Figure 8 :** Libération des signaux « find-me » par la cellule apoptotique à l'origine du recrutement du phagocyte. Différents "find-me" signaux sont représentés dont la Lysophosphatidylcholine (LPC), la Sphingosine-1-Phosphate (S1P), l'Adénosine-TriPhosphate (ATP) et la Chimiokine CX3CL1 (CX3CL1) ainsi que leur récepteur respectif (G2A, S1PR, P2Y2, CX3CR1). La reconnaissance des « find me » par le phagocyte stimule sa migration vers la cellule cible.

## 1.5.2 Reconnaissance de la cellule apoptotique par le phagocyte

Une fois recruté, il est nécessaire pour le phagocyte de faire la discrimination entre une cellule apoptotique et une cellule viable. Ainsi, plusieurs molécules sont exposées à la surface des cellules apoptotiques et favorisent sa reconnaissance par le phagocyte. L'interface ainsi formée entre la cellule apoptotique et le phagocyte est appelée « efferosynapse » par homologie à la synapse immunologique qui se forme au contact entre une cellule présentatrice d'antigène et un lymphocyte.

### 1.5.2.1 Rôle des signaux « don't eat-me »

Certaines protéines ont été identifiées comme inhibitrices de la phagocytose lorsqu'elles sont exposées à la surface d'une cellule viable et reconnues par les récepteurs exprimés par le phagocyte. Elles empêchent ainsi la phagocytose des cellules viables. On appelle ces molécules des « don't eat-me » signaux [(Pour revue (Kelley and Ravichandran, 2021))]. En transfusant des érythrocytes déficients en CD47 chez des souris sauvages, Oldenborg et collaborateurs avaient remarqué que l'espérance de vie des érythrocytes était réduite, car phagocytés par les macrophages présents dans la rate (Oldenborg, 2000). L'un des premiers « don't eat-me » fut ainsi identifié : la protéine transmembranaire CD47 et son récepteur SIRP $\alpha$  (Signal-Regulatory Protein alpha). De façon similaire, d'autres protéines membranaires ont ensuite été identifiées telles que CD24 et son récepteur siglec-10 (Barkal et al., 2019), PDL-1 et son récepteur PD-1 (Gordon et al., 2017) et enfin le complexe MHC-I et son récepteur LILRB1 (Barkal et al., 2018). L'effet inhibiteur de ces différents couples repose sur la phosphorylation du récepteur au niveau des motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) présent dans le domaine intracellulaire, entraînant le recrutement de phosphatases capables d'inhiber la phosphorylation et donc la signalisation associée à la phagocytose. L'ensemble de ces « don't eat-me » est exprimé par un large panel de cellules au sein de l'organisme. Beaucoup d'entre eux ont été identifiés et étudiés dans le cadre des cancers car les cellules tumorales détournent leur fonction inhibitrice à leur avantage afin d'empêcher leur phagocytose. Néanmoins, le rôle exact de ces molécules et leur devenir tout au long de l'apoptose restent encore peu étudiés.

### 1.5.2.2 Exposition des signaux « eat-me »

A l'inverse des « don't eat-me », plusieurs signaux ont été identifiés à la surface des cellules apoptotiques comme favorable à leur phagocytose et sont désormais considérés comme des signaux « eat-me ». Le signal le plus étudié et commun à l'ensemble des cellules apoptotiques est l'exposition de la PS (Fadok et al., 1992). Une fois exposée en surface lors de la perte d'asymétrie de la membrane, la PS est reconnue par une multitude de récepteurs impliqués dans le processus de phagocytose. Un autre « eat-me » emblématique de l'apoptose est la calréticuline (CRT) exposée en surface (Gardai et al., 2005). Cette protéine du réticulum endoplasmique est maintenant bien connue pour être exposée à la surface des cellules cancéreuses traitées par des drogues pro-apoptotiques [pour revue (Fucikova, 2020)]. Enfin, d'autres signaux ont été proposés pour favoriser la phagocytose de cellules mourantes mais nombre d'entre eux apparaissent lorsque la cellule atteint le stade de nécrose secondaire [pour revue (Westman et al., 2020)]. De plus, certains sont spécifiques d'un type cellulaire comme la protéine ICAM-3 exprimée majoritairement par les leucocytes. Elle favorise à la fois la chimiotaxie des macrophages et la stabilisation de l'efferosynapse au travers de son interaction avec le récepteur CD14 (Moffatt et al., 1999; Torr et al., 2012).

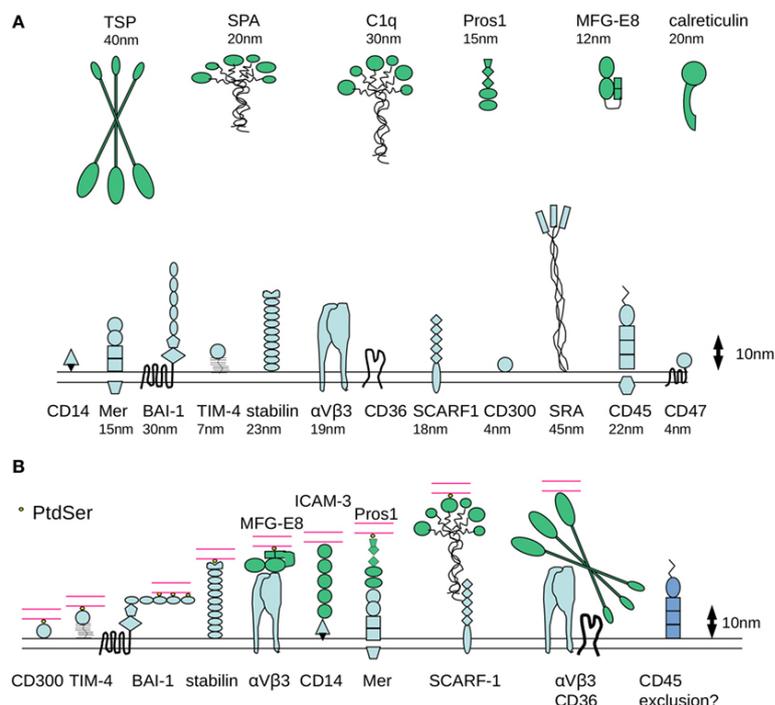
L'exposition des différents signaux « eat-me » évolue durant l'apoptose et module ainsi la capacité des phagocytes à interagir avec les cellules selon le stade de l'apoptose. Cependant, on ne connaît pas encore la contribution précise de chacun de ces « eat-me » et « don't eat-me » signaux au sein de l'efferosynapse. De plus, il est difficile d'estimer l'interdépendance, la synergie ou encore l'antagonisme de ces différentes molécules vis-à-vis de la reconnaissance mais aussi de la réponse immune associée. Par ailleurs, il manque encore des données relatives à l'influence de l'organisation membranaire des « eat-me » et « don't eat-me » sur leur reconnaissance par le phagocyte.

### 1.5.2.3 Récepteurs de l'efferocytose

Les molécules exposées à la surface de la cellule apoptotique sont ensuite reconnues par les phagocytes grâce à une large palette de récepteurs [pour revue (Levine and Ucker, 2019)]. Une multitude de récepteurs a été identifiée comme participant à la reconnaissance directe des signaux « eat-me » et en particulier à la reconnaissance de la PS. C'est le cas des récepteurs BAI1 (Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1), TIM1 & TIM4 (T-cell Immunoglobulin and Mucin domain-containing 1 & 4), stabilin-1 & 2, CD300b ou encore RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) qui interagissent directement avec la PS. A l'inverse, d'autres récepteurs nécessitent des molécules solubles connectant les « eat-me » à des récepteurs de l'efferocytose. Parmi eux, on retrouve les récepteurs de la famille TAM (Tyro3, Axl, et MerTK) qui au travers des molécules solubles Gas6 et protéine S reconnaissent la PS. Les intégrines  $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$  reconnaissent quant à elles la PS par l'intermédiaire de la protéine soluble MFG-E8 (Milk Fat Globule-EGF factor 8 protein). Enfin, d'autres molécules solubles comme la thrombospondine 1 (TSP1), la protéine du complément C1q ou encore SP-A (Surfactant Protein A) se positionnent comme des plateformes protéiques et sont capables d'interagir avec un grand nombre de partenaires de part et d'autre de l'efferosynapse. Par exemple, C1q interagit à la fois avec la PS ou encore la CRT mais aussi avec les récepteurs LRP1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1), SR-F1 (Scavenger Receptor class F member 1) et MEGF10 (Multiple EGF like domains 10). La TSP1 est quant à elle reconnue par les récepteurs CD36 et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , même si ses ligands à la surface de la cellule apoptotique restent à être caractérisés. Par ailleurs, bien que les récepteurs de l'efferocytose reconnaissent pour la plupart la PS, leurs structures ainsi que leurs tailles sont très variables. Par exemple, les récepteurs CD300 et TIM4 ont une longueur de 4 et 7 nm respectivement, tandis que la stabiline-2 (20 nm) et C1q (30 nm) sont plus étendues (Figure 9).

Ces récepteurs ne sont pas tous exprimés sur une même cellule, cela dépend du type de phagocyte et de sa polarisation [pour revue (Hughes et al., 2021; Morioka et al., 2019)]. Certains récepteurs peuvent agir en synergie. Par exemple, TIM4 qui ne possède pas de domaine de signalisation au niveau de sa queue cytoplasmique, coopère avec MerTK (Park et al., 2009). Il stabilise la connexion entre la cellule apoptotique et le macrophage afin de promouvoir la signalisation du récepteur MerTK (Nishi et al., 2014). De même, le récepteur « scavenger » SR-AI (Scavenger Receptor class A member I) participe lui aussi à l'élimination des cellules apoptotiques en favorisant la signalisation du récepteur MerTK (Todt et al., 2008). Enfin, même si la capacité des différents récepteurs à reconnaître les cellules apoptotiques est redondante, les conséquences sur la fonction de phagocytose ne le sont pas. En effet, chez les souris déficientes pour la protéine MerTK, le récepteur BAI1 restaure que partiellement le processus d'efferocytose, malgré le fait qu'ils reconnaissent tous les deux la PS. Une différence que les auteurs proposent d'être liée aux gènes normalement régulés par MerTK (Penberthy et al., 2017). La distribution de ces récepteurs au niveau de l'efferosynapse reste à être étudiée en détail, même si des données cinétiques ont récemment été obtenues grâce à l'étude de Draper 1 chez *Drosophila melanogaster*. L'étude de cette protéine homologue à la protéine CED-1

(*C.elegans*), a permis de mettre en avant les différentes étapes nécessaires à l'initiation de la phagocytose, avec premièrement la clusterisation du récepteur Draper 1 et deuxièmement, l'exclusion des phosphatases transmembranaires du contact (Williamson and Vale, 2018).



**Figure 9 : Récepteurs de l'efferosynapse.**

(A) Estimation de la taille des récepteurs et des molécules solubles, (B) ainsi que celle des complexes formés au niveau du contact cellulaire entre le phagocyte et la cellule apoptotique [tiré de (Barth et al., 2017), Fig.2].

### 1.5.3 Voie de signalisation de l'efferocytose

La reconnaissance de la cellule apoptotique par le phagocyte entraîne la réorganisation du cytosquelette à l'origine de la formation de la coupe phagocytaire. Deux voies de signalisation redondantes à l'origine de ce processus ont d'abord été identifiées chez *C.elegans* (Ellis et al., 1991). Cette découverte a permis ensuite d'identifier des protéines homologues chez les mammifères, expliquant entre autres pourquoi, il est commun d'introduire les protéines de *C.elegans*. Ces deux voies de signalisation aboutissent à l'activation de la protéine Rac1, une protéine de la famille des Rho GTPase (homologue CED-10, *C.elegans*) à l'origine de l'initiation de la polymérisation de l'actine, nécessaire à la phagocytose de la cellule apoptotique (Kinchen, 2010).

#### 1.5.3.1 Voie CED-1, CED-6 et CED-7

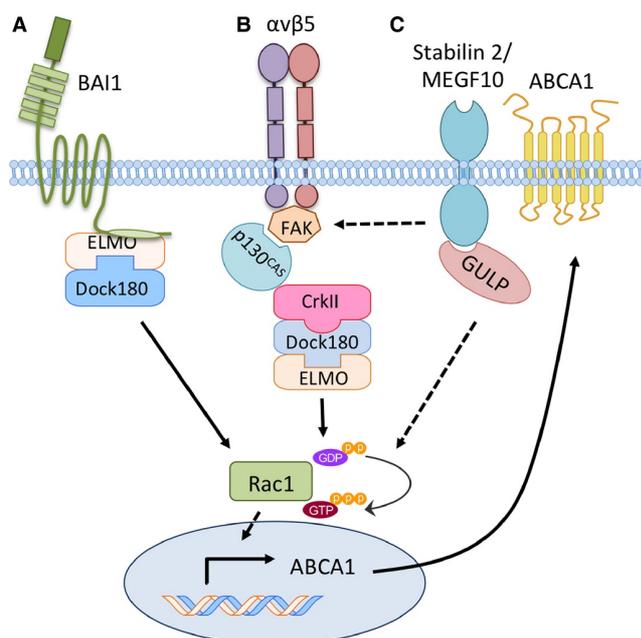
La première voie de signalisation se compose des protéines CED-1, CED-6 et CED-7. La protéine CED-1 est un récepteur transmembranaire qui s'apparente aux récepteurs scavengers. Chez *C.elegans*, elle est à la base de la reconnaissance des cellules apoptotiques puisqu'elle reconnaît la phosphatidylsérine de manière indirecte au travers de la protéine TTR-52 (Wang et al., 2010; Zhou et al., 2001). La protéine CED-6 se lie à la protéine CED-1 et permet la transmission du signal jusqu'à CED-10 (Su et al., 2002). Plusieurs homologues à CED-1 ont été identifiés chez les mammifères comme les récepteurs LRP1 (région cytoplasmique), MEGF10 et SR-F1, tous décrits comme participant à la reconnaissance des cellules apoptotiques de manière indirecte par le biais de la protéine C1q (Gardai et al., 2005;

Iram et al., 2016; Ramirez-Ortiz et al., 2013; Su et al., 2002). La signalisation des récepteurs LRP1 et MEGF10 est médiée par la protéine GLUP, homologue à CED-6 (Su et al., 2002). A noter que d'autres récepteurs comme la stabiline 1 & 2 sont également dépendants de la protéine GLUP pour leur signalisation (Park et al., 2008, 2010). Finalement, bien qu'essentiel à l'élimination des cellules apoptotiques, le rôle de CED-7 reste équivoque. Cette protéine est homologue à la protéine ABCA1 (protéine de la famille des ABC transporteurs) chez les mammifères. Elle contribue entre autres, à la régulation du cholestérol via son transport au niveau de la membrane plasmique [pour revue (Phillips, 2014)]. Durant l'efférocytose, cette protéine de la famille des ABC transporteurs intervient dans différentes étapes autres que celle de la phagocytose. Elle participe à la libération du « find-me » LPC par la cellule apoptotique (Peter et al., 2012), mais aussi à la régulation du métabolisme du cholestérol par le macrophage. Des fonctions qui supportent un rôle plus global de la protéine ABCA1 dans l'efférocytose, plutôt qu'un rôle isolé dans la voie de signalisation CED-1, CED-6 et CED-7.

### 1.5.3.2 Voie CED-2, CED-5 et CED-12

La deuxième voie de signalisation chez *C.elegans* se compose des protéines CED-2, CED-5 et CED-12. Elles ont comme homologues chez les mammifères les protéines CrkII – Dock180 – ELMO respectivement. Durant la reconnaissance de la cellule apoptotique, ces trois protéines interagissent et coopèrent ensemble dans l'initiation de l'activation de Rac1 (Brugnera et al., 2002). Différents récepteurs ont été identifiés comme utilisant cette voie de signalisation. C'est le cas des récepteurs BAI1 (Park et al., 2007), de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  (Albert et al., 2000) et du récepteur MerTK via Gas6 (Wu et al., 2005). Dans le cas de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$ , son interaction avec la protéine soluble MFG-E8 fixée à la surface d'une cellule apoptotique, entraîne la phosphorylation de la protéine p130<sup>cas</sup> par la tyrosine Kinase FAK. Une fois phosphorylée, elle s'associe ensuite avec CrkII et recrute Dock180 pour finalement activer Rac1 (Akakura et al., 2004).

La contribution respective de ces deux voies de signalisation reste à préciser, tout comme les récepteurs dépendants de celles-ci. Néanmoins, elles convergent toutes les deux vers l'activation de Rac1, initiant la réorganisation du cytosquelette et l'internalisation de la cellule apoptotique (Figure 10).



**Figure 10 :** Complexes de signalisation associés à des récepteurs de l'efférocytose à l'origine de l'activation de Rac1.

(A) BAI1 interagit avec les protéines ELMO et Dock180 nécessaires à l'activation de Rac 1. (B) L'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  interagit avec le module CrkII – Dock180 – ELMO au travers de la phosphorylation de p130<sup>cas</sup>. (C) Les récepteurs stabiline 2, MEGF10 utilise la protéine adaptatrice GLUP pour activer Rac1. L'internalisation de la cellule apoptotique par le phagocyte favorise l'expression de la protéine ABCA1 en membrane [tiré de (Penberthy and Ravichandran, 2016), Fig.6].

#### 1.5.4 Digestion de la cellule apoptotique et régulation métabolique du phagocyte

Une fois la réorganisation du cytosquelette engagée et la coupe phagocytaire fonctionnelle, la cellule se retrouve internalisée au sein d'une vacuole appelée efferosome. La cellule apoptotique est alors digérée et décomposée en sous-unités grâce à l'action des protéases, des nucléases et des lipases. Ces enzymes sont exportées au sein de l'efferosome grâce à la fusion ordonnée des endosomes et des lysosomes. Ce processus est orchestré par les mêmes protéines responsables de la phagocytose de pathogènes, incluant les protéines Rab, GTPases et SNAREs. Une voie de signalisation alternative, faisant appel à la protéine LC3, a aussi été décrite. Elle implique des médiateurs de l'autophagie et correspond à une forme non canonique de celle-ci [Pour revue (Yin and Heit, 2021)].

L'internalisation d'une cellule apoptotique impose un changement métabolique de taille au phagocyte. En effet, en fonction du nombre de cibles internalisées, son contenu en lipides, protéines ou encore nucléotides augmente significativement. Afin de rétablir le phagocyte dans un état basal, la régularisation de son métabolisme est nécessaire. Plusieurs facteurs de transcription sont à l'origine de la réponse du phagocyte suite à l'élimination de cellules apoptotiques, parmi eux on retrouve les facteurs de transcription de la famille liver X receptor (LXR) et Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) (A-Gonzalez et al., 2009; Mukundan et al., 2009). L'activation de ces facteurs de transcription s'opère suite à leur interaction avec des métabolites dérivés de lipides produits durant la digestion de la cellule apoptotique [pour revue (Castrillo and Tontonoz, 2004)]. Une fois activés, ils favorisent l'expression de gènes liés aux voies de signalisation métaboliques nécessaires à la prise en charge des lipides, des stérols et des protéines, avec par exemple la stimulation de l'expression de la protéine ABCA1 nécessaire à la régulation du cholestérol par le macrophage (A-Gonzalez et al., 2009; Mukundan et al., 2009). Ils sont d'autre part liés à la régulation de l'expression des récepteurs de l'efferocytose comme le récepteur MerTK ou la protéine soluble C1q (A-Gonzalez et al., 2009; Mukundan et al., 2009). Ces facteurs de transcription sont essentiels puisque leur délétion diminue significativement l'élimination des cellules apoptotiques ainsi que la réponse anti-inflammatoire associée, favorisant de ce fait, l'apparition de maladies auto-immunes chez les souris déficientes. De plus, l'élimination de cellules apoptotiques par les macrophages déficients pour PPAR $\delta$ , LXR $\alpha/\beta$  sont incapables de produire les cytokines anti-inflammatoires, notamment TGF- $\beta$  et IL-10 à la base de la réponse immune tolérogène de l'efferocytose (A-Gonzalez et al., 2009; Mukundan et al., 2009).

#### 1.5.5 Réponse immune associée à l'efferocytose

Dans des conditions dites physiologiques, l'élimination des cellules apoptotiques est anti-inflammatoire : elle favorise la tolérance au soi et participe au maintien de l'homéostasie tissulaire. Cette réponse spécifique du système immunitaire est conditionnée à la fois par la cellule apoptotique mais aussi par le phagocyte.

Du côté de la cellule apoptotique, l'activation des caspases s'accompagne de la libération de métabolites dans le milieu extracellulaire. Ce processus actif est coordonné par différents acteurs comme par exemple la protéine pannexine 1, dont la fonction de canal s'active lors de son clivage par les caspases (Medina et al., 2020). Une fois dans le milieu extracellulaire, ces métabolites apoptotiques ont un impact direct sur les cellules environnantes. Ils modulent l'expression d'une multitude de gènes en lien avec la suppression de l'inflammation, la

prolifération cellulaire ainsi que la cicatrisation (Medina et al., 2020). Au niveau de la membrane de la cellule apoptotique, c'est l'exposition de la PS qui détient un rôle immunosuppresseur, de par sa reconnaissance par les récepteurs de l'efferoctose [pour revue (Birge et al., 2016)].

La réponse immune est également dépendante du type de phagocytes. Ils sont classés en deux catégories, avec d'une part les phagocytes professionnels qui englobent par exemple les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques et d'autre part, les phagocytes dits non professionnels, tels que les fibroblastes, les cellules épithéliales et cellules endothéliales (Seeberg et al., 2019). Bien que toutes ces cellules aient été classées selon leur « efficacité » de phagocytose et leur capacité à présenter les antigènes, elles agissent en synergie dans l'élimination des cellules apoptotiques et contribuent au maintien de l'homéostasie tissulaire.

#### 1.5.5.1 Origine et fonction des phagocytes professionnels

Les macrophages sont les premiers phagocytes professionnels à faire leur apparition durant le développement. Ils tirent leur origine de sources distinctes de progéniteurs répartis durant le développement pré et post-natal, durant l'hématopoïèse primitive et définitive. Dans des conditions dites physiologiques, les macrophages ont pour la majorité une origine prénatale (Ginhoux and Williams, 2016). Ils sont capables de persister et de se renouveler à l'âge adulte, indépendamment de la contribution des monocytes produits au niveau de la moelle osseuse (Hashimoto et al., 2013; Yona et al., 2013). Il existe cependant des tissus qui font exception comme la peau ou encore les intestins, avec un apport constant du pool de monocytes à la population résidente de macrophages et de cellules dendritiques (Bain et al., 2014; Bogunovic et al., 2009; Tamoutounour et al., 2013). Les macrophages agissent comme des sentinelles avec des spécificités propres à chaque tissu. De façon générale, leur capacité à migrer est faible mais ils interagissent avec leur environnement proche grâce à l'expression d'un large panel de récepteurs. Ils participent activement à l'élimination des cellules mourantes et des potentiels pathogènes. Ils contribuent au recrutement des différentes cellules du système immunitaire et modulent la réaction inflammatoire au travers de la production de cytokines et de chimiokines [pour revue (Varol et al., 2015)].

Contrairement aux macrophages, les cellules dendritiques apparaissent après la naissance au niveau de la moelle osseuse durant l'hématopoïèse définitive. Les cellules dendritiques ont une durée de vie courte, de l'ordre de 6 jours, avec un renouvellement constant au niveau de la moelle osseuse (McKenna et al., 2000). Ces cellules se divisent en trois sous classes : cDC1, cDC2 (cDC, conventionall Dendritic Cell) et pDC (plasmacytoid Dendritic Cell). Les cDC1 sont spécialisés dans la présentation croisée d'antigènes aux lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup> via l'expression majoritaire du complexe MHC I (Major Histocompatibility Complex Class I), alors qu'à l'inverse, les cDC2 sont spécialisés dans l'activation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> via l'expression majoritaire du complexe MHCII. La classification des cellules dendritiques selon ces groupes est récente. C'est pourquoi il faut adapter les anciennes classifications basées alors sur la localisation des cellules dendritiques et l'expression de différents marqueurs comme : CD207 dans la peau, CD103 dans les intestins, CD11b dans les poumons, CD4/CD8 $\alpha$  dans la rate et CD24/CD172 $\alpha$  pour les cellules dendritiques différenciées *in vitro* (Williams and van de Laar, 2015). Les cellules dendritiques jouent un rôle clé dans le traitement et la présentation des antigènes. Elles sont capables de migrer jusque dans les ganglions lymphatiques où elles participent au « priming » des lymphocytes T naïfs. Quant aux pDC, ils sont spécialisés dans la production d'interféron de type I et sont essentiels à la réponse immune antivirale (Swiecki and Colonna, 2015).

Finalement, les monocytes trouvent leur origine au niveau de l'hématopoïèse définitive, durant le développement de l'embryon mais aussi à l'âge adulte. Chez la souris, deux sous-classes sont distinguables par leur niveau d'expression du marqueur Ly6C<sup>hi</sup> et Ly6C<sup>low</sup>. Ils font référence respectivement aux monocytes classiques et non classiques. Chaque sous-classe a des rôles différents. La fonction principale des monocytes Ly6C<sup>low</sup> est de surveiller l'intégrité endothéliale intravasculaire (Auffray et al., 2007; Carlin et al., 2013). Les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> sont, quant à eux, essentiels au niveau des sites de l'inflammation. En fonction de l'environnement, les monocytes peuvent se différencier et arborer les fonctions de macrophages ou de cellules dendritiques (Jakubzick et al., 2017). On parle alors de macrophages ou cellules dendritiques dérivés de monocytes. A noter cependant, que les monocytes peuvent aussi avoir des fonctions qui leur sont propres, indépendamment de leur différenciation en macrophage ou cellule dendritique (Jakubzick et al., 2013). Ainsi, ce sont des cellules très mobiles et d'une grande plasticité, qui vont en fonction de leur environnement, compléter la population résidente des macrophages ou des cellules dendritiques (Guilliams et al., 2018).

#### 1.5.5.2 Réponse immune en fonction du type de phagocyte

On retrouve ces différents types de phagocyte dans tout l'organisme, mais ils peuvent se concentrer localement afin de maximiser leur efficacité d'action [pour revue (Blander, 2017)]. Bien qu'ils agissent en concert, chaque type de phagocyte a une spécialité. Par exemple, grâce à la mise au point d'un modèle *in vivo* d'efferocytose des cellules de l'intestin chez la souris, Cummings et collaborateurs ont pu montrer que les cellules apoptotiques sont majoritairement éliminées par les macrophages et dans une moindre mesure, par les cellules dendritiques (Cummings et al., 2016). De plus, chez les macrophages, la phagocytose de cellules apoptotiques est associée à la régulation des gènes impliqués dans la maturation du phagosome et du métabolisme des lipides, alors qu'elle est associée à des gènes en lien avec l'activation des lymphocytes T régulateur (Treg) chez les cellules dendritiques (Cummings et al., 2016).

Le rôle du macrophage ne se résume pas qu'à sa capacité à phagocyter, mais s'illustre aussi par sa capacité à moduler son environnement en fonction des stimulus qu'il reçoit. Il est maintenant établi que la phagocytose des cellules apoptotiques promeut l'expression de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou encore TGF- $\beta$  [pour revue (Gordon and Plüddemann, 2018)]. Outre l'expression de cytokines anti-inflammatoires, le macrophage communique aussi avec les cellules environnantes, par exemple via la libération du facteur de croissance IGF-1 et de microvésicules. Ces deux éléments sont capables à la fois, d'inhiber la phagocytose des particules de grande taille par les phagocytes non professionnels tels que les cellules épithéliales des voies respiratoires, mais aussi, de réduire la réponse inflammatoire (Han et al., 2016). Par ailleurs, la communication qu'entretient le macrophage avec son environnement est à double sens. Il est lui-même influencé par les cellules environnantes comme les lymphocytes Treg dont la sécrétion d'IL-13 favorise l'élimination des cellules apoptotiques et la résolution de l'inflammation par les macrophages (Proto et al., 2018).

En comparaison aux macrophages, les cellules dendritiques sont spécialisées dans la fonction de « priming » des lymphocytes T et B. En effet, les cellules dendritiques ont la capacité de phagocyter les cellules apoptotiques, de présenter les antigènes aux lymphocytes, et en fonction de leur état de différenciation d'activer ou non les lymphocytes. Par exemple, la phagocytose de cellules apoptotiques par les cellules dendritiques immatures de la rate chez la souris, induit une réponse tolérogène avec la délétion des lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup>.

Cependant lorsque les cellules dendritiques sont matures, la réponse est inverse, avec l'expansion des lymphocytes T spécifiques et la production massive de cytokines pro inflammatoires comme IL-2 et l'interféron  $\gamma$  (Liu et al., 2002). Ainsi la cellule dendritique, dans des conditions physiologiques et en l'absence de stimulus inflammatoires, participe largement au maintien de la tolérance périphérique. Un rôle qu'elle joue au travers de la présentation des antigènes du soi, inhibant l'expansion clonale des lymphocytes auto réactifs et favorisant également l'induction des lymphocytes Treg [pour revue (Cabeza-Cabrerizo et al., 2021)].

### 1.5.5.3 Mort cellulaire immunogénique

Bien que la mort par apoptose est généralement tolérogène, sous certaines conditions, elle peut également engager une réponse immunitaire adaptative, on parle alors de « mort cellulaire immunogénique » [pour revue (Galluzzi et al., 2017)]. Ce phénomène est conditionné par l'antigénicité et l'adjuvantité de la cellule mourante. Dans le cas d'une apoptose provoquée par l'infection de la cellule par un pathogène, la reconnaissance des MAMPs (Microorganism-Associated Molecular Patterns) associée à la présence du pathogène, et des DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) associée à la cellule mourante, par les PRR (Pattern Recognition Receptors) sont responsables de l'adjuvantité. Plusieurs molécules au sein des DAMPs ont été identifiées, comme par exemple la CRT, l'Annexine 1, l'ATP, HMGB1 (High Mobility Group Box 1) ou l'interféron de type I. Elles sont à la base du recrutement des phagocytes, de la formation des contacts et favorisent une réponse immune pro-inflammatoire envers la cellule mourante. D'autre part, la présence d'antigènes et plus précisément d'épitopes inconnus des systèmes de tolérance centrale et périphérique sont responsables de l'antigénicité. Ces néoépitopes sont exposés à la fois par les pathogènes mais aussi à la surface des cellules cancéreuses. Ainsi combinées, l'adjuvantité et l'antigénicité sont favorables à la mise en place d'une réponse adaptative spécifique aux néoépitopes reconnus par le système immunitaire. Ce processus contrebalance par conséquent l'effet tolérogène de l'efferocytose, favorable à la mise en place d'un environnement inflammatoire dans un contexte infectieux ou cancéreux.

Différents types d'inducteur peuvent être responsables d'une mort cellulaire immunogénique. Parmi eux, on retrouve la mort cellulaire provoquée par un pathogène, par des agents chimio thérapeutiques, par un stress physique ou par nécroptose [pour revue (Galluzzi et al., 2017)]. L'étude de la mort immunogénique fait l'objet d'études approfondies dans le domaine du cancer. L'objectif est de développer des stratégies capables de provoquer à la fois la mort des cellules cancéreuses et leur élimination, en favorisant une réponse immunogénique.

## 1.6 Dysfonctionnement et subversion de l'efferocytose

### 1.6.1 Maladies auto-immunes et chroniques inflammatoires

Comme décrit dans les paragraphes précédents (paragraphe I.1.5), l'efferocytose se décompose en plusieurs étapes, reliées les unes aux autres. Ainsi, une anomalie au sein d'une étape et c'est l'ensemble du processus qui est déséquilibré, altérant finalement la réponse immune associée, propice à un terrain inflammatoire. Plusieurs maladies auto-immunes et chroniques inflammatoires ont été identifiées comme étant étroitement reliées à un défaut d'efferocytose, parmi lesquelles le lupus systémique érythémateux (SLE), l'athérosclérose, la polyarthrite rhumatoïde pour ne citer qu'elles [pour revue (Boada-Romero et al., 2020)]. L'une des plus communes est le SLE, une maladie auto-immune chronique qui affecte une multitude d'organes comme la peau, les poumons, les reins, ou encore le système nerveux central. Les

patients atteints de SLE développent pour la plupart des auto-anticorps dirigés contre des composants membranaires ou intracellulaires comme l'ADN double brin ou des lipides de la membrane. L'apparition de ces anticorps est liée à un déséquilibre dans les processus de tolérance, aboutissant à une réponse immune envers des antigènes du soi [pour revue (Kaul et al., 2016)]. L'origine du SLE est multifactorielle et est associée à un défaut général d'efférocytose. En effet, il peut apparaître suite à la déplétion d'une multitude de protéines intervenant à tous les niveaux dans le processus d'efférocytose (S1P, TIM4, MFG-E8, Protein S, MerTK, C1q, LXRs, PPARs, ABCA1) (Morioka et al., 2019).

## 1.6.2 Cancer et stratégies thérapeutiques

Outre les maladies auto-immunes, l'étude de l'efférocytose a un intérêt particulier en cancérologie. En effet, les cellules cancéreuses détournent les différentes molécules qui participent au processus d'efférocytose et favorisent la création d'écosystème propice à leur développement. Par exemple, en recréant un environnement tolérogène ou encore en inhibant la phagocytose. Une aptitude qu'elles partagent aussi avec certains pathogènes (virus, bactéries, parasites) capables eux aussi de détourner la fonction de ces molécules pour inhiber ou à l'inverse favoriser leur phagocytose dans le cas des parasites intracellulaires [pour revue (Karaji and Sattentau, 2017)].

Les cellules cancéreuses détournent la fonction des signaux « don't eat-me » et les surexpriment à leur surface dans le but d'inhiber leur phagocytose par le système immunitaire. La protéine CD47 est notamment surexprimée dans les tumeurs solides ou d'origine hématopoïétique (Jaiswal et al., 2009; Willingham et al., 2012). De façon surprenante, les molécules « eat-me » sont également exposées à la surface des cellules cancéreuses. La PS est exploitée pour ses propriétés immunosuppressives lorsqu'elle est exposée à la surface des cellules cancéreuses (Riedl et al., 2011). Par ailleurs, au sein des tumeurs ovariennes, elle inhibe l'activation des lymphocytes T, de par son exposition à la surface de microvésicules sécrétées (Kelleher et al., 2015). La fonction « eat-me » de la CRT est, quant à elle, contrecarrée chez les néoplasmes myéloprolifératifs. Ce type de cancer exprime une version mutée de la CRT, ce qui entraîne sa sécrétion dans le milieu extracellulaire. Au lieu de favoriser la phagocytose des cellules cancéreuses, cela a pour conséquence la saturation des récepteurs à la surface du phagocyte, bloquant de ce fait, la reconnaissance de la CRT exposée à la surface des cellules cancéreuses (Liu et al., 2020).

Des stratégies d'immunothérapies en développement ciblent ces différentes molécules. Par exemple, les anticorps bloquant la fonction de la protéine CD47 représentent une stratégie prometteuse dans le traitement des hémopathies malignes telles que la leucémie aigüe myéloblastique [pour revue (Chao et al., 2019)]. Employés en combinaison avec d'autres anticorps immunothérapeutiques, les anticorps anti CD47 augmentent l'élimination des cellules cancéreuses. C'est le cas du rituximab, un anticorps anti CD20 utilisé pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens, où les anticorps anti CD47 améliorent l'efficacité du traitement (Chao et al., 2010).

## 2 Rôle des signaux « eat-me » et « don't eat-me » au sein de l'efferosynapse

L'une des étapes clés de l'efferocytose est la reconnaissance de la cellule apoptotique par le phagocyte. Cette étape s'articule autour de la création d'une zone de contact entre la cible et le phagocyte : l'efferosynapse. C'est au niveau de cette plateforme protéique que s'opèrent les interactions membranaires à l'origine de la phagocytose mais aussi de la réponse immune associée. Avant de s'intéresser en particulier à quelques molécules impliquées dans l'efferosynapse, qui ont fait l'objet de mes travaux, je résumerai les principales propriétés moléculaires qui régissent les interactions à l'interface entre deux cellules.

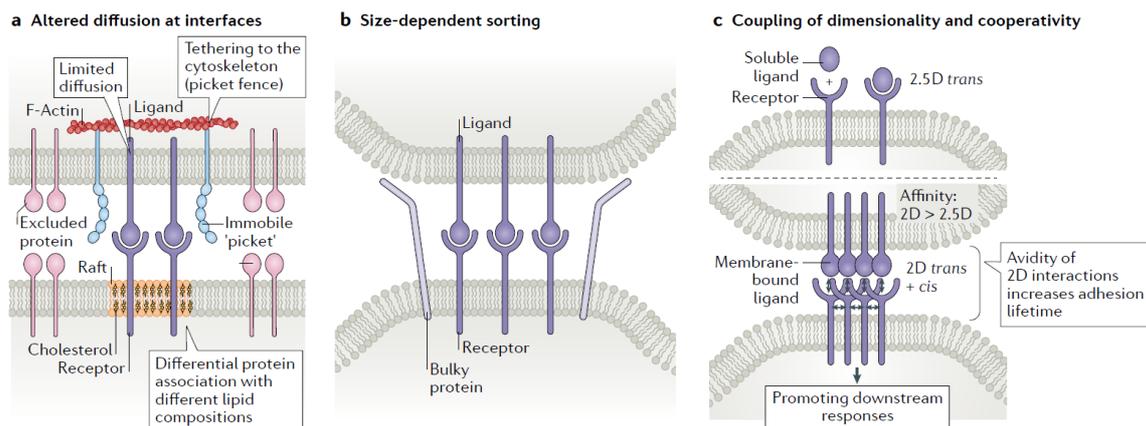
### 2.1 Influence de l'interface cellule-cellule sur les interactions récepteurs-ligands

Lors d'un contact cellulaire, l'intégration des signaux multiples en provenance de chaque cellule, repose sur l'interaction des récepteurs avec leurs ligands. Cet événement engendre la signalisation intracellulaire nécessaire à l'établissement d'une réponse adaptée. L'interaction d'un récepteur avec son ligand est influencée par les propriétés même des molécules mises en jeu, une caractéristique qui se matérialise par leur affinité. Cependant, contrairement à l'interaction d'un récepteur avec son ligand en milieu liquide, leur interaction au sein d'un contact cellulaire est également contraint par l'environnement membranaire [pour revue (Belardi et al., 2020)]. En effet, celui-ci intervient à plusieurs niveaux dans la régulation de l'interaction récepteur-ligand.

Premièrement, le recrutement à la jonction entre deux cellules est dépendant de la diffusion des protéines dans la membrane (Figure 11a). Celle-ci peut être altérée par des composants sous-jacents comme le cytosquelette ou encore les glycocalyx. Par exemple, durant le processus de phagocytose, lorsque les récepteurs du macrophage sont engagés dans la reconnaissance d'anticorps, les intégrines et l'actine forment une barrière capable d'inhiber le recrutement de la phosphatase CD45, une molécule inhibitrice de la phagocytose (Freeman et al., 2016). De façon similaire, les glycocalyx peuvent aussi former une barrière physique extracellulaire capable de limiter la diffusion latérale des protéines et de restreindre leur accès à d'autres récepteurs (Freeman et al., 2018). Outre les composants externes à la membrane, l'environnement lipidique lui-même joue un rôle crucial dans l'interaction récepteur-ligand grâce à la présence des radeaux lipidiques. Ces plateformes lipidiques sont essentielles à la localisation et à la signalisation de nombreuses protéines en surface [pour revue (Mollinedo and Gajate, 2020)].

Deuxièmement, l'interaction ligand-récepteur est dépendante de la taille de l'interface formée après le contact entre deux cellules (Figure 11b). En effet, si une protéine qui diffuse librement est trop grande par rapport à la taille du contact cellulaire formé, alors elle sera exclue de celui-ci (Schmid et al., 2016). Une propriété qui permet également d'expliquer l'exclusion de CD45 lors de la phagocytose initiée par la reconnaissance d'un anticorps (Bakalar et al., 2018).

Enfin, bien que les interactions au niveau du contact cellulaire soient dépendantes de l'affinité du récepteur pour son ligand, elles sont aussi dépendantes des phénomènes d'avidité (Figure 11c). Ces phénomènes entrent en jeu, par exemple, lorsque plusieurs sites d'interaction sont présents à la surface d'une même molécule. Ils interviennent également lorsque la concentration locale du ligand ou du récepteur est enrichie (formations de clusters), augmentant ainsi leur probabilité de rencontre [pour revue (Erlendsson and Teilmann, 2021)].



**Figure 11 : Influence de l'environnement cellulaire sur l'interaction récepteur-ligand à l'interface entre deux cellules.**

L'interaction récepteur-ligand dépend des différentes caractéristiques de l'environnement membranaire au contact entre deux cellules. Elle dépend : (a) de la diffusion des molécules membranaires, (b) de la dimension de l'interface membranaire dont résulte la ségrégation des molécules en fonction de leur taille et (c) de la concentration locale du récepteur ou de ligand [tiré de (Belardi et al., 2020), Fig.3].

## 2.2 Rôle de la PS, de la CRT, du C1q et de SR-F1 dans l'efferocytose

Je décrirai dans ce paragraphe le rôle de la PS, de la CRT, du C1q et du récepteur SR-F1 au sein de l'efferocytose. Ces molécules sont connues pour favoriser la phagocytose et interviennent dans la formation de l'efferosynapse. Elles ont fait l'objet d'études menées au sein du laboratoire, qui ont montré qu'elles étaient capables d'interagir entre elles.

### 2.2.1 La phosphatidylsérine

Outre sa fonction cruciale dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques, la PS intervient dans une multitude de processus cellulaires, à la fois lorsqu'elle est exposée en surface comme par exemple durant la coagulation des plaquettes, mais aussi à l'intérieur de la cellule où elle coordonne la localisation des protéines chargées [pour revues (Bevers and Williamson, 2016; Kay and Fairn, 2019)]. La synthèse de ce glycérophospholipide chargé négativement se déroule au niveau des jonctions qui connectent les mitochondries avec le réticulum endoplasmique, appelées membrane associée des mitochondries. Sa concentration est inégale en fonction des organelles. Au niveau de la membrane plasmique, le lieu le plus concentré de la cellule, elle représente environ 15% des molécules de lipides. De plus, sa distribution est asymétrique. Elle se répartit principalement au niveau du feuillet interne où elle s'organise sous forme de clusters d'une taille d'en moyenne 11 nm et se retrouve enrichie, notamment au niveau des calvéoles (Fairn et al., 2011). Elle participe à leur formation ainsi qu'à leur dynamique (Hirama et al., 2017). Ces invaginations membranaires ont la particularité d'être enrichies en cholestérol et sphingolipides tout comme les radeaux lipidiques (Sonnino and Prinetti, 2009). L'enrichissement partagé de la PS avec le cholestérol au niveau de ces structures souligne leur interdépendance. D'une part, la distribution du cholestérol au sein de la membrane, et particulièrement au niveau du feuillet interne, est dépendante de celle de la PS (Maekawa and Fairn, 2015). D'autre part, la mobilité de la PS au niveau du feuillet interne est dépendante de celle du cholestérol (Kay et al., 2012). En effet, lorsque la proportion de cholestérol en membrane diminue, la diffusion de la PS diminue. Étonnamment, elle diminue aussi lorsque le cholestérol est ajouté en excès (Kay et al., 2012). Enfin, bien qu'il ait été montré que les radeaux lipidiques riches en cholestérol sont nécessaires à la transition de la PS du

feuillet interne vers le feuillet externe durant l'apoptose, une fois exposée la PS est distribuée dans des domaines distincts de ceux du ganglioside GM1, un marqueur des radeaux lipidiques (Ishii et al., 2005).

- *Influence des propriétés membranaires dans la reconnaissance de la PS*

Durant l'apoptose, la PS est exposée en surface (paragraphe I.1.4.3.2). Elle devient un signal de reconnaissance de la cellule apoptotique par les récepteurs du phagocyte (paragraphe précédent I.1.5.2.2). Il est important de souligner que l'exposition seule de la PS en surface n'est pas suffisante pour induire le processus de phagocytose. Un exemple frappant est celui de l'exposition de la PS par des cellules viables transfectées avec une version mutée de la protéine TMEM16F dont l'activité de scramblase est constitutive. Bien que l'exposition de la PS à la surface des cellules mutées pour la protéine TMEM16F soit comparable à celle des cellules apoptotiques, seules ces dernières sont phagocytées (Segawa et al., 2011). De plus, certains types de cellules expriment naturellement de la PS, sans pour autant être phagocytées, notamment les lymphocytes B et T durant leur activation (Dillon et al., 2000; Elliott et al., 2005; Fischer et al., 2006). Plusieurs paramètres ont été proposés pour expliquer la différence de réponse des phagocytes envers l'exposition de la PS à la surface d'une cellule viable et des cellules apoptotiques, comme le niveau d'expression, la topologie ou encore la mobilité de la PS (Appelt et al., 2005). Même si ces hypothèses manquaient alors de preuves directes, de récentes études ont pu mettre en avant la sensibilité des récepteurs TIM4 et Axl vis-à-vis de la densité de la PS (Meyer et al., 2015; Tietjen et al., 2014). D'autres facteurs semblent aussi intervenir comme l'état d'oxydation de la PS favorable à son interaction avec le récepteur BAI1 et la protéine soluble Gas6 (Tyurin et al., 2014). L'exposition de la PS est une étape clé vers la reconnaissance de la cellule apoptotique. Bien que sa topologie ou encore sa mobilité semble influencer sa reconnaissance, l'évolution de sa distribution à l'échelle nanométrique et de sa mobilité à la surface de la cellule apoptotique sont pour l'heure inconnues.

## 2.2.2 La calréticuline

La CRT est une protéine soluble, sans domaine transmembranaire, de 46 kDa. Elle se localise majoritairement au niveau du lumen du réticulum endoplasmique, où elle participe à l'homéostasie du calcium et intervient comme chaperonne dans le bon repliement des protéines et des glycoprotéines nouvellement synthétisées. Elle participe à l'assemblage du complexe MHC-I, en interagissant avec ERp57, une autre chaperonne. Sa structure se décompose en trois sous-domaines N, P et C avec des fonctions différentes. Le domaine N avec le domaine P assurent la fonction chaperonne de cette protéine. Quant au domaine C, il participe à la fixation du calcium et permet la rétention de la CRT au niveau du réticulum endoplasmique grâce à sa séquence KDEL. Il est important de mentionner que le domaine P peut lui aussi fixer le calcium et intervient dans l'interaction avec ERp57 [Pour revue (Michalak et al., 2009)].

- *Reconnaissance et mécanismes d'exposition de la CRT*

Hors du réticulum endoplasmique, la CRT détient d'autres fonctions comme celles d'être un signal « eat-me ». En effet la CRT est reconnue par les phagocytes et active la phagocytose lorsqu'elle est exposée en surface, par exemple durant l'apoptose. Elle est reconnue par le récepteur LRP1 directement ou indirectement via les molécules solubles C1q, Mannose Binding Lectin (MBL), Surfactant Protein A & D (SP-A & SP-D) et adiponectine (Ogden et al., 2001; Takemura et al., 2007; Vandivier et al., 2002). Au niveau de la membrane de la cellule apoptotique, elle est présente sous forme de clusters et peut colocaliser avec la PS

(Gardai et al., 2005), avec qui elle interagit de manière dépendante du calcium au niveau de son domaine C (Païdassi et al., 2011; Wijeyesakere et al., 2016).

Plusieurs voies ont été proposées pour expliquer l'exposition de la CRT en surface. Elles sont toutes déclenchées par un stress mais elles diffèrent selon l'inducteur du stress et varient en fonction du stade d'apoptose [pour revue (Krysko et al., 2012)]. Au stade pré-apoptotique, avant même l'exposition de la PS, la CRT est co-transloquée en surface avec ERp57 suite à des traitements pro-apoptotiques (Obeid et al., 2007). Parmi eux, on retrouve la mitoxantrone, l'oxaliplatine (agents chimio thérapeutiques) ou encore l'irradiation aux ultraviolets C. A noter que l'exposition précoce de la CRT n'est pas un phénomène universel puisque certains inducteurs de mort cellulaire n'induisent pas son exposition (Obeid et al., 2007). En effet, c'est un processus actif qui requiert la phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  (eukaryotic translation Initiation Factor 2 $\alpha$ ) par la kinase PERK (Protein kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase), l'activation de la caspase 8 à l'origine du clivage de la protéine BAP31 (famille des protéines BCL-2) et l'activation de BAX et BAK. Cette cascade moléculaire engage la sécrétion de la CRT depuis l'appareil de Golgi vers la membrane, grâce au complexe d'exocytose SNARE (Panaretakis et al., 2009). A noter que lorsque les cellules sont traitées par photothérapie, un autre inducteur de mort cellulaire, seulement les protéines PERK, BAX, BAK sont nécessaires à l'exposition de la CRT en surface (Garg et al., 2012). De plus, dans ce cas précis, l'exposition de la CRT en surface est coordonnée par le récepteur LRP1 (Garg et al., 2012). Ensuite, avec l'évolution du phénotype apoptotique, un autre mécanisme d'exposition de la CRT a été caractérisé et fait intervenir la co-translocation de la CRT avec la PS (Tarr et al., 2010). Finalement, avec l'avancement de la cellule apoptotique vers un phénotype plus tardif, la CRT est exposée avec d'autres chaperonnes, en même temps que la fusion de portions du réticulum endoplasmique avec la membrane (Franz et al., 2007). Dans un contexte différent de celui de l'apoptose, la présence de la CRT en surface peut également provenir des macrophages capables de sécréter la CRT dans le milieu extracellulaire. La CRT sécrétée se fixe aux « asialoglycan » dont l'expression est altérée à la surface des neutrophiles « âgés », ce qui favorise leur élimination par les macrophages (Feng et al., 2018). Dans ce contexte, les auteurs parlent de « Phagocytose Programmée » (Feng et al., 2018). La libération de la CRT dans le milieu extracellulaire influence aussi la réponse immune des macrophages et des cellules dendritiques [pour revue (Schcolnik-Cabrera et al., 2019)]. Elle favorise par exemple la migration et une réponse pro-inflammatoire du macrophage avec l'expression de l'interleukine 8 (Osman et al., 2017).

Si l'exposition à la membrane de la CRT semble être un événement général suite à l'exposition de la cellule à un stress, il faut toutefois souligner que la majorité des études se sont focalisées sur les cellules cancéreuses. En effet, le pouvoir « immunogénique » de la CRT peut, sous certaines conditions, contrebalancer l'effet anti inflammatoire de la PS (Obeid et al., 2007). Ce qui en fait un sujet d'étude de premier intérêt, en particulier dans le domaine du cancer. Néanmoins, même si de nombreuses études tendent à montrer que la CRT favorise la phagocytose des cellules, on en sait peu quant à l'influence de son organisation ou de ses partenaires sur sa reconnaissance par les différents récepteurs du phagocyte.

### 2.2.3 La protéine du complément C1q

C1q est une protéine multimérique de haut poids moléculaire (460 kDa). Elle découle de de l'association de trois chaînes polypeptidiques distinctes A, B et C, pour former six hétéotrimères ABC. Chaque hétéotrimère ABC, contient une région N-terminale de type collagène et une région C-terminale globulaire. Ces 6 hétéotrimères ABC s'assemblent pour former la molécule de C1q composée au final de 18 chaînes polypeptidiques, dont la structure s'apparente à celle d'un « bouquet de tulipes » avec six régions globulaires et une queue collagène [pour revue(Reid, 2018)].

Dans des conditions physiologiques normales, C1q circule dans le sang à une concentration de 80 µg/mL, majoritairement en association avec le tétramère C1r<sub>2</sub>C1s<sub>2</sub> (Ziccardi and Tschopp, 1982). Il interagit de façon calcium dépendant avec le domaine collagène de C1q et forme le complexe C1 (C1q/C1s-C1r-C1r-C1s). Ce complexe fut initialement caractérisé pour son rôle dans l'initiation de la voie classique du complément après fixation aux complexes immuns. En effet, les régions globulaires de C1q reconnaissent les domaines Fc des anticorps IgM (Immunoglobulin M) et IgG qui forment les complexes immuns. La fixation de C1q aux complexes immuns altère la conformation des protéines C1rC1s et provoque leur activation. Une fois activées, ces protéases à sérine clivent la protéine C4 initiant la voie classique du complément [pour revue (Noris and Remuzzi, 2013)]. Cette cascade moléculaire aboutit entre autres, à la fixation d'un produit d'activation C3b sur les complexes immuns ce qui facilite leur élimination.

Indépendamment de son rôle dans la voie classique du complément, C1q est impliqué dans une multitude de processus cellulaires, tels que la phagocytose des cellules apoptotiques ou encore la production de cytokines [pour revue (Thielens et al., 2017)]. Dans le sang, il est produit principalement par les macrophages présents dans le foie. Il est aussi produit localement par les macrophages, les cellules dendritiques ou encore des fibroblastes (Ghebrehiwet et al., 2012) et son expression est régulée par le facteur de transcription Mafk (Tran et al., 2017). Chez l'Homme, une déficience en C1q est associée à un risque accru aux infections et à l'apparition des symptômes du SLE (Stegert et al., 2015). Les souris déficientes en C1q présentent également un phénotype de type SLE et sont caractérisées par la présence de nombreux corps apoptotiques dans les tissus (Botto, 1998). Ces observations ont suggéré le rôle de C1q à la fois dans la prévention des maladies auto-immunes, mais aussi dans l'élimination des cellules apoptotiques.

- *Implication de C1q dans l'efferocytose*

C1q est impliqué dans le processus d'efferocytose et le maintien de la tolérance à plusieurs niveaux [pour revue (Galvan et al., 2012a)]. Premièrement C1q reconnaît les cellules apoptotiques et joue le rôle d'intermédiaire avec le phagocyte. Il reconnaît ,entre autres la PS et la CRT exposées par les cellules apoptotiques (Païdassi et al., 2008, 2011). Il interagit à la fois avec la CRT et la PS au niveau de ses têtes globulaires et fixe également la CRT au niveau de ses régions collagènes (Païdassi et al., 2011). A noter que la CRT peut interférer dans la reconnaissance de la PS par C1q (Païdassi et al., 2011). Une fois fixé à la surface des cellules apoptotiques, C1q est reconnu par différents récepteurs de l'efferocytose exprimés par le phagocyte comme MEGF10, SR-F1 et LRP1. L'interaction de C1q avec LRP1 a été étudiée plus en détail. Elle implique les régions collagènes de C1q et les clusters II et IV de LRP1 (Fouët et al., 2020). Néanmoins, lorsque LRP1 est exprimé par des cellules CHO transfectées, aucune augmentation de la fixation des cellules apoptotiques en présence de C1q, n'est

observée. Ces observations sont cohérentes avec une étude ultérieure menée par Lillis et collaborateurs, qui tendait à montrer que l'effet pro-phagocytaire de LRP1 est indépendant de C1q (Lillis et al., 2008). Toutefois, il est important de souligner que la différence de modèle ou la présence de la CRT comme troisième partenaire du complexe LRP1-C1q pourrait être un facteur explicatif à ces disparités (Ogden et al., 2001). Deuxièmement, C1q est impliqué dans l'élimination des cellules en nécrose secondaire au travers de l'activation de la voie du complément (Mevorach et al., 1998). Lorsque la membrane des cellules mourantes se perméabilise, les cellules nécrotiques exposent des épitopes reconnus par les IgM circulants. Le complexe C1 est alors recruté par les complexes immuns ce qui entraîne son activation et conduit à la déposition de C3b favorable à l'élimination des cellules en nécrose secondaire (Hesketh et al., 2015; Zwart et al., 2004). Troisièmement, C1q influence directement la fonction des cellules du système immunitaire. Il stimule la phagocytose chez le macrophage via l'expression des protéines de l'efferocytose comme le récepteur MerTK et ses ligands Gas6 et la protéine S (Galvan et al., 2012b). Il influence la polarisation des macrophages et favorise la production de cytokines anti-inflammatoires essentielles au maintien de la tolérance [pour revue (Bohlsou et al., 2014)]. A noter que ce processus semble indépendant de son association ou non avec les protéines C1rC1s (Colonna et al., 2016). Il inhibe également l'effet pro-inflammatoire de la protéine HMGB1 et collabore avec celle-ci dans la différenciation des monocytes en macrophages anti-inflammatoires (Son et al., 2016). Enfin, il restreint la réponse aux antigènes du soi en régulant l'activité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Ling et al., 2018).

Ainsi le rôle de C1q dans l'élimination des cellules apoptotiques s'étend au-delà de sa simple fonction d'opsonine. En association avec le tétramère C1r<sub>2</sub>C1s<sub>2</sub>, il assure un mécanisme de secours dans l'élimination des cellules apoptotiques devenues nécrotiques afin de limiter la réponse inflammatoire et d'éviter la dispersion des antigènes du soi. C'est enfin une molécule clé dans l'orientation de la réponse immune, favorable au maintien de la tolérance au soi.

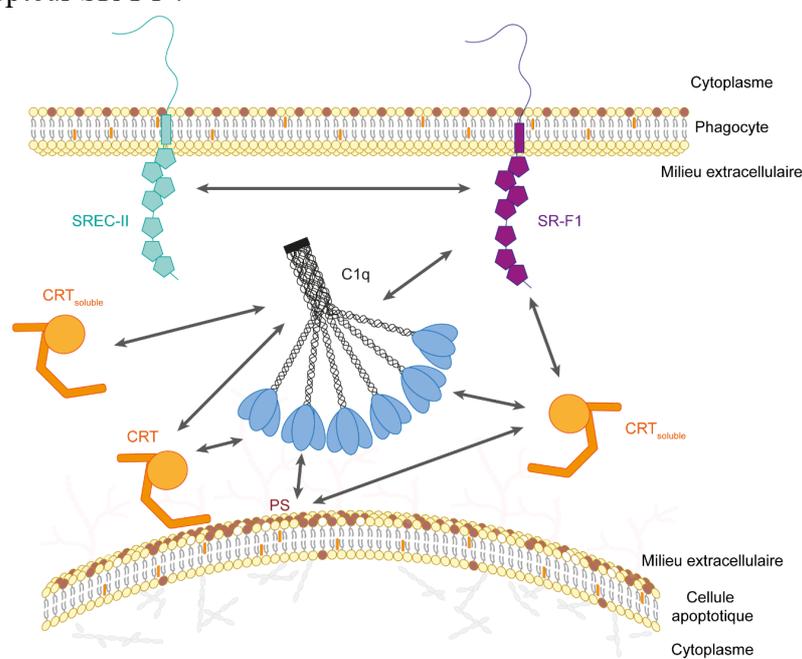
#### 2.2.4 Le récepteur SR-F1

SR-F1 est une protéine transmembranaire de 86 kDa. Elle est composée d'un domaine transmembranaire organisé par dix modules semblables à des modules EGF (Epidermal Growth Factor), dont sept contiennent exactement la séquence consensus EGF, d'une partie transmembranaire et d'une longue queue cytoplasmique riche en sérine, proline et glycine (Adachi et al., 1997). SR-F1 fut initialement cloné à partir de cellules HUVEC (cellules endothéliales de cordon ombilical humain) et fut ensuite classé parmi les « scavengers » pour sa capacité à lier les lipoprotéines de basse densité modifiées comme l'Ac-LDL (Acetylated Low Density Lipoprotein) et l' Ox-LDL (Oxydated Low Density Lipoprotein) (Adachi et al., 1997). SR-F1 est exprimé dans différents types de tissus, notamment le cœur, les reins, les ovaires, les poumons et la rate (Ishii et al., 2002). Il est capable de fixer un grand nombre de molécules endogènes mais aussi exogènes exprimées à la surface des virus, des champignons et des bactéries. Il intervient ainsi à différents niveaux dans l'immunité (innée & adaptative) et dans l'élimination des cellules apoptotiques [Pour revue (Patten, 2018)]. Il participe également à l'adhérence des lymphocyte T CD4<sup>+</sup> à la surface des cellules endothéliales sinusoidales du foie qui expriment SR-F1 (Patten et al., 2017). A noter que SR-F1 présente une forte similarité avec la protéine SREC-II. Cependant, malgré leur homologie, SREC-II ne partage aucune des propriétés de SR-F1 et ne fixe que faiblement les LDL modifiés (Ishii et al., 2002). Son seul ligand connu à ce jour est SR-F1, dont l'interaction peut être bloquée par l'ajout AcLDL ou de OxLDL (Ishii et al., 2002).

- Implication de SR-F1 dans l'efferocytose

SR-F1 est considéré comme un orthologue de CED-1 puisque leurs séquences partagent 24% d'homologie, ce qui suggère que ces deux protéines possèdent des fonctions similaires (Zhou et al., 2001). Ainsi, la délétion du gène SCARF1 codant pour la protéine SR-F1, bien que non délétère chez la souris, est favorable à l'apparition spontanée de symptômes semblables au SLE (Ramirez-Ortiz et al., 2013). En effet, SR-F1 participe à la reconnaissance indirecte et à l'élimination des cellules apoptotiques chez la souris. La reconnaissance des cellules apoptotiques médiées par SR-F1 est dépendante de l'intermédiaire C1q capable de se fixer sur les cellules apoptotiques. La protéine C1q est capable de reconnaître une multitude de ligands dont, entre autres la PS et la CRT exprimées à la surface des cellules apoptotiques (Figure 12). Cependant, d'après Ramirez et collaborateurs, il semblerait que la reconnaissance de C1q à la surface des cellules apoptotiques soit elle-même dépendante de la reconnaissance de la PS par C1q. En effet, même si SR-F1 est capable d'interagir et de favoriser l'endocytose de la CRT (Berwin et al., 2004), l'élimination des cellules apoptotiques semble indépendante de l'exposition de celle-ci. Par ailleurs, Ramirez et collaborateurs ont montré que chez la souris, SR-F1 est exprimé par les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules dendritiques CD8 $\alpha^+$ . Ce récepteur est nécessaire à la phagocytose des cellules apoptotiques particulièrement chez la cellule dendritique où sa délétion diminue drastiquement la phagocytose. Cette sous classe de cellules dendritiques a été décrite comme cruciale dans la présentation des antigènes du soi aux lymphocytes T et dans le maintien de la tolérance périphérique (Belz et al., 2002; Iyoda et al., 2002).

Bien que les observations menées par Ramirez et collaborateurs suggèrent que SR-F1 est un récepteur important de l'efferocytose chez la souris, de nombreuses questions demeurent. Chez l'Homme, SR-F1 est-il aussi un récepteur de l'efferocytose ? Quels sont les déterminants moléculaires à l'origine de l'interdépendance de SR-F1 vis-à-vis du couple C1q-PS ? Comment SR-F1 transmet-il le signal de phagocytose ? Et finalement quelle est la réponse immune associée au récepteur SR-F1 ?



**Figure 12 : Interactions entre les molécules PS, CRT, C1q, SR-F1 et SREC-II.**

La CRT soluble (CRTsoluble) ou membranaire (CRT) interagit avec la PS ainsi qu'avec la protéine du complément C1q (régions collagène et globulaires). Le récepteur SR-F1 entraîne la phagocytose lors de la reconnaissance de C1q fixé à la PS. Enfin le récepteur SR-F1 reconnaît également la CRT soluble et interagit avec son homologue le récepteur SREC-II.

## 2.3 Fonction du « don't eat-me » CD47

La protéine CD47 est une protéine membranaire de 50 kDa. Elle est composée d'un domaine extracellulaire semblable à un domaine immunoglobuline, de cinq régions transmembranaires, et d'une queue cytoplasmique. En plus de détenir plusieurs sites de glycosylation (Kaur et al., 2011; Lindberg et al., 1993), son domaine extracellulaire est connecté par un pont disulfure au domaine transmembranaire (Rebres et al., 2001). Quatre isoformes de cette protéine ont été décrites et sont issues d'épissages alternatifs dans la partie cytoplasmique (Reinhold et al., 1995). Néanmoins, leurs rôles précis sont encore mal connus. A noter, qu'une forme de CD47 avec un poids moléculaire de plus de 250 kDa a aussi été identifiée et correspond à une modification du domaine extracellulaire par l'addition d'une chaîne de sulfate d'héparane (Kaur et al., 2011). La protéine CD47 régule de nombreux processus cellulaires par l'intermédiaire de son interaction avec différents partenaires, notamment les intégrines, la TSP1 et le récepteur SIRP $\alpha$ . Par exemple, il est impliqué dans l'induction de l'apoptose, la régulation de la phagocytose ou encore l'adhérence cellulaire [pour revue (Oldenberg, 2013; Soto-Pantoja et al., 2015)].

Les premières fonctions de cette protéine transmembranaire ont été élucidées à l'aide d'anticorps bloquants dirigés contre CD47. Incubés avec des neutrophiles, ces anticorps inhibent la phagocytose lorsque celle-ci est activée par des éléments de la matrice contenant une séquence RGD (Arg-Gly-Asp). Ces observations ont démontré l'importance de CD47 dans l'activité des intégrines, ce qui lui a d'ailleurs valu le nom de IAP (Integrin Associated Protein)(Brown et al., 1990; Gresham et al., 1989). La première intégrine identifiée comme partenaire de CD47 fût l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Brown et al., 1990). Plus tard, la génération de souris déficientes pour la protéine CD47 a pu confirmer le rôle de CD47 vis-à-vis à des intégrines, notamment dans les processus dépendants de ces protéines, comme la migration, l'adhérence et la phagocytose chez les leucocytes. Ainsi les souris déficientes en CD47 montrent une sensibilité accrue aux infections provoquées par les bactéries due à un défaut de l'accumulation des leucocytes au site de l'infection (Lindberg et al., 1996). Au fil des recherches, il a également été montré, que CD47 influence l'activité d'autres intégrines comme les intégrines  $\alpha_{11b}\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_5$  [pour revue (Oldenberg, 2013)] et  $\alpha_M\beta_2$  (Podolnikova et al., 2019).

### 2.3.1 Régulation et interaction de la protéine CD47 avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

- *Description générale des intégrines*

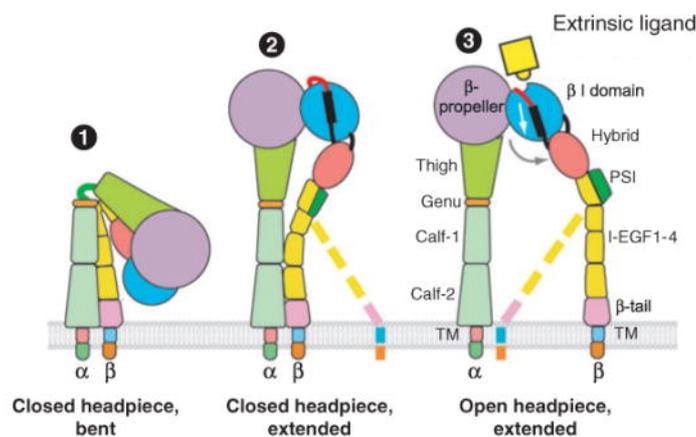
Avant de décrire l'influence de CD47 sur les intégrines, il est important de rappeler le fonctionnement général de ces protéines. Les intégrines connectent la matrice extracellulaire au cytosquelette de la cellule. Elles transmettent les signaux essentiels qui contrôlent la morphologie de la cellule, sa migration, sa survie et sa différenciation [pour revue (van der Flier and Sonnenberg, 2001)]. Ce sont des hétérodimères non covalents composés d'une sous unité  $\alpha$  et d'une sous unité  $\beta$ . Ces deux sous unités sont synthétisées au sein du réticulum endoplasmique et sont ensuite exportées en membrane sous forme d'un hétérodimère obligatoire. Chez les invertébrés, 24 intégrines ont été répertoriées et proviennent de la combinaison de 18 sous unités  $\alpha$  et 8 sous unités  $\beta$ . Chaque hétérodimère a des propriétés d'interaction qui lui sont spécifiques [pour revue (Humphries et al., 2006)].

Les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  des intégrines sont des protéines transmembranaires composées d'un large domaine extracellulaire, d'un seul domaine transmembranaire, et d'une queue

cytoplasmique. Elles adoptent plusieurs conformations dont dépend leur affinité : pliée-fermée (bent-closed), dépliée-fermée (extended-closed), dépliée-ouverte (extended-opened) (Figure 13). Le site de fixation pour leur ligand est peu accessible pour les conformations pliée-fermée et étendue-fermée. Ces conformations ont donc une faible affinité pour leur ligand. A l'inverse, dans la conformation étendue-ouverte, le site de fixation pour leur ligand est accessible. Elle représente la conformation de forte affinité. Ainsi le processus d'activation des intégrines fait référence au passage d'une conformation pliée-fermée/étendue-fermée à une conformation étendue-ouverte [pour revue (Luo et al., 2007)].

Les intégrines sont activées selon deux mécanismes de signalisation différents appelés « inside-out » et « outside-in » selon si le signal d'activation provient de l'extérieur ou de l'intérieur de la cellule. Dans le cas de la signalisation « inside-out », les intégrines sont activées suite à la fixation des protéines adaptatrices taline et kindline. En interagissant avec la queue cytoplasmique de la sous unité  $\beta$ , la taline assistée par la kindline, provoque la séparation des domaines cytoplasmiques des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Cette étape déclenche le changement de conformation du domaine extracellulaire à l'origine du passage de l'intégrine d'une conformation pliée-fermée, vers une conformation étendue-fermée jusqu'à finalement une conformation étendue-ouverte [pour revue (Sun et al., 2019)]. L'activation « outside-in » s'opère lors de l'interaction du domaine extracellulaire de l'intégrine avec son ligand. Cette interaction favorise un changement de conformation au niveau du domaine extracellulaire qui se propage jusqu'au domaine cytoplasmique et entraîne sa séparation. Une fois activées, les intégrines interagissent avec des protéines de la matrice extracellulaire (ECM) entraînant la formation de clusters. De nombreuses protéines du cytoplasme et du cytosquelette sont alors recrutées et forment les contacts focaux. Ces sites d'adhérence lient la matrice extracellulaire au cytosquelette et leur maturation aboutit à la formation de l'intégrine « adhesome » (Horton et al., 2015).

L'activité des intégrines est non seulement dépendante des protéines du cytoplasme, mais elle est aussi dépendante de ses partenaires en membrane. Parmi eux les tétraspanines, comme CD151 capable d'interagir avec l'intégrine  $\alpha_3\beta_1$ . De par leur interaction, la tétraspanine CD151 contrôle l'internalisation et la glycosylation de l'intégrine  $\alpha_3\beta_1$  (Baldwin et al., 2008; Liu et al., 2007). Elle favorise aussi la conformation de haute affinité de l'intégrine  $\alpha_3\beta_1$  bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents ne soient pas encore élucidés (Nishiuchi et al., 2005).



**Figure 13 :** Conformations des intégrines liés à leur activation.

Les intégrines adoptent plusieurs conformations. (1) Une conformation pliée-fermée, inactive avec une faible affinité pour son ligand. (2) Une conformation étendue-fermée, active mais avec une faible affinité pour son ligand. (3) Une conformation étendue-ouverte, active avec une forte affinité pour son ligand [Tiré de (Luo et al., 2007) Fig.6].

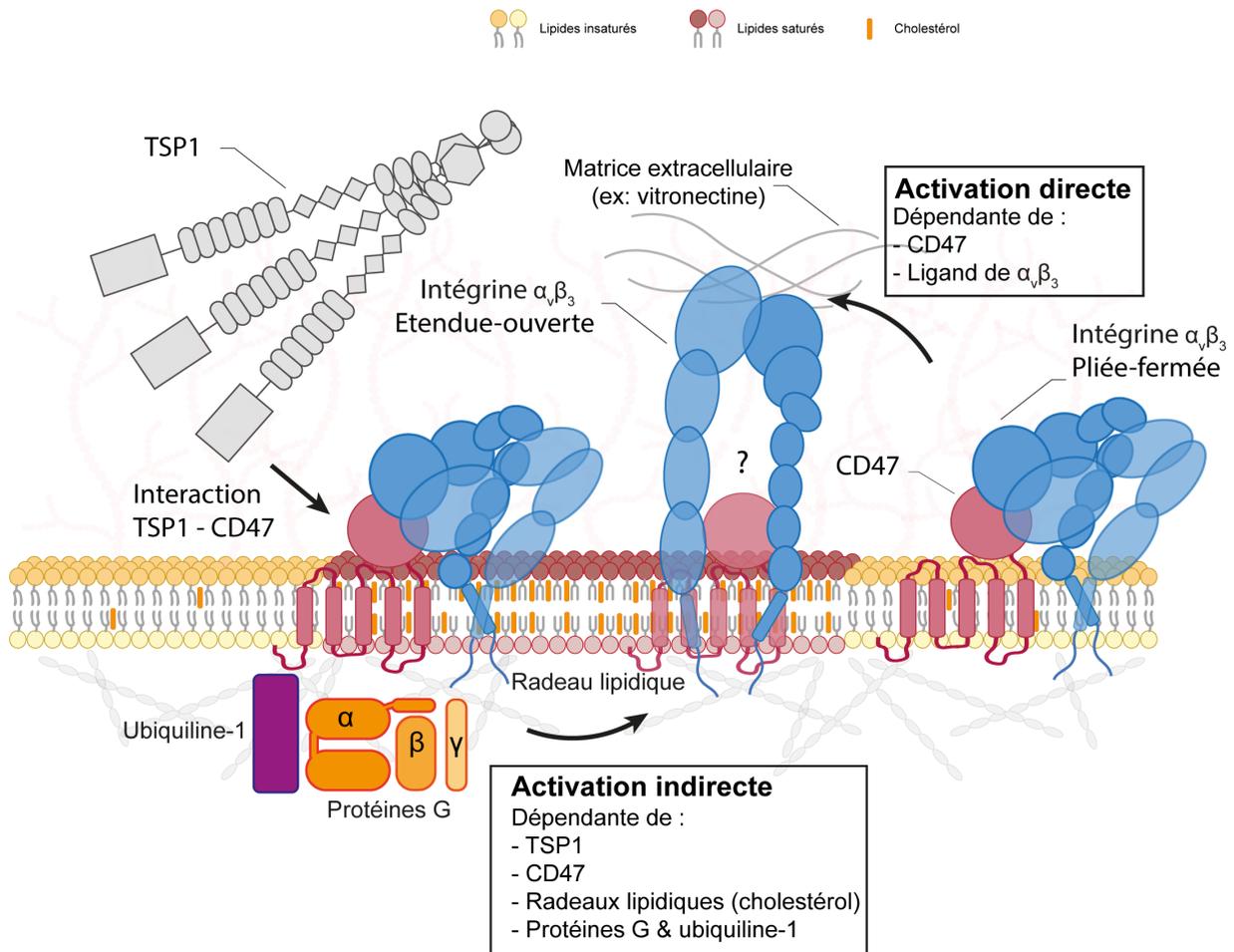
- *Influence de CD47 sur l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$*

L'interaction de CD47 avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  a fait l'objet d'investigations approfondies afin de comprendre l'influence de CD47 sur son partenaire. L'expression de CD47 est essentielle à la reconnaissance de la vitronectine par l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , mais seulement dans des conditions particulières. En effet, CD47 favorise l'adhérence cellulaire lorsque la densité de vitronectine est faible. A l'inverse lorsque la densité est élevée, CD47 n'est plus indispensable (McDonald et al., 2004). Afin de comprendre ce phénomène, McDonald et collaborateurs ont utilisé des anticorps conformationnels dirigés contre la forme activée de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Ils ont montré que CD47 favorise à la fois, l'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  lorsqu'elle est en présence de son ligand, mais aussi l'assemblage de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  sous forme de clusters. Ainsi, CD47 facilite l'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  en présence de son ligand. Une observation cohérente avec la dépendance de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  à CD47 lorsque la concentration en vitronectine est faible (McDonald et al., 2004). De plus, ils ont constaté que seul le domaine extracellulaire de CD47 suffisait à la régulation de l'activité de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

D'autre part, CD47 influence indirectement l'activité de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  via la protéine TSP1. La protéine CD47 interagit avec cette protéine soluble ou avec le peptide dérivé de sa partie C terminale (peptide 4NK1). Leur interaction favorise l'adhérence des cellules sur la vitronectine à faible densité (Green et al., 1999). Dans ce contexte, le domaine extracellulaire, ainsi que le domaine transmembranaire de CD47 sont nécessaires. Le domaine extracellulaire de CD47 interagit avec la TSP1. Alors que le domaine transmembranaire localise le complexe CD47- $\alpha_v\beta_3$  dans les radeaux lipidiques enrichis en cholestérol. C'est au niveau de cette plateforme que le complexe CD47- $\alpha_v\beta_3$  s'associe avec les protéines G essentielles à la signalisation de la TSP1 et à l'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Green et al., 1999; McDonald et al., 2004). A noter, que la signalisation de CD47 via les protéines G est dépendante de la protéine ubiquiline 1 capable d'interagir à la fois avec le domaine cytoplasmique de CD47 et les protéines G (N'Diaye and Brown, 2003; Wu et al., 1999). L'interaction de CD47 avec la TSP1 et l'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  font intervenir de nouveaux acteurs : les protéines G et les radeaux lipidiques. Les protéines G ont largement été caractérisées pour leur interaction avec les récepteurs couplés aux protéines G (G protein-coupled receptor, GPCR) [pour revue (Weis and Kobilka, 2018)]. La signalisation de nombreuses GPCR s'opère suite à la fixation de leur ligand, ce qui entraîne un changement de conformation favorable à l'activation des protéines G. Ces récepteurs sont constitués de sept régions transmembranaires. Une caractéristique qui a alimenté l'hypothèse selon laquelle, les cinq régions transmembranaires de CD47 couplées aux deux régions transmembranaires de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , formeraient un complexe ad-hoc de sept régions transmembranaires capables de recruter et d'activer les protéines G (Brown and Frazier, 2001). Néanmoins, aucune preuve moléculaire ou structurale n'a encore été obtenue à l'heure actuelle pour étayer cette hypothèse.

Les radeaux lipidiques jouent également un rôle clé dans le recrutement de CD47, de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et des protéines G. Chacune de ces protéines est détectée dans ces domaines de façon indépendante. La déstabilisation des radeaux empêche leur co-immunoprécipitation (Green et al., 1999). Elle bloque par la même occasion l'effet de la TSP1 sur l'adhérence des cellules sur la vitronectine. Leur déstabilisation impacte également la conformation de CD47 comme en témoigne l'augmentation de la fixation de l'anticorps 10G2 à la surface des cellules traitées par la M $\beta$ CD. Enfin, la localisation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  dans les radeaux lipidiques semble être dépendante de son état d'activation. Bien que ces observations ont été réalisées sur des modèles membranaires, elles montrent que l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  activée est recrutée dans les domaines ordonnés (Ge et al., 2018).

Ainsi l'influence de CD47 sur l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est double. D'une part, CD47 favorise directement l'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  en présence de son ligand via l'interaction de son domaine extracellulaire, indépendamment de son domaine transmembranaire et de l'environnement lipidique. D'autre part, il favorise indirectement l'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  en interagissant avec la TSP1. Cet effet est dépendant du domaine extra et intra cellulaire de CD47, des radeaux lipidiques et des protéines G (Figure 14). Cependant de nombreuses questions subsistent : Comment le domaine extracellulaire de CD47 favorise-t-il la conformation de haute affinité de l'intégrine ? Sous quelle conformation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , CD47 interagit-il ? Quel est le site d'interaction de CD47 sur l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  ?



**Figure 14 : Influence de la protéine CD47 sur l'activité de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .**

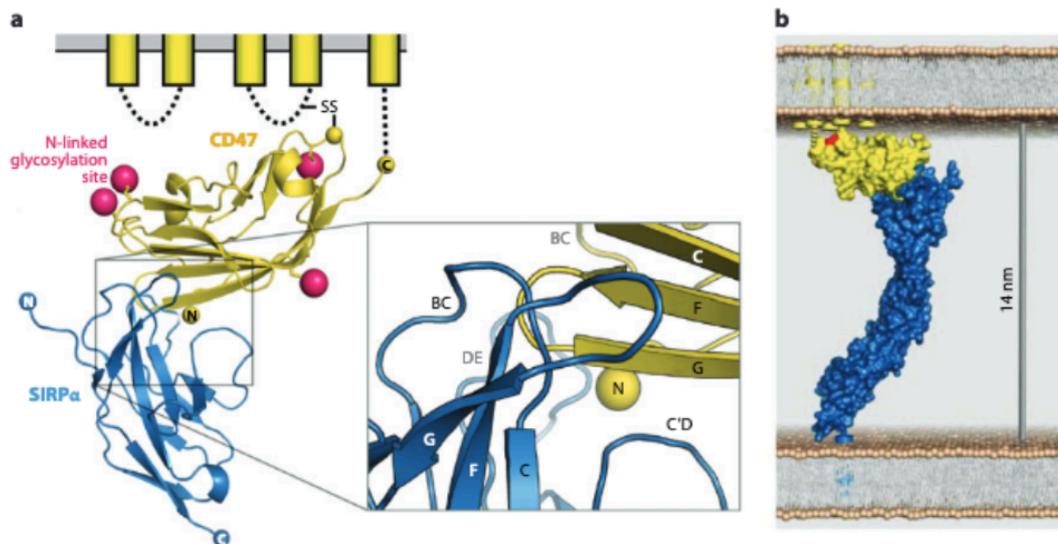
D'une part, CD47 favorise directement l'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  au travers de l'interaction de son domaine extracellulaire avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . D'autre part, il favorise indirectement l'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , de par son interaction avec la TSP1 et de sa localisation dans les radeaux lipidiques, où il s'associe avec les protéines G grâce à la protéine ubiquiline 1.

### 2.3.2 Interaction de la protéine CD47 avec le récepteur SIRP $\alpha$ et inhibition de la phagocytose

Outre son rôle dans la régulation des intégrines, CD47 influence également le processus de phagocytose, de par son interaction avec le récepteur membranaire SIRP $\alpha$  [pour revue (Barclay and van den Berg, 2014)]. Ce récepteur est exprimé à la surface de nombreux phagocytes comme les monocytes, les macrophages, les granulocytes ou encore les cellules dendritiques (Seiffert et al., 1999; Veillette et al., 1998). C'est un récepteur composé de trois domaines semblables à des domaines immunoglobulines, d'une partie transmembranaire et d'une queue cytoplasmique avec quatre résidus tyrosine qui forment deux motifs ITIM. L'interaction de SIRP $\alpha$  avec CD47 est de faible affinité, de l'ordre du micromolaire (Hatherley et al., 2008). Leur interaction fait intervenir le domaine N terminal de SIRP $\alpha$  et le domaine extracellulaire de CD47 (Figure 15a). Bien que distant du site d'interaction, le pont disulfure connectant le domaine extracellulaire et la partie transmembranaire de CD47 stabilise également leur interaction. Un attribut propre à l'interaction avec le récepteur SIRP $\alpha$ , puisque ce pont disulfure n'est pas indispensable pour l'interaction de CD47 en *cis* avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Rebres et al., 2001). L'interaction CD47-SIRP $\alpha$  est espèce dépendante. En effet, le récepteur SIRP $\alpha$  humain n'interagit pas avec la protéine CD47 exprimée chez la souris ou le rat (Subramanian et al., 2006). Étonnamment, cette particularité ne se vérifie pas chez la souris. Le récepteur murin SIRP $\alpha$  interagit toujours avec la protéine CD47 humaine (Tsai et al., 2010). Le complexe CD47-SIRP $\alpha$  formé a une dimension (environ 14 nm) similaire à celle des complexes que l'on trouve au sein de la synapse immunologique (Figure 15b). Leur interaction entraîne la phosphorylation des motifs ITIM de SIRP $\alpha$  ce qui provoque à la fois le recrutement et l'activation des tyrosines phosphatases présentes dans le cytoplasme : SHP-1 et SHP-2 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 & 2). Une fois activées, elles déphosphorylent une multitude de substrats. Dans la plupart des cas, cela aboutit à leur inhibition. Par exemple, lors de la phagocytose, l'interaction de SIRP $\alpha$  en *trans* avec CD47, déphosphoryle la myosine IIA impliquée dans la formation de la coupe phagocytaire au niveau du macrophage. En conséquence, leur interaction inhibe le processus d'internalisation (Tsai and Discher, 2008). CD47 favorise également le recrutement et l'activation de SIRP $\alpha$  dans la synapse phagocytaire. Au niveau de cette interface, SIRP $\alpha$  inhibe l'activation des intégrines du macrophage impliquées dans l'interaction et l'internalisation durant la phagocytose (Morrissey et al., 2020). Ainsi l'exposition de CD47 à la surface cellulaire protège les cellules viables de la phagocytose.

Néanmoins la fonction de « don't eat-me » CD47 évolue durant l'apoptose. En effet, lorsque les cellules apoptotiques sont phagocytées par les macrophages, la phosphorylation des motifs ITIM du récepteur SIRP $\alpha$  diminue (Gardai et al., 2005). Cette observation est cohérente avec la baisse de l'exposition de CD47 à la surface des cellules apoptotiques, notamment des neutrophiles et des fibroblastes (Gardai et al., 2005). Cependant, à la surface des lymphocytes de souris et des lymphocytes JurkaT apoptotiques l'exposition de CD47 reste constante durant l'apoptose. La baisse de phosphorylation du récepteur SIRP $\alpha$  ne peut donc être seulement expliquée par la diminution de l'exposition de CD47. Gardai et ses collaborateurs ont donné les premières informations sur ce phénomène en montrant la redistribution de CD47 et son exclusion des domaines enrichis à la fois en PS et en CRT (Gardai et al., 2005). Par la suite, Lv et ses collaborateurs ont démontré que la distribution de CD47 sous forme de cluster dans les radeaux lipidiques est une condition essentielle à son interaction avec le récepteur SIRP $\alpha$  (Lv et al., 2015). Cette distribution est déstabilisée durant l'apoptose entraînant une baisse d'avidité entre les deux partenaires ce qui explique la diminution de signalisation du récepteur SIRP $\alpha$ .

Étonnamment, bien que CD47 inhibe la phagocytose, sa fonction de « don't eat-me » semble évoluer vers une fonction de « eat-me » avec le développement de l'apoptose. En effet, deux études ont rapporté que CD47 favorise l'élimination des cellules apoptotiques (Nilsson and Oldenborg, 2009; Tada et al., 2003). De façon similaire, lorsque CD47 est exprimé à la surface des érythrocytes âgés ou oxydés, il est davantage reconnu par la TSP1 ou le peptide 4NK1. Leur interaction augmente l'élimination des érythrocytes par les macrophages (Burger et al., 2012). Plusieurs paramètres semblent intervenir dans la fixation de la TSP1. Par exemple, Burger et collaborateurs ont proposé un changement de conformation de CD47 favorable à la fixation de TSP1. Récemment une étude par microscopie à super résolution a permis l'observation de l'augmentation de la clusterisation de CD47 à la surface des érythrocytes âgés favorable à la fixation de TSP1 (Wang et al., 2020).



**Figure 15 :** Interaction entre la protéine transmembranaire CD47 et le récepteur SIRPα.

(a) Structure du domaine N-terminal de SIRPα en interaction avec le domaine extracellulaire de CD47. (b) Modélisation de l'interaction de CD47 avec le récepteur SIRPα à l'interface entre deux cellules. La distance estimée du complexe formé est d'environ 14 nm [tiré de (Barclay and van den Berg, 2014), Fig.2].

### 3 Objectifs de mon travail de thèse

Mon travail de thèse avait pour vocation l'étude de l'interface qui se forme entre le phagocyte et la cellule apoptotique : l'efferosynapse. C'est une structure clé pour l'élimination des cellules apoptotiques puisque c'est à ce niveau que se mettent en place les interactions qui déclencheront, ou non, leur internalisation. De nombreuses molécules sont impliquées, que ce soit au niveau de la cellule apoptotique, qui expose à sa surface des « don't eat-me » et « eat-me » signaux, mais aussi, au niveau du macrophage qui exprime une grande variété de récepteurs (paragraphe I.1.5.2). Du fait de sa complexité, l'organisation moléculaire de l'efferosynapse est encore méconnue. Toutefois, sa caractérisation est une étape cruciale vers une meilleure connaissance des signaux présentés par la cellule apoptotique et de leur interprétation par le phagocyte dont dépend la réponse immune (paragraphe I.1.5.5).

Avant d'explorer l'efferosynapse dans son ensemble, il nous a semblé nécessaire de décomposer cette structure afin d'en simplifier l'étude. Ainsi, nous avons analysé séparément la cellule apoptotique du macrophage et étudié quelques molécules impliquées dans la formation de l'efferosynapse.

#### 3.1 Caractérisation de la distribution de la PS, de la CRT et de CD47 durant l'apoptose

La première étape, qui constitue l'essentiel de mon travail, a été d'analyser l'organisation et la dynamique des signaux « eat-me » et « don't eat-me ». L'objectif était de comprendre comment la cellule apoptotique manipule ces différents signaux pour faciliter sa reconnaissance par le phagocyte. Les molécules plus particulièrement visées ont été celles déjà étudiées au sein du laboratoire, à savoir : la PS, la CRT et CD47.

Puisque l'ensemble de ces modifications s'opère à l'échelle de la molécule, c'est-à-dire en dessous des limites de résolution de l'imagerie classique, j'ai décidé d'utiliser les nouvelles techniques de microscopie à super résolution comme le STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy). Cette technique franchit la limite de résolution (environ 200 nm) de la microscopie de fluorescence conventionnelle et atteint une résolution jusqu'à dix fois supérieure (environ 20 nm). Elle m'a permis de décrire avec une grande précision les assemblages moléculaires impliqués dans la formation de la synapse phagocytaire. Dans le but de décrire également l'évolution de la dynamique de ces signaux durant l'apoptose, j'ai étudié la mobilité de la protéine CD47 grâce à la technique de microscopie de suivi de molécule unique.

#### 3.2 Etude de l'interaction entre le récepteur SR-F1 et la protéine C1q

Du côté du macrophage, je me suis focalisée sur le décryptage du rôle du récepteur SR-F1, connu pour son implication dans la phagocytose médiée par C1q chez la souris. L'objectif était à la fois de corroborer la fonction de SR-F1 dans un modèle humain, mais aussi de caractériser plus en détail l'interaction de SR-F1 vis-à-vis de son partenaire C1q à l'échelle de la cellule.

CHAPITRE

# II

## Matériels et Méthodes

Une grande partie du matériels et méthodes est décrit dans le manuscrit « *Nanoscale imaging of CD47 informs how plasma membrane modifications shape apoptotic cell recognition* » et l'article « *Molecular and Cellular Interactions of Scavenger Receptor SR-F1 With Complement C1q Provide Insights Into Its Role in the Clearance of Apoptotic Cells* » présent dans la partie résultats. Je ne développerai donc ici qu'en détail les protocoles de microscopie à super résolution que j'ai mis au point et adaptés à l'étude des molécules membranaires de l'efférosynapse, ainsi que le matériels et méthodes des expériences complémentaires ne faisant pas partie des articles.

### 1 Biologie moléculaire

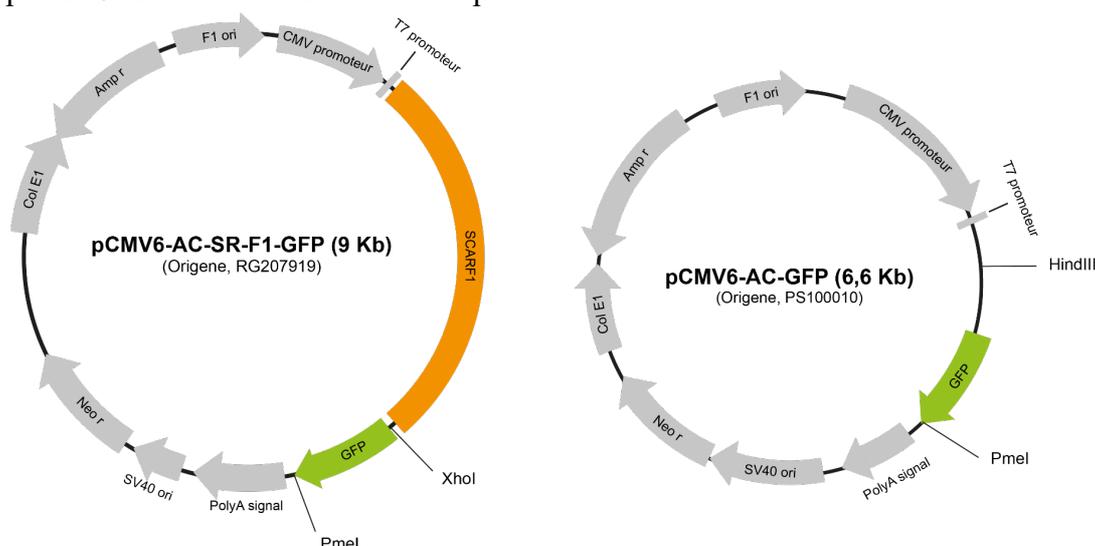
Les étapes de transformation, de sélection, d'amplification et de purification de l'ADN ont été réalisées en suivant les recommandations des différents fabricants. Brièvement, les bactéries compétentes DH5 $\alpha$  (Thermofisher, 18265017) sont transformées et cultivées sur LB agar en présence d'ampicilline (100  $\mu$ g/mL). Les colonies bactériennes résistantes à l'ampicilline sont amplifiées séparément sous forme de suspension bactérienne en présence de milieu de culture LB (Lysogeny broth). L'ADN plasmidique est extrait et purifié à l'aide du kit « NucleoSpin plasmid mini kit » (Macherey-Nagel, 740588). Les produits de PCR et d'extraction de gel d'agarose sont purifiés à partir du kit « NucleoSpin gel and PCR clean-up » (Macherey-Nagel, 740609). Finalement, les plasmides obtenus sont cartographiés par digestion enzymatique et séquencés (Eurofins Genomics, Sanger sequencing) afin de vérifier la construction.

Les amorces utilisées pour la création des plasmides pCMV6-AC-SR-F1 et pCMV6-AC-SR-F1-mEos4b sont répertoriées ci-dessous :

Name	Séquence (5' → 3')	Modification
SRF1-stopF	CCAGGCCACCAGAACCCTAGTTTAAACGG CCGCTCGAGATGGAGAGC	Substitution en 5' pour un créer un codon <b>stop</b> et un site de clivage <b>PmeI</b>
SRF1-stopR	GCTCTCCATCTCGAGCGGCCGTTTAAACTA GGGTTCTGGTGGCCTGG	Substitution en 3' pour un créer un codon <b>stop</b> et un site de clivage <b>PmeI</b>
mEos4b_XhoI_F	AGCACTCGAGATGAGTGCGATTAAGCCAG AC	Insertion en 5' d'un site restriction <b>XhoI</b>
mEos4b_PmeI_R	TGCTGTTTAAACTTATCGTCTGGCATTGTC AGG	Insertion en 3' d'un site restriction <b>PmeI</b>

**Tableau 1 :** Liste des différentes amorces utilisées pour la biologie moléculaire.

Les plasmides utilisés pour la construction des plasmides pCMV6-AC-SR-F1, pCMV6-AC, pCMV6-AC-SR-F1-mEos4b sont représentés ci-dessous :



**Figure 16 :** Carte schématique des plasmides pCMV6-AC-SR-F1-GFP et pCMV6-AC-GFP.

## 1.1 Création du plasmide pCMV6-AC-SR-F1

Le plasmide portant la séquence codante du gène SCARF1 d'origine humaine codante pour l'isoforme 1 de la protéine SR-F1 (pCMV6-AC-SR-F1) a été obtenu à partir du plasmide pCMV6-AC-SR-F1-GFP (Origene, RG207919, représenté Figure 16) après création d'un codon STOP à la fin de la séquence du gène SCARF1. Celui-ci a été ajouté par mutagenèse dirigée sur la base des instructions du kit « QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis » (Agilent technologies, 200516). Les amorces SRF1-stopF et SRF1-stopR (Tableau 1) ont été utilisées pour amplifier le plasmide pCMV6-AC-SR-F1-GFP et créer à partir de plusieurs substitutions, un codon STOP ainsi qu'un site de restriction PmeI. Une fois la mutagenèse par PCR terminée, l'ADN parental méthylé (ne portant pas les substitutions) est digéré par l'enzyme de restriction DpnI. Les bactéries ultracompetentes XL10 Gold sont ensuite transformées avec le plasmide d'ADN muté. Le plasmide est extrait des bactéries résistantes à l'ampicilline (100 µg/mL), cartographié grâce à ses sites de restrictions et séquencé (Tableau2).

Mélange Réactionnel			
ADN matrice (100 ng/µL)			2 µL (200 ng)
Amorce SRF1-stopF (150 ng/µL)			1,5 µL (225 ng)
Amorce SRF1-stopR (150 ng/µL)			1,5 µL (225 ng)
QuickSolution			3 µL
QuickChange Buffer X10			5 µL
dH <sub>2</sub> O stérile			35 µL (Compléter jusqu'à 48 µL)
10 min à 95°C			
dNTP mix			1 µL
Pfu Polymérase (2.5 U/µL)			1 µL (2.5 U)
Cycles de PCR			
Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95 °C	60 s	1
Dénaturation	95 °C	50 s	18
Hybridation	60 °C	50 s	
Extension	68 °C	18 min	
Extension finale	68 °C	7 min	1
Stockage	4°C	∞	

**Tableau 2 :** Conditions de réactions utilisées pour la construction du plasmide pCMV6-AC-SR-F1.

## 1.2 Création du plasmide pCMV6-AC

Le plasmide pCMV6-AC, utilisé pour la transfection contrôle, a été obtenu à partir du plasmide pCMV6-AC-GFP (Origene, PS100010, représenté [Figure 16](#)) après 2h de digestion par les enzymes de restriction HindIII et PmeI (Thermofisher, ER1341 & Neb, R0104S) afin d'exciser la séquence codante de la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein). Les enzymes de restriction sont ensuite inactivées par la chaleur à 80 °C pendant 20 min. L'extrémité 5' débordante générée par HindIII est comblée avec l'utilisation d'un fragment de Klenow de ADN polymérase I (M0210, NEB), pendant 15 min à 25°C en présence de dNTP (1mM). Le fragment de Klenow est inactivé par la chaleur à 75°C pendant 20 min. Le produit de digestion est alors chargé sur un gel d'agarose 0.7 %. La bande correspondante à la séquence du plasmide pCMV6-AC linéarisé est découpée et purifiée. Le fragment purifié est ensuite ligaturé dans le but de former un plasmide avec l'enzyme T4 DNA ligase (Thermo, EL0011). Les bactéries compétentes DH5 $\alpha$  sont transformées avec le produit de ligation et cultivées sur LB agar en présence d'ampicilline (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Les colonies bactériennes résistantes à l'ampicilline sont amplifiées et l'ADN plasmidique est extrait et purifié ([Tableau 3](#)).

<i>Digestion</i>	
pCMV6-AC-GFP (1,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Origene, PS100010)	2 $\mu\text{L}$ (2.2 $\mu\text{g}$ )
Tampon 2.1 (Neb, B7202S) 10X	2 $\mu\text{L}$
PmeI (5 U/ $\mu\text{L}$ ) (Thermofisher, ER1341)	2 $\mu\text{L}$ (5U)
HindIII (20 U/ $\mu\text{L}$ ) (Neb, R0104S)	1 $\mu\text{L}$ (20 U)
dH <sub>2</sub> O stérile	13 $\mu\text{L}$ (Compléter jusqu'à 20 $\mu\text{L}$ )
Incubation - 2h à 37°C	
Inactivation par la chaleur - 20 min à 80°C	
<i>Remplissage de l'extrémité 5' débordante</i>	
dNTP (1mM)	1 $\mu\text{L}$
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (5 U/ $\mu\text{L}$ ) (Neb, M0210)	0.5 $\mu\text{L}$ (2.5U)
Incubation - 15 min à 25 °C	
Inactivation par la chaleur - 20 min à 80°C	
Purification après migration sur gel d'agarose	
<i>Ligation</i>	
pCMV6-AC linéarisé (65 ng/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$ (65ng)
Tampon de ligation X10 (Thermofisher, #B69)	2 $\mu\text{L}$
T4 ligase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) (Thermofisher, EL0011)	1 $\mu\text{L}$ (5U)
dH <sub>2</sub> O stérile	16 $\mu\text{L}$
Incubation - 3h à 25°C	
Inactivation par la chaleur - 10 min à 70°C	
<i>Transformation bactérienne</i>	

**Tableau 3 :** Conditions de réactions utilisées pour la construction du plasmide pCMV6-AC

## 1.3 Création du plasmide pCMV6-AC-SR-F1-mEos4b

Le plasmide pCMV6-AC-SR-F1-mEos4b a été obtenu à partir du plasmide pCMV6-AC-SR-F1-GFP (Origene, RG207919, représenté [Figure 16](#)) en substituant la séquence de la protéine fluorescente GFP par celle de mEos4b. Préalablement, la séquence de mEos4b a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pRSETb – mEos4b ([De Zitter et al., 2019](#)) avec les amorces mEos4b\_XhoI\_F et mEos4b\_PmeI\_R ([Tableau 1](#)) conçues pour ajouter un site de restriction XhoI à l'extrémité 5' et un site PmeI à l'extrémité 3' de la séquence codante de mEos4b. Le produit de PCR est chargé sur un gel d'agarose 0.7 %, la bande correspondante à la séquence du plasmide mEos4b est découpée et purifiée. L'ADN purifié de mEos4b et le

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

plasmide pCMV6-AC-SR-F1-GFP sont ensuite digérés en parallèle par les enzymes XhoI et PmeI. Les produits de digestion sont purifiés après migration sur gel d'agarose 0.7%. Les séquences sont ensuite ligaturées ensemble avec la T4 DNA ligase (Thermo, EL0011). Les bactéries compétentes DH5 $\alpha$  sont transformées avec le produit de ligation et cultivées sur LB agar en présence d'ampicilline (100  $\mu$ g/mL). Les colonies bactériennes résistantes à l'ampicilline sont amplifiées et l'ADN plasmidique est extrait, purifié et enfin séquencé (Tableau 4).

<i>Mélange réactionnel PCR</i>			
Phusion high-Fidelity PCR MASTER MIX (2X) (ThermoFisher, F532S)	25 $\mu$ L		
pRSETb – mEos4b (10 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L (10 ng)		
Forward Primer (10 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ L (0.5 $\mu$ M)		
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ L (0.5 $\mu$ M)		
dH <sub>2</sub> O stérile	29 $\mu$ L (Compléter jusqu'à 50 $\mu$ L)		
<i>Cycles de PCR</i>			
Etape	Température	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	98°C	60 s	1
Dénaturation	98°C	30 s	30
Hybridation	63°C	30 s	
Extension	72°C	30 s	
Extension finale	72°C	10 min	1
Stockage	4°C	$\infty$	
Purification après migration sur gel d'agarose			
<i>Digestion</i>			
ADN	pCMV6-AC-SR-F1-GFP (Origene, RG207919) 2 $\mu$ L (3 $\mu$ g)	mEos4b : produit de PCR 16 $\mu$ L (1.5 $\mu$ g)	
Tampon cutsmart (Neb, B7204S) 10X	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	
PmeI (5 U/ $\mu$ L) (ThermoFisher, ER1341)	1 $\mu$ L (5U)	1 $\mu$ L (5U)	
XhoI (20 U/ $\mu$ L) (Neb, R0146S)	1 $\mu$ L (20U)	1 $\mu$ L (20U)	
dH <sub>2</sub> O stérile	41 $\mu$ L (Compléter jusqu'à 50 $\mu$ L)	27 $\mu$ L (Compléter jusqu'à 50 $\mu$ L)	
Incubation sur la nuit à 37°C			
Purification après migration sur gel d'agarose			
<i>Ligation</i>			
pCMV6-AC-SR-F1-GFP digéré XhoI/ PmeI	0.6 $\mu$ L (50 ng)		
mEos4b digéré XhoI/ PmeI (1:3 rapport molaire insert :vecteur)	1 $\mu$ L (1ng)		
Tampon de ligation X10 (Thermo, #B69)	2 $\mu$ L		
T4 ligase (5 U/ $\mu$ l) (ThermoFisher, EL0011)	1 $\mu$ L (5U)		
dH <sub>2</sub> O stérile	15.5 $\mu$ L (Compléter jusqu'à 20 $\mu$ L)		
Incubation - 2h à 25°C			
Inactivation par la chaleur - 10 min à 70°C			
<i>Transformation bactérienne</i>			

**Tableau 4 :** Conditions de réactions utilisées pour la construction du plasmide pCMV6-AC-SR-F1-mEos4b.

## 2 Biologie cellulaire

### 2.1 Lignées et culture cellulaire

Les différentes lignées cellulaires (Tableau 5) sont cultivées dans une étuve à 37°C, en présence de 5% CO<sub>2</sub> afin de tamponner le milieu de culture et sous atmosphère humide pour limiter son évaporation. Les différents milieux de culture sont supplémentés avec 10% sérum de veau fœtal (on dira d'un milieu supplémenté qu'il est complet) afin d'apporter un mixte physiologique des différents facteurs de croissance et de survie nécessaire au maintien des lignées cellulaires. Les protéines du complément présentes au sein de ce sérum ont été inactivées préalablement en chauffant le milieu à 56 °C pendant 20 min. Finalement, un mélange d'antibiotiques (pénicilline 3 U/ml, streptomycine 3 µg/ml, Thermofisher) est ajouté pour limiter le risque de contamination.

Les cellules adhérentes HeLa, CHO et J774 sont cultivées en flasque T75 dans du DMEM complet enrichi en glucose, pyruvate et Glutamax (Thermofisher, 31966021). En routine, elles sont passées 2 fois par semaine. Brièvement, les cellules sont détachées de leur support en les incubant avec une solution 0.5% Trypsine-EDTA (Thermofisher, 25300054) après lavage au DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, sans calcium, sans magnésium, Thermofisher, 14190144). Une fois que les cellules sont détachées, l'action de la trypsine est inhibée par l'ajout de milieu complet. Les cellules sont dénombrées sur lame de Malassez, centrifugées (230g, 5 min) et réensemencées entre 1.5 x 10<sup>6</sup> et 2 x 10<sup>6</sup> cellules dans 12 mL de milieu frais.

Les cellules en suspension JurkaT et THP-1 sont cultivées en suspension en RPMI 1640 supplémenté en Glutamax (Thermofisher, 61870010) complet et sont traitées de la même manière que précédemment en omettant l'étape de lavage et de détachement. Les cellules sont ensemencées à 3.6 x 10<sup>6</sup> cellules pour 12 mL de milieu dans une flasque T75.

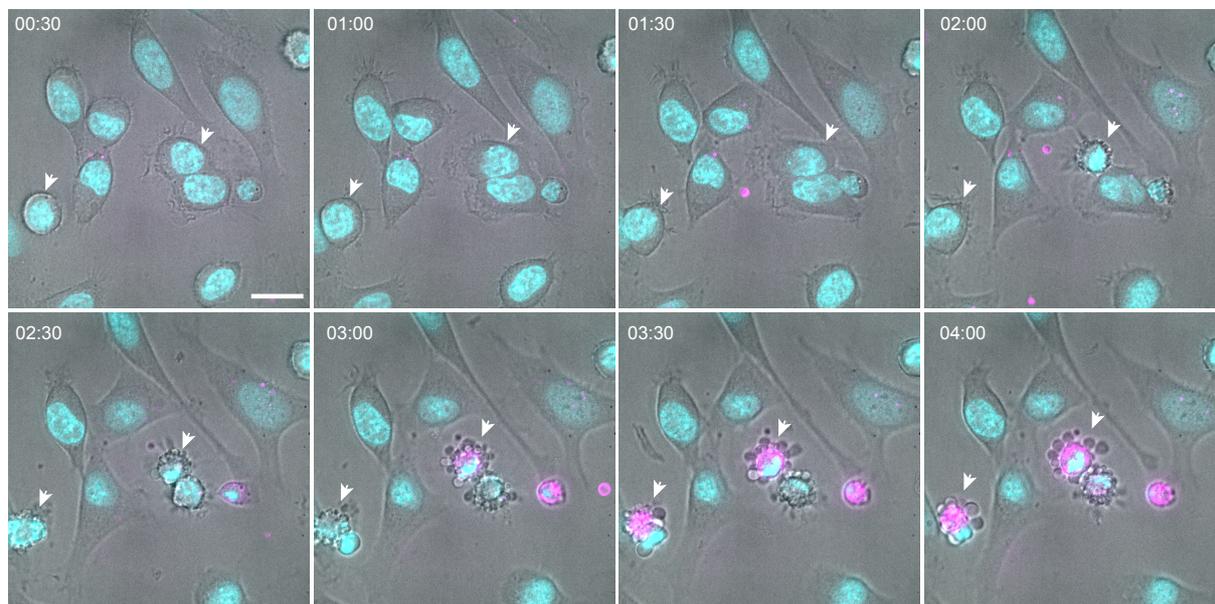
Lignée cellulaire	Type	Origine	Sexe	Milieu de culture	Reference
HeLa CCL-2	Epithéliale (adhérente)	Cancer du col de l'utérus (Homo sapiens)	Femme	DMEM complet	
J774	Macrophage (adhérente)	Réticulosarcome, (Mus musculus)	Femelle	DMEM complet	(Ralph et al., 1975)
CHO	Epithéliale (adhérente)	Ovaire (Cricetulus griseus)	Femelle	DMEM complet	T. T. Puck in 1957.
THP-1	Monocyte (suspension)	Leucémie monocyttaire aiguë (Homo sapiens)	Homme	RPMI complet	(Tsuchiya et al., 1980)
JurkaT	Lymphocyte T (suspension)	Leucémie lymphoblastique aiguë (Homo sapiens)	Homme	RPMI complet	(Schneider et al., 1977)

**Tableau 5 :** Liste des différentes lignées cellulaires.

### 2.2 Induction de l'apoptose des cellules HeLa par UVB

Le protocole d'induction de l'apoptose est équivalent quel que soit le support de culture utilisé. Les cellules HeLa sont ensemencées la veille dans du DMEM complet pour permettre leur adhésion. Elles sont ensuite irradiées le lendemain aux ultraviolets (UVB, longueur d'onde 312 nm, lampe Fischer Bioblock Scientific VL-6.MC) durant 9 min, ce qui correspond à une dose de 1000 mJ/cm<sup>2</sup>. Une fois irradiées, les cellules sont remises dans les mêmes conditions de culture et sont analysées 4 heures après. L'induction de l'apoptose par UVB est un processus hétérogène, son développement ne s'enclenche pas au même moment chez toutes les cellules. Seulement 20% des cellules exposent la PS après 4 heures (Païdassi et al., 2008). Cependant,

cela permet d'observer dans un même échantillon, des cellules à différents stades de l'apoptose : la rétraction de la cellule, l'apparition des blebs et l'augmentation de la dynamique des blebs (Figure 17).



**Figure 17 :** Caractérisation de l'apoptose des cellules HeLa irradiées aux UVB.

Les cellules HeLa ont été irradiées aux UVB, marquées avec de Hoescht 33342 (cyan) pour détecter le noyau et imagées en présence d'annexin V marquée Alexa Fluor A647 pour détecter l'exposition de la PS (magenta). Elles ont ensuite été imagées pendant 4 heures après irradiation sur un microscope confocale spinning disk. Les flèches pointent deux cellules dont le développement de l'apoptose est caractéristique avec premièrement la rétraction de la cellule (2 :00), suivie de la formation des renflements membranaires appelés blebs (2:30). Plus tard, ces modifications s'intensifient et deviennent plus dynamiques (3:00–4:00). L'échelle représente 20  $\mu\text{m}$  et le temps après irradiation est indiqué en haut à gauche. Cette figure est tirée de la Fig.S1 du manuscrit CD47.

## 2.3 Transfection des lignées cellulaires

Les cellules THP-1, sous forme de monocyte ou différenciées en macrophage, expriment en faible quantité et de façon endogène le récepteur SR-F1. Afin d'étudier le rôle spécifique du récepteur SR-F1, les monocytes THP-1 sont donc transfectés dans le but d'induire la surexpression du récepteur SR-F1. La transfection s'effectue par lipofection.

La transfection par lipofection permet le passage de la barrière membranaire et le déversement de matériel génétique au sein de la cellule jusqu'à la machinerie de transcription présente au niveau du noyau. Le principe de la lipofection repose sur l'utilisation de liposomes chargés positivement, générés à partir d'un mélange de différents lipides. La charge positive des liposomes facilite leur complexation avec l'ADN mais aussi avec la membrane plasmique, qui sont tous les deux de charge négative. Une fois les liposomes complexés à l'ADN, ils fusionnent avec la membrane plasmique, pour ensuite atteindre le noyau où l'ADN deviendra accessible à la machinerie de transcription.

La Lipofectamine LTX (Thermofisher, 15338030) est un agent de lipofection. Elle est constituée d'un mélange breveté de lipides cationiques formulé pour permettre la transfection de plasmide d'ADN avec une cytotoxicité minimale. Cette propriété est essentielle lorsque les cellules sont sensibles et difficiles à transfecter comme le sont généralement les cellules d'origine hématopoïétique. La transfection des cellules THP-1 est réalisée en plaque 6 puits (9.4  $\text{cm}^2$  par puits). Chaque puits estensemencé avec un million de cellules THP-1 dans 2 mL

de RPMI complet. En parallèle, pendant 10 min et à température ambiante, 2.5 µg de d'ADN plasmidique sont dilués dans 500 µL de milieu Opti-MEM® (Thermofisher, 51985026) avec 2.5 µL de réactif PLUS™. La lipofectamine LTX (7.5 µL) est ensuite ajoutée à l'ADN, puis le mélange est incubé pendant 25 min à température ambiante. Finalement, le mélange est ajouté aux cellules et elles sont ensuite remises en culture. Le temps d'incubation des cellules avec la lipofectamine LTX est un facteur clé pour la réussite de la transfection. En effet, l'efficacité de transfection est proportionnelle au temps d'incubation tout comme l'effet cytotoxique de l'agent de transfection. Dans le but de maximiser l'efficacité de la transfection tout en diminuant son impact délétère, les cellules sont incubées pendant 24h avec la lipofectamine LTX, avant d'être centrifugées et re-suspendues dans du milieu frais. Dans le but d'établir une lignée stable, les THP-1 sont ensuite cultivés en présence de 400 µg/mL d'antibiotique Généticine (Thermofisher, 10131027). Ainsi, seulement les cellules transfectées porteuses du gène de résistance (néo) à cet antibiotique survivront.

Le milieu de culture des cellules (RPMI complet plus Généticine) est renouvelé une fois par semaine jusqu'à l'apparition de colonies. Elles sont ensuite amplifiées et peuvent être conservées par cryogénie à -192°C. Chaque transfection représente une population hétérogène de cellules transfectées. Le succès de la transfection est finalement évalué par cytométrie en flux afin de vérifier l'expression de la protéine d'intérêt par immunofluorescence ou grâce à la fluorescence intrinsèque dans le cas d'une fusion traductionnelle avec une protéine fluorescente (mEos4b ou autre).

Les cellules THP-1 sont transfectées avec les plasmides pCMV6-AC-SR-F1, pCMV6-AC et pCMV6-AC-SR-F1-mEos4b (paragraphe II.1) selon les conditions énoncées précédemment.

Les cellules CHO sont transfectées avec le plasmide pCMV6-AC-SR-F1-mEos4b dans le but d'étudier l'influence du récepteur SR-F1 chez des phagocytes non-professionnels. La transfection des cellules CHO suit la même procédure que celle des THP-1 avec les modifications suivantes : la transfection des cellules CHO est réalisée en plaque 24 puits (surface de 1.88 cm<sup>2</sup>), ensemencés avec 4 x 10<sup>4</sup> cellules dans 0.5 mL de DMEM complet un jour avant la transfection. Le lendemain, pendant 25 min et à température ambiante, 0.5 µg de d'ADN plasmidique est dilué dans 100 µL de milieu Opti-MEM® (Thermofisher, 51985026) avec 2 µL de lipofectamine LTX. Trois jours après la transfection, les cellules sont détachées et transférées dans une boîte de 60 mm de diamètre (surface de 21 cm<sup>2</sup>). Le milieu de culture est remplacé par du RPMI complet en présence de 600 µg/mL de Généticine (Thermofisher, 10131027). Les cellules sont amplifiées et la dose d'antibiotique est augmentée à 800 µg/mL de Généticine (Thermofisher, 10131027). La transfection des cellules CHO est hétérogène, seulement environ 1/10 de la population exprime en quantité détectable le récepteur SR-F1 - mEos4b. Les cellules sont donc triées et sélectionnées en fonction de leur expression grâce un trieur cellulaire (BD FACS Melody cell sorter, plateforme d'analyse et de tri cellulaire, IRIG, Grenoble).

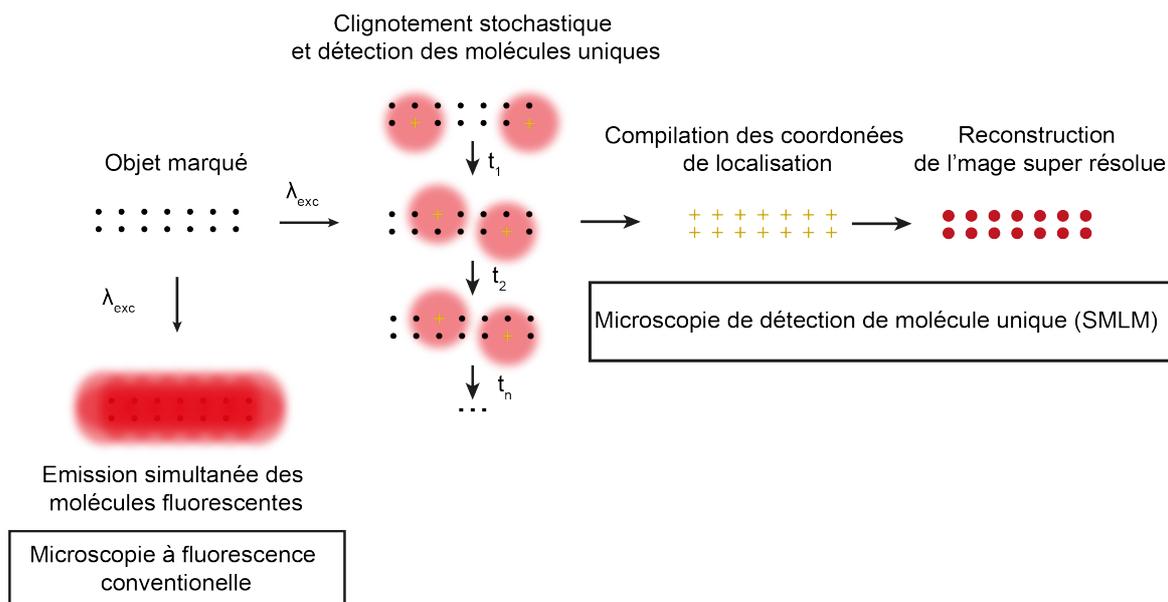
### 3 Microscopie de localisation de molécule unique

La résolution en microscopie optique est limitée par la diffraction de la lumière. Celle-ci se matérialise par le fait que l'image d'un point lumineux arbitraire en microscopie optique n'est pas représentée par un point, mais par une fonction d'étalement du point (Point Spread Function, PSF). Ainsi, selon la loi décrite par Abbe, la résolution théorique maximale atteignable en microscopie optique à fluorescence est d'environ 200 nm. Dans le but de franchir cette limite et de se rapprocher de l'échelle moléculaire, de nouvelles techniques ont émergé. Les plus populaires sont le STED (Stimulated Emission Depletion), le SIM (Structured Illumination microscopy) et le SMLM (Single Molecule Localisation Microscopy). Chacune de ces techniques a ses avantages et ses inconvénients [pour revue (Schermelleh et al., 2019)].

La technique de SMLM est celle que j'ai utilisée durant ma thèse pour étudier la distribution des molécules qui composent l'efférosynapse. Cette technique repose, comme son nom l'indique, sur la détection de molécule isolée. En effet, si une molécule fluorescente est isolée, il est possible d'extraire avec précision sa position à partir de sa PSF. En microscopie à fluorescence conventionnelle, cela est impossible car toutes les molécules fluorescentes sont excitées simultanément. En conséquence, toutes les PSF se superposent, empêchant d'extrapoler leur localisation de façon précise. En microscopie SMLM, l'émission de fluorescence des molécules est décomposée dans le temps afin que chaque PSF soit isolée. Une fonction gaussienne est ensuite utilisée pour déterminer avec précision leur position. Ces positions sont finalement compilées afin de reconstruire une image super résolue. Ce procédé permet d'atteindre une résolution de l'ordre de 20 nm (Figure 18).

Plusieurs approches comme le STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), le PALM (photo-activated localization microscopy) ou le PAINT (Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topograph) décomposent la fluorescence des molécules dans le temps selon des procédés différents. Le STORM utilise des fluorophores organiques capables de clignoter entre un état « brillant » et un état « noir » dans un environnement chimique adapté. Le PALM utilise des protéines fluorescentes photo-transformables et plus généralement des molécules fluorescentes photo-transformables, qui s'activent, par exemple après excitation aux UV. Enfin, le PAINT utilise des molécules fluorescentes en solution, qui vont commuter entre diffusion et immobilisation. Seuls les fluorophores immobiles seront détectés. A noter, que le clignotement observé de ces molécules fluorescentes grâce à ses différentes techniques est un processus aléatoire, dit stochastique.

La résolution de l'image finale dépend de deux critères. Premièrement, de la précision de localisation. Elle est liée au rapport du signal sur bruit qui intègre à la fois, le nombre de photons collectés (en lien avec les propriétés photophysiques de l'émetteur) pour chaque localisation mais aussi le niveau de bruit de fond. Ainsi, plus le rapport signal sur bruit sera élevé, plus la localisation sera précise. Deuxièmement, elle dépend de la densité de marquage. D'après le critère de Nyquist-Shannon, la structure d'intérêt doit être marquée à un intervalle régulier, au moins deux fois plus petit que la plus petite caractéristique de cette structure. En pratique, pour atteindre une résolution de 20 nm dans un espace 2D, au moins un fluorophore doit être présent tous les 10 nm. Enfin, la taille de la protéine fluorescente (4 nm) ou celle des anticorps utilisés (13 nm) pour marquer la protéine d'intérêt ajoute un biais au résultat obtenu et constitue également un facteur limitant la résolution.



**Figure 18 : Principe de la microscopie de détection de molécule unique.**

En microscopie conventionnelle, l'ensemble des molécules fluorescentes émettent simultanément lors de leur excitation ( $\lambda_{exc}$ ) empêchant le discernement d'objet plus petit que la limite de résolution de la microscopie à fluorescence. En microscopie de détection de molécule unique (SMLM), les molécules fluorescentes isolées s'activent de façon stochastique au cours du temps ce qui permet la détection de leur position. Celles-ci sont compilées et une image super résolution est reconstruite, avec une résolution proche de 20 nm.

### 3.1 Déroulement du protocole STORM

La technique STORM augmente significativement la résolution des images obtenues comparativement à la microscopie à fluorescence conventionnelle (champs large et confocale). Néanmoins, le protocole expérimental requiert une attention particulière afin de restituer avec la plus grande fidélité possible, la distribution des molécules ciblées. De nombreuses revues décrivent le schéma expérimental nécessaire à l'obtention de l'image STORM [pour revue (Jimenez et al., 2020; Lelek et al., 2021)]. En s'inspirant de la structure du plan du protocole expérimental décrit par Jimenez et ses collaborateurs, je décrirai ici le protocole que j'ai utilisé pour l'étude des cellules apoptotiques par microscopie STORM.

#### 3.1.1 Préparation de l'échantillon

La préparation des cellules HeLa pour la microscopie STORM se déroule dans les mêmes conditions que celles de culture, à savoir : en milieu DMEM Glutamax complet, en présence de 5% de CO<sub>2</sub> et à une température de 37°C. Un jour avant le marquage, les cellules sont ensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits dans une lamelle compartimentée (Thermofisher, Nunc Lab-Tek II Chambered Coverglass, référence #1.5). L'épaisseur du fond des puits est de 170  $\mu\text{m}$ . La plupart des objectifs avec une forte ouverture numérique sont optimisés pour cette épaisseur. C'est pourquoi, dans le but de maximiser la résolution et de minimiser l'introduction d'aberrations, il est recommandé d'utiliser cette épaisseur. Des lamelles de haute précision sont aussi disponibles et porte la référence #1.5H. La variation de leur épaisseur est plus faible, de l'ordre de 5  $\mu\text{m}$  contre 15  $\mu\text{m}$  pour les lamelles #1.5. Elles doivent donc être privilégiées. A noter, que certains objectifs disposent d'une bague de correction capable de compenser l'épaisseur de la lamelle choisie.

Avant l'ajout des cellules, les lamelles sont nettoyées au préalable grâce à un traitement aux UV (Ozone cleaning system, UVOCS) afin d'éliminer toutes les impuretés organiques qui sont des sources potentielles d'autofluorescence. Le principe de ce traitement repose sur l'émission d'UV de longueur d'onde de 185 nm et 254 nm. Ces longueurs d'onde génèrent de l'oxygène atomique (O) et excitent ou dissocient les contaminants organiques. Une fois excités, les contaminants réagissent avec l'oxygène atomique et forment des produits volatiles qui sont ensuite facilement éliminés (ex : CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O ou O<sub>2</sub>). En comparaison à d'autres traitements utilisant, par exemple, des solutions acides, basiques ou des solvants, ce traitement a l'avantage de ne laisser aucun résidu à la surface du verre.

Dans un deuxième temps, les lamelles compartimentées sont incubées avec 0.2 mg/mL de Poly-D-lysine Hydrobromide (Sigma, P7886) pendant deux heures ou durant toute la nuit à température ambiante. La poly-D-lysine est un acide aminé chargé positivement. Lorsqu'elle s'absorbe à la surface du verre, elle augmente les interactions électrostatiques, ce qui rend la surface plus hydrophile et favorise l'adhérence des cellules. Cette propriété est importante pour minimiser l'élimination des cellules apoptotiques durant les étapes de lavages.

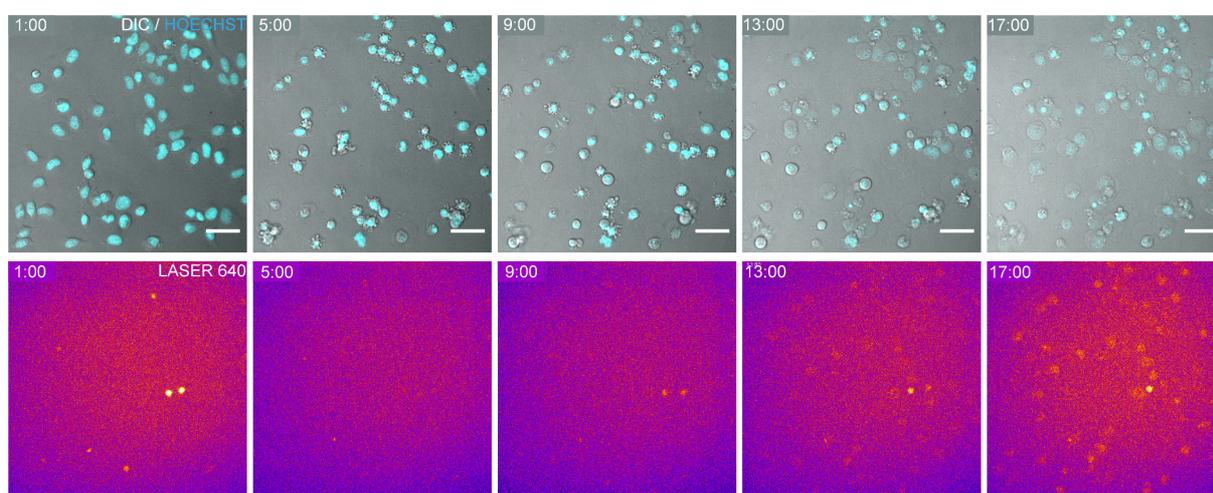
### 3.1.2 Fixation

L'augmentation de la résolution offerte par la microscopie à super résolution nécessite de porter une attention particulière aux processus de fixation et d'immunofluorescence. En effet, les artefacts alors imperceptibles en microscopie de fluorescence conventionnelle sont désormais visibles avec la microscopie à super résolution. Afin de retranscrire l'architecture de la cellule le plus finement possible, celle-ci doit être préservée au plus proche de son état initial (avant fixation). Pour cela, on utilise le formaldéhyde (FA) et le glutaraldéhyde qui sont des agents de fixation communément utilisés en microscopie. Ils sont composés de groupement aldéhyde capable de lier les protéines entre elles grâce à la formation de ponts méthylène (Kiernan, 2000). Le formaldéhyde est une petite molécule composée d'un groupement aldéhyde. Il pénètre rapidement la membrane plasmique et préserve l'architecture de la cellule. Néanmoins il stabilise partiellement les protéines membranaires (Tanaka et al., 2010). Par rapport au formaldéhyde, le glutaraldéhyde est composé de deux groupements aldéhyde ce qui augmente son pouvoir fixateur et participe à stabiliser les protéines de la membrane (Tanaka et al., 2010). Cette condition est primordiale dans l'étude de l'organisation membranaire des protéines et des lipides (Pereira et al., 2019; Stanly et al., 2016). Cependant, une concentration élevée en glutaraldéhyde favorise l'apparition de composés autofluorescents et peut masquer certains épitopes. Une alternative, est l'association du formaldéhyde avec le glutaraldéhyde offrant un compromis entre rapidité, conservation et faible autofluorescence. En effet, leur association est suffisante pour stabiliser les protéines de la membrane plasmique (Tanaka et al., 2010), sans pour autant favoriser l'autofluorescence des cellules (Paez Segala et al., 2015).

Le lendemain, les cellules sont irradiées aux UVB directement dans les lamelles compartimentées selon les conditions établies (Paragraphe II.2.2). Après 4 heures d'attente, les cellules sont lavées délicatement avec du PBS à 37°C et sont ensuite fixées pendant 10 min à 37°C avec une solution composée de 3% formaldéhyde et 0.1% glutaraldéhyde dilués en PBS à pH 7.4 (Electron Microscopy Sciences, 15710, 16020). A noter que durant la fixation la température, ainsi que le pH de la solution, doivent être au plus proche des valeurs physiologiques afin de minimiser tout changement d'état de la cellule (Whelan and Bell, 2015).

### 3.1.3 Traitement de l'autofluorescence

Après fixation, les cellules sont rincées avec du PBS et sont ensuite incubées pendant 30 min avec une solution de 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> dans un tampon d'ammonium acétate (100 mM, pH 7.4). Originellement, cette solution est utilisée pour réduire l'autofluorescence du pigment lipofuscine présent dans les cellules âgées du système nerveux central (Schnell et al., 1999). Dans nos conditions d'observation, elle offre deux avantages. D'une part, les ions ammonium présents dans la solution tampon réagissent avec les groupements encore libres du formaldéhyde et du glutaraldéhyde, inhibant la fixation potentielle et aspécifique des anticorps. D'autre part, l'ion cuivre participe à diminuer l'autofluorescence des cellules en apoptose, sans pour autant altérer la photophysique des fluorophores. En effet, le développement de l'apoptose chez les cellules HeLa irradiées aux UVB favorise l'augmentation de l'autofluorescence. Cela devient particulièrement visible par microscopie confocale lorsque les cellules atteignent le stade de nécrose secondaire (Figure 19, 13h & 17h après irradiation).



**Figure 19 : Augmentation de l'autofluorescence durant le développement de l'apoptose des cellules HeLa.**

Les cellules ont été irradiées aux UVB et ont ensuite été imagées pendant 16h avec un microscope spinning disk confocal en présence de CO<sub>2</sub> et à 37°C. Le noyau des cellules est marqué avec du Hoesht (cyan). La fluorescence naturelle ou autofluorescence des cellules est détectée après excitation des cellules avec le laser 640 nm. Sur l'image 1h00 après irradiation, les spots lumineux correspondent à des débris cellulaires. 17h00 après irradiation, la majorité des cellules est en nécrose secondaire comme en témoigne la présence des blebs nécrotiques. Le temps en heure après irradiation est indiqué en haut à gauche et l'échelle représente 50  $\mu$ m.

### 3.1.4 Marquage par immunofluorescence

Ensuite, les cellules sont incubées pendant une heure à température ambiante, sous une légère agitation, avec une solution contenant 3% d'albumine de sérum bovin (BSA) en PBS. La BSA sature tous les sites d'interactions non spécifiques, avec lesquels les anticorps pourraient interagir. A noter que l'étude de protéines et de lipides membranaires est incompatible avec l'observation de structures intracellulaires nécessitant la perméabilisation de la membrane plasmique. En effet, la perméabilisation requiert des détergents comme le Triton X100 capable de solubiliser une partie des lipides membranaires. Cependant, ces traitements sont susceptibles, à la fois d'extraire des protéines/lipides de la membrane mais aussi d'altérer son organisation générale (Schnell et al., 2012). Certains agents de perméabilisation sont réputés plus doux, comme la saponine capable d'extraire le cholestérol des membranes mais doivent être utilisés avec prudence pour éviter, encore une fois, d'altérer la structure de la membrane plasmique. C'est pourquoi, si possible, l'étape de perméabilisation est à proscrire pour l'étude des constituants de la membrane.

Après saturation, les cellules sont lavées et incubées avec les anticorps primaires dirigés contre la CRT, CD47 ou ERp57 pendant 1h et sous agitation (Tableau 6). Les anticorps sont dilués dans une solution contenant 3% de BSA en PBS. La densité de marquage est un facteur critique en microscopie SMLM, c'est pourquoi les anticorps primaires sont généralement utilisés à forte concentration. Dans ces conditions, il est essentiel de choisir des anticorps très affins pour leurs antigènes, limitant les fixations non-spécifiques. Afin d'augmenter encore la densité de marquage, il est également possible de privilégier des anticorps polyclonaux capables de reconnaître différents épitopes d'une même protéine. Cependant leur purification est parfois moins bonne que celle des monoclonaux, ce qui peut conduire à un marquage moins spécifique.

Anticorps primaires	Source	Référence	Concentration
Anticorps polyclonaux IgY de poulet anti CRT	Thermofisher	PA1-902A	4,4 µg/mL
Annexin V marquée par la biotine	Biolegend	640904	2.5 µg/mL
Anticorps polyclonaux IgG de lapin anti ERp57	Abcam	ab10287	Dilution 1:100
Anticorps monoclonal IgG1 de souris anti CD47 marqué par l'Alexa Fluor A647	Santa Cruz	Clone B6H12, sc-12730 AF647	2 µg/mL

**Tableau 6 :** Liste des différents anticorps primaires utilisés pour la microscopie STORM.

La détection de la PS est un cas particulier. En effet, l'annexine A5 (ou annexine V) est utilisée pour détecter la PS seulement lorsqu'elle est exposée à la surface de cellules apoptotiques non-fixées et en présence de calcium. Les cellules sont donc incubées avec l'annexine A5 avant fixation dans un tampon Hepes (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7.4) durant 30 min. De plus, les cellules sont incubées sur la glace pour prévenir l'internalisation de l'annexine A5 (Kenis et al., 2004).

Après l'incubation des anticorps primaires, les cellules sont lavées 5 fois en PBS, avec 10 min d'intervalle entre chaque lavage. Cette étape est nécessaire pour éliminer tous les anticorps primaires encore en solution. Les cellules sont ensuite incubées pendant 45 min et sous agitation avec les anticorps secondaires ou la streptavidine marqués (Tableau 7), dilués dans une solution contenant 3% de BSA en PBS. Tout comme les anticorps primaires, l'affinité et la spécificité des anticorps secondaires sont des caractéristiques clés. A noter que, les anticorps secondaires sont généralement absorbés contre des anticorps de différentes espèces afin de limiter de possible réaction croisée. Ainsi, le nombre d'espèces pour lesquelles l'anticorps secondaire est absorbé, peut représenter un premier indicateur de sa spécificité. Quoi qu'il en soit, dans nos conditions, chaque anticorps secondaire est testé sans anticorps primaire dans le but de détecter toute fixation aspécifique.

Anticorps secondaires	Source	Référence	Concentration
Anticorps polyclonaux de lapin dirigé contre les IgY de poulet marqués par l'Alexa Fluor 532	Cohesion Biosciences	CSA3314	5 µg/mL
Anticorps polyclonaux de chèvre dirigé contre les IgY de poulet marqués par l'Alexa Fluor 555	Thermofisher	A21437	2µg/mL
Anticorps polyclonaux d'âne dirigé contre les IgG de lapin marqués par FluoProbes 647H	Interchim	FP-SC5110	10 µg/mL
Streptavidine marquée par l'Alexa Fluor 647	Thermofisher	S32357	0,4 µg/mL

**Tableau 7 :** Liste des différents anticorps secondaires utilisés pour la microscopie STORM.

Après incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS, avec 10 min d'intervalle entre chaque lavage. A noter que pour stabiliser les anticorps secondaires, il peut être nécessaire de réaliser une post-fixation dans les mêmes conditions que celles réalisées précédemment (cf paragraphe II.3.1.2). Dans nos conditions, seuls les anticorps polyclonaux de chèvre marqués par l'Alexa Fluor 555 et les anticorps polyclonaux d'âne marqués par le FluoProbes 647H sont post-fixés.

Finalement les cellules sont incubées toute la nuit à 4°C avec des nanoparticules d'or de 100 nm de diamètre (Sigma, 753688) diluées au 1:8 en PBS. Les nanoparticules sont préalablement traitées aux ultrasons pendant 30 min afin d'éviter tout agrégat pendant l'observation. De par leur propriété physique, les nanoparticules d'or sont brillantes et photostables après illumination avec les lasers 532 nm et 642 nm. Elles servent de référence pour corriger la dérive durant l'acquisition. Elles permettent également de vérifier, dans le cas de la microscopie deux couleurs, si l'alignement entre les deux canaux de fluorescence est correct.

### 3.1.5 Acquisition des données SMLM

#### 3.1.5.1 Configuration du microscope

Toutes les expériences de microscopies SMLM ont été réalisées à l'IBS sur une installation maison développée par l'équipe PIXEL et faisant partie de la plateforme M4D de l'IBS. L'ensemble des composants de ce microscope est accessible. Cela offre plusieurs avantages comme : mieux comprendre le fonctionnement de la microscopie SMLM mais aussi pouvoir effectuer facilement des modifications. Cette installation est composée de trois parties : le module d'excitation, le microscope et le module de détection, disposés sur une table optique pour limiter les vibrations.

Le module d'excitation est composé de six lasers de longueur d'onde différente : 405, 488, 532, 561, 642 et 730 nm. Chaque laser est co-aligné grâce à des miroirs dichroïques jusqu'à un AOTF (Acousto-Optic Tunable Filter). Celui-ci permet de contrôler à la fois, l'intensité et le temps de l'illumination au niveau du microscope.

Le microscope, est un microscope inversé IX-81 (Olympus), équipé d'un objectif 100x avec une ouverture numérique de 1.49 (Olympus). Les lasers sont concentrés au niveau du plan focal arrière de l'objectif, offrant une illumination champ large (Widefield, WF). Un bras TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) permet de modifier l'angle d'incidence au niveau de l'objectif, jusqu'à atteindre l'angle critique et la création d'une onde évanescente. Dans cette configuration, seuls les fluorophores dans un intervalle de 0 à environ 200 nm sont excités, augmentant significativement la résolution en z comparativement à l'illumination WF [pour revue (Fish, 2009)]. Une platine motorisée (PI) accueille les échantillons et permet leur déplacement de façon précise dans l'espace (x,y,z). Afin de corriger la dérive en z, le microscope dispose également d'un système de focus continue (ZDC, Olympus). Enfin, le microscope est équipé de plusieurs cubes de filtres à fluorescence dont le cube dénommé DENDRA et RFP. Le cube DENDRA est composé d'un miroir dichroïque ZT532/640rpc-UF1 (Chroma) adapté aux lasers 532 nm et 642 nm et d'un filtre d'émission ZET532/640m (Chroma). Le cube RFP est quant à lui composé d'un miroir dichroïque F580-FDi01-25x36 (Semrock) adapté aux lasers 532 nm et 561 nm et d'un filtre d'émission FF01-630/92-25 (Semrock).

Enfin, deux caméras EMCCD (Evolve 512 back-illuminated, Photometrics) composent le module de détection et permettent l'acquisition des images. A noter, qu'il est possible d'ajouter un miroir dichroïque FF640-FDi02-t3-25\*36 (Semrock) dans la boîte de détection pour diviser en deux l'émission de fluorescence et réaliser simultanément de l'imagerie deux couleurs. Les caméras sont contrôlées par le logiciel Metamorph (Molecular Devices), tandis que l'illumination des lasers via l'AOTF, est contrôlée par le logiciel Labview (National Instruments).

### 3.1.5.2 Acquisition STORM deux couleurs

La photophysique des fluorophores est très variable. Ils ne sont pas tous adaptés à l'imagerie STORM (Dempsey et al., 2011). De plus, les conditions nécessaires à leur clignotement sont généralement très spécifiques, ce qui limite le choix des combinaisons pour la microscopie STORM deux couleurs. Le fluorophore par excellence est l'Alexa Fluor 647 (A647) dont les propriétés (un clignotement lent, un grand nombre de photons émis) sont parfaitement adaptées à la microscopie STORM (Dempsey et al., 2011). Comme deuxième fluorophore, l'Alexa Fluor 532 (A532) dont le spectre d'absorption est suffisamment éloigné de l'A647 a été choisi pour sa capacité à clignoter et à émettre suffisamment de photons dans les mêmes conditions expérimentales que l'A647. De plus, les fluorophores FluoProbes F647H (F647H) et Alexa Fluor 555 (A555) ont été utilisés comme alternative à l'A647 et l'A532 respectivement.

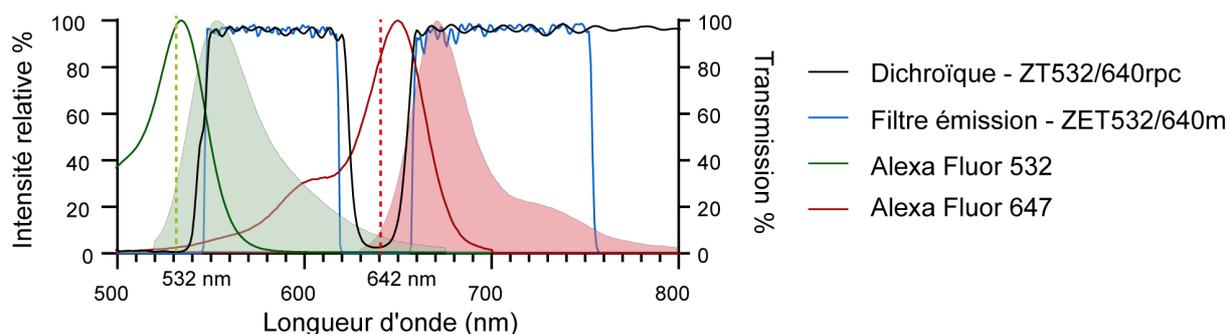
Après l'immunofluorescence, les cellules sont délicatement lavées avec du PBS et sont ensuite incubées dans un tampon STORM (Tableau 8). A noter que pour le couple de fluorophores F647H et A555, la concentration de MEA est réduite à 10 mM de MEA.

Compositions du tampon STORM	Solutions stocks
50 mM Tris, 10% (w/v) D-glucose, 10 mM NaCl, pH 8.0	A partir d'une solution concentrée X1.25 : 62.5 mM Tris, 12.5% (w/v) D-glucose, 12.5 mM NaCl, pH 8.0. Filtré et conservé à 4°C
100 mM MEA, pH 8.0 (Cysteamine, Sigma, 30070)	Préparé extemporanément. Conservé à 4°C, pendant 1 mois.
0.5 mg/mL glucose oxidase (G2133-50KU, Sigma, 225 970 units/g) 40 µg/mL catalase (C40, Sigma, 21850 units/mg)	A partir d'une solution concentrée X10 : 100 mM Tris-HCL pH 7.5, 25 mM KCL, 1 mM TCEP (tris (2-carboxyethyl) phosphine), 5 mg/mL Glucose Oxidase, 0.4 mg/mL Catalase, 50% (v/v) Glycerol. Conservé à -20°C, pendant 1 an

**Tableau 8 :** Composition du tampon STORM.

Le clignotement des fluorophores tels l'A647 est dépendants de plusieurs composants : la présence d'un agent réducteur, l'absence d'oxygène et du pH de la solution (Dempsey et al., 2011). Dans le tampon STORM, le MEA (cyteamine) est l'agent réducteur. La combinaison du glucose oxidase avec la catalase participe à réduire drastiquement la concentration d'oxygène dissous. Enfin, le pH est tamponné par la solution de TRIS, NaCl. A noter que sa valeur peut évoluer avec l'oxydation du glucose par l'enzyme glucose oxydase qui acidifie la solution. C'est pourquoi, avant l'acquisition, les puits sont scellés avec une lamelle de verre et du picodent twinsil (Picodent, 1300 1000) afin de limiter la dissolution de l'oxygène ambiant.

Durant l'acquisition deux couleurs, le cube DENDRA est utilisé pour l'excitation des fluorophores A532 et A647 (Figure 20). L'excitation du fluorophore 647H est également réalisée avec le cube DENDRA alors que l'excitation du fluorophore A555 est réalisée avec le cube RFP.



**Figure 20 :** Spectres d'absorbance et d'émission des fluorophores Alexa fluor 532 et 647.

Les transmissions du miroir dichroïque (courbe noire) et du filtre d'émission (courbe bleu) du cube DENDRA sont superposées aux différents spectres d'absorbance et de fluorescence des fluorophores A532 (courbe verte) et A647 (courbe rouge). Les lignes en pointillés verte et rouge correspondent à la longueur d'onde des lasers 532 et 642 respectivement.

L'échantillon est imagé séquentiellement. Le fluorophore avec la plus grande longueur d'onde d'excitation est toujours imagé en premier. Avant l'acquisition, le système de maintien du focus est activé (ZDC, Olympus). Dans un premier temps, une image en microscopie à fond clair (bright-field) est acquise, ainsi que des images WF en utilisant une faible intensité de laser. Celle-ci servira de point de comparaison avec le rendu obtenu après détection des molécules uniques. Les cellules apoptotiques sont des cellules denses avec de nombreuses invaginations. Les molécules liées à leur reconnaissance par les phagocytes sont exprimées à la surface des blebs répartis sur l'ensemble de la cellule. C'est pourquoi les cellules sont illuminées en champ large (WF) afin de pouvoir imager des zones éloignées de la lamelle. Dans un deuxième temps, l'échantillon est illuminé avec le laser 642 nm (Toptica Photonics). Le faisceau d'excitation est gaussien et la puissance d'excitation moyenne au centre du faisceau est de  $2.1 \text{ kW.cm}^{-2}$ . Une fois que la densité des fluorophores permet leur localisation individuelle, l'acquisition est lancée et 20 000 images sont enregistrées avec un temps d'acquisition de 50 ms, soit 20 Hz. Le temps d'acquisition est réglé de sorte que, dans la majorité des cas, l'ensemble des photons provenant d'un événement de clignotement soit collecté sur une même image. La puissance du laser et le temps d'acquisition sont des paramètres à optimiser car ils influencent la résolution de l'image finale (Diekmann et al., 2020). De la même façon, le fluorophore A532 est illuminé ensuite en champ large avec le laser 532 nm (CNI Laser) avec une puissance d'excitation moyenne de  $3.1 \text{ kW.cm}^{-2}$  au centre du faisceau. Dans nos conditions, la vitesse de clignotement de l'A532 est plus élevée que celle de l'A647. Le temps d'acquisition est donc diminué à 20 ms, soit 50 Hz. A noter que le nombre de localisation diminue durant l'acquisition du fait du blanchiment des fluorophores. Pour compenser ce phénomène et réactiver les fluorophores dans l'état brillant, le laser 405 nm est activé avec une faible puissance d'excitation ( $1.1 \text{ mW.cm}^{-2}$ ). L'activation du laser 405 nm est seulement efficace pour le fluorophore A647.

Le fluorophore F647H est imagé dans les mêmes conditions que le fluorophore A647. Le fluorophore A555 est quant à lui imagé avec le cube RFP. De plus, l'A555 est excité à la fois par le laser 561 nm (Cobolt Jive) avec une puissance moyenne de  $1.8 \text{ kW x cm}^{-2}$  au centre du faisceau d'excitation, mais aussi, par le laser 532 nm ( $3.1 \text{ kW.cm}^{-2}$ ) afin de favoriser son clignotement.

### 3.1.5.3 Acquisition PALM/STORM deux couleurs

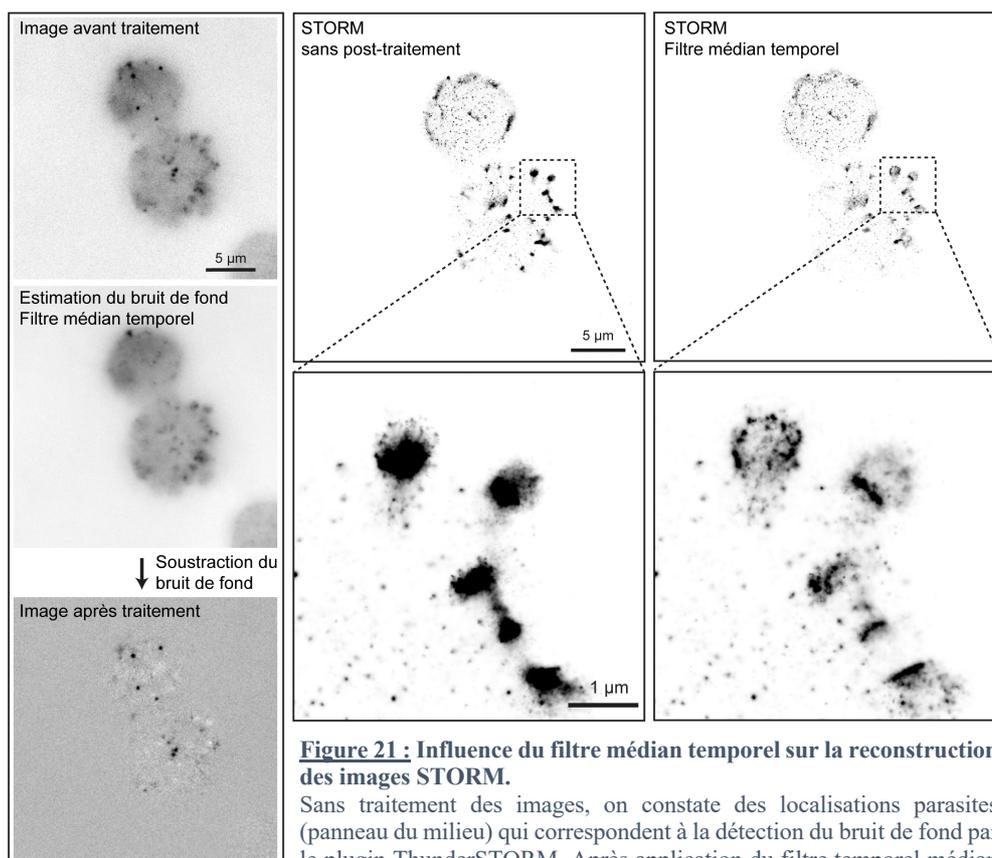
Dans le cadre d'une acquisition deux couleurs PALM/STORM l'opération est sensiblement la même. Le fluorophore A647 et la protéine fluorescente mEos4b sont utilisés en combinaison et imagés séquentiellement. La protéine mEos4b est une protéine fluorescente phototransformable. Elle fluoresce initialement dans le vert et commute vers le rouge lorsqu'elle est illuminée par un rayonnement UV (ex : 405 nm) (Paez Segala et al., 2015). Ainsi, durant l'acquisition PALM, sa fluorescence dans le rouge est collectée, après son excitation simultanée par les lasers 405 nm (qui commute l'absorption de la protéine dans le rouge) et 561 nm (qui excite les protéines commutées).

Le Fluorophore A647 est imagé dans les mêmes conditions que dans le paragraphe précédent en utilisant le cube DENDRA. La protéine mEos4b est quant à elle imagée avec le cube RFP. Elle est illuminée par le laser 561 nm avec une puissance d'excitation moyenne au centre du faisceau de  $0.9 \text{ kW.cm}^{-2}$ . Afin de promouvoir la transition de la protéine de son état vert à l'état rouge, l'échantillon est excité également avec le laser 405 nm à une puissance de  $0.44 \text{ mW.cm}^{-2}$ . Ensuite, 20 000 images sont enregistrées avec un temps d'acquisition de 50 ms, soit 20 Hz. A noter que dans ces conditions, le laser 405 n'est pas utilisé pour repeupler le fluorophore A647 durant son acquisition.

### 3.1.5.4 Traitement des images

De nombreux logiciels sont désormais disponibles pour déterminer avec précision la localisation des fluorophores. Des concours sont même organisés afin de comparer leurs performances en fonction de différents paramètres comme la densité de marquage mais aussi pour l'imagerie en 3 dimensions (3D) (Sage et al., 2015, 2019). Parmi eux, on retrouve le logiciel ThunderSTORM qui a l'avantage d'être développé comme plugin (module d'extension) ImageJ avec une interface conviviale (Ovesný et al., 2014). Ce logiciel offre de bonnes performances en 2D, bien que celles-ci deviennent limitées en 3D (Sage et al., 2019). Pour l'imagerie 3D on privilégiera d'autres logiciels, plus complets comme le logiciel SMAP pour ne citer que lui (Ries, 2020).

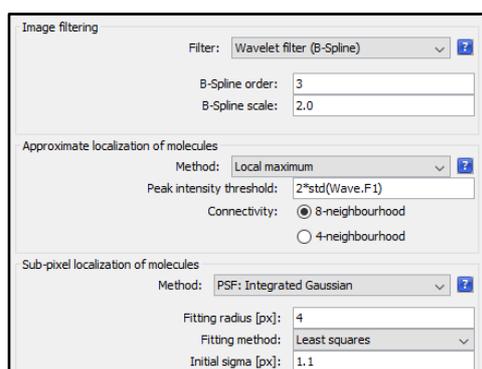
La microscopie STORM requiert de puissants lasers. Malgré une attention particulière portée au protocole expérimental afin de réduire les sources de bruit de fond, celui-ci est toujours présent lors de l'acquisition STORM. Il provient à la fois de l'autofluorescence de la cellule apoptotique, mais aussi de l'excitation WF. Ainsi, avant d'être analysées avec le plugin ThunderSTORM, les images sont donc traitées avec un filtre temporel médian (Hoogendoorn et al., 2014). Ce filtre exploite, sur un intervalle de temps donné, le caractère stable du bruit de fond et la nature stochastique du clignotement des fluorophores afin d'estimer et de soustraire le bruit de fond (Figure 21). Dans nos conditions, le filtre médian temporel a été réalisé sur des blocs de 10 pixels de côté et sur un intervalle de 100 images grâce au plugin ImageJ GDSC SMLM (Tableau 9).



**Figure 21 : Influence du filtre médian temporel sur la reconstruction des images STORM.**

Sans traitement des images, on constate des localisations parasites (panneau du milieu) qui correspondent à la détection du bruit de fond par le plugin ThunderSTORM. Après application du filtre temporel médian ces localisations sont supprimées (panneau de droite).

Une fois traitées, les localisations sont détectées avec le plugin ThunderSTORM selon les paramètres présentés en Figure 22. Ces paramètres sont donnés à titre indicatif et doivent être adaptés en fonction des caractéristiques du microscope et des propriétés des fluorophores choisis.



**Figure 22 : Paramètres de détection des localisations utilisés dans le plugin ThunderSTORM.**

La taille de pixel initial est définie à 1.1 pour l'Alexa Fluor 647, tandis qu'elle est définie sur 0.9 pour l'Alexa Fluor 532, dont la PSF est plus petite.

### 3.1.5.5 Post-traitements des données de localisation

- *Tri des localisations*

Avant la reconstruction de l'image finale, les localisations sont traitées selon différents paramètres. Premièrement la dérive est corrigée. Celle-ci est due en partie aux variations de température et aux vibrations au cours de l'acquisition STORM. Il est donc nécessaire d'estimer et de corriger cette dérive avec précision pour ne pas altérer la résolution de l'image finale. La dérive est estimée de deux façons : grâce aux nanoparticules d'or ou par cross corrélation. Les

nanoparticules d'or servent de point de référence et permettent d'estimer avec précision la dérive de l'échantillon. Cependant, comme dit précédemment, les régions d'intérêt à la surface des cellules apoptotiques sont rarement situées au niveau de la lamelle, où la majeure partie des nanoparticules d'or sédimentent. C'est pourquoi, lorsqu'aucune nanoparticule d'or n'est présente dans le champ d'acquisition, la dérive est corrigée par cross corrélation sur un intervalle de 1000 images (Wang et al., 2014).

Deuxièmement, les localisations correspondant à un même fluorophore sont rassemblées. En effet, bien que les paramètres d'acquisition aient été optimisés, certains fluorophores peuvent apparaître sur plusieurs images et donc être à l'origine de plusieurs localisations. Toujours dans l'objectif d'améliorer la reconstruction de l'image finale, ces localisations sont donc rassemblées en fonction d'un rayon défini. Dans nos conditions, ce rayon est de 120 nm, ce qui représente environ la taille d'un pixel (125.8 nm).

Enfin, les localisations sont filtrées selon la taille de « l'évènement de clignotement ». Cette étape permet d'éliminer les fluorophores éloignés du plan focal. Dans le plugin ThunderSTORM ce paramètre est représenté par la valeur « sigma ». Dans nos conditions, tous les fluorophores avec un sigma 1.5 fois supérieur à la valeur médiane du sigma (environ 130 nm) sont éliminés.

- *Alignement des deux canaux de fluorescence*

Pour l'acquisition deux couleurs, les canaux de fluorescence doivent être alignés. Dans un premier temps, bien que son impact soit atténué par l'utilisation d'un objectif apochromatique, l'aberration chromatique est corrigée. Afin de l'estimer, des microsphères TetraSpeck fluorescentes de 100 nm (Thermofisher, T7279) sont déposées entre deux lamelles en présence de tampon STORM dépourvu de ses enzymes. Ce montage est scellé avec du picodent twinsil et peut être réutilisé. Les billes sont imagées dans la même configuration que celles employées pour l'acquisition STORM. Un film de 100 images est enregistré pour chaque canal de fluorescence. L'aberration chromatique est ensuite estimée grâce au plugin ImageJ DOM (Tableau 9). Elle est ensuite corrigée sur le canal A647. Enfin, l'acquisition séquentielle des deux canaux de fluorescence requiert d'appliquer le déplacement dû à la dérive en x et y du premier canal imagé, au second canal. Cette opération est effectuée à l'aide du plugin ImageJ : ChriSTORM macros and scripts (Tableau 9).

- *Reconstruction de l'image STORM*

Finalement, les données de localisation sont générées sous la forme d'un tableau permettant la reconstruction de l'image finale. Chaque coordonnée est représentée par une fonction gaussienne dont la taille est dépendante de la précision de localisation. La taille de pixel choisi pour l'image finale est 10 fois supérieure à la taille initiale des pixels durant l'acquisition, soit une taille finale d'environ 12,5 nm / pixel.

Fonction	Plugin ImageJ	Références
Filtre temporel médian	GDSC Single Molecule Light Microscopy (SMLM)	<a href="https://github.com/aherbert/gdsc-smlm/">https://github.com/aherbert/gdsc-smlm/</a>
Localisation des fluorophores	ThunderSTORM	<a href="https://github.com/zitmen/thunderstorm">https://github.com/zitmen/thunderstorm</a>
Correction de l'aberration chromatique	DOM (Detection of Molecules)	<a href="https://github.com/ekatrakha/DoM_Utrecht">https://github.com/ekatrakha/DoM_Utrecht</a>
Alignement	ChriSTORM macros and scripts	<a href="https://github.com/cleterrier/ChriSTORM">https://github.com/cleterrier/ChriSTORM</a>

**Tableau 9 :** Liste des différents plugin ImageJ utilisés pour le traitement des données STORM.

### 3.1.5.6 Analyse des données de localisation

La résolution des images obtenues peut être estimée grâce à l'indicateur FRC (Fourier Ring Correlation) utilisé initialement en microscopie électronique (Nieuwenhuizen et al., 2013). Cet indicateur est particulièrement informatif pour comparer l'impact de différents traitements (localisations, post-traitement, dérivation, filtre ...) sur un même jeu de données. Il est calculé à partir du plugin ImageJ NanoJ-SQUIRREL (Culley et al., 2018).

Grâce aux données de localisation obtenues, il est possible de visualiser la distribution des protéines ciblées. Il est également possible de quantifier leur distribution grâce à l'étude de leur clusterisation. Plusieurs méthodes mesurent la clusterisation des protéines et sont basées sur une analyse statistique, bayésienne, graphique ou encore sur analyse de la densité [pour revue (Khater et al., 2020)]. Parmi elles, on retrouve également des approches basées sur la tessellation (pavage de plan), une technique graphique basée sur la construction de cellule de Voronoï autour de chaque localisation. L'aire des cellules de Voronoï est inversement proportionnelle à la densité des molécules. Ainsi, plus la densité est forte, plus la taille des cellules de Voronoï est petite. La clusterisation des molécules est définie en fonction d'un seuil choisi. Dans nos conditions, la clusterisation par tessellation est réalisée avec le logiciel SR-Tesseler (Levet et al., 2015). Le seuil de clusterisation utilisé correspond à une fois la valeur de densité moyenne globale des localisations ( $\delta$ ).

Pour la microscopie deux couleurs, un indicateur clé est la mesure de la colocalisation entre deux protéines. Cette mesure est réalisée encore une fois selon la même méthode de tessellation grâce au logiciel coloc-tesseler (Levet et al., 2019). Le niveau de colocalisation est mesuré par la corrélation de Spearman qui évalue si les densités des deux protéines d'intérêt sont corrélées ou non. La corrélation entre les deux couleurs peut être également visualisée à l'aide d'un graphique en nuage de points, où la densité d'un canal est tracée par rapport à la densité de l'autre canal pour chaque localisation. La densité du canal A ( $\hat{\delta}_i^A$ ) est représenté en abscisse, ainsi que celle du canal B ( $\hat{\delta}_j^B$ ) en ordonnée.

Dans nos conditions, la mesure de la corrélation de Spearman est réalisée sur la cellule entière et sur des zones sélectionnées d'une surface de 2.6  $\mu\text{m}^2$ . Afin de valider les données obtenues par cette approche et selon les recommandations de Levet et collaborateurs (Levet et al., 2019), plusieurs contrôles expérimentaux et théoriques sont réalisés. Le contrôle positif théorique simulant la colocalisation parfaite est généré à partir d'un même jeu de données divisé aléatoirement en deux. Ainsi, les localisations sont triées en fonction de si elles appartiennent à une image paire ou impaire grâce à la fonction  $frame\%2=1$  (nombre paire) ou  $frame\%2=0$  (nombre impaire) du plugin ThunderSTORM. Le contrôle négatif théorique est obtenu en comparant un jeu de données avec sa version symétrique selon l'axe vertical, dont les localisations se superposent aléatoirement. Enfin, un contrôle positif expérimental est effectué en marquant le même anticorps primaire avec deux anticorps secondaires, chacun étant couplé à un fluorophore différent (A647 ou A532). Ce contrôle permet d'intégrer les variations dues au protocole expérimental dans la quantification de la colocalisation. Ainsi l'anticorps anti CRT (IgY de poule, PA1-902A) est révélé à la fois par un anticorps polyclonal de lapin anti IgY de poulet marqué par l'A532 et par un anticorps polyclonal de chèvre anti IgG de souris marqué par l'A647, qui cross-réagit avec les anticorps de poulet.

## 3.2 Microscopie de suivi de molécule unique

### 3.2.1 Principe de la microscopie de suivi de molécule unique

Les techniques de SMLM sont basées sur la séparation temporelle de l'émission de la fluorescence des fluorophores organiques ou des protéines fluorescentes. Ces techniques peuvent être appliquées à l'étude de protéines sur des cellules non fixées, mais elles souffrent de biais lié par exemple, à la mobilité de la cellule qui nécessite dans la plupart des cas son immobilisation par fixation. Néanmoins, une des forces de la microscopie à fluorescence est sa capacité à étudier des systèmes dynamiques et donc en absence de fixation. L'une des approches pour étudier le comportement d'une protéine d'intérêt dans le temps est la technique de suivi de molécule unique (Single Particle Tracking, SPT). Elle permet l'observation et l'extraction d'informations temporelles à l'échelle de la molécule [pour revue (Manzo and Garcia-Parajo, 2015)]. Tout comme la microscopie SMLM, le SPT nécessite la détection de molécules isolées. Plusieurs stratégies sont possibles comme le marquage endogène d'une protéine d'intérêt à faible densité grâce à une sonde fluorescente. D'une part, la spécificité de la sonde est assurée, par exemple, par un anticorps ou ses variants tels qu'un F(ab) (Fragment Antigen Binding) ou un anticorps à domaine unique (nanobody). D'autre part, le marquage fluorescent de la sonde est assuré, par exemple, par un fluorophore organique, un quantum dot ou une particule d'or. Une autre approche est le sptPALM, qui dans la plupart des cas, nécessite la construction et l'expression d'une protéine chimérique fusionnée à une protéine fluorescente photoactivable. L'activation des protéines fluorescentes à faible densité permet, comme pour le PALM, de localiser et de suivre les molécules marquées. Chacune de ces stratégies a ses avantages et ses inconvénients [pour revue (Manzo and Garcia-Parajo, 2015)]. Le SPT utilisant des sondes fluorescentes a l'avantage de détecter les protéines endogènes grâce à l'utilisation d'anticorps ou de ses dérivés. Le couplage avec un fluorophore organique, un quantum dot ou une particule d'or permet de suivre les molécules sur de longue période. Néanmoins, il requiert l'utilisation d'un rapporteur, tel qu'un anticorps, pouvant interférer avec la protéine. De plus, seulement une faible proportion de la population de protéines ciblées est marquée. A l'inverse, durant les expériences de sptPALM utilisant des protéines photoactivables, la longueur des traces n'excède pas la seconde. Bien que cette stratégie requière l'expression d'une protéine génétiquement recombinée, elle offre une très grande spécificité et permet de marquer l'ensemble de la population des protéines d'intérêt.

Durant une acquisition de suivi de molécule unique, les molécules isolées sont imagées, et leur parcours reconstruit (Figure 23a). Brièvement, les localisations proches d'une image à l'autre sont considérées comme appartenant à la même molécule, ce qui permet de reconstituer son mouvement dans le temps et de reconstruire son parcours sous forme de traces. A partir de ces traces, il est possible d'extraire différentes données quantitatives à l'échelle de la molécule [pour revue (Alcor et al., 2009)]. Une des approches les plus communes pour analyser la dynamique d'une molécule consiste à calculer le déplacement quadratique moyen, ou MSD (Mean Square Displacement) (Qian et al., 1991; Saxton, 1997). Le MSD calcule la moyenne du déplacement au carré pour un temps de latence donné, appelé  $t_{lag}$  suivant l'équation suivante :

$$MSD(t_{lag} = m\Delta t) = \frac{1}{N - m} \sum_{i=1}^{N-m} [(x_{(i+m)} - x_i)^2 + (y_{(i+m)} - y_i)^2]$$

Où N correspond au nombre total de détections de la trace,  $\{x_i, y_i\}$  correspond aux coordonnées dans un plan 2D de chaque localisation et  $\Delta t$  correspond au plus petit intervalle de temps.

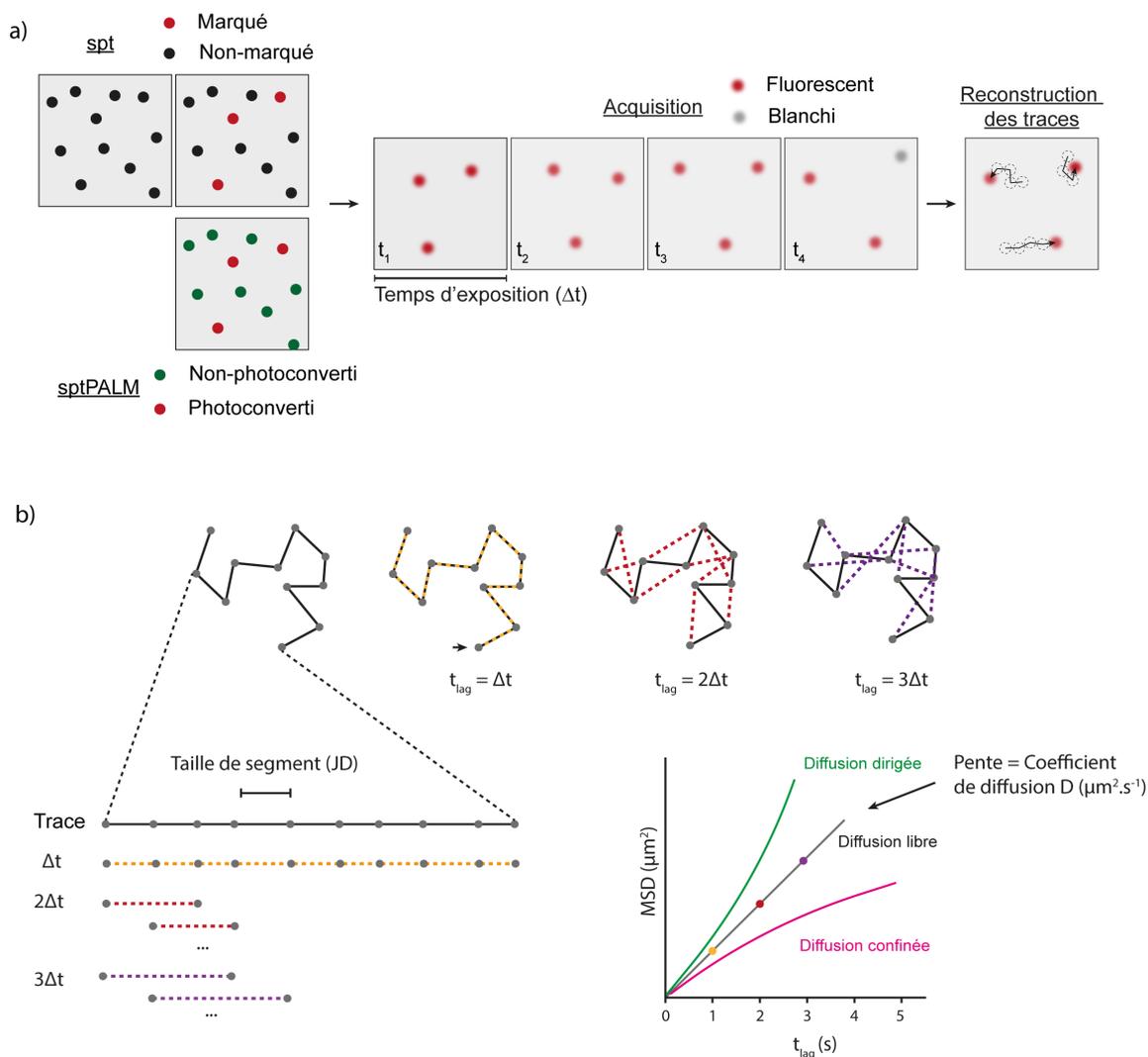
Le type de diffusion d'une molécule peut être estimé grâce à la représentation du MSD en fonction de  $t_{lag}$  sous la forme d'une courbe (Figure 23b). Pour une molécule dont la diffusion suit un mouvement Brownien, la relation entre MSD et  $t_{lag}$  est linéaire et peut être décrite selon l'équation suivante :

$$MSD(t_{lag}) = 2dDt_{lag}$$

Où  $d$  correspond au nombre de dimensions et  $D$  au coefficient de diffusion.

Ainsi, à partir de l'ajustement de la courbe MSD vs  $t_{lag}$  il est possible d'extraire le coefficient de diffusion ( $D$ ) qui correspond à la pente. Néanmoins, dans le cas d'un mouvement non Brownien (ex : diffusion dirigée ou confinement), la courbe des MSD vs  $t_{lag}$ , n'est plus linéaire (Figure 23b). Dans ce cas-ci, la diffusion peut être décrite selon d'autres équations [pour revue (Saxton and Jacobson, 1997)]. A noter que si l'on représente la courbe du MSD pour différents  $t_{lag}$  pour une seule particule dont le mouvement est Brownien, la relation entre MSD et  $t_{lag}$  est aussi non linéaire (Saxton, 1993). Néanmoins, il est possible de retrouver cette relation linéaire en moyennant un grand nombre de courbes représentant le MSD vs  $t_{lag}$  provenant de plusieurs particules dont le mouvement est semblable. Cette opération nécessite de moyennner des populations dont la diffusion est similaire et requiert donc l'identification des différentes sous populations et des différents régimes de diffusion. A l'échelle d'une molécule, même si le type de diffusion est inconnu, il est possible d'estimer le coefficient de diffusion en supposant que le mouvement de la molécule est Brownien. L'estimation du coefficient de diffusion dépend de deux paramètres : de l'intervalle utilisé pour ajuster la courbe et de la longueur de la trace (Saxton, 1997). En effet la courbe représentant le MSD vs  $t_{lag}$  est linéaire seulement pour des valeurs faibles de  $t_{lag}$ , c'est pourquoi le coefficient de diffusion est calculé sur un nombre limité de  $t_{lag}$ . De plus, plus la longueur de la trace est courte, plus l'erreur relative du calcul est grande due au faible nombre de localisations pris en compte, ce qui augmente l'incertitude de la mesure du coefficient de diffusion. A partir de la distribution des coefficients de diffusion mesuré pour chaque trace, il est possible de discriminer plusieurs populations et d'en estimer le coefficient de diffusion moyen. A noter qu'il est également possible de déterminer le coefficient de diffusion d'une population de molécules à partir de la distribution de la taille des segments (Jump Distance, JD), qui définit la distance parcourue par une molécule pendant un intervalle de temps fixé, généralement le temps d'exposition ( $\Delta t$ ) (Somleitner et al., 1999).

La qualité de l'expérience de SPT dépend de plusieurs critères. Premièrement, elle dépend de la précision de localisation. Comme pour la microscopie SMLM, celle-ci est dépendante du niveau du signal par rapport au bruit de fond. Deuxièmement, elle dépend de la densité de marquage. Celle-ci doit être suffisamment basse pour détecter les molécules de façon isolée et déterminer avec précision leur localisation. Par ailleurs plus la densité sera faible, plus il sera facile pour le logiciel de reconstruire les traces des différentes molécules tout en limitant le risque d'erreurs de connexion entre différentes molécules. Troisièmement, elle dépend du temps d'acquisition. Plus celui-ci est rapide, plus il est possible d'extraire de l'information quant à la dynamique des protéines d'intérêt. A l'inverse, si le temps d'acquisition est trop lent par rapport à la diffusion des molécules observées, cela causera l'observation de molécules dont la PSF est flou, ce qui diminue la précision de localisation. Enfin, elle dépend de la longueur des traces. Plus une trace sera longue, plus le calcul du MSD incorporera de données ce qui augmentera sa précision. De plus, de longues traces augmentent la probabilité d'observer des changements de régime.



**Figure 23 : Principe de la microscopie de suivi de molécule unique.**

(a) La protéine cible est détectée grâce à une sonde fluorescente (spt) ou une protéine fluorescente (sptPALM). Durant l'acquisition, les molécules isolées diffusant sont détectées. Leurs parcours sous forme de traces sont reconstruits. (b) Le déplacement quadratique moyen (MSD) pour différents  $t_{lag}$  peut être calculé et représenté sous forme de courbe. Grâce à l'analyse de cette courbe il est possible d'identifier le régime de diffusion (dirigée, libre ou confinée) et d'extraire ensuite le coefficient de diffusion ( $D$ ) après ajustement de la courbe [inspiré de (Ruthardt et al., 2011)].

### 3.2.2 Préparation de l'échantillon pour la microscopie de suivi de molécule unique

La préparation des cellules HeLa pour les expériences de suivi de molécule unique est similaire à la microscopie STORM, à la différence que les lamelles compartimentées utilisées sont des Lab-Tek™ Chambered Coverglass 8-well (Thermofisher, 155411, référence #1) et qu'elles ne sont pas recouvertes de Poly-D-lysine Hydrobromide. Cette étape est omise afin de limiter la fixation non spécifique des anticorps à la surface du verre. Bien que minime, cela causerait la détection d'un faux positif immobile de la protéine CD47. Ensuite, toutes les étapes sont réalisées à 37°C et en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Le lendemain, après ensemencement, les cellules sont lavées délicatement avec du DMEM FluoroBrite non supplémenté en sérum (Thermofisher, A1896701). Ce milieu de culture est particulièrement adapté à l'observation de cellules par microscopie car son niveau d'auto fluorescence est faible. Les cellules sont ensuite traitées selon différentes conditions. Elles sont incubées ou non avec du M $\beta$ CD (10 mM) pendant 15 min ou bien avec de la Cytochalasine D (CytD, 5  $\mu$ M) ou du Mn<sup>2+</sup> (1 mM) (Tableau 10). A noter que les cellules contrôles (non traitées) sont incubées avec la même quantité de

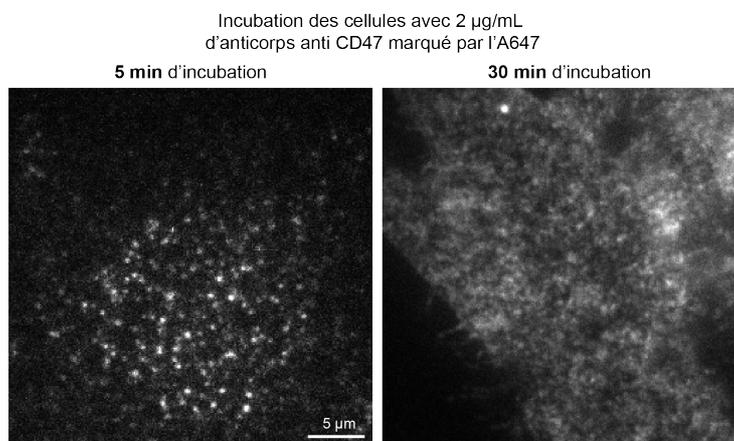
PBS ou de DMSO, ajoutés respectivement lors des traitements avec du M $\beta$ CD et de la CytD. Les cellules sont également rendues apoptotiques dans la lamelle compartimentée par irradiation aux UVB selon les conditions énoncées précédemment (paragraphe II.2.2).

Dans le cas des cellules JurkaT, leur préparation diffère des cellules HeLa. Contrairement aux cellules HeLa qui sont des cellules adhérentes, les cellules JurkaT sont des cellules cultivées en suspension. Afin d'induire leur adhérence, les cellules sont incubées le jour même dans du milieu sans sérum. Pour cela, elles sont centrifugées et lavées deux fois avec du DMEM FluoroBrite. Elles sont ensuite re-suspendues dans du milieu DMEM FluoroBrite sans sérum, et transférées dans les puits de la Lab-Tek™ à raison de 150 000 cellules / puits. Après 30 min d'incubation à 37°C, les cellules ont adhéré à la lamelle. Elles sont ensuite traitées de la même façon que les cellules HeLa pour réaliser les expériences de SPT.

Traitement	Solution stock
10 mM M $\beta$ CD dilué en DMEM Fluo	37 mM M $\beta$ CD (Santa Cruz, sc-215379) dilué en PBS stérile pH 7,4. Filtré et conservé à 4°C pendant 2 semaines
5 $\mu$ M CytD diluée en DMEM Fluo	2 mM CytD (Sigma, C8273) diluée en DMSO Conservée -20°C pendant 2 ans
1 mM Mn <sup>2+</sup> dilué en DMEM Fluo	410 mM MnCl <sub>2</sub> (Sigma, M3634) dilué en dH <sub>2</sub> O Filtré et conservé à 4°C

**Tableau 10 :** Liste des différentes solutions utilisées pour traiter les cellules HeLa.

Après traitement, les cellules sont lavées et incubées avec l'anticorps de souris anti CD47 couplé au fluorophore A647, clone B6H12 (Santa Cruz, sc-12730 AF647). Comme mentionné précédemment, la technique de suivi de molécule unique requiert que chaque molécule fluorescente soit isolée pour pouvoir être détectée avec précision. Ainsi, la concentration et le temps d'incubation sont deux paramètres clés qui influencent la densité de marquage. Dans nos conditions, l'anticorps anti CD47 est utilisé à 2  $\mu$ g/mL dans du DMEM FluoroBrite et incubé pendant 5 min. Cela permet l'obtention d'une densité de marquage adéquate comparativement à une incubation de 30 min, où la densité de marquage est trop élevée pour pouvoir détecter des molécules isolées (Figure 24). Dans certaines conditions, après incubation avec l'anticorps anti CD47, les cellules sont fixées 10 min à 37°C avec 4% de formaldéhyde ou avec 3% de formaldéhyde et 0,1% glutaraldéhyde en PBS, pH 7,4. Les cellules sont lavées et sont ensuite incubées ou non avec 0,05% saponine (Sigma, S-4521) diluée en PBS, BSA 3% pendant 1h à 37°C.



**Figure 24 :** Influence du temps d'incubation sur la densité de marquage de la protéine CD47.

L'incubation des cellules HeLa pendant 5 min avec 2  $\mu$ g/mL d'anticorps anti CD47 marqué par l'A647 permet de distinguer individuellement chaque molécule fluorescente. Cela devient impossible lorsque le temps d'incubation est rallongé à 30 min.

Les cellules sont ensuite lavées délicatement et sont recouvertes de DMEM FluoroBrite supplémenté avec 0.1 mg/mL de glucose oxydase et 8 µg/mL de catalase à partir de la solution utilisée pour le tampon STORM (Tableau 8). L'utilisation de ces enzymes réduit la concentration d'oxygène dissous dans le milieu. Une condition favorable à l'inhibition du blanchiment du fluorophore A647 et donc à son suivi sur une plus longue durée (Vogelsang et al., 2008). Par ailleurs, les puits sont scellés avec une lamelle de verre et du picodent twinsil.

En plus des traitements énoncés précédemment (Tableau 9), les cellules sont incubées en présence d'EDTA. Cette molécule chélate les ions divalent  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  nécessaires à la fixation des intégrines à leurs ligands. En présence EDTA, les intégrines sont ainsi inactivées. L'action de l'EDTA sur l'adhérence des cellules est rapide, de l'ordre 10 min. Pour minimiser le détachement des cellules durant l'étude, elles sont donc directement imagées dans une solution de 0,48 mM EDTA dilué en PBS, pH 7,4 à 37°C (ThermoFisher, 15040066), supplémentée avec 4.5 g/L de D-glucose pour permettre l'activité de la glucose oxydase.

### 3.2.3 Acquisition des données pour la microscopie de suivi de molécule unique une couleur

L'acquisition SPT est réalisée sur la même installation utilisée pour l'imagerie PALM et STORM (Paragraphe II.3.1.5.1). Durant l'acquisition, la température du microscope est maintenue à 37°C. La bague de correction de l'objectif est modifiée pour adapter l'objectif à l'épaisseur de la lamelle et à la température utilisée pour l'acquisition. L'autofocus est activé et une image en microscopie à fond clair (bright-field) de la cellule est capturée. Pour l'acquisition une couleur, les cellules sont illuminées par une excitation TIRF afin de limiter le bruit de fond et d'augmenter le rapport du signal sur bruit. Le cube DENDRA est utilisé pour l'excitation du fluorophore A647 par le laser 642 nm (Toptica Photonics). La puissance d'excitation moyenne au centre du faisceau est d'environ 13 W.cm<sup>-2</sup>. Enfin, entre 2000 à 4000 images sont enregistrées avec un temps d'acquisition de 30 ms, soit à une fréquence de 33 Hz.

### 3.2.4 Acquisition des données pour la microscopie de suivi de molécule unique deux couleurs

#### 3.2.4.1 Préparation de la solution de TopFluor PS

La molécule TopFluor PS (Avanti, 810283C-1MG) est un lipide synthétique fluorescent analogue de la PS. Ce lipide est stocké en chloroforme à -20°C, sous azote, dans des fioles de verre borosilicate scellées avec du téflon (Biacore, BR100209) ou alternativement dans des fioles conçues pour le stockage des lipides en chloroforme (Avanti, 600511). La molécule TopFluor PS diluée en chloroforme est transférée dans un tube de verre borosilicaté de 4 mL (Biacore, BR100209) et est séchée sous un jet d'azote. Un fois le chloroforme évaporé, le TopFluor PS est re-suspendu avec du PBS, BSA 3% stérile à une concentration finale de 10 µM. La solution est ensuite mélangée énergiquement avec un vortex pendant 5 min et traitée aux ultrasons pendant 30 min. La solution obtenue de teinte vert clair peut être stockée pendant 2 semaines à 4°C.

### 3.2.4.2 Marquage des cellules

Deux types de marquage sont réalisés en combinaison au marquage de faible densité de la protéine CD47. D'une part, la chaîne  $\beta 1$  des intégrines et le TopFluor PS sont imagés à haute densité. Cela empêche la détection de molécule unique, mais permet de comparer la mobilité de CD47 vis-à-vis des structures membranaires composées par les intégrines exprimant la chaîne  $\beta 1$  et le TopFluor PS. Dans ce cas, les cellules sont incubées pendant 15 min avec une solution de 10  $\mu\text{M}$  de TopFluor PS diluée en PBS, BSA 3% comme décrit par Kay et collaborateurs (Kay et al., 2012), ou bien avec une solution contenant 2  $\mu\text{g/mL}$  de l'anticorps 12G10 anti intégrine  $\beta 1$  marqué par l'Alexa Fluor A488 (Santa Cruz, sc-59827 AF488) en DMEM FluoroBrite. D'autre part, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est imagée à faible densité. Cette stratégie permet de comparer la mobilité de la protéine CD47 vis-à-vis de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Les cellules sont alors incubées pendant 30 min avec une solution contenant 1.25  $\mu\text{g/mL}$  d'anticorps de souris anti intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , marqués par la phycoérythrine (PE) (BD Biosciences, 50037) dilués en DMEM FluoroBrite.

### 3.2.4.3 Acquisition deux couleurs

Une première image TIRF de la fluorescence de l'anticorps anti intégrine  $\beta 1$  marquée par le fluorophore A488 ou de la fluorescence du TopFluor PS est acquise. Ils sont excités avec le laser 488 (Oxxius) grâce au cube GFP, composé du filtre dichroïque ZT488rdc (Chroma) et du filtre d'émission BrightLine FF01-525/45-25 (Semrock). Ensuite, la fluorescence de la protéine CD47 détectée par l'anticorps anti CD47 marqué par l'A647 est acquise dans les mêmes conditions que décrites précédemment (Paragraphe II.3.2.3).

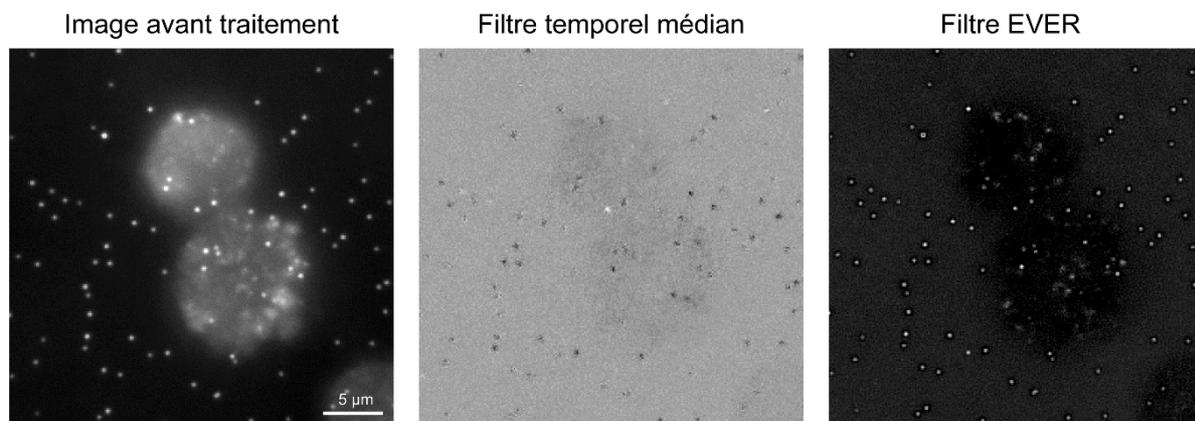
Pour l'acquisition deux couleurs de la protéine CD47 et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , la configuration du microscope est similaire, à la différence que l'échantillon est illuminé simultanément par les lasers 532 nm et 642 nm sur le cube DENDRA. La puissance d'excitation moyenne au centre du faisceau du laser 532 nm est d'environ 2.4  $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Le miroir dichroïque FF640-FDi02-t3-25\*36 (Semrock) est placé dans le module de détection afin de séparer la fluorescence émise par chaque fluorophore sur deux caméras EMCCD (Photometrics). A noter que dans nos conditions, bien que très brillant, le fluorophore PE a tendance à clignoter, ce qui diminue la longueur des traces reconstruites après analyse.

## 3.2.5 Détection et reconstruction des traces

### 3.2.5.1 Traitement des images et extraction des données de localisation

Tout comme pour la microscopie STORM, même si l'ensemble du protocole est optimisé pour limiter la présence du bruit de fond, celui-ci reste présent. Afin qu'il n'interfère pas dans l'analyse, les images sont filtrées. Contrairement, à la microscopie STORM, le filtre temporel médian est inadapté à la technique de suivi de molécule unique. En effet, son action supprimerait les fluorophores immobiles pouvant correspondre à l'immobilisation de la protéine marquée. C'est pourquoi le plugin EVER (Enhanced super-resolution microscopy by extreme Value based Emitter Recovery) ImageJ est utilisé (Ma et al., 2021). Ce plugin permet d'éliminer le bruit de fond diffus sans supprimer les signaux (PSF) immobiles (Figure 25).

Ensuite, les mêmes paramètres de détection que ceux utilisés pour la microscopie STORM (Figure 22) sont appliqués pour la détection des molécules uniques, à l'exception du seuil de détection réglé sur  $1.5 \cdot \text{std}$  (Wave.F1) (c.a.d. 1.5 fois l'écart type du premier niveau « wavelet » appliqué par l'algorithme ThunderSTROM).



**Figure 25 :** Comparaison de l'impact du filtre médian temporel et du filtre EVER sur la suppression du bruit de fond. Une séquence de 100 images a été traitée par le filtre temporel médian ou le filtre EVER. Cette séquence d'images provient de la superposition d'une séquence d'images de billes immobiles avec une séquence d'images correspondant au bruit de fond d'une acquisition STORM. La fluorescence des billes ainsi que le bruit de fond sont éliminés avec le filtre médian temporel, alors que seul le bruit de fond est éliminé avec le filtre EVER.

### 3.2.5.2 Reconstruction des traces

Les données de localisation sont ensuite traitées avec le logiciel SWIFT (Wimmi et al., 2021) dont la fonction est de reconstruire le parcours des molécules uniques, appelé trace. Ce logiciel est développé par Marc Endesfelder, Christoph Schielbl, Tosca Lechner, Bartosz Turkowyd et Ulrike Endesfelder dans l'optique d'améliorer la reconstruction des traces lorsque la densité de molécules est élevée [décrit dans (Wimmi et al., 2021)]. Ce logiciel incorpore différentes informations pour reconstruire les traces des molécules à partir de leurs données de localisation comme : le niveau du signal sur bruit ( $\text{exp\_noise\_rate}$ ), la précision de localisation en xy ( $\text{precision}$ ), la durée de vie moyenne de la fluorescence ( $\text{p\_bleach}$ ), la longueur estimée du déplacement d'une molécule entre chaque acquisition ( $\text{exp\_displacement}$ ), la probabilité pour une particule de changer de régime de diffusion ( $\text{p\_switch}$ ). La probabilité de chaque régime de diffusion (diffusion libre, diffusion dirigée, mouvement dirigé et immobile) peut être également spécifiée. Dans nos conditions les paramètres suivants sont utilisés :  $\text{p\_bleach} = 0.2$  ;  $\text{exp\_noise\_rate} = 10\%$  ;  $\text{ex\_displacement} = 200 \text{ nm}$  ;  $\text{p\_switch} = 0.001$ ,  $\text{precision} = 25 \text{ nm}$  et la probabilité de la diffusion libre est deux fois supérieure à la probabilité des autres régimes de diffusion. Ces paramètres servent de guide au logiciel mais ne sont pas appliqués de façon stricte par celui-ci.

Ensuite, les traces d'une longueur s'étalant sur moins de 10 images sont filtrées. La distance moyenne de déplacement (Mean Jump Distance, MJD) d'une molécule entre deux images consécutives est calculée pour chaque trace. Il est également possible d'estimer le coefficient de diffusion selon un modèle de diffusion libre sur un intervalle  $t_{\text{lag}}$  donné. Dans notre cas, l'intervalle maximum est fixé à  $t_{\text{lag}} = 4\Delta t$ . Les données sont ensuite exportées dans prisme GraphPad version 8. La distribution de la fréquence des MJD est calculée et permet de distinguer deux populations : une population de faible et de haute mobilité (low and high mobility). La distribution selon deux Gaussiennes des MJD est ajustée. L'amplitude, la

moyenne et l'écart-type (Standard déviation, SD) de chaque Gaussienne sont extraits et l'aire sous la courbe est calculée pour chaque population selon la formule suivante :

$$A_{\text{aire sous la courbe}} = \text{Amplitude} \times \text{SD} \times \sqrt{2\pi}.$$

Finalemment, la proportion de la population de MJD de haute mobilité est calculée selon la formule suivante :

$$P_{(\text{population haute mobilité})} = \frac{A_{\text{haute mobilité}}}{A_{\text{haute mobilité}} + A_{\text{faible mobilité}}}$$

### 3.2.6 Simulation des expériences de microscopie de suivi de molécule unique

Afin de conforter les performances du logiciel de détection utilisés (SWIFT) pour la reconstruction des traces, des données de microscopie de suivi de molécule unique sont simulées. Cette approche permet également de confronter les données expérimentales avec des données simulées afin d'identifier différents biais potentiels liés à l'acquisition et à l'analyse des données.

Les données de simulation sont obtenues à partir d'une application MATLAB développée dans le groupe I2SR par Dominique Bourgeois (IBS, Grenoble). Ce logiciel permet dans la théorie de simuler un microscope de fluorescence à champ large virtuel, en spécifiant différents attributs d'un microscope tel que les caractéristiques de l'objectif et d'échantillons, les paramètres d'acquisition et d'illumination. Il permet également de simuler n'importe quelles molécules fluorescentes à partir de ses paramètres photophysiques, qu'il faut au préalable renseigner.

Un jeu de données se rapprochant des données expérimentales est simulé. Il inclut deux populations comportant chacune 100 molécules disposées aléatoirement dans un espace à 2 dimensions de 256 x 256 pixels soit une densité de  $3.05 \times 10^{-3}$  molécule / pixel. Ces deux populations simulées suivent une loi de diffusion Brownienne, mais elles se distinguent par leur coefficient de diffusion :  $0.12 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  et  $0.30 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ . Ces coefficients de diffusion ont été choisis car proches de la diffusion de la protéine CD47 estimée à partir des données expérimentales observées à la surface des cellules viables HeLa. La fluorescence des molécules simulées est stable et ne blanchie pas. Par ailleurs, les molécules ne sont pas contraintes au champ d'observation et peuvent diffuser en dehors de celui-ci. Le temps d'exposition est réglé à 30 ms et 4000 images sont simulées.

## 4 Observation par microscopie de fluorescence confocale

### 4.1 Marquage des cellules par immunofluorescence

Les expériences d'immunofluorescence pour la microscopie de fluorescence confocale sont réalisées sur cellules fixées, en suivant le même protocole que celui utilisé pour les expériences de microscopie STORM (paragraphe II.3.1.4), à l'exception qu'il n'y a pas de pause entre chaque lavage durant l'incubation des anticorps primaire et secondaire.

Pour détecter le ganglioside GM1 et la protéine CD47, les cellules fixées non irradiées et apoptotiques sont incubées avec la sous unité B de la choléra toxine (CTB) marquée par le fluorophore CF568 (Biotium, 00071) diluée à 5 µg/mL ainsi que l'anticorps anti CD47 (Clone B6H12) de souris marqué par le fluorophore A647 (Santa cruz, sc-12730 AF647) dilué à 2 µg/mL dans du PBS, BSA 3%.

Des anticorps polyclonaux de lapin sont utilisés pour détecter les chaînes  $\beta 1$  (Thermofisher, PA-29606) et  $\beta 3$  (Sigma, AB2984) des intégrines, dilués respectivement à 8.4 µg/mL et 10 µg/mL en PBS, BSA 3%. Ils sont ensuite révélés par des anticorps anti-lapin polyclonaux produits chez l'âne marqués avec le fluorophore FluoProbes 647H (Interchim, FP-SC5110) et dilués à 10 µg/mL en PBS, BSA 3%. Lors du marquage des intégrines, la molécule CD47 est détecté par l'anticorps anti CD47 (Clone B6H12) de souris non marqué (Santa cruz, sc-12730) dilué à 2 µg/mL dans du PBS, BSA 3%. Puis, révélé par les fragments F(ab')<sub>2</sub> dérivés d'anticorps polyconaux de chèvre dirigés contre les IgG de souris marqués par le fluorophore A488 (Thermofisher, A-11017) dilués à 10 µg/mL en PBS, BSA 3%. A noter que pour la détection des intégrines, la lamelle est recouverte avec de la vitronectine recombinante tronquée (Thermofisher, A14700) avant l'ajout des cellules, afin de favoriser la formation de zones d'adhérence. La lamelle est incubée pendant 1h à température ambiante, avec une solution de vitronectine recombinante tronquée, diluée à 5 µg/mL en PBS.

Les cellules sont ensuite recouvertes du milieu de montage Fluoromount G avec DAPI (SouthernBiotech, 0100-20) et sont imagées sur un microscope confocal spinning disk équipé d'un objectif x100 et d'un platine piézo (plateforme M4D, IBS). Cette platine permet de collecter la fluorescence (excitation 488 nm, 561 nm et 640 nm) et le DIC (Differential Interference Contrast) selon différents plans de la cellule afin d'obtenir une représentation en 3D de celle-ci. Seul le plan correspondant au contact de la cellule avec la lamelle est utilisé pour réaliser les différentes figures.

## 4.2 Mise en place d'un modèle artificiel de phagocytose

Afin de pouvoir étudier la contribution exclusive d'une protéine ou d'un lipide impliqué dans la reconnaissance des cellules apoptotiques sur le processus de phagocytose, un modèle artificiel de phagocytose a été mis en place. Ce modèle repose sur l'utilisation de billes de silice de 5 µm de diamètre (Bang laboratories, ssd5003) comme support artificiel pour des protéines ou une bicouche lipidique (Joffe et al., 2020). Nous avons utilisé ce modèle pour caractériser la reconnaissance de la protéine C1q par le récepteur SR-F1 et son influence sur le processus de phagocytose par les macrophages THP-1. A noter qu'une approche similaire a été utilisée pour étudier l'impact de la fluidité de la PS sur sa reconnaissance et l'initiation de la phagocytose par les macrophages J774 (Figure 5e, manuscrit CD47).

### 4.2.1 Marquage de la protéine C1q par couplage amine

La protéine C1q plasmatique est purifiée au sein du laboratoire IRPAS à partir d'un mélange de plusieurs sérums humains selon la méthode établie par Arlaud et ses collaborateurs (Arlaud et al., 1979). Après décongélation, la protéine C1q est dialysée dans un tampon HEPES (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, Ca<sup>2+</sup> 2mM, pH 7.4). Afin d'étudier la fixation de la protéine C1q, celle-ci est marquée de manière covalente par un couplage amine avec l'Alexa Fluor 647 NHS Ester (ThermoFisher, A20173) en suivant les instructions du fabricant. Brièvement, 600 µg de C1q dans du tampon HEPES (750 µg/mL) sont incubés avec 10 µL d'Alexa Fluor 647 NHS Ester (10 mg/mL, tampon HEPES) pendant 1h à température ambiante, sous agitation et protégés de la lumière. Ensuite, afin de séparer les fluorophores libres de ceux qui ont réagi avec la protéine, la solution est dialysée 5 fois avec 500 mL de tampon HEPES. Finalement, la solution de protéine marquée est centrifugée pour éliminer les protéines précipitées (10 000g, 20 min, à 4°C). Le surnageant est récupéré. La concentration finale protéique et le nombre de fluorophores par protéine sont déterminés à partir de la mesure de l'absorbance à 280 nm, 320 nm et 650 nm, selon les instructions du fabricant. Dans ces conditions, on obtient environ 4 fluorophores A647 pour une molécule de C1q. La protéine C1q ainsi marquée est appelée C1qA647. A noter que plus le nombre de fluorophores associés à la protéine C1qA647 est grand, plus la protéine C1qA647 aura tendance à précipiter.

### 4.2.2 Préparation des billes - C1qA647

Les billes de silice d'un diamètre de 5 µm (Bang laboratories, ssd5003) sous de forme de poudre (1g correspond à 8.528 x 10<sup>9</sup> billes) sont préalablement diluées dans du PBS stérile (tampon d'absorption) à une concentration de 20 mg/mL dans un tube eppendorf « low binding » (Eppendorf, 0030108051). Ensuite, 2.34 mg de billes de silice sont dilués avec 117 µL du tampon d'absorption. La solution de billes en suspension est ensuite diluée au demi en présence de 14 µg de C1qA647. L'absorption s'effectue pendant 1h à température ambiante puis toute la nuit à 4°C sous agitation afin que les billes ne sédimentent pas. Le lendemain, les billes sont collectées par centrifugation à 2400 g pendant 5 minutes et re-suspendues dans du tampon d'absorption à 10 mg/mL. Cette étape est répétée 3 fois afin d'éliminer toutes les protéines de C1qA647 libres. La couleur cyan du culot de billes témoigne de l'absorption de la protéine C1q marquée avec l'Alexa Fluor 647. Après la dernière centrifugation, les billes sont re-suspendues dans une solution 0.05% de BSA en PBS, pH 7.4 et stockées à 4°C. La concentration finale des billes est estimée sur lame Malassez. Ces billes seront appelées « billes - C1qA647 ».

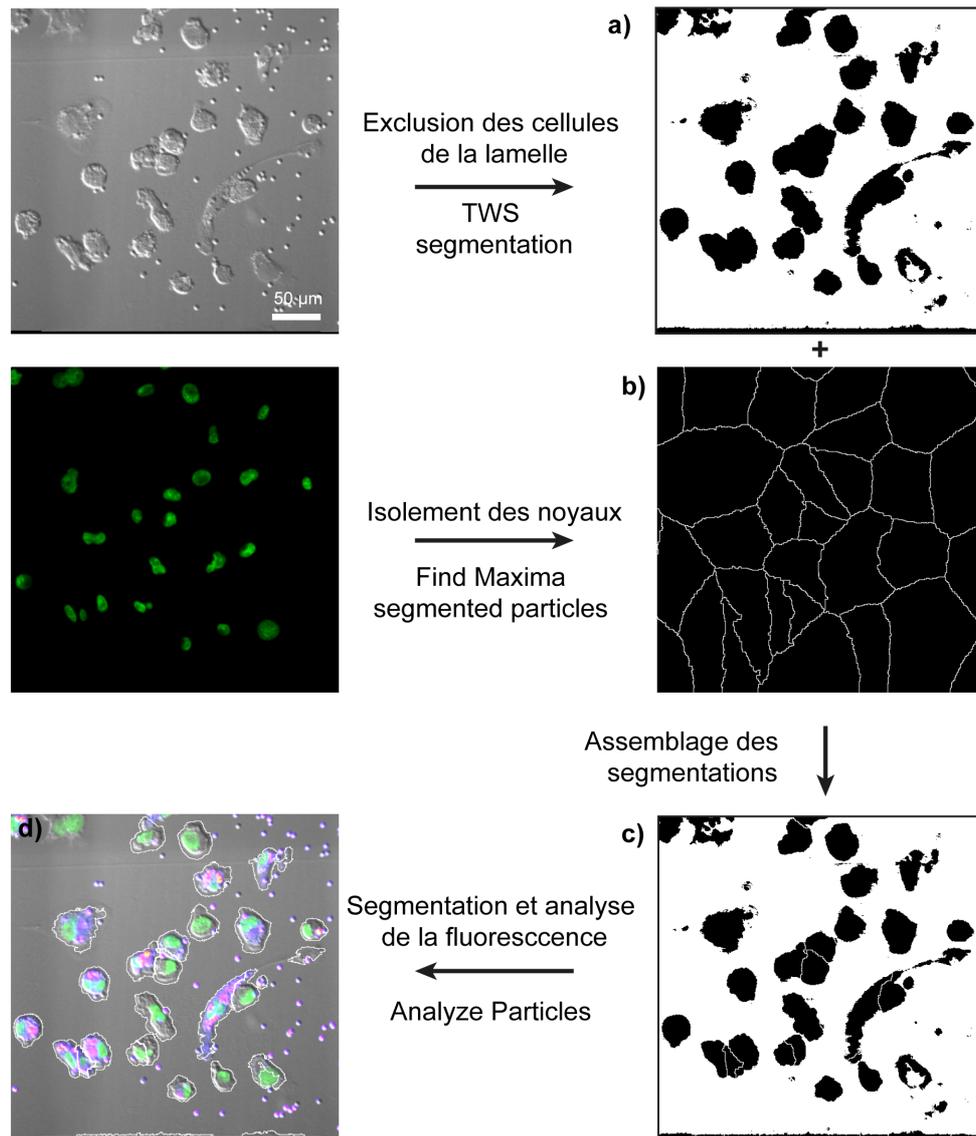
#### 4.2.3 Phagocytose des billes - C1qA647 par les macrophages THP-1

La phagocytose des billes C1qA647 par les macrophages différenciés THP-1 MOCK et SR-F1 est réalisée en lamelle compartimentée 4 puits millicell (Sigma, PEZGS0416). Les lamelles sont préalablement traitées aux UV (Ozone cleaning system, UVOCS®) pendant 20 minutes. Les monocytes THP-1 sontensemencés à raison de 40 000 cellules par puit dans 1 mL de milieu RPMI complet contenant 10 nM de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate). Après 48h de différenciation, les macrophages THP-1 adhérents, sont lavés avec du RPMI sans sérum et sont incubés avec les billes C1qA647 à raison de 5 billes par macrophage en milieu sans sérum. Après 1h d'incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS à 37°C et fixées avec une solution 4% formaldéhyde en PBS (pH 7.4), 10 min à 37°C. Après un dernier lavage en PBS, le montage entre lame et lamelle s'effectue en Fluoromount G avec DAPI (SouthernBiotech, 0100-20).

#### 4.2.4 Quantification de la phagocytose des billes - C1qA647 par microscopie de fluorescence

Les macrophages sont ensuite observés sur un microscope confocal spinning disk équipé d'un platine piézo (plateforme M4D, IBS). Des images champ (objectif x20) de la fluorescence (excitation 405 nm et 640 nm) et DIC sont obtenues à partir de l'acquisition selon une grille quadratique de cinq images de côté, avec 20 % de chevauchement. L'image globale, est reconstruite avec le plugin Grid/Collection stitching Image J (Preibisch et al., 2009).

Les macrophages sont ensuite segmentés selon la procédure décrite [Figure 26](#) afin d'extraire la fluorescence individuelle de chaque cellule. Cette procédure permet de quantifier le contact macrophage-billes et l'internalisation des billes C1qA647 par les macrophages. Dans un premier temps, les macrophages sont segmentés sur la base de l'image DIC grâce au plugin ImageJ TWS (Trainable Weka Segmentation) (Arganda-Carreras et al., 2017). Ce plugin intègre des algorithmes de « machine learning » dans le but d'entraîner le logiciel à segmenter des images complexes à partir d'exemples segmentés manuellement. Dans nos conditions, TWS est particulièrement efficace pour distinguer les macrophages de la lamelle ([Figure 26a](#)). Cependant, ses capacités sont restreintes pour délimiter plusieurs macrophages en contact. C'est pourquoi, l'image est ensuite segmentée à partir de la fluorescence des noyaux du macrophage. La fonction « find maxima » du logiciel ImageJ est utilisée pour détecter chaque noyau. Ils sont ensuite isolés les uns des autres grâce à la fonction « segmented particules » ([Figure 26b](#)). Ce traitement vise à délimiter les macrophages en contact. L'image obtenue est ensuite combinée à l'image filtrée par le plugin TWS ([Figure 26c](#)) pour aboutir à la segmentation isolée de chaque macrophage ([Figure 26d](#)). La fluorescence moyenne provenant des billes en contact ou phagocytées par le macrophage est finalement quantifiée grâce à la fonction « analyze particles » du logiciel ImageJ.



**Figure 26 : Procédure de segmentation des macrophages et quantification de la phagocytose des billes – C1qA647.** (a) Premièrement les cellules sont segmentées sur la base de l'image DIC. (b) L'image est ensuite segmentée à partir de la fluorescence des noyaux. (c) Les deux images obtenues sont ensuite combinées en une seule image. (d) A partir de celle-ci, les cellules sont segmentées et la fluorescence moyenne provenant des billes est quantifiée. La dénomination des plugin ImageJ utilisés pour chaque étape est spécifiée en dessous de chaque flèche horizontale.

CHAPITRE

# III

## Résultats

### 1 Etude de la distribution de la PS, de la CRT et de CD47 à la surface des cellules en apoptose

#### 1.1 Contexte

Au cours de l'efférocytose, la reconnaissance des cellules apoptotiques est conditionnée par l'exposition des signaux "eat-me". Ces signaux sont reconnus par les récepteurs exprimés par le phagocyte et lui permettent de faire la différence entre une cellule viable et une cellule apoptotique. Par ailleurs, les cellules viables exposent également des signaux "don't eat-me" dont la fonction est d'inhiber la phagocytose, et de prévenir ainsi leur élimination. Durant l'apoptose l'équilibre de ces différents signaux que sont les "eat-me" et les "don't eat-me" est modifié afin de favoriser la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques. Cela se traduit par l'augmentation de l'exposition des signaux "eat-me" tels que la PS et la CRT, accompagnée de la diminution de l'exposition des signaux "don't eat-me" tels que CD47. Bien que cette affirmation se vérifie dans la plupart des cas, il existe néanmoins des exceptions.

Ainsi il a été démontré que la PS, dont l'exposition constitutive peut être induite artificiellement à la surface des cellules viables, est nécessaire mais pas suffisante pour que les cellules viables soient phagocytées (Segawa et al., 2011). De plus, les cellules vivantes peuvent exposer à leur surface des signaux "eat-me" tels les lymphocytes activés ou neutrophiles qui exposent à leur surface de la CRT ou de la PS (Elliott et al., 2005; Gardai et al., 2005). De façon similaire, bien que l'expression de CD47 soit constante à la surface des cellules viables et des cellules apoptotiques, sa reconnaissance par le récepteur SRIP $\alpha$ , exprimé à la surface des macrophages, est altérée durant l'apoptose. Gardai et ses collaborateurs ont rapporté les

premiers détails de ce phénomène en montrant la redistribution de CD47 et son exclusion des domaines enrichis à la fois en PS en CRT (Gardai et al., 2005). Par la suite, Lv et ses collaborateurs ont démontré que la distribution de CD47 sous forme de cluster dans les radeaux lipidiques est un paramètre essentiel à son interaction avec le récepteur SIRP $\alpha$  (Lv et al., 2015).

Ces données soulignent le fait que même si l'exposition d'une protéine à la surface d'une cellule est une condition nécessaire, ce n'est pas pour autant une condition suffisante à sa reconnaissance et à l'initiation de la phagocytose. Ainsi, il est crucial d'identifier les modifications de la membrane des cellules en apoptose qui influencent la reconnaissance des signaux "eat-me" et "don't eat-me", dans l'objectif de déterminer les paramètres nécessaires à l'identification et donc à l'élimination des cellules apoptotiques.

Nous nous sommes attachés dans un premier temps à caractériser plus en détail l'évolution relative de la distribution de la CRT, de la PS et de CD47 à l'échelle de la molécule grâce à la technique de microscopie STORM. Contrairement aux données de la littérature, nous n'avons observé aucune clusterisation de la protéine CD47 à la surface des cellules viables, ni même son exclusion des domaines enrichis en CRT lors du développement de l'apoptose. Ces disparités nous ont donc poussé à examiner l'évolution de la dynamique de CD47 à la surface des cellules apoptotiques par microscopie de suivi de molécule unique (SPT). Le résultat de ce travail est présenté dans le manuscrit qui suit.

**Manuscrit** : Nanoscale imaging of CD47 informs how plasma membrane modifications shape apoptotic cell recognition

Samy Dufour<sup>1</sup>, Pascale Tacnet-Delorme<sup>1</sup>, Jean-Philippe Kleman<sup>1</sup>, Oleksandr Glushonkov<sup>1</sup>, Nicole Thielens<sup>1</sup>, Dominique Bourgeois<sup>1</sup> & Philippe Frchet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IBS, F-38000 Grenoble, France

**Contribution** : Dans ce manuscrit j'ai réalisé l'ensemble des expériences, de leur conception jusqu'à leur analyse, à l'exception des expériences de co-immunoprécipitation et des expériences de cytométrie de flux. J'ai également participé à la rédaction du manuscrit.

## 1.2 Manuscrit CD47

### **Nanoscale imaging of CD47 informs how plasma membrane modifications shape apoptotic cell recognition**

Samy Dufour<sup>1</sup>, Pascale Tacnet-Delorme<sup>1</sup>, Jean-Philippe Kleman<sup>1</sup>, Oleksandr Glushonkov<sup>1</sup>, Nicole Thielens<sup>1</sup>, Dominique Bourgeois<sup>1</sup> & Philippe Frachet<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IBS, F-38000 Grenoble, France

<sup>2</sup>corresponding author: philippe.frachet@ibs.fr

#### **Keywords**

Phagocytosis, efferocytosis, CD47, phosphatidylserine, calreticulin, SIRP $\alpha$ ,  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin, apoptotic cells, STORM super-resolution fluorescence imaging, single particle tracking.

#### **Abstract**

CD47 recognized by its macrophage receptor SIRP $\alpha$  serves as a “don’t eat-me” signal protecting viable cells from phagocytosis. How this is abrogated by apoptosis-induced changes in the plasma membrane, concomitantly with exposure of phosphatidylserine and calreticulin “eat-me” signals, is not well understood. Using STORM imaging and single-particle tracking, we interrogate how the distribution of these molecules on the cell surface correlates with plasma membrane alteration, SIRP $\alpha$  binding, and cell engulfment by macrophages. Apoptosis induces calreticulin clustering into blebs and CD47 mobility. Modulation of integrin affinity impacts CD47 mobility on the plasma membrane but not the SIRP $\alpha$  binding, whereas CD47/SIRP $\alpha$  interaction is suppressed by cholesterol destabilization. SIRP $\alpha$  no longer recognizes CD47 localized on apoptotic blebs. Overall, the data suggest that disorganization of the lipid bilayer at the plasma membrane, by inducing inaccessibility of CD47 possibly due to a conformational change, is central to the phagocytosis process.

## Introduction

Phagocytosis of undesirable cells is a fundamental process in multicellular organisms. Beyond its well-known role in the fight against pathogens, it ensures tissue homeostasis, elimination of apoptotic cells in a tolerogenic way, and immune surveillance of cancer cells <sup>1-3</sup>. The phagocytosis of apoptotic cells, referred to as “efferocytosis”, is now extensively studied <sup>4</sup>, and has been identified when perturbed as responsible for numerous and widespread pathologies, notably with a particular immune prevalence. It may therefore constitute a relevant target to develop therapeutic strategies in the fields of autoimmunity and cancers.

Efferocytosis is a routine cellular process with many stages managed by phagocytes and especially by macrophages, from sensing and testing to the final uptake decision of the selected prey <sup>5,6</sup>. This last step is achieved by a set of interactions occurring at the phagocyte-prey interface. However, how the target cell is engulfed, shapes the macrophage’s response in an inflammatory or anti-inflammatory manner and drives its antigen presentation ability, remain to be studied in detail.

Although numerous molecules have been proposed to be part of “the phagocytic synapse” and act as “eat-me” or “don’t eat-me” signals, the exact function of many of them remains to be understood to establish links between molecular dysfunctions and pathologies. The “don’t eat-me” CD47 protein has been found to be a critical player for inhibition of the phagocytosis when bound, *in trans*, to the macrophage receptor SIRP $\alpha$  (Signal Regulatory Protein  $\alpha$ ). The finding that disruption of the SIRP $\alpha$ -CD47 interaction enhances phagocytosis of viable cells <sup>7-9</sup>, contributed to the emergence of experimental targeting of CD47 for applications in cancer immunotherapy <sup>10,11</sup>. The function of CD47, also known as integrin associated protein (IAP) <sup>12</sup> has been linked to the cell membrane plasticity <sup>13</sup> and modulation of cell adhesion properties. Indeed, CD47 was shown to interact, *in cis*, with  $\beta$ 3 integrins such as  $\alpha$ v $\beta$ 3,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, and the  $\beta$ 1 integrins  $\alpha$ 2 $\beta$ 1,  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 <sup>12,14</sup> even though the conditions under which CD47 and integrins are physically and functionally connected need to be clarified. A recent study of Morrissey and collaborators <sup>15</sup> demonstrated that CD47 ligation to SIRP $\alpha$  ensures repositioning of SIRP $\alpha$  on the phagocytic synapse, along with suppression of integrin activation on the phagocyte, provoking an efficient blockade of phagocytosis.

Interestingly, it was proposed that the efficiency of the “eat-me” signal calreticulin (CRT) which is a key ligand for apoptotic cell recognition and also shown to potentially influence apoptotic cell immunogenicity <sup>16</sup>, is dependent on CD47 redistribution at the cell surface concomitant with a loss of binding to SIRP $\alpha$  <sup>7,17</sup>. In addition, this could influence phosphatidylserine (PS)-mediated engulfment. Indeed, PS, which is the best-characterized signal for phagocytosis of apoptotic cells, can interact with CRT <sup>18-20</sup>. Moreover, it was demonstrated that PS, which may be constitutively exposed on viable cells, is required but not sufficient for the dead or apoptotic cells to be engulfed <sup>21</sup>. CRT was also found on the surface of various viable cells <sup>7,22,23</sup> without inducing their uptake by phagocytes.

These data highlight the fact that exposing “eat-me” or “don’t-eat” motifs at the cell surface is not sufficient to prompt phagocyte engulfment or to inhibit it. A central question regarding efferocytosis is therefore how modifications of the apoptotic cell membrane influence the reorganization, i.e. clustering and mobility of the molecular complexes that are necessary to activate the uptake process. Answering this question is fundamental to improve our understanding of how “eat-me” and “don’t eat-me” signaling molecules act with their potential lateral partners and their receptors to contribute to the functional phagocytic synapse.

Furthermore CD47 and membrane exposed CRT (ecto-CRT) are extensively targeted in developing anti-tumor approaches (Eggleton et al., 2016; Feng et al., 2018; Krysko et al., 2012; Obeid et al., 2007; Scholnik-Cabrera et al., 2019; Veillette and Chen, 2018), the optimization of which now requires a better knowledge of the molecular organization of these molecules at the cell surface.

As of today, little is known regarding the nanoscale localization and dynamics of molecules known to be crucial for the control of cell-cell recognition and phagocytosis. Recently Wang and collaborators<sup>28</sup> analyzed the nanoscale organization of CD47 in red blood cells (RBCs) from young and aged mice, and suggested that such organization could influence thrombospondin-1 (TSP1) binding, and thus the process of removal of aged RBCs.

Here, we used STORM super-resolution microscopy and single-particle-tracking (SPT) experiments to analyze the differential cell membrane r distribution and diffusion behavior of PS, ecto-CRT, and CD47 on adherent HeLa cells. We compared viable cells to cells in early apoptotic stages induced by UVB irradiation. Because the size of the phagocytic synapse is in the 100-300 nm range, beyond the diffraction limited of visible light, super-resolution microscopy provides a new tool for analyzing the spatial organization and possible co-localization of the involved molecular assemblies.

We show that at the nanoscale PS, CRT and CD47 are not, or weakly, co-localized at the cell surface. The results obtained on CD47 dynamics and SIRP $\alpha$  binding on apoptotic cells were compared to those measured on viable cells treated to modify membrane components. Our study shows that CD47 distributes into a low and a high-mobility population, the fractions of which depend on the applied treatments. Apoptosis leads to a significant increase in CD47 mobility and the functional activity of CD47 toward SIRP $\alpha$  was found to be strongly dependent on cholesterol.

## **RESULTS**

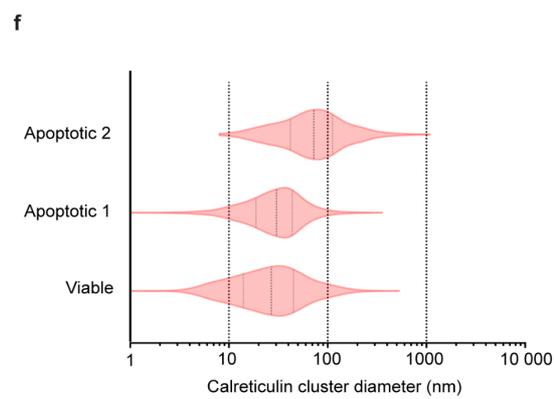
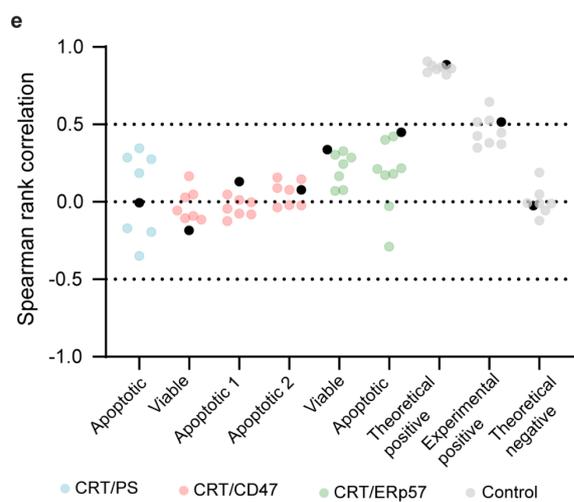
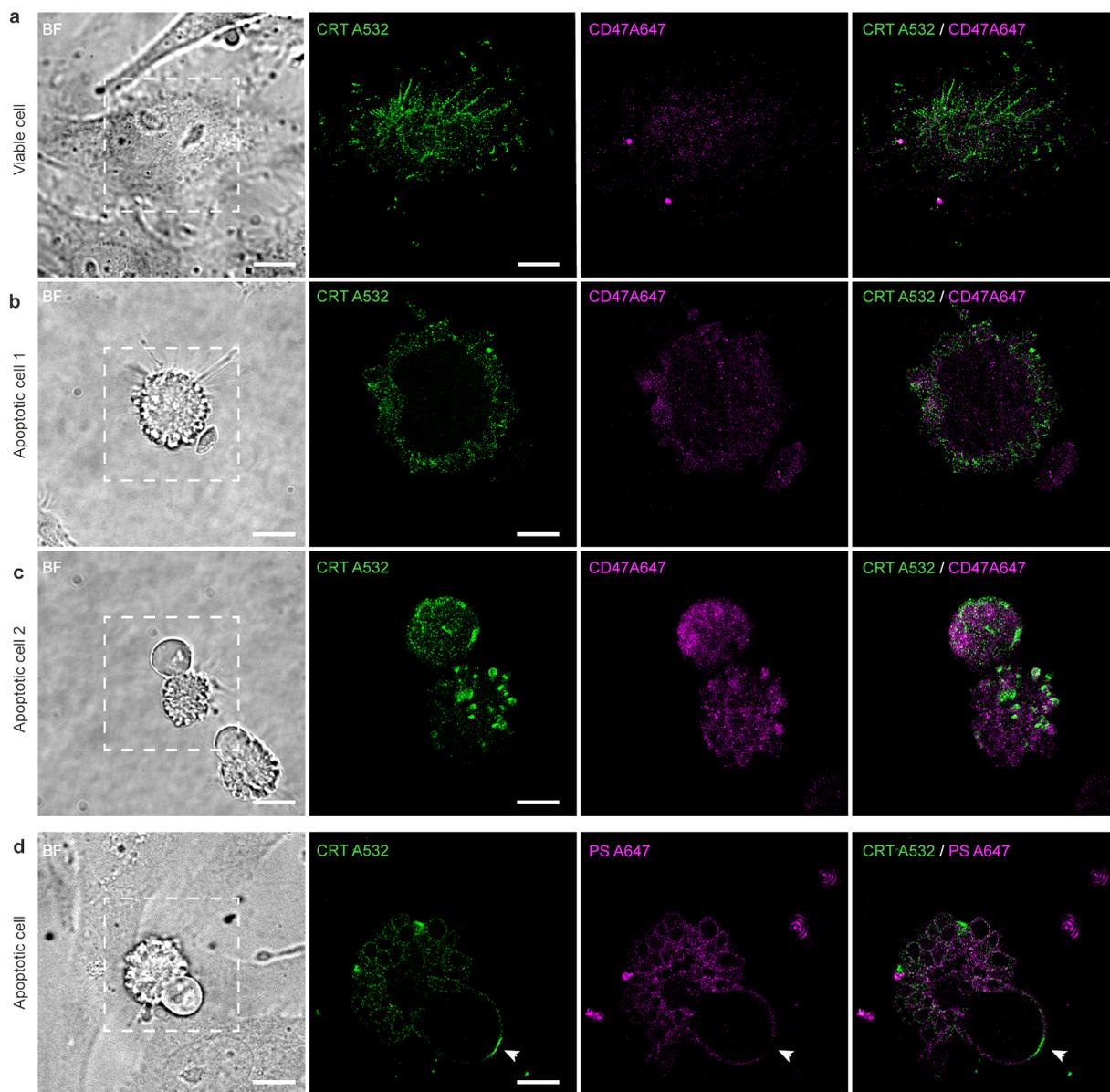
### **CD47 distribution on apoptotic cells is independent of CRT clustering**

It was originally proposed that the CD47 “don’t eat-me” function is altered while CD47 moves away from CRT following the onset of apoptosis, which is accompanied by PS exposure<sup>7</sup>. This

correlates with an increase of apoptotic cell engulfment by macrophages hypothetically due to the “eat-me” functions of CRT and PS, and to the loss of CD47 cell surface clustering which could affect its binding to SIRP $\alpha$ <sup>17</sup>. This prompted us to investigate at the nanoscale, using STORM super-resolution imaging, the localization of CD47, CRT and PS along the remodeling of the apoptotic cell membrane. HeLa cells were used as a model (as described in Fig. S1) well adapted to our super-resolution microscopy approach as these adherent cancer cells express CD47 and expose ectopic CRT, which has been characterized as a pro-phagocytic event at early apoptotic stages<sup>16,19,29</sup>. Unpermeabilized cell samples were labeled for CRT, CD47 and PS using primary anti-CRT and secondary A532 antibodies, an A647 anti CD47 antibody or by A647 annexin V, respectively. Thanks to these combinations, we generated two color super-resolution STORM images (Figure 1) from double-labeled CRT/CD47 and CRT/PS samples. These images showed a non-homogeneous distribution of the molecules on the apoptotic cell surface. CRT, which was present on the outside face of viable HeLa cells (Fig. 1a and S2a) was noticeably redistributed on the surface of apoptotic cells and mostly clustered in restricted areas, specifically on apoptotic blebs as shown in Fig. 1a-1c, which represent different steps of the morphological modifications of the plasma membrane induced by apoptosis. As a control, a similar pattern was observed for ERp57 another endoplasmic reticulum chaperone which is known to be co-translocated with CRT on the outer leaflet of the plasma membrane<sup>26,30,31</sup> (Fig. S3a). Unlike CRT, CD47 detected on viable and apoptotic cells remained homogeneously distributed throughout the cell surface (Fig. 1a-1c). Although CD47 was found in CRT-enriched regions (Fig. 1a-1c), the Spearman’s rank correlation coefficient indicates a weak, or a lack, of co-localization between CRT and CD47 on either viable or apoptotic cells contrary to what was obtained for CRT/ERp57 (Fig. 1e, S2 and S3a).

Cell labeling with annexin V revealed that PS is distributed all over the cell membrane with a typical decoration of the blebs membrane (Fig. 1d), also enriched with CRT. Nevertheless, analysis at the scale of the entire cell using the Spearman’s test indicated a lack of correlation between localization of PS and CRT (Fig. 1e). However, a more detailed investigation revealed a very heterogeneous situation, with regions where CRT localized with PS (particularly in blebs) and peculiar areas where CRT is present, but PS is excluded (Fig. 1d and S2b). On the one hand these observations are in agreement with published data showing that CRT and PS can interact<sup>7,19,20,32</sup>. On the other hand the fact that CRT can be localized to the membrane in the absence of PS is in line with the observation that CRT exposure can precede PS exposure<sup>18,31</sup> which was also observed in our experimental model (Fig. S4). This highlights the complexity of interactions evolving with the development of apoptosis. In addition, the size of CRT clusters (Fig. 1f and S3c) increases significantly along their re-localization into apoptotic blebs.

All together these results indicate that CD47 distribution and CRT repositioning on apoptotic cells concomitantly to PS exposure are not directly linked.

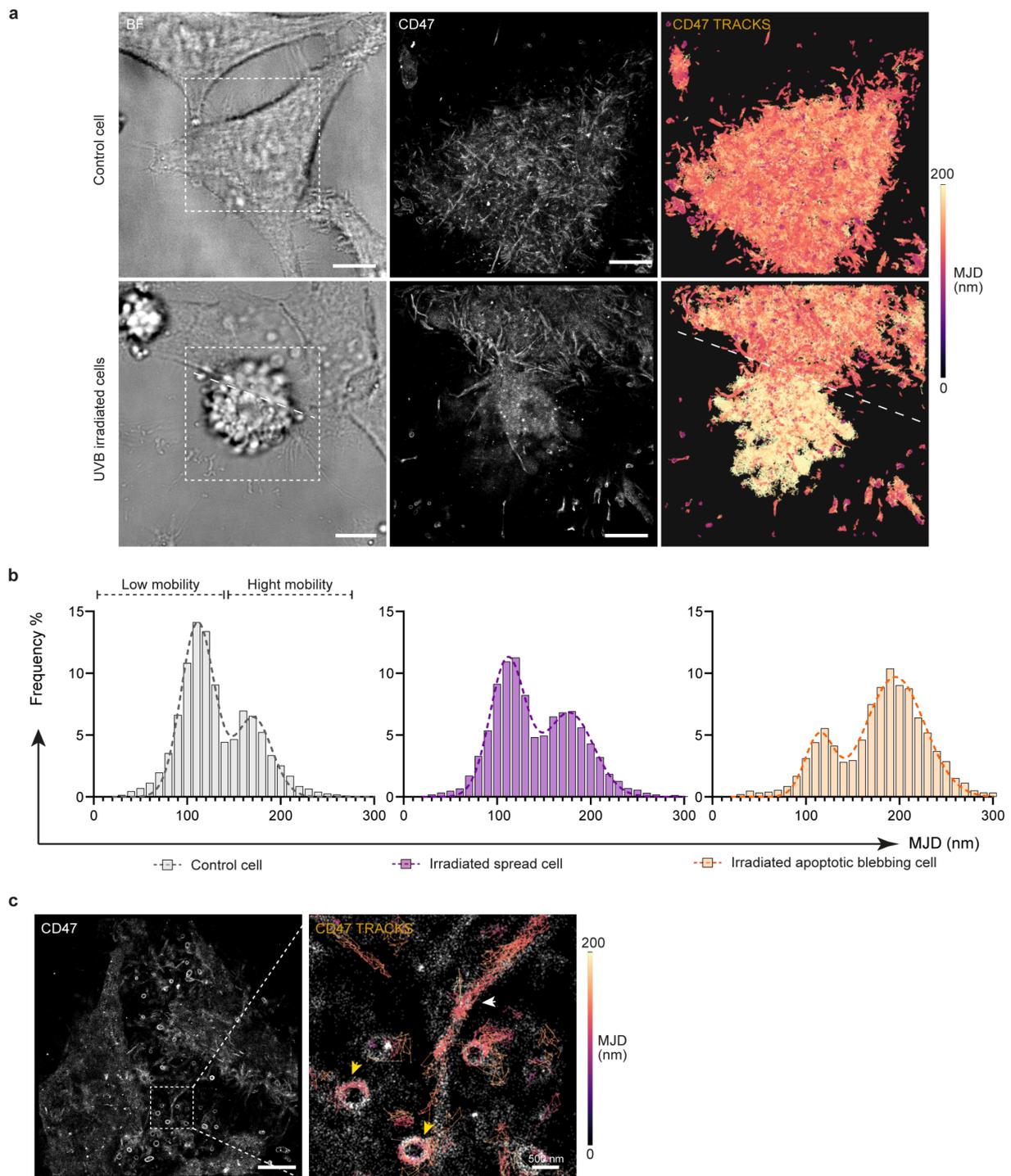


**Figure 1. Evolution of the nanoscale organization of calreticulin, PS and CD47 during apoptosis.**

HeLa cells, viable or 4h post UVB-irradiation were stained and imaged by STORM. Bright-field imaging (BF) was used to differentiate healthy cell from apoptotic cell. **(a,b,c)** CD47 (magenta) and calreticulin (green) were detected with anti-CD47 (B6H12) labeled with Alexa Fluor 647 (A647) and with anti-calreticulin (PA1-902A) revealed by secondary antibodies labeled with Alexa Fluor 532 (A532). **(d)** Phosphatidylserine (magenta) and calreticulin (green) were detected with biotinylated annexin V and anti-calreticulin (PA1-902A) and revealed by streptavidin labeled with A647 and secondary antibodies labeled with A532 fluorophores, respectively. The white arrow points a specific area where CRT and PS are excluded. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$  on BF images and 5  $\mu\text{m}$  on STORM images. **(e)** 2D co-localization was quantified by Spearman's rank correlation. Subsampling of the whole cell (black dot) is represented by colored dots as indicated. Analyses were performed on cells shown in Figure 1 and specific ROIs of 2.6  $\mu\text{m}^2$ ; areas selected for the whole cells are represented in Figure S2. Experimental, theoretical positive and theoretical negative controls were obtained as described in the methods section and represented in Figure S3a and b. **(f)** Violin plots show representative distribution of CRT cluster diameter measured on the cells represented in Fig. 1a-1c. Segmentation and quantification of calreticulin cluster diameter were determined as shown in Figure S3.c

**CD47 displays a low-mobility and a high-mobility form which is enhanced on the apoptotic cell surface**

Our above observation mostly showing a lack of redistribution of CD47 towards CRT during apoptosis, prompted us to examine the dynamical behavior of CD47 at the surface of viable and apoptotic cells. A single particle tracking approach in TIRF mode was thus developed using an A647 anti-CD47 antibody (B6H12) (Fig. 2). The density of recorded CD47 tracks, as well as the length of the tracks, were optimized as described in Methods. As a proxy for mobility, we measured the Mean Jump Distance (MJD), that is, the average distance travelled by one particle between two consecutive frames in individual tracks<sup>33</sup>. One advantage of measuring MJDs is that they are independent of an a priori diffusion model. The analysis of the MJD distribution on viable cells revealed two distinct populations, a “low-mobility” (MJDs  $\leq 140$  nm) and a “high mobility” (MJDs  $\geq 140$  nm) population (Fig. 2a-2c). On one of our UV-irradiated samples (Figure 2a), two neighboring cells were spotted, one showing a clear apoptotic phenotype with a characteristic membrane blebbing and the other displaying a more spread and adherent phenotype. The length of CD47 MJDs increased clearly on the cell at a more advanced stage of apoptosis (Fig. 2a). The histogram distribution of MJDs evolved accordingly (Fig. 2b), with an increase of the high mobility sub-population and a decrease of the low mobility population in the cell with a blebbing phenotype, whereas the MJD histogram of the well adherent cell remained similar to that of viable cells. These observations strongly suggest that the CD47 mobility increases upon apoptosis onset. Interestingly, analysis of individual tracks reconstructed from viable cells revealed peculiar nanoscale patterns that could not be observed on fixed cells by STORM. This suggests that some CD47 molecules are sequestered in restricted regions (Fig. 2c) possibly assigned to microvilli and vesicle-like domains, in line with previous experiments<sup>34,35</sup>.



**Figure 2. Two mobile subpopulations of CD47 coexist on the cell surface and their proportion evolves with apoptosis.**

**(a-c)** CD47 was detected with an anti-CD47 (B6H12) antibody labeled with A647 and imaged by TIRF microscopy during 120 s at 33 Hz. **(a)** CD47 was visualized on non-treated (control) or UVB-irradiated HeLa cells. Brightfield image (BF) was used to differentiate spread cells from apoptotic cells (left panels). CD47 localizations over the time were compiled to reconstruct the image (middle panel). Mean Jump Distance (MJD) was calculated and each CD47 trajectory was colored according to its MJD value (color scale on the right side). The dotted line in the lower right image delimits the spread cell from the apoptotic cell presenting a blebbing phenotype. Scale bar, 10  $\mu$ m on BF images, 5  $\mu$ m on CD47 images. **(b)** Representative MJD distributions extracted from the acquisition of the cells shown above (a). Two classes of CD47 mobility were determined according to their MJD as annotated on the histogram obtained on a viable control cell. **(c)** Views of CD47 localization from 250 frames tracks showing CD47 sequestered on microvilli (white arrow) and microvesicle-like structures (yellow arrows). Scale bar, 5  $\mu$ m.

### **CD47 mobility is dependent on integrin state and on plasma membrane organization**

To test whether the mobility behavior of CD47 is linked to its interaction with other plasma membrane molecules, we performed SPT measurements after treating cells with various chemicals, which impact plasma membrane components. Formaldehyde (FA) fixation is currently used to fix proteins and preserve the cell cytoskeleton but has a poor ability to immobilize lipids in contrast to glutaraldehyde<sup>36</sup>. Interestingly, after FA fixation, the extent of CD47 tracks diminished (Fig. 3a and 3b). The MJDs were significantly reduced with the appearance of a fraction of almost immobile molecules. One mobile population of CD47 persisted after FA treatment, but essentially disappeared after glutaraldehyde treatment, which stiffens the membrane, or in the presence of saponin, a detergent known to extract cholesterol, hence triggering destabilization of the lipid rafts (Fig. 3a and b). These observations suggest that the low-mobility CD47 population may be constrained by other macromolecules of the membrane or of the cytoskeleton, while the high-mobility population is diffusing more freely in the lipid bilayer. Changes in CD47 mobility observed in apoptotic cells may thus be controlled by its interaction with plasma membrane components, such as lipids, lipid-associated molecules or proteins that are modified during apoptosis. To test this hypothesis, we decided to treat cells with cytoskeleton, integrins or lipid rafts perturbators. To evaluate how these treatments affect the CD47 mobility, we calculated the value (R) corresponding to the proportion of high mobility MJDs relative to all MJDs collected from individual cells (Fig. 3c and S4). Thus, a bigger R value is indicative of a higher proportion of MJDs above 140 nm, i.e. of an increase in CD47 mobility.

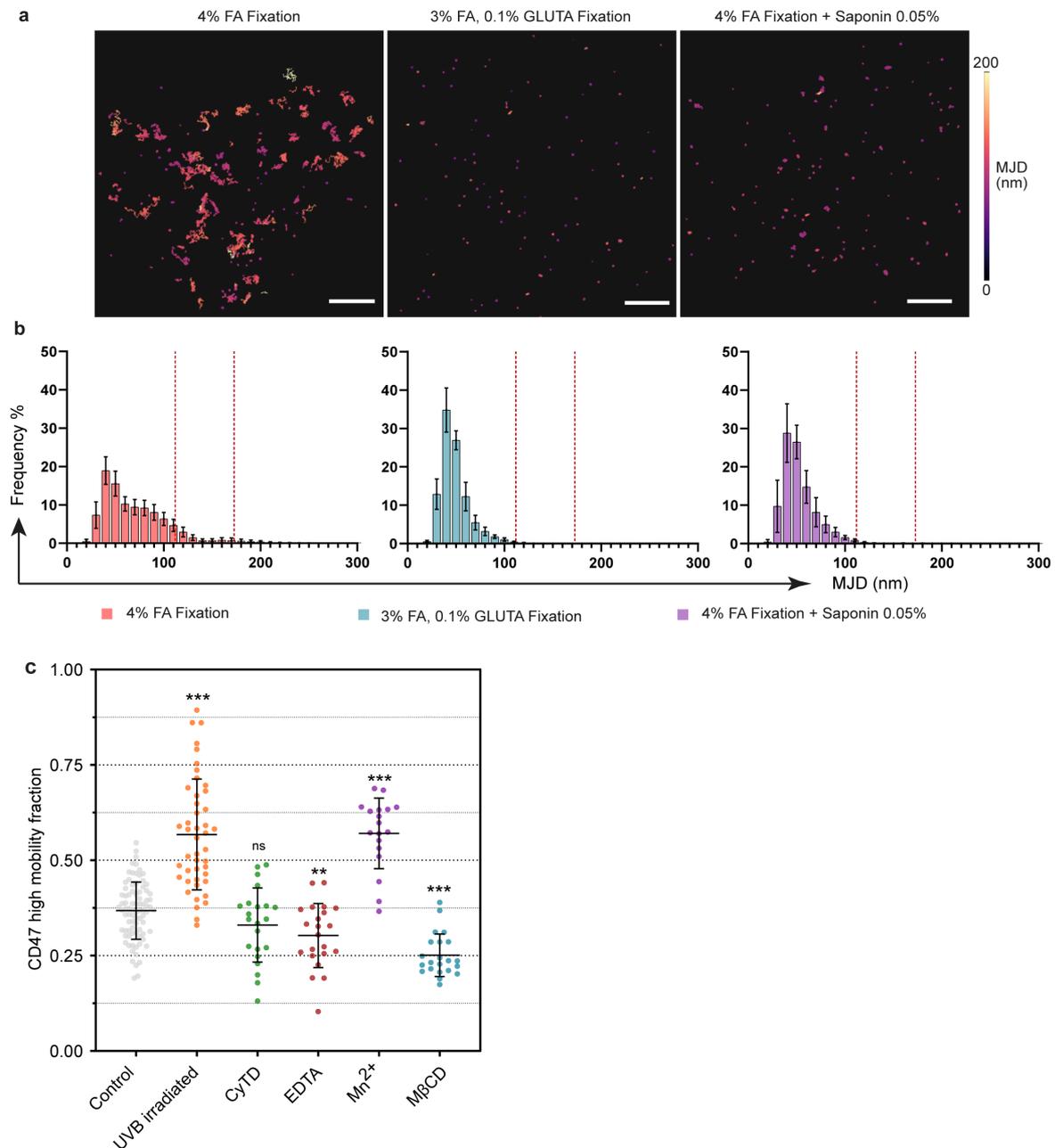
- **Breaking actin filaments does not affect CD47 mobility**

Cytochalasin D treatment, which disrupts the cytoskeleton by breaking actin filaments, did not affect CD47 mobility (Fig. 3c). This suggests that the change in R observed upon apoptosis is not directly due to an alteration of the cytoskeleton structure but most likely a consequence of a modification of the plasma membrane in link with the depolymerization of actin fibers<sup>37,38</sup>.

- **Destabilization of cholesterol-containing domains is not sufficient to increase CD47 mobility**

It was previously proposed that cholesterol may be important for CD47/ $\alpha v\beta 3$  signaling activity<sup>41</sup>. Accordingly, Lv and collaborators showed that CD47 could aggregate in lipid rafts<sup>17</sup>, and that destabilization of the latter by methyl-beta-cyclodextrin (M $\beta$ CD) induced the onset of a diffuse-like pattern of CD47 as observed by immunolabeling. Therefore, we tested the influence of M $\beta$ CD on the mobility of CD47 by SPT. We observed that this treatment did not increase the fraction of the highly-mobile population of CD47 (Fig. 3c), but that, on the contrary, only the low-mobile fraction remained (Fig. S5). This suggests that the high-mobility state of CD47 is dependent on the presence of cholesterol-rich domains and that the diffuse pattern observed by Lv and collaborators<sup>17</sup> is not associated with an increased mobility of CD47. This conclusion is also strengthened by our above data (Fig. 3a and 3b) showing that

the use of saponin to extract cholesterol drastically diminished the proportion of the still mobile CD47 molecules after fixation.



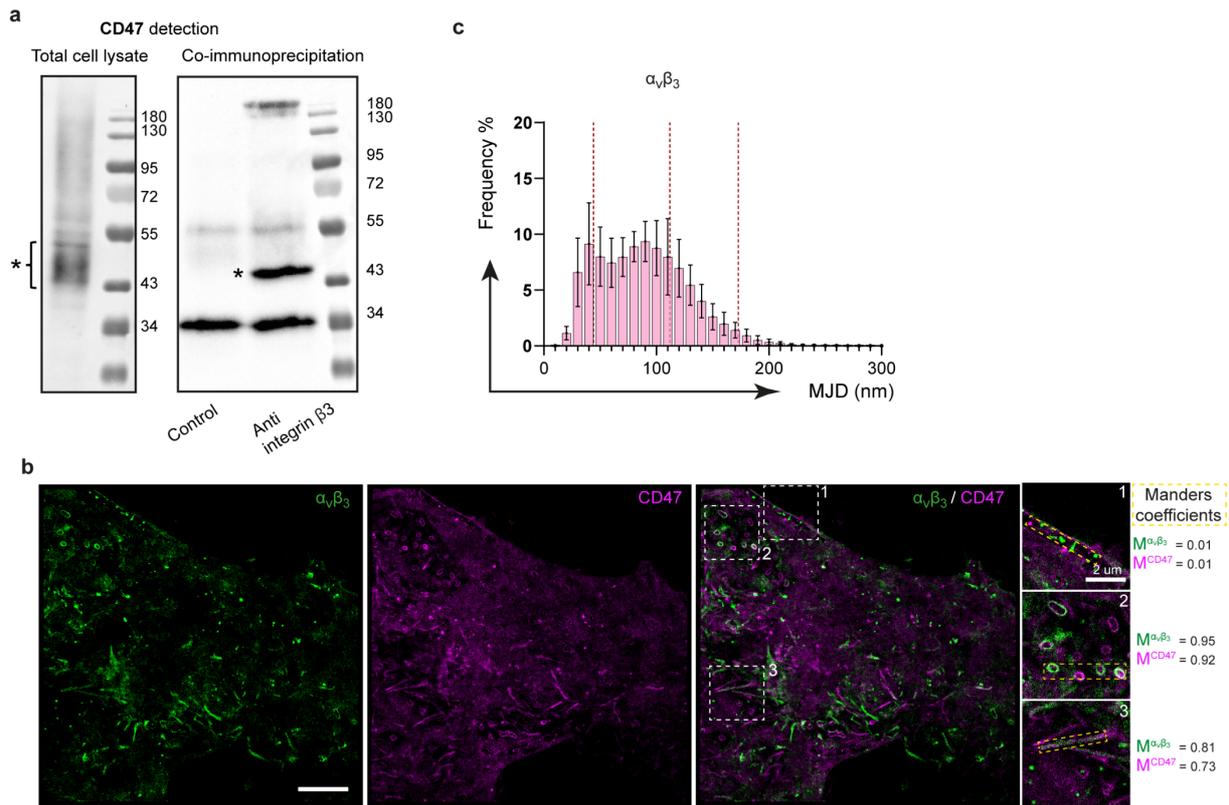
**Figure 3. Plasma membrane molecules affect the mobility of CD47.**

CD47 was detected on viable HeLa cells with an anti-CD47 (B6H12) antibody labeled with A647 and imaged by TIRF microscopy during 60 s (**a,b**) or 120 s (**c**) at 33 Hz. (a) Viable cells were stained to detect CD47 protein and then fixed: with respectively 4% formaldehyde, 3% formaldehyde and 0.1% glutaraldehyde or 4% formaldehyde followed by 0.05% saponin. Mean Jump Distance (MJD) was calculated and each CD47 trajectory was colored according to its MJD value. A range of 250 frames of CD47 tracking was represented. Scale bar, 5  $\mu$ m. (b) MJD distribution was obtained after merging the MJD from several cells (4% formaldehyde n=20 cells, 3% formaldehyde, 0.1% glutaraldehyde n=14 cells, 4% formaldehyde, 0.05% saponin n=13 cells) from two independent experiments. Dotted red line corresponds to the mean value of the low mobility (111.9 nm) and high mobility (172.7 nm) extracted from control viable cell (represented in figure S4) (c). Cells were treated by UVB irradiation n =

45, Cytochalasin D (CytD)  $n = 22$ , EDTA  $n = 22$ ,  $Mn^{2+}$   $n = 18$  and M $\beta$ CD  $n = 22$  and compared to nontreated viable (control) cells  $n = 84$ . MJD was calculated for each cell, the Gaussian distribution of low and high mobility fraction was fitted, and the fraction of the high mobility MJD on the total MJD was represented. Each dot corresponds to one cell and each experiment was performed at least two times independently. The mean and the standard deviation for each treatment are represented. \*\*\* denotes  $p < 0.0005$ , \*\* denotes  $p < 0.005$ , and n.s. denotes  $p > 0.05$  as determined by a Student's  $t$  test in comparison to the control.

- **Modulation of Integrin affinity state impacts CD47 mobility**

$\beta 3$  integrins are cell-cell and cell-matrix adhesion receptors whose function (i.e. ligand binding activity) is affected by apoptosis and which are known to be CD47 partners<sup>12</sup>. EDTA treatment, which destabilizes integrin heterodimers and results in a shift toward the inactive forms that abrogate binding to their adhesion ligands<sup>39,40</sup>, resulted in a significant decrease of the CD47 R-value (Fig. 3c). In contrast,  $Mn^{2+}$ , which promotes the high affinity state of integrins, increased the R value, similarly to what we observed on apoptotic cells. In support of an interaction of  $\beta 3$  integrins with CD47, which could be at the origin of the modified R values, CD47 was efficiently detected from  $\beta 3$  immunoprecipitation on HeLa cells lysate (Fig. 4a). To probe this putative interaction in more detail, we performed two-color CD47/ $\alpha v\beta 3$  SPT experiments. Strikingly, CD47 and mobile integrins could be detected in the same restricted areas (microvilli or vesicle-like domains, Fig. 4b, selected area 2 and 3) while CD47 did not localize with  $\alpha v\beta 3$  in areas where integrins appeared immobile (Fig. 4b, selected area 1), expected to be focal adhesion sites. This suggests that the low mobility population of CD47 and the mobile population of  $\alpha v\beta 3$  are constrained inside the same type of membrane sub-domain structure, proposed above as being microvilli or vesicle-like domains (Fig. 2c). In addition, the analysis of the  $\alpha v\beta 3$  MJDs extracted from SPT acquisitions (Fig. 4c) showed that they are mainly distributed between an immobile population with a mean MJD value around 44 nm (corresponding to the MJD of immobile CD47 molecules determined after glutaraldehyde fixation and shown in Fig. 3b) and a mobile one. This latter is characterized by MJDs close to the mean value determined for the low mobility population of CD47 (111.9 nm, Fig. S5) suggesting that the mobile integrin preferentially associate with the low mobility fraction of CD47 molecules. In support of this, we observed in regions, such as microvilli, where the two molecules are co-localized, CD47- $\alpha v\beta 3$  co-diffusion events as shown in the supplemental videos (Movie 1 and Movie 2).



**Figure 4. Mobile  $\alpha_v\beta_3$  integrin and CD47 appear confined in the same membrane area.**

**(a)** CD47 was detected after  $\beta_3$  integrin subunit immunoprecipitation from a HeLa cell lysate. Cell lysate was absorbed to non-coated magnetic beads (Control) or coated with anti-integrin  $\beta_3$  (AB2984). CD47 were next detected by western blotting with an anti-CD47 (B6H12). (1): CD47 detected on a whole cell lysate (2): CD47 detected on the  $\beta_3$  integrin subunit immunoprecipitated sample. Samples were submitted to 10 % SDS PAGE analysis under nonreducing conditions. The position of CD47 is indicated by a (\*). A non-specific band is detected at 34 kDa in both samples. Molecular weight markers (kDa) are shown. **(b)** Two color single particle tracking of integrin  $\alpha_v\beta_3$  and CD47 was obtained using anti- $\alpha_v\beta_3$  (23C6) and anti-CD47 (B6H12) antibody labeled with PE and Alexa Fluor 647 respectively, and imaged by TIRF microscopy during 120 s at 33 Hz. The localization of the two proteins was compiled over the time to reconstruct one image. White dotted squares numbered 1, 2, 3 delimit enlarge zone on the right and yellow dotted rectangles delimit zone used to calculate Manders' coefficients.  $M^{\alpha_v\beta_3}$  and  $M^{CD47}$ , Manders' overlap coefficient of  $\alpha_v\beta_3$  localization with CD47 and of CD47 with  $\alpha_v\beta_3$ , respectively. Scale bar, 5  $\mu\text{m}$ . **(c)** MJD distribution for  $\alpha_v\beta_3$  extracted from SPT acquisition as previously done in Fig. 3 and 2. Dotted red lines correspond to the CD47 mean value of immobile population MJD extracted from formaldehyde, glutaraldehyde fixation (44 nm), the low mobility (111.9 nm) and high mobility (172.7 nm) population extracted from control viable MJD population. MJD distribution was obtained after merging the MJD from several cells (n=12) from two independent experiments.

### **Destabilization of cholesterol impacts SIRP $\alpha$ binding and phagocytosis efficiency**

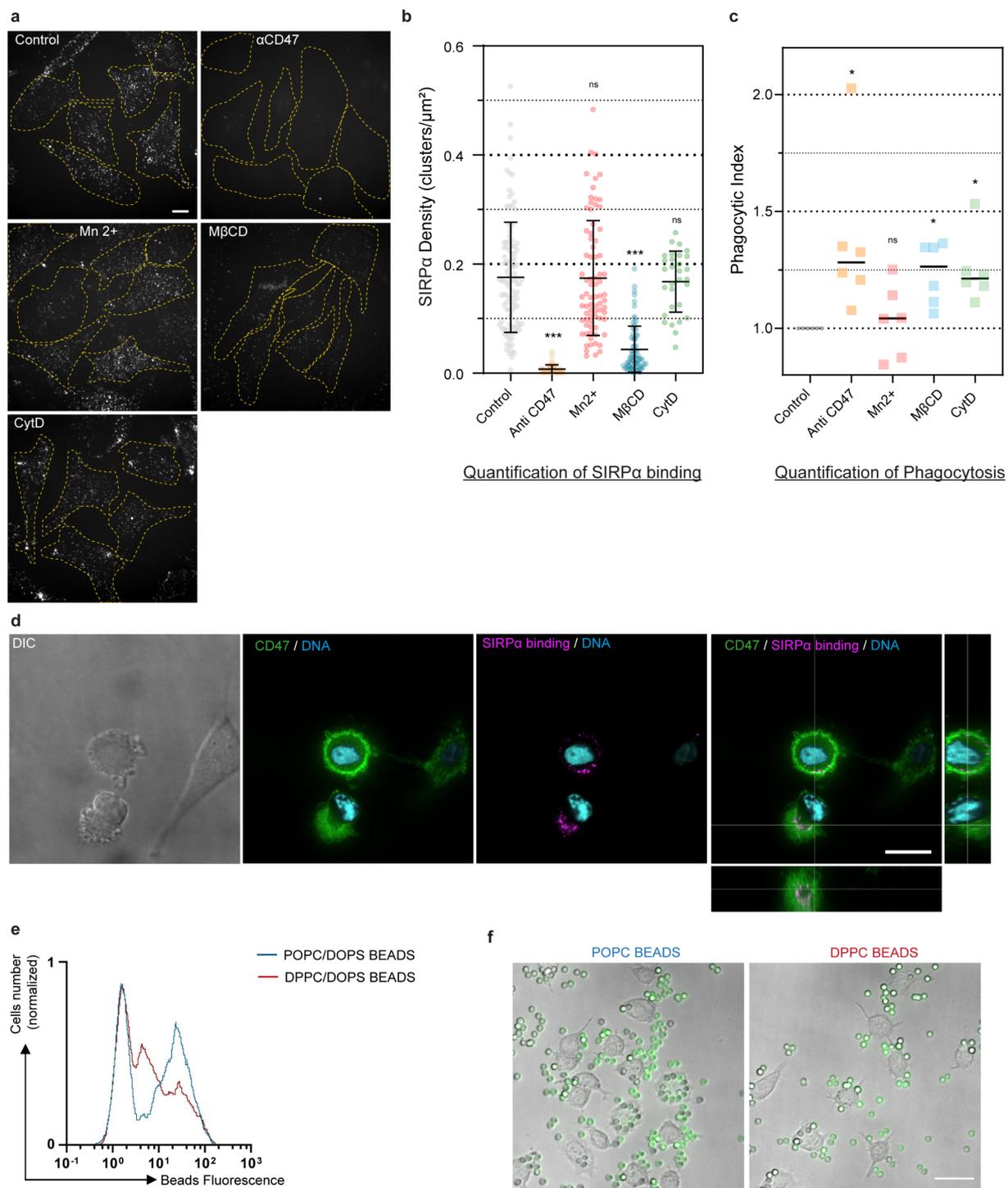
To evaluate how the mobility of CD47 influences its biological function, we first investigated the binding of the SIRP $\alpha$  protein on HeLa cells in adherence situation. The binding of a soluble recombinant form of SIRP $\alpha$  (biotinylated-SIRP $\alpha$ /CD172a Fc Chimera) was measured by confocal imaging on HeLa cells treated with Mn<sup>2+</sup>, M $\beta$ CD or Cytochalasin D (treatment with EDTA could not be performed due to loss of adhesion) (Fig. 5a and 5b). SIRP $\alpha$  binding was evaluated on individual cells by determining the density (number of spots per  $\mu\text{m}^2$ ) of fluorescence foci. As shown in Fig. 5a and 5b, the number of SIRP $\alpha$  foci detected per cell drastically decreased after M $\beta$ CD treatment but not in the other conditions except after incubation with the therapeutic anti-CD47 B6H12 antibody known to block the SIRP $\alpha$ /CD47 interaction. We next tested if the applied treatments had effects on cell engulfment by J774 macrophages (Fig. 5c) using flow cytometry. As expected, the B6H12 anti-CD47 antibody drastically increased phagocytosis. An increase of phagocytosis was also observed after M $\beta$ CD and to a lesser extent with CytD treatment. The increased phagocytosis after M $\beta$ CD treatment is in agreement with the observed loss of SIRP $\alpha$  binding (Fig. 5a and 5b). The apparent increased phagocytosis in the presence of CytD could be biased by the high proportion of cell debris observed with CytD treatment (data not shown), that can be engulfed independently of the SIRP $\alpha$ /CD47 pathway. The exogenous activation of integrins on the HeLa cells by Mn<sup>2+</sup> did not have a significant effect on phagocytosis, suggesting that activating integrins on the target cell prior to contact with macrophages does not prevent CD47 from acting as a “don’t eat-me” signal, in agreement with the observation that SIRP $\alpha$  binding to the cell is preserved upon Mn<sup>2+</sup> addition (Fig. 5a and 5b). All together our observations that (i) removing cholesterol by M $\beta$ CD increased the phagocytosis efficiency while decreasing the CD47 mobility and SIRP $\alpha$  binding, and (ii) activating integrins did not have an effect on phagocytosis while increasing CD47 mobility, suggest that CD47 mobility and its recognition by the SIRP $\alpha$  receptor are essentially uncoupled.

### **Soluble SIRP $\alpha$ does not bind to apoptotic blebs despite the presence of CD47**

Our above results obtained with M $\beta$ CD treatment on viable cells prompted us to ask whether SIRP $\alpha$  would be able to recognize CD47 differentially according to its location on the apoptotic cell surface. Indeed, apoptosis is accompanied by a decrease of lipid order of the plasma membrane related to phospholipids exchange and cholesterol destabilization<sup>42</sup>, inducing profound and heterogeneous structural changes throughout the membrane, a process highlighted by the characteristic membrane blebbing. Remarkably, our confocal images demonstrated that SIRP $\alpha$  did not bind at all to the characteristic membrane blebs despite the presence of CD47 (Fig. 5d). Conversely, CD47 and exogenously added SIRP $\alpha$  co-localized on membrane areas located outside the blebs. This observation suggests that CD47 accessibility to SIRP $\alpha$  is dependent on the way it is exposed on the cell surface and is not linked to its mobility.

### **Unlike CD47, the mobility of PS facilitates phagocytosis**

In contrast to what we demonstrate for CD47 function, an increase of PS lateral mobility in the plasma membrane during apoptosis has been suggested to participate in the PS "eat-me" signaling function and was put forward to explain that non-apoptotic cells where PS is constitutively exposed (e.g., B cells or neutrophils)<sup>43</sup> are not engulfed. For this reason, further experiments were done to test the role of PS mobility on the phagocytosis ability of macrophages. We prepared PC/PS phospholipids-coated glass beads as phagocytic targets, using synthetic lipids POPC or DPPC to modulate the DOPS mobility on reconstituted phospholipids bilayers<sup>44</sup>. TopFluor PS was also incorporated as an indirect marker to monitor the fluidity and the distribution of DOPS lipid. As shown in figure 5e, the target beads with mobile PS (i.e, containing POPC) as controlled by FRAP analysis (Fig. S6), were markedly more engulfed by J774 macrophages than control beads (i.e, containing DPPC) characterized by a lower PS mobility. This confirms the link between PS mobility and its capacity to serve as an "eat-me" signal toward the receptors expressed by the macrophage.



**Figure 5. SIRPα binding to HeLa cells and their phagocytosis by J774 macrophages are dependent on cholesterol content.**

(a,b,d) Cholesterol depletion inhibits SIRPα binding and increases phagocytosis. (a, b) Cells were incubated with Cytochalasin D (CytD), Mn<sup>2+</sup>, MβCD or anti CD47 (B6H12). Cells were next incubated with recombinant biotinylated human SIRPα Fc chimera protein, revealed by A647-streptavidin and imaged by confocal microscopy. (a) Z stack of cells was acquired and max projection was performed with cells outlined in yellow. Scale bar, 10μm. (b) Density of SIRPα binding on HeLa treated cells. Each dot corresponds to one cell coming at least two independent experiments (Control n = 106, anti CD47 n = 60, Mn<sup>2+</sup> n = 77, MβCD n = 72 and Cytochalasin D (CytD) n = 60). The mean and the standard deviation for each treatment are represented. \*\*\* denotes p < 0.0005, and n.s. denotes p > 0.05 as determined by a Student's t test in comparison to the control. (c) Phagocytosis of HeLa treated cells by J774 macrophage. Harvested cells were treated as indicated in Methods section and washed before adding to macrophages. Each point corresponds to an independent experiment (n=6). The median for each

treatment is represented. \* denotes  $p < 0.5$ , and n.s. denotes  $p > 0.05$  as determined by Wilcoxon-Mann-Whitney's test in comparison to the control. (d) Soluble SIRP $\alpha$  does not bind to apoptotic blebs. After incubation, cells were incubated with biotinylated SIRP $\alpha$  and streptavidin A647 (magenta) and then fixed and stained with anti-CD47 (B6H12) revealed by secondary antibodies labeled with Alexa 488 fluorophores (green). Cells were mounted with Hoechst 33342 to detect the nucleus (cyan) and imaged by confocal microscopy. Lateral 3D representations are shown. Scale bar 10  $\mu\text{m}$ . (e) PS mobility enhances phagocytosis. Phagocytosis of lipid bilayer coated silica beads containing DOPS by J774 macrophages. To modulate the mobility of DOPS, the lipid bilayer was composed of POPC (high mobility) or DPPC (low mobility). J774 were incubated with fluorescent beads (TopFluor PS) and phagocytosis was assessed by measuring the fluorescence of cells with internalized beads by flow cytometry. A representative experiment of two is shown. (f) Images of beads phagocytosis by J774 macrophages are shown. Scale bar 30  $\mu\text{m}$ .

## Discussion

A thorough knowledge of the relative exposure and organization of “eat-me” and “don't eat-me” signals at the plasma membrane is essential to consider therapeutic approaches aimed at the elimination of transformed or apoptotic cells (e.g. in anti-cancer or auto immune disease therapies).

Ecto-CRT has been found to be an “eat-me” signal which can also help in the development of an immunogenic response, and CD47 is a crucial “don't eat-me” signal, the blocking of which stimulates phagocytosis. There are many remaining questions about how these molecules function together and their potential patterning at the plasma membrane, known to be profoundly reshaped during apoptosis. By accessing the nanoscale thanks to single molecule localization (SML) microscopy, we quantitatively and qualitatively analyzed the molecular distribution of CRT, CD47 and PS on viable or apoptotic cells. CRT and CD47 are exposed on viable cells with no obvious co-localization and we only observed their reorganization after apoptosis induction showing a clear redistribution of CRT into clusters at the surface of apoptotic cells with a marked accumulation in blebs. We also noticed that CD47 is present in these blebs. This shows that modification of CRT/CD47 spatial proximity is neither a prerequisite for activating the calreticulin “eat-me” signal, nor inhibiting the CD47 interaction with the macrophage SIRP $\alpha$  receptor, although this was previously proposed<sup>7</sup>. It was also assumed that CRT and PS could contribute to common complexes needed for apoptotic cell recognition by phagocytes from their reported ability to interact in *in vitro* assays<sup>19</sup>. However, this was challenged by the fact they are not simultaneously translocated at the cell surface<sup>18,31</sup>. In this sense, we show that PS and CRT are usually not found in the same nano-domain with a particular segregation of CRT into the blebs but also in peculiar regions outside the blebs where PS is excluded, even if the role of these areas remains to be discovered. Therefore, our observations strongly suggest that when exposed on the outer surface of apoptotic cells, CRT, PS and CD47 act independently of each other to recognize their phagocyte receptors.

Next, we discovered by SPT experiments that CD47 exists in two different mobility states. In healthy adherent HeLa cells, about two-third of the CD47 population is found in a low mobility state, and one third in a high mobility state. Strikingly this ratio was found to be inverted on early apoptotic cells obtained by UVB irradiation. We wondered if this change toward the high-mobility state could be connected to the decrease of the CD47/SIRP $\alpha$  interaction characteristic of cells going into apoptosis. To provide insight into this question, we

investigated the impact of modulating components expected to be altered during apoptosis and implicated in CD47 regulation on the mobility of CD47 and its interaction with SIRP $\alpha$ . Because CD47 is an integrin associated protein, its activity is presumed to be affected by the integrin affinity state which is controlled by inside-out or outside-in signaling which is altered during apoptosis. Accordingly, exogenous destabilization of integrins by EDTA slightly diminished the CD47 mobility, whereas activation of integrins in HeLa cells increased the proportion of highly mobile CD47 at the cell surface. With our two-color SPT experiments, we also showed that some CD47 and  $\alpha v\beta 3$  integrin molecules were found co-localized in microdomains such as microvilli or vesicles-like domains and could be seen to move together transiently (Fig. 2c and SPT supplemental video). Stationary integrins, in contrast, assumed to be found in adhesion sites, did not co-localize with CD47. These observations argue that CD47 associates preferentially with mobile integrin in its low affinity state. However, our finding that MJDs measured for mobile  $\alpha v\beta 3$  integrins are similar to those of the low mobile CD47 molecules indicates that the highly mobile CD47 molecules are mostly unlinked to integrins. Together with our observation that CD47 mobility is enhanced after apoptosis induction, this also strongly suggests that during apoptosis development, CD47 molecules progressively lose their link with integrins. Nevertheless, although integrin activation consequently to Mn<sup>2+</sup> treatment induced an increase in CD47 mobility, this did not affect SIRP $\alpha$  binding or cell engulfment by macrophages, suggesting that CD47 binding to SIRP $\alpha$  is not directly dependent on integrin regulation by the outside face of the cell. Interestingly it was recently proposed by Morrissey et al.<sup>15</sup> that activating the macrophage integrins eliminates the suppressive CD47 effect through repositioning SIRP $\alpha$  outside of the phagocytic synapse. Conversely, it appears that integrins of the target cell are not directly involved in tuning the accessibility of CD47 to SIRP $\alpha$ .

Removing cholesterol abolished the highly mobile CD47 population, together with increasing the engulfment of cells by macrophages and decreasing the binding of SIRP $\alpha$  to the cell surface. With the knowledge that depleting cholesterol activates cell death and apoptosis<sup>45,46</sup>, this highlights the role of cholesterol to preserve the CD47 “don’t eat-me” signal. Cholesterol is involved in the regulation of membrane fluidity and is the major component of lipid rafts, where lipids are more ordered and tightly packed than on the surrounding bilayer. Lv and collaborators<sup>17</sup> have previously suggested that CD47 clustering in cholesterol-rich lipid rafts may be necessary for SIRP $\alpha$  binding. Our data confirm the importance of cholesterol to maintain SIRP $\alpha$  binding but also indicate that CD47 clustering is not critical for SIRP $\alpha$  binding since cells with a large proportion of highly mobile CD47, obtained by activating integrins, are efficiently recognized by SIRP $\alpha$ .

Apoptosis is marked by changes in cell adhesion resulting from intracellular signaling and cleavage of components of the focal adhesion complex<sup>47,48</sup> together with other major plasma membrane structural alterations. These major modifications can contribute to destabilization of lateral molecular interactions needed for the correct CD47 “don’t eat-me” signaling state toward the macrophage. They could induce conformational changes of CD47, altering its

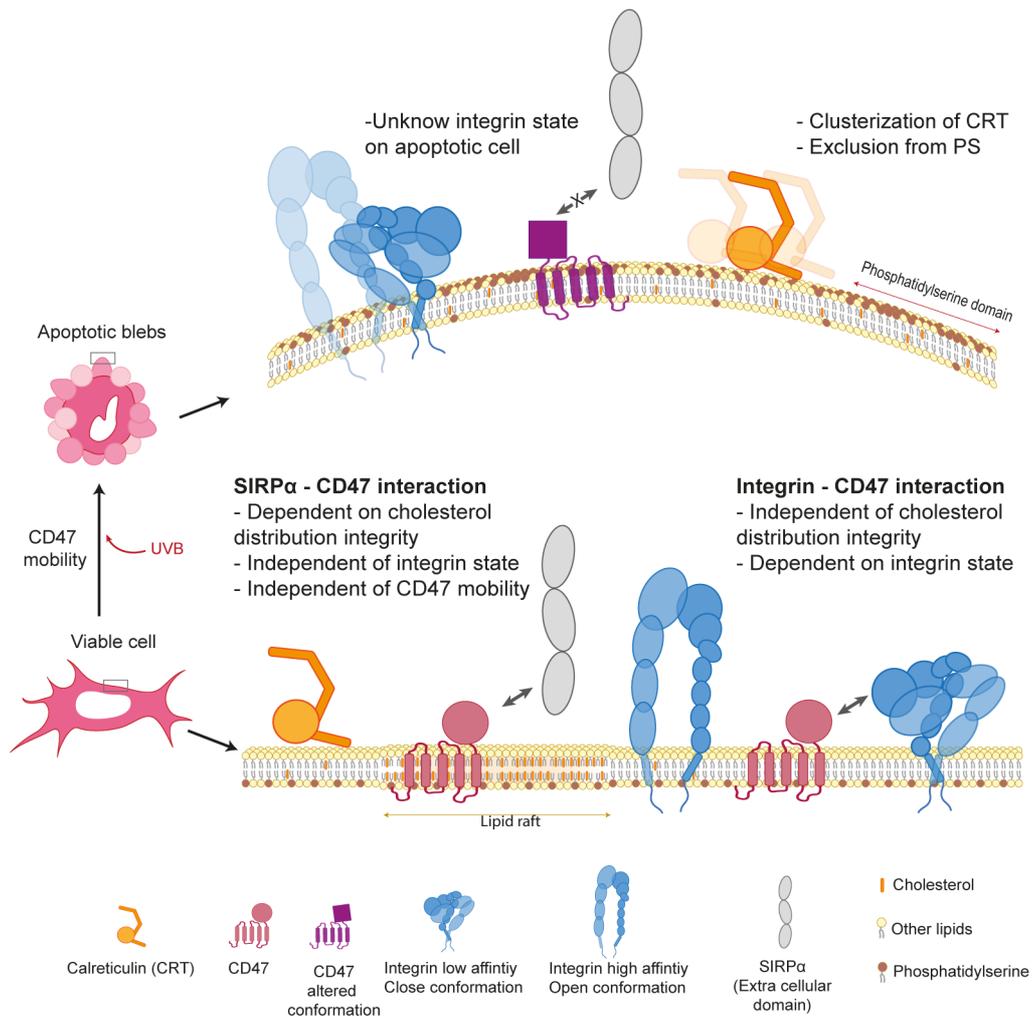
binding site to SIRP $\alpha$  or making it inaccessible. Our data showing that SIRP $\alpha$  does not bind to CD47 exposed on apoptotic blebs support the hypothesis that local perturbation of the plasma membrane could induce conformational changes of CD47 or that the SIRP $\alpha$  binding site becomes inaccessible (Fig. 6) potentially due to modification of the lipid environment<sup>41</sup> or to fluctuation of the plasma membrane flexibility<sup>49</sup>. Of note, such conformational changes were not detected by the used anti-CD47 antibody B6H12, which appeared to bind successfully to the CD47 epitope in all tested conditions. Nevertheless, this hypothesis is in line with data showing the influence of the lipid environment and cholesterol on membrane protein structure and conformation<sup>50,51</sup>. Interestingly, CD47 conformation or epitope modifications were shown at the cell surface of aged erythrocytes promoting TSP-1 recognition and subsequent clearance<sup>28,52</sup>.

During the writing of this paper, the whole 3D structure of CD47 was published<sup>53</sup>, and two conformations states were observed as a result of the flexibility of the inter-domain connecting the transmembrane domain to the extracellular domain of the molecule. Notably, disturbing the disulfide bond (Cys15-Cys245) increased dynamics of the inter-domain with transmitted conformational changes in the transmembrane and extracellular domains. Interestingly, destabilization of this cysteine bond impacts CD47-SIRP $\alpha$  interaction<sup>54</sup>. We can thus postulate that, by influencing membrane organization, cholesterol stabilizes the CD47 extracellular domain in one conformation governing its binding activity.

The opposing effects obtained on the CD47 mobility behavior by destabilizing cholesterol-rich domains or by activating integrins is in agreement with data showing that CD47- $\alpha$ v $\beta$ 3 interactions leading to integrin clustering are insensitive to cholesterol depletion<sup>55</sup>, even if it has been shown that cholesterol is essential for the formation of a multimolecular signaling complex composed of  $\alpha$ v $\beta$ 3, CD47 and G proteins<sup>41</sup>. This underlines the need for future investigations of the CD47/integrin interactions to highlight the role of CD47 in the modulation of integrin affinity or avidity toward its ligands, and associated signaling events.

Overall, the efficacy of CD47 “don’t eat-me” signal does not seem to be directly linked to its molecular mobility behavior in striking contrast to what has been proposed for the PS “eat-me” signal. Indeed it has been suggested that differences in PS mobility could explain why exposure of PS is not sufficient to be an effective “eat-me” signal (Appelt et al., 2005) and thus why cells that constitutively express PS are not engulfed<sup>21</sup>. Notably, our results showing that engulfment of lipids-coated beads by macrophages is more efficient when increasing PS mobility, experimentally supports this hypothesis.

To sum up, as schematized in Fig. 6, the present study provides new insight into the nanoscale reorganization and dynamics of CD47 induced by apoptosis and will contribute to establish how its cooperative interactions with the macrophage SIRP $\alpha$  receptor is dependent on fluctuations in the composition and properties of the plasma membrane. This may be beneficial to efficiently target the CD47-SIRP $\alpha$  phagocytosis inhibitory signal and cancer immunotherapy research.



**Figure 6: Illustration of the modifications on the cell membrane due to apoptosis, involving CD47, PS, CRT, integrins and cholesterol that impact CD47-SIRP $\alpha$  recognition and the exposure of eat-me signals.**

On viable cell, the extracellular domain of SIRP $\alpha$  interacts preferentially with CD47 located in high cholesterol content membrane domains. This interaction is independent of CD47 mobility and of the integrin state. When the cell becomes apoptotic, asymmetric distribution of lipid is lost leading to the phosphatidylserine exposition and to the lipid domain destabilization. The cell forms apoptotic blebs where calreticulin is relocated and eventually clustered. The destabilization of high cholesterol content domains promotes conformational destabilization of CD47 and avoids its recognition by the receptor SIRP $\alpha$ . The status of integrin on apoptotic blebs remains to be clarified.

## References

1. Feng, M. *et al.* Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **19**, 568–586 (2019).
2. Gordon, S. R. *et al.* PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* **545**, 495–499 (2017).
3. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
4. Morioka, S., Maueröder, C. & Ravichandran, K. S. Living on the Edge: Efferocytosis at the Interface of Homeostasis and Pathology. *Immunity* **50**, 1149–1162 (2019).
5. Henson, P. M. Cell Removal: Efferocytosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **33**, 127–144 (2017).
6. Hochreiter-Hufford, A. & Ravichandran, K. S. Clearing the Dead: Apoptotic Cell Sensing, Recognition, Engulfment, and Digestion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**, a008748–a008748 (2013).
7. 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).
8. Kojima, Y. *et al.* CD47 blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis. *Nature* **536**, 86–90 (2016).
9. Tsai, R. K. & Discher, D. E. Inhibition of 'self' engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *J. Cell Biol.* **180**, 989–1003 (2008).
10. Murata, Y., Saito, Y., Kotani, T. & Matozaki, T. CD47-signal regulatory protein  $\alpha$  signaling system and its application to cancer immunotherapy. *Cancer Sci* **109**, 2349–2357 (2018).
11. Veillette, A. & Chen, J. SIRP $\alpha$ –CD47 Immune Checkpoint Blockade in Anticancer Therapy. *Trends in Immunology* **39**, 173–184 (2018).
12. Brown, E. J. & Frazier, W. A. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends in Cell Biology* **11**, 130–135 (2001).
13. Sosale, N. G. *et al.* Cell rigidity and shape override CD47's "self"-signaling in phagocytosis by hyperactivating myosin-II. *Blood* **125**, 542–552 (2015).
14. Orazizadeh, M. *et al.* CD47 associates with alpha 5 integrin and regulates responses of human articular chondrocytes to mechanical stimulation in an in vitromodel. *Arthritis Research & Therapy* **10**, R4 (2008).
15. Morrissey, M. A., Kern, N. & Vale, R. D. CD47 Ligation Repositions the Inhibitory Receptor SIRPA to Suppress Integrin Activation and Phagocytosis. *Immunity* **53**, 290–302.e6 (2020).
16. Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13**, 54–61 (2007).
17. Lv, Z. *et al.* Loss of cell surface CD47 'clustering' formation and binding avidity to SIRP $\alpha$  facilitate apoptotic cell clearance by macrophage. *J Immunol* **195**, 661–671 (2015).
18. Osman, R., Tacnet-Delorme, P., Kleman, J.-P., Millet, A. & Frchet, P. Calreticulin Release at an Early Stage of Death Modulates the Clearance by Macrophages of Apoptotic Cells. *Frontiers in Immunology* **8**, (2017).
19. Païdassi, H. *et al.* Investigations on the C1q–Calreticulin–Phosphatidylserine Interactions Yield New Insights into Apoptotic Cell Recognition. *Journal of Molecular Biology* **408**, 277–290 (2011).

20. Wijeyesakere, S. J., Bedi, S. K., Huynh, D. & Raghavan, M. The C-terminal acidic region of calreticulin mediates phosphatidylserine binding and apoptotic cell phagocytosis. *J Immunol* **196**, 3896–3909 (2016).
21. Segawa, K., Suzuki, J. & Nagata, S. Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 19246–19251 (2011).
22. 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. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 16917–16922 (1999).
23. Krysko, D. V., Ravichandran, K. S. & Vandenabeele, P. Macrophages regulate the clearance of living cells by calreticulin. *Nat Commun* **9**, 4644 (2018).
24. Eggleton, P., Bremer, E., Dudek, E. & Michalak, M. Calreticulin, a therapeutic target? *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **20**, 1137–1147 (2016).
25. Feng, M. *et al.* Programmed cell removal by calreticulin in tissue homeostasis and cancer. *Nat Commun* **9**, 1–15 (2018).
26. Krysko, D. V. *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **12**, 860–875 (2012).
27. Schcolnik-Cabrera, A. *et al.* Calreticulin in phagocytosis and cancer: opposite roles in immune response outcomes. *Apoptosis* **24**, 245–255 (2019).
28. Wang, F. *et al.* Aging-associated changes in CD47 arrangement and interaction with thrombospondin-1 on red blood cells visualized by super-resolution imaging. *Aging Cell* **19**, e13224 (2020).
29. Verneret, M. *et al.* Relative Contribution of C1q and Apoptotic Cell-Surface Calreticulin to Macrophage Phagocytosis. *J Innate Immun* **6**, 426–434 (2014).
30. 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).
31. Panaretakis, T. *et al.* Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *The EMBO journal* **28**, 578–590 (2009).
32. Tarr, J. M. *et al.* A Mechanism of Release of Calreticulin from Cells During Apoptosis. *Journal of Molecular Biology* **401**, 799–812 (2010).
33. Weimann, L. *et al.* A Quantitative Comparison of Single-Dye Tracking Analysis Tools Using Monte Carlo Simulations. *PLOS ONE* **8**, e64287 (2013).
34. Abitorabi, M. A., Pachynski, R. K., Ferrando, R. E., Tidswell, M. & Erle, D. J. Presentation of Integrins on Leukocyte Microvilli: A Role for the Extracellular Domain in Determining Membrane Localization. *Journal of Cell Biology* **139**, 563–571 (1997).
35. Kaur, S., Elkahlon, A. G., Singh, S. P., Arakelyan, A. & Roberts, D. D. A function-blocking CD47 antibody modulates extracellular vesicle-mediated intercellular signaling between breast carcinoma cells and endothelial cells. *J. Cell Commun. Signal.* **12**, 157–170 (2018).
36. Tanaka, K. A. K. *et al.* Membrane molecules mobile even after chemical fixation. *Nature Methods* **7**, 865–866 (2010).
37. Kothakota, S. *et al.* Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis. *Science* **278**, 294–298 (1997).
38. Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C. & Han, J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research* **28**, 9–21 (2018).
39. Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).

40. Mould, A. P., Akiyama, S. K. & Humphries, M. J. Regulation of Integrin  $\alpha 5\beta 1$ -Fibronectin Interactions by Divalent Cations: EVIDENCE FOR DISTINCT CLASSES OF BINDING SITES FOR  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , AND  $Ca^{2+}$ (\*). *Journal of Biological Chemistry* **270**, 26270–26277 (1995).
41. Green, J. M. *et al.* Role of Cholesterol in Formation and Function of a Signaling Complex Involving  $\alpha v\beta 3$ , Integrin-Associated Protein (Cd47), and Heterotrimeric G Proteins. *Journal of Cell Biology* **146**, 673–682 (1999).
42. Pyshev, K. A., Klymchenko, A. S., Csúcs, G. & Demchenko, A. P. Apoptosis and eryptosis: Striking differences on biomembrane level. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1860**, 1362–1371 (2018).
43. Appelt, U. *et al.* Viable, apoptotic and necrotic monocytes expose phosphatidylserine: cooperative binding of the ligand Annexin V to dying but not viable cells and implications for PS-dependent clearance. *Cell Death Differ* **12**, 194–196 (2005).
44. Joffe, A. M., Bakalar, M. H. & Fletcher, D. A. Macrophage phagocytosis assay with reconstituted target particles. *Nat Protoc* **15**, 2230–2246 (2020).
45. Li, Y., Kim, Y., Park, M. & Kim, C. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol depleting agents. *Cancer Res* **65**, 1297–1297 (2005).
46. Verstraeten, S. L. *et al.* Membrane cholesterol delays cellular apoptosis induced by ginsenoside Rh2, a steroid saponin. *Toxicology and Applied Pharmacology* **352**, 59–67 (2018).
47. Fink, S. L. & Cookson, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect Immun* **73**, 1907–1916 (2005).
48. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 231–241 (2008).
49. Steinkühler, J. *et al.* Membrane fluctuations and acidosis regulate cooperative binding of ‘marker of self’ protein CD47 with the macrophage checkpoint receptor SIRP $\alpha$ . *J Cell Sci* **132**, jcs216770 (2019).
50. Grouleff, J., Irudayam, S. J., Skeby, K. K. & Schiøtt, B. The influence of cholesterol on membrane protein structure, function, and dynamics studied by molecular dynamics simulations. *Biochim Biophys Acta* **1848**, 1783–1795 (2015).
51. Sengupta, D. & Chattopadhyay, A. Molecular dynamics simulations of GPCR–cholesterol interaction: An emerging paradigm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1848**, 1775–1782 (2015).
52. Burger, P., Hilarius-Stokman, P., de Korte, D., van den Berg, T. K. & van Bruggen, R. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood* **119**, 5512–5521 (2012).
53. Fenalti, G. *et al.* Structure of the human marker of self 5-transmembrane receptor CD47. *Nat Commun* **12**, 5218 (2021).
54. Rebres, R. A., Vaz, L. E., Green, J. M. & Brown, E. J. Normal ligand binding and signaling by CD47 (integrin-associated protein) requires a long range disulfide bond between the extracellular and membrane-spanning domains. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 34607–34616 (2001).
55. McDonald, J. F., Zheleznyak, A. & Frazier, W. A. Cholesterol-independent Interactions with CD47 Enhance  $\alpha v\beta 3$  Avidity. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 17301–17311 (2004).
56. Kay, J. G., Koivusalo, M., Ma, X., Wohland, T. & Grinstein, S. Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *MBoC* **23**, 2198–2212 (2012).

57. Tietjen, G. T. *et al.* Molecular mechanism for differential recognition of membrane phosphatidylserine by the immune regulatory receptor Tim4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E1463-1472 (2014).
58. Païdassi, H. *et al.* C1q Binds Phosphatidylserine and Likely Acts as a Multiligand-Bridging Molecule in Apoptotic Cell Recognition. *The Journal of Immunology* **180**, 2329–2338 (2008).
59. Hoogendoorn, E. *et al.* The fidelity of stochastic single-molecule super-resolution reconstructions critically depends upon robust background estimation. *Scientific Reports* **4**, 3854 (2014).
60. Ovesný, M., Křížek, P., Borkovec, J., Švindrych, Z. & Hagen, G. M. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics* **30**, 2389–2390 (2014).
61. Culley, S. *et al.* NanoJ-SQUIRREL: quantitative mapping and minimisation of super-resolution optical imaging artefacts. *Nat Methods* **15**, 263–266 (2018).
62. Levet, F. *et al.* SR-Tesseler: a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. *Nature Methods* **12**, 1065–1071 (2015).
63. Levet, F. *et al.* A tessellation-based colocalization analysis approach for single-molecule localization microscopy. *Nat Commun* **10**, (2019).
64. Ma, H., Jiang, W., Xu, J. & Liu, Y. Enhanced super-resolution microscopy by extreme value based emitter recovery. *bioRxiv* 295261 (2018) doi:10.1101/295261.
65. Ma, H., Xu, J. & Liu, Y. WindSTORM: Robust online image processing for high-throughput nanoscopy. *Science Advances* **5**, eaaw0683 (2019).
66. Wimmi, S. *et al.* Dynamic relocalization of cytosolic type III secretion system components prevents premature protein secretion at low external pH. *Nat Commun* **12**, 1625 (2021).
67. Koulouras, G. *et al.* EasyFRAP-web: a web-based tool for the analysis of fluorescence recovery after photobleaching data. *Nucleic Acids Research* **46**, W467–W472 (2018)

## Materials and methods

### Cell culture

HeLa (CCL2) and J774 (TIB 67) cell lines were provided by the ATCC. The cells were grown in Glutamax DMEM (ThermoFisher) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal calf serum, penicillin (0.3 U/ml) and streptomycin (0.3 µg/ml). The cells were tested for Mycoplasma contamination (Mycoalert detection kit, Lonza). All cell lines were maintained at 37°C, under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Apoptosis of HeLa cells was induced by UVB irradiation (1000 mJ/cm<sup>2</sup>) at 312 nm as previously described<sup>58</sup>.

## **Antibodies and reagents**

The following antibodies and molecules were used (concentrations used are indicated in parentheses): Chicken polyclonal anti-calreticulin (Thermofisher, PA1-902A, 4,4 µg/mL), Rabbit polyclonal anti ERp57 (Abcam, ab10287, Dilution 1:100), Mouse anti CD47 conjugated to Alexa Fluor A647 (Santa Cruz, B6H12, 2 µg/mL), Annexin V conjugated to Biotin (Biolegend, 640904, 2.5 µg/mL), Rabbit Polyclonal anti-Chicken IgY labeled with Alexa Fluor 532 (Cohesion Biosciences, CSA3314, 5 µg/mL), Goat polyclonal anti-Chicken labeled with Alexa Fluor 555 (Thermofisher, A21437, 2µg/mL), Donkey polyclonal anti-Rabbit IgG labeled with FluoProbes 647H (Interchim, FP-SC5110, 10 µg/mL), Streptavidin conjugated to Alexa Fluor 647 (Thermofisher, S32357 - 0,4 µg/mL).

## **Microscopy and data analysis**

### **STORM**

Cells were plated Nunc™ Lab-Tek™ II Chambered Coverglass (Thermofisher, 155409) at ~50000 cells per well the day prior to fixation. Before seeding, to minimize background noise, the Lab-Tek was cleaned with an ultraviolet Ozone cleaning system (UVOCS®) during 20 min. In addition, to increase the adhesion of apoptotic cells, the Lab-Tek was coated with Poly-D-lysine Hydrobromide (Sigma, P7886) at 0.2 mg/mL during 2 hours or over the night at room temperature. All the following steps were performed after fixation except for the phosphatidylserine detection with annexin V-biotin performed in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup> pH 7.4 during 30 min on ice to avoid internalization. Cells were washed gently with PBS at 37°C, fixed for 10 min at 37°C with 3% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, 15710) and 0.1% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, 16020) in PBS to immobilize the membrane (Tanaka et al., 2010). After fixation, cells were washed and incubated for 30 min with 100 µM CuSO<sub>4</sub> in ammonium acetate (100mM, pH 7,4) to react with free aldehyde and to reduce background fluorescence from apoptotic cells (personal observation). Then, the cells were blocked for 1 hour with 3% bovine serum albumin (Sigma, A7030) in PBS before staining for 1 hour with primary antibodies in PBS, 3% BSA. Thorough washing was performed with PBS, 5 times with 10 min incubation between each washing before incubation with secondary antibodies or streptavidin in PBS, 3% BSA for 45 min at room temperature. Finally, the cells were washed 3 times with PBS and incubated with fiducial marker: sonicated Gold nanoparticles (Sigma, 753688) at 1:8 dilution in PBS, overnight. For Alexa Fluor 555 and FluoProbes 647H secondary antibodies staining, an additional fixation step was performed to stabilize secondary antibodies for 10 min at room temperature with 3% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in PBS. Before imaging, cells were washed gently, immersed with the imaging buffer and the wells were sealed with a coverslip and picodent twinsil® (Picodent, 1300 1000) to limit gas exchange. The imaging buffer was composed of 50 mM Tris, 10% (w/v) D-glucose, 10 mM NaCl, pH 8.0, an oxygen scavenging system composed of 0.5 mg/mL glucose oxidase (Sigma, G2133-50KU), 40 µg/mL catalase (Sigma, C40) and 10 or 100 mM MEA (Cysteamine) according to the dye used. The

concentration of 100 mM MEA (Sigma, 30070) was used for Alexa Fluor 532 and 647 and 10 mM was used for Alexa Fluor 555 and FluoProbes 647H fluorophores combination

Cells were imaged on a home-built PALM setup based on an Olympus IX81 inverted microscope equipped with a x100 1.49 NA oil immersion apochromatic objective lens (Olympus). Widefield illumination was achieved by focusing the diode-pumped solid-state 405 nm (CrystaLaser), 532 nm (CNI Laser), 561 nm (Cobolt Jive) and 642-nm laser (Toptica Photonics), beams to the back focal plane of the objective. Laser illuminations intensities were tuned by an acousto-optical tunable filter (AOTF; Quanta Tech). Fluorescence images were acquired onto a 256×256 pixel region of an Evolve 512 back-illuminated EMCCD camera (Photometrics) controlled by the Metamorph software (Molecular Devices). The two colors acquisition was performed sequentially and 15000 to 20000 frames were recorded for each condition.

The following longpass dichroic mirrors were used to reflect the excitation sources listed above: ZT532/640rpc-UF1 (Chroma) for 532 nm and 642 nm, FF580-FDi01-25x36 (semrock) for 561 nm. Fluorescence passed through either one of the following bandpass emission filters: ZET532/640m (Chroma) for A532, A647, F647H dyes and FF01-630/92-25 (Semrock) for A555 dye.

The A647 or F647H dyes were imaged first at 20 Hz with a 642 nm laser ( $2.1 \text{ kW x cm}^{-2}$  at the beam center). Next the A532 or A555 dyes were imaged at 50 Hz with a 532 nm laser ( $3.1 \text{ kW x cm}^{-2}$  at the beam center). For the A555 dye, 561 nm laser ( $1.8 \text{ kW x cm}^{-2}$  at the beam center) was used in combination to the 532 nm laser. During data acquisition, a continuous focus system (ZDC, Olympus) was used to maintain a constant focal plane.

To estimate chromatic aberration shift, TetraSpeck™ microspheres 100 nm (Thermofisher, T7279) embedded in the imaging buffer without the scavenging system were imaged in the same conditions as used during acquisition.

Streams were treated next using imageJ. To remove uniform background noise, the temporal median filter was performed on images with a 100 frames interval<sup>59</sup> using GDSC Single Molecule Light Microscopy (SMLM) ImageJ Plugins (<https://github.com/aherbert/gdsc-smlm>). Images were next analyzed with ThunderSTORM<sup>60</sup>. The drift correction was performed thanks to fiducial marker. If no fiducials were present, cross correlation was performed on the table or on the stream. To allow registration of sequential acquisition the drift displacement of the first channel was applied on the second channel thanks to the ChriSTORM macros and scripts (<https://github.com/cleterrier/ChriSTORM>). The chromatic aberration correction was performed using Detection of Molecules (DoM) plugin v.1.2.1 for imageJ ([https://github.com/ekatrunkha/DoM\\_Utrecht](https://github.com/ekatrunkha/DoM_Utrecht)). Finally the FRC was estimated on the whole image thanks to NanoJ-SQUIRREL imageJ plugin<sup>61</sup>. Voronoï tessellation analysis was computed to quantify cluster size, Spearman's rank correlation and Manders' coefficients were computed on 2 channels using SR-Tesseler and Coloc-Tesseler software<sup>62,63</sup>. Segmentations of the clusters and Manders' coefficients were obtained by applying a

threshold based on one time the average density ( $\delta$ ) of the whole dataset. The Spearman's rank analysis was performed on the whole cell and specific areas of  $2.6 \mu\text{m}^2$ . Control experiments were performed to have reference values. The theoretical positive control was obtained after splitting localization from even and odd frames. The negative control was obtained after flipping vertically the localizations. The experimental control was obtained after staining the calreticulin (green) with an anti-calreticulin (PA1-902A) and two secondary antibodies labeled with a rabbit polyclonal anti chicken IgY labeled with Alexa Fluor 532 and a goat polyclonal anti-mouse labeled with Alexa Fluor 647 (Thermofisher, A21236,  $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ) that we found to cross react with IgY from chicken.

### **Single particle tracking**

Cells were plated in Lab-Tek™ Chambered Coverglass 8-well (Thermofisher, 155411) at  $\sim 50000$  cells per well the day prior to fixation. Prior seeding, the Lab-Tek was cleaned with an ultraviolet Ozone cleaning system (UVOCS®) during 20 min. All the following steps were performed at  $37^\circ\text{C}$  under a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere and in DMEM fluorobrite medium (Thermofisher, A1896701). Cells were washed and then incubated or not with reagents: 10 mM M $\beta$ CD (Santa Cruz, sc-215379) during 15 min or  $5 \mu\text{M}$  CytD (Sigma, C8273), 1 mM  $\text{Mn}^{2+}$  (Sigma, M3634) for 30 min. For the apoptosis induction, cells were irradiated directly within the Lab-Tek and stained after 4 hours. After treatment, the cells were washed and incubated with the anti CD47 (B6H12) labeled with Alexa Fluor 647 at  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  during 5 min. Next, cells were washed and imaged in DMEM fluorobrite (containing D-glucose at  $4.5 \text{ g}/\text{L}$ ) supplemented with an oxygen scavenging system ( $0.1 \text{ mg}/\text{mL}$  glucose oxidase,  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$  catalase) to reduce photobleaching by oxygen. Finally, to minimize gas exchange, the wells and the lid were sealed with picodent twinsil. For the EDTA condition and to avoid cell detachment during washing steps, cells were imaged directly in  $0.48 \text{ mM}$  EDTA in PBS (Thermofisher, 15040066) supplemented in with D-glucose at  $4.5 \text{ g}/\text{L}$  to allow glucose oxidase activity. Concerning the fixation conditions, cells were washed after primary antibody incubation and next fixed for 10 min at  $37^\circ\text{C}$  with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, 15710) in PBS or 3% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, 16020) in PBS. Cells were then incubated or not with 0.05 % saponin (Sigma, S-4521) in PBS, 3% BSA during 1 h at  $37^\circ\text{C}$ .

Cells-coverslip interface were imaged by TIRF on the same home-built PALM setup used for STORM microscopy. The temperature of imaging was maintained to  $37^\circ\text{C}$ . Depending of the conditions, 2000 to 4000 frames were recorded at 33 Hz with 1% laser of the maximal laser power (give power laser). For the two colors single particle tracking acquisition two cameras Evolve 512 back-illuminated EMCCD camera (photometrics) were used with a dichroic splitter FF640-FDi02-t3-25\*36 (Semrock). Cells were illuminated simultaneously with a 532 nm laser ( $2.4 \text{ W} \times \text{cm}^{-2}$  at the beam center) and a 642 nm laser ( $13 \text{ W} \times \text{cm}^{-2}$  at the beam center) and recorded at 33 Hz

To remove non-uniform background without removing immobile signal coming from non-diffusing molecules, the EVER (Enhanced super-resolution microscopy by extreme value based emitter recovery) ImageJ plugin was used to pre-process images before analysis<sup>64,65</sup>. The background smooth kernel width was set to 1 on non-fixed cells and to 3 for fixed cells. Images were next analyzed with ThunderSTORM<sup>60</sup>. The wavelet filter was selected and single-molecule least-squares Gaussian function fitting was used for localization. Next, to reconstruct the tracks, the localization tables were analyzed with the SWIFT software 0.3.1<sup>66</sup>. The data were filtered to remove the shortest tracks and only tracks with more than 10 counts were kept. The MJD (Mean Jump Distance) of each track was calculated and the two Gaussian distribution was fitted using Prism GraphPad software. The amplitude, the mean and the standard deviation of each Gaussian distribution was extracted to calculate the area under curve corresponding to the proportion of each population. Finally, the fraction of the high mobility population was obtained after dividing the proportion of high mobility population by the proportion of the total population of MJD.

### **Confocal microscopy**

All samples were visualized under a laser spinning-disk confocal microscope (Olympus & Andor, M4D cell imaging platform, ISBG). Cells were prepared as for single particle experiment. All the following steps were performed at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and in DMEM Fluorobrite medium (Thermofisher, A1896701). First the cells were washed gently and then incubated or not with reagents: 10 mM M $\beta$ CD (Santa Cruz, sc-215379) during 15 min or 5  $\mu$ M CytD (Sigma, C8273), 1 mM Mn<sup>2+</sup> (Sigma, M3634), Mouse anti-CD47 (B6H12, 10  $\mu$ g/mL) during 30 min at 37°C. Then, the cells were washed and incubated with the recombinant biotinylated SIRP $\alpha$  extracellular domain fusion protein (SIRP $\alpha$ .ex-Fc, R&D, BT4546B-050, 5  $\mu$ g/mL) during 30 min. To detect biotinylated SIRP $\alpha$ .ex-Fc, cells were washed and incubated with streptavidin Alexa Fluor 647 (Thermofisher, S32357, 5  $\mu$ g/mL) during 15 min. Then, cells were washed and fixed for 10 min at 37°C with 3% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, 15710) and 0.1% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, 16020) in PBS. Finally, the cells were imaged in Fluoromount G with DAPI (SouthernBiotech, 0100-20) using a 60x objective. To image the whole cells, multiple slices were taken with a Z distance calculated according to the Nyquist criterion. The density of SIRP $\alpha$  labeling was quantified by an ImageJ analysis. Briefly, the shape of cells was determined from DIC and autofluorescence in 405 nm and 488 nm channel. Max projection of Z plane was compiled to allow 2D analysis. The find maxima function was used to discriminate each "cluster" according to a fixed threshold. Finally, the density of SIRP $\alpha$  binding was calculated by dividing the number of clusters by the area of the cell.

For simultaneous detection of SIRP $\alpha$  and CD47, the SIRP $\alpha$  binding was performed as previously. After the fixation, the CD47 molecule was labeled as described in the STORM section with a mouse anti CD47 (B6H12, 2  $\mu$ g/mL) and detected with a secondary goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Thermofisher, A-11017, 10  $\mu$ g/mL). Finally, the cells were imaged in ProLong<sup>™</sup> Glass antifade (Thermofisher, P36982) mounting medium in the presence of

Hoechst with a 100x objective. One representative slice was selected and 3D lateral representation was performed on visualization software Imaris (Oxford instruments).

For the time lapse imaging of HeLa apoptosis, cells were irradiated directly within the Lab-Tek with UVB and then stained with Hoescht 33342 (Thermofisher, 62249, 5µg/mL) during 5 min to detect the nucleus. Cells were next imaged in DMEM Fluorobrite supplemented with Annexin V labeled with Alexa Fluor 647 (Biolegend, 640912, 2.5 µg/mL) to detect the exposition of phosphatidylserine. Cells were visualized 4 hours after irradiation with a 60x objective, at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and one image was acquired each 30 s.

### **Flow cytometry**

Cells were seeded one day before the collect at 1.5 millions of cells in a P100 dish in complete DMEM. Before UVB irradiation, the medium was changed. Four hours after irradiation, the supernatants of irradiated and non-irradiated cells were collected and adherent cells were harvested with Versene solution (Thermofisher, 15040066). Cells were washed with PBS and then fixed except for the phosphatidylserine detection; cells were incubated prior fixation with Annexin V biotin in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup> pH 7.4 during 30 min on ice. Cells were then washed in PBS, fixed for 10 min with 3% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, 15710) and 0.1% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, 16020) solution at 37°C. All the following steps were performed at room temperature and separated by washing steps. Cells were blocked with PBS, 3% BSA (Sigma, A7030) for 15 min. Primary antibodies against CRT, ERp57 and CD47 directly labeled with Alexa Fluor 647 in PBS, 3% BSA were added for 45 min at RT. Cells were incubated next in the dark for 30 min with secondary antibodies when necessary or labeled streptavidin and then suspended in PBS for flow cytometry analysis. Control was done by omitting primary antibody. Flow cytometry analyses were performed with MACSQuant VYB cytometer and at least 10000 events in the analysis gate were collected (Miltenyi Biotec, M4D cell imaging platform, ISBG). Collected data were treated with MACSQuantify software (Miltenyi Biotec) and dot plot were represented with Graphpad Prism 8.

### **Phagocytosis Assay**

J774 cells were labeled with CFSE (Thermofisher, C34554) and HeLa cells were labeled with PKH26 (Sigma, MINI26-KT) dye following manufacturer's recommendations. Cells were allowed to adhere overnight. HeLa cells were detached with Versene solution, washed and incubated with reagents: 10mM MβCD (Santa Cruz, sc-215379) during 15 min or 5 µM CytD (Sigma, C8273), 1 mM Mn<sup>2+</sup> (Sigma, C8273), mouse anti-CD47 (B6H12) at 10 µg/mL during 30 min at 37°C. Then, cells were washed and added to J774 macrophages at a ratio of 2:1 (HeLa:J774), for 2 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in serum-free DMEM. Cells were then washed and harvested with 0.25% trypsin/EDTA (Thermofisher, 25300054) and kept on ice before analysis by flow cytometry. The percentage (%) of PKH26-HeLa cells in the CFSE-J774 macrophage population was determined for each condition and normalized by the value of phagocytosis of non-treated cells giving the value of the phagocytic index. For each condition, negative

controls corresponding to phagocytosis performed at 37°C in the presence of 5 µM CytD were subtracted. For the anti-CD47 condition, J774 were pre-incubated with IgG isotype control at 10 µg/mL (Santa Cruz, sc-3877) to block Fc receptor contribution during phagocytosis.

### **Immunoprecipitation and Western blot analysis**

Adherent cells were washed twice in cold phosphate-buffered saline and lysed in RIPA buffer (ThermoFisher, 89900) (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Nonidet, P-40, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% sodium dodecyl) with freshly added protease inhibitor mixture (Roche, 5056489001). Cells debris were removed by centrifugation at 9000 g for 20 min at 4°C. A micro BCA assay was used to quantify protein concentration. Cell lysates were precleared with dynabeads protein G magnetic beads (ThermoFisher, 10003D). Immunoprecipitation was performed overnight at 4°C with 40 µl of dynabeads protein G that were preincubated with 8 µL of rabbit antibody anti-β3 integrin subunit (Sigma, AB2984). After washing the beads with lysis buffer, immunoprecipitated proteins were eluted with SDS sample buffer under non-reducing conditions. They were analyzed by western blotting after separation on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using the mouse monoclonal anti-CD47 antibody (B6H12, Santa Cruz, sc-12730, dilution 1:200) and a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for chemiluminescence detection (Sigma, A0545, dilution 1:3000).

### **Lipid coated beads and phagocytosis**

Silica 5 µm beads (Bang laboratories, ssd5003) and borosilicate glass vial were cleaned with an ultraviolet Ozone cleaning system (UVOCS®) during 10 min. Lipids in chloroform were transferred in glass vial at the following proportions: 89 % POPC (Avanti polar lipids, 850457C) or DPPC (Avanti polar lipids, 850355C), 10 % DOPS (Avanti polar lipids, 840035C) and 1% TopFluor PS (Fluorescent PS analog to allow fluorescence detection, Avanti polar lipids, 810283C) and dried under nitrogen gas. Then they were suspended in sterile DPBS at 2 mg/mL, quickly vortexed and sonicated during 20 min. Then silica beads in PBS were added to the lipids in order to obtain a concentration of 1 mg/mL lipids and 1% w/vol beads. The mix was sonicated during 15 min and next left under agitation during 30 min. Finally, the beads were washed two times and suspended in PBS to 1% w/vol beads. Uniform lipid coating was checked by flow cytometry. Beads were added to J774 macrophages at a ratio of 10:1 (beads:J774), for 1 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in serum-free DMEM. J774 were then washed and harvested with 0.25% trypsin/EDTA and kept on ice before analysis by flow cytometry. To assess the global lipids mobility reduction within DPPC in comparison to POPC bilayer, we monitored the mobility of the fluorescent PS analog TopFluor PS by FRAP experiments performed with a spinning disk confocal microscope (Olympus & Andor, M4D cell imaging platform, ISBG). Data were analyzed with EasyFRAP-web<sup>67</sup>

## **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

The details of each quantification during super-resolution images processing are included in the Methods section. Statistical analysis was performed in Prism 8 (GraphPad). The statistical tests used and sample sizes were mentioned in the figure legend.

## **SUPPLEMENTAL VIDEOS**

Movie 1 and 2: Single particle tracking of integrin  $\alpha\beta3$  and CD47 on the surface membrane of a HeLa viable cell represented in Figure 4b. The movie represents 500 images at 12 images/s speed. Each image corresponds to 34 ms exposure time. Filtered tracks of 10-images length were reconstructed with SWIFT on the left. The corresponding localizations are represented on the right. The square delimits the zone enlarged in the movie 2. Analysis of the two-color tracking data reveals that 3.4 % of the  $\alpha\beta3$  tracks and 1.9% of the CD47 tracks show partial co-diffusing patterns (movie 1). The overall rare observation of co-diffusion in fact can be fully explained by the low labeling density of the two partners which is required to properly track single diffusing molecules.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work used M4D facilities at the Grenoble Instruct-ERIC Center (ISBG; UMS 3518 CNRS CEA-UGA-EMBL) with support from the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI; ANR-10-INSB-05-02) and GRAL, a project of the University Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003) within the Grenoble Partnership for Structural Biology. Research reported in this manuscript was supported by the French National Research Agency (grant ANR-16-CE11-0019) and GRAL (7C047GRAL). IBS acknowledges integration into the Interdisciplinary Research Institute of Grenoble (IRIG, CEA. We are grateful to Dr Ulrike Endesfelder (Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology, Marburg, Germany) to provide us the swift tracking software. We thank Dr. Joanna Timmins for critical reading of the manuscript.

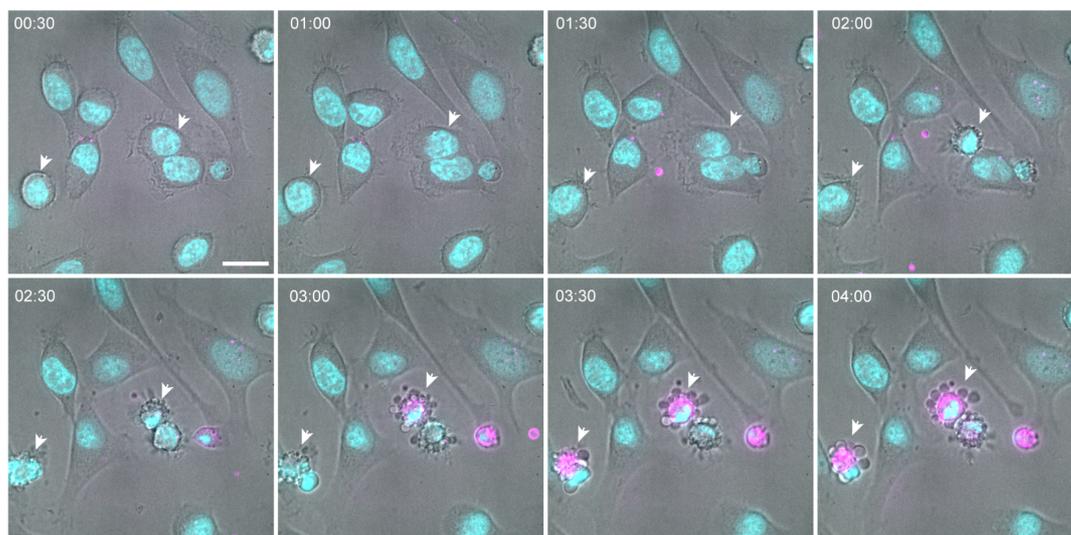
## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Conceptualization, S.D., D.B. and P.F.; Methodology, S.D., P.F, P. T-D. and D.B.; Investigation, S.D., P.T-D., O. G. and J-P. K.; Validation, P.F. and D.B. Writing – Original Draft Preparation P.F and S.D; Visualization, S.D. and P.F.; Funding Acquisition, N.T. and P.F.; Writing – Review & Editing, P.F., D.B, J-P. K., N.T. and D.B.; Supervision, P.F. and D.B.

## **DECLARATION OF INTERESTS**

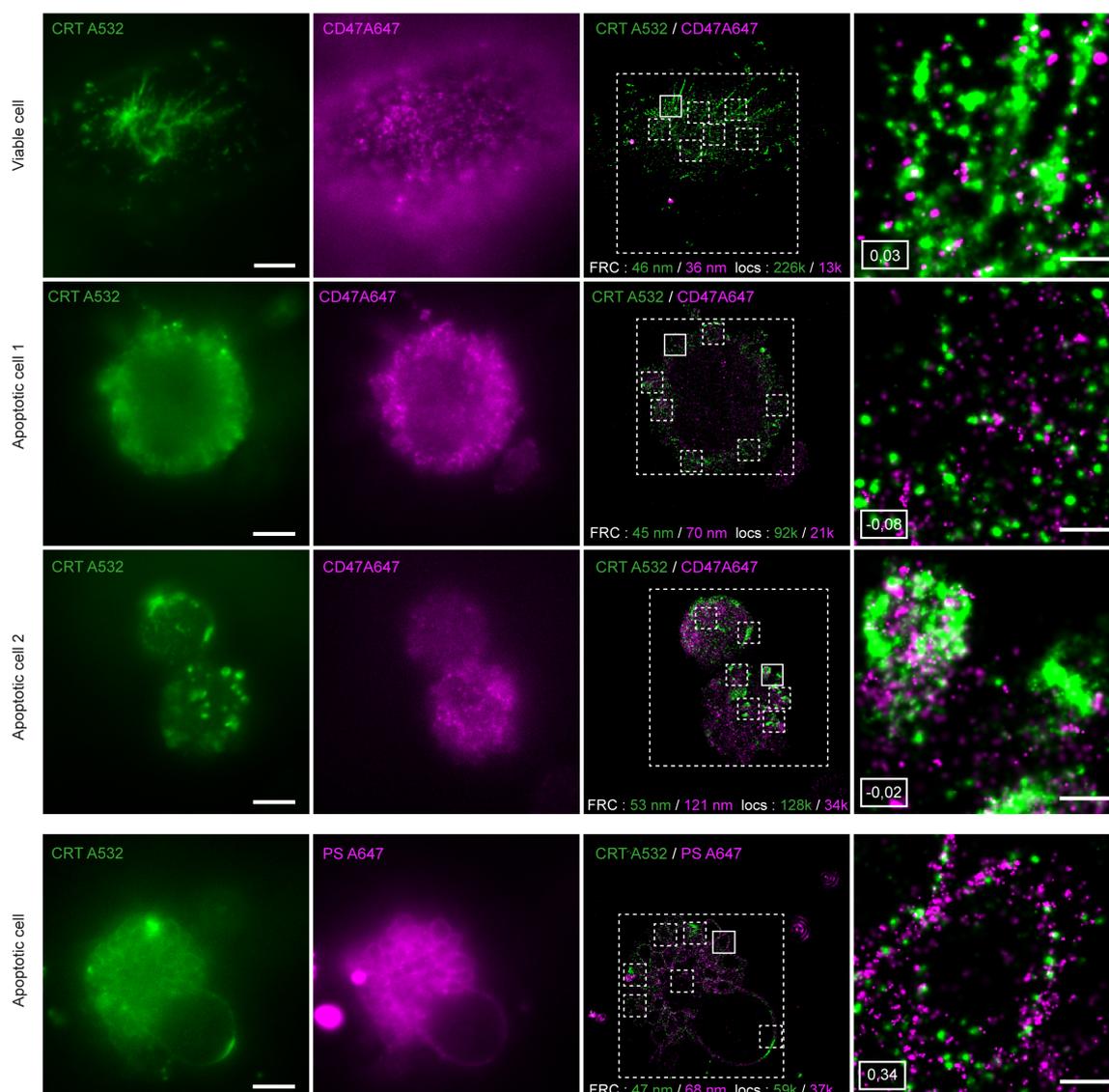
The authors declare that there is no conflict of interest

Supplemental figures S1-S6



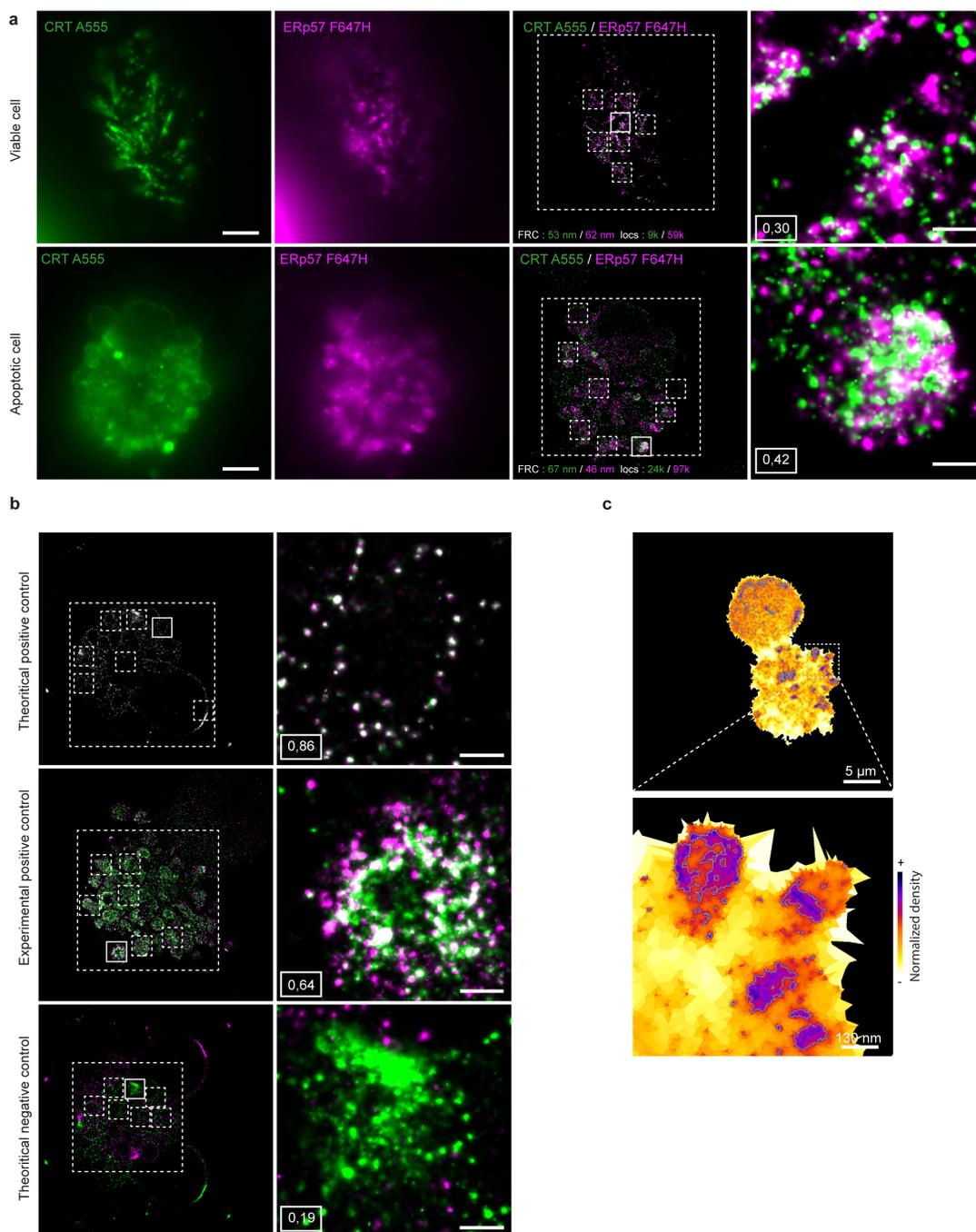
**Figure S1. Characterization of our UVB-induced apoptosis cellular model.**

HeLa cells were irradiated with UVB and then stained with Hoescht 33342 (cyan) to detect the nucleus and imaged in the presence of Alexa fluor 647-labeled Annexin V (magenta) to detect the phosphatidylserine exposure. Cells were visualized 4 hours after irradiation with a spinning disk confocal microscope to create atime lapse imaging of apoptotic HeLa. Images shown were selected every 30 minutes as indicated. Arrows point cells undergoing typical membrane shrinkage and blebbing as they were selected as typical apoptotic cells in our cell samples for STORM and SPT analysis. The first step is the cell rounding resulting from the retraction of the cell (2:00). After that, apoptotic membrane blebbing begins, which involves the formation ofcircular bulges at the plasma membrane (2:30). Then at a later stage, drastic changes in cell shape occur that are called dynamic blebbing (3:00–4:00). Scale bar 20  $\mu$ m.



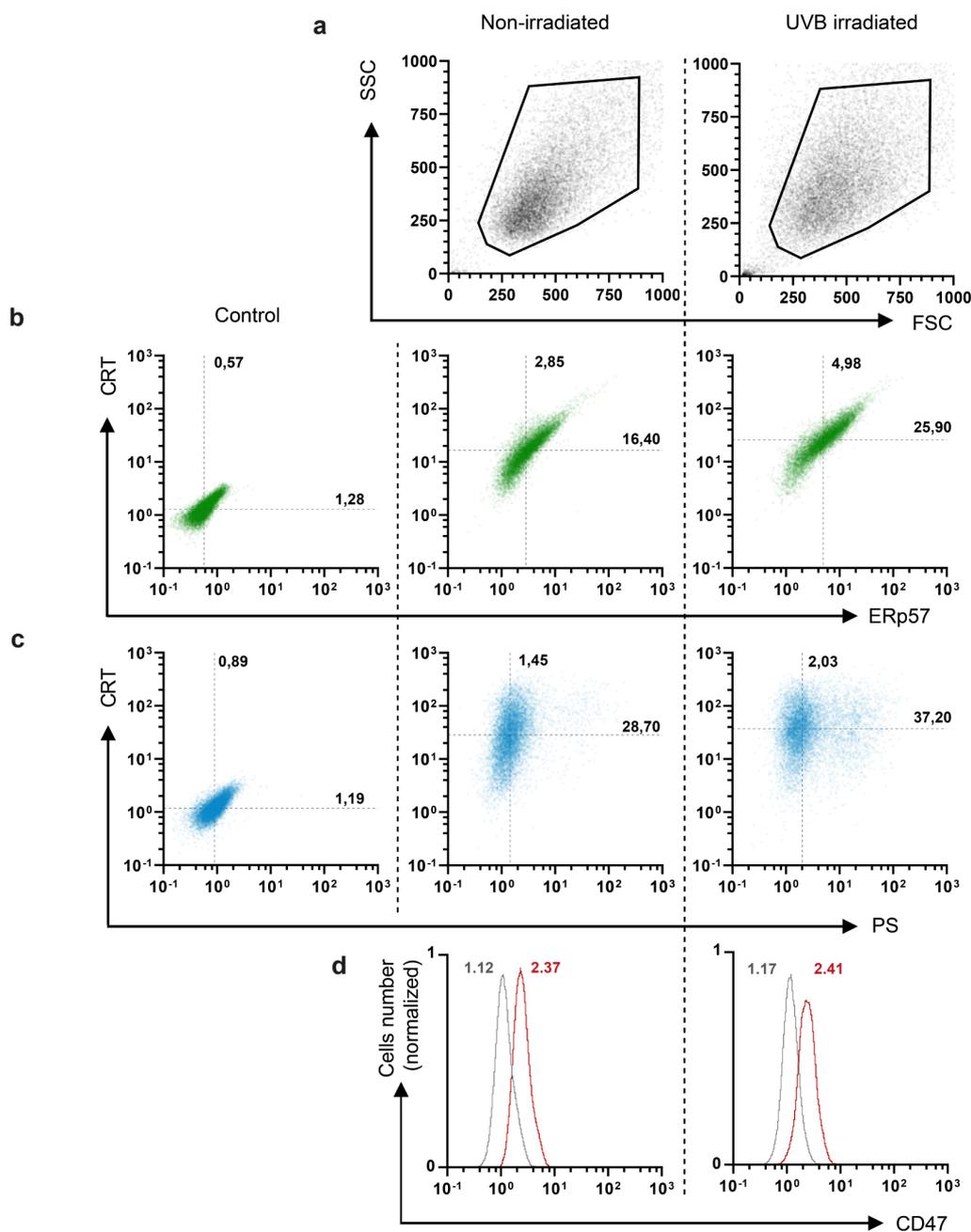
**Figure S2. STORM images details and their corresponding widefield views.**

(a) STORM images shown in Figure 1 with their corresponding widefield (WF) views imaged at low laser power. Regions selected to perform Spearman's rank correlation analysis (as shown in Figure 1e) are represented on the two-color images. The solid square corresponds to the zoomed views on the right. The FRC (Fourier Ring Correlation) used to evaluate the resolution for both label and number of localizations ( $k = 1000$ ) are indicated at the bottom of the two-color STORM images. The corresponding Spearman's rank correlation value is presented at the bottom of the zoomed view. Scale bars,  $5\mu\text{m}$  on WF and STORM images;  $500\text{ nm}$  on zoomed view.



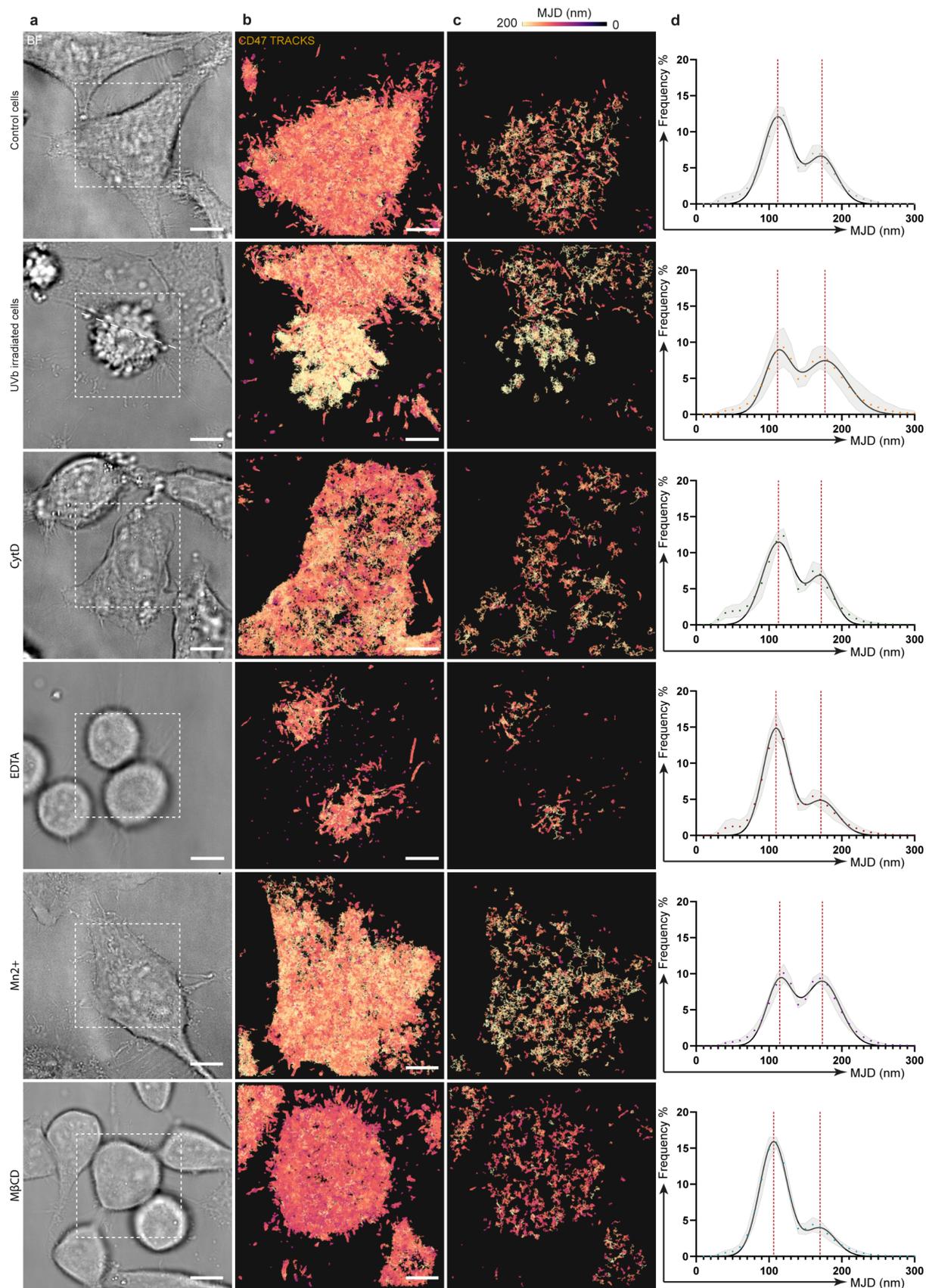
**Figure S3. Images used to calibrate Spearman rank correlation analysis and cluster sizes.**

(a) ERp57/CRT colocalization. ERp57 (magenta) and calreticulin (green) were detected with anti-ERp57 (ab10287) and anticalreticulin (PA1-902A) and revealed by secondary antibodies labeled with FluoProbes 647H and Alexa Fluor 555 fluorophores respectively. (b) The theoretical positive control was obtained after randomly splitting the localizations from CRT A532-image (Figure 1d) to obtain two channels. The experimental positive control was obtained after staining the calreticulin (green) with an anti-calreticulin (PA1-902A) and two distinct secondary antibodies labelled with A532 and A647 fluorophores respectively. The theoretical negative control was obtained after flipping vertically the localizations from CRT A532-image (Figure 1e) to obtain two channels. Selected regions to perform Spearman's rank correlation analysis represented in Figure 1 are shown on the two-color images. The solid square corresponds to the zoomed view. The Spearman's rank correlation value is indicated at the bottom of the zoomed view. Scale bars, 5 μm on WF and STORM images, 500 nm on zoomed view. (c) Images show the density maps of the apoptotic cell (Figure 1c) computed from the Voronoi diagram, normalized by the average localization density. Inset shows zoomed views of apoptotic blebs, with cyan lines representing the cluster contours.



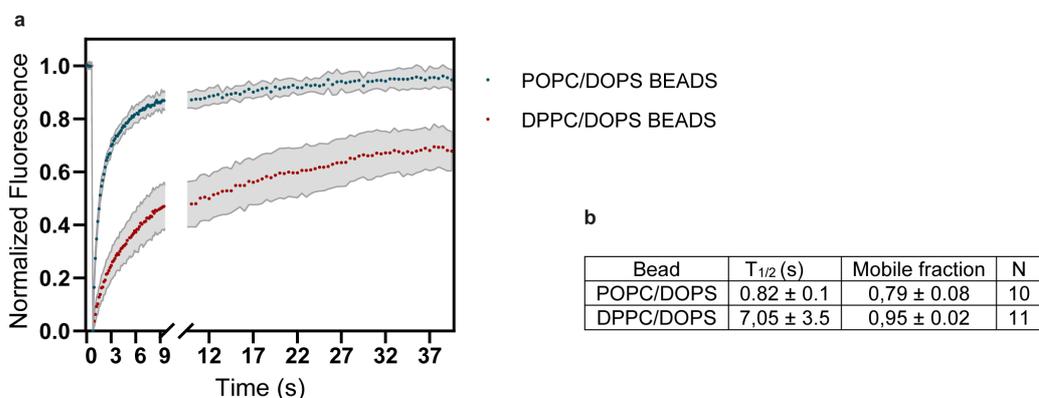
**Figure S4. Flow cytometry analysis of CRT, Erp57, PS and CD47 exposure on viable and apoptotic cells.**

CRT and Erp57 are significantly exposed at the surface of viable HeLa cells and increased after UVB irradiation. CRT exposure precedes PS exposure and CD47 does not significantly evolve on UVB irradiated cells. HeLa cells were irradiated or not with UVB and fixed 4 hours after irradiation. CRT, Erp57, PS and CD47 were detected with anticalreticulin (PA1-902A), anti-Erp57 (ab10287), annexin V labeled with A647 and anti-CD47 (B6H12 labelled with A647). CRT and Erp57 primary antibodies were revealed by secondary antibodies labeled with DL488 and F647 fluorophores respectively. (a) SSC/FSC dot plots are shown for non-treated cells or HeLa cells harvested 4 hours after UVB irradiation. (b) Dot plots for CRT/Erp57 and (c) for CRT/PS detection and the corresponding controls as indicated. (d) Histogram representation of CD47 detection (red) with its associated control (gray). Median of fluorescence intensity value for each channel is annotated. Experiments were performed at least two times.



**Figure S5. Detailed measurements of the MJD distribution analyzed after treatment**

(a-d) CD47 protein was detected with an anti-CD47 (B6H12) antibody labeled with A647 and imaged by TIRF microscopy during 120 s at 33 Hz. CD47 was visualized on non-treated (control), cells irradiated by UVB, or treated with Cytochalasin D (CytD), EDTA, Mn<sup>2+</sup> and M $\beta$ CD. (a) Brightfield image was used to monitor the status of the cell. Mean Jump Distance (MJD) was calculated and each CD47 trajectory was colored according to its MJD. Two densities were represented corresponding to 4000 (b) and 250 (c) frames interval. (d) MJD mean distribution used in (Figure 4c) represented as histogram. Dotted red line corresponds to the MJD mean value of the low and high mobility respectively: 111.9 nm and 172.7 nm for control cells, 111.7 nm and 176.9 nm for control UVB irradiated cells, 112.9 nm and 171.7 nm for CytD treated cells, 109.6 nm and 171.4 nm for EDTA treated cells, 114.7 nm and 173.4 nm for Mn<sup>2+</sup> treated cells and 106.4 nm and 170.2 nm for M $\beta$ CD treated cells. Dots represent the mean and the gray surface corresponds to the standard deviation. Control cell and UVB irradiated cells (a,b) are also represented in the Figure 3. Scale bar, 10  $\mu$ m on BF images, 5  $\mu$ m on CD47 tracks reconstructed images.



**Figure S6. Measure of TopFluor PS mobility within POPC or DPPC lipid bilayer coated silica beads by Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP).**

Silica beads were coated with lipids at following concentration: 1% TopFluor PS, 10% DOPS, 89% POPC or DPPC. (a) The mobility of the fluorescent PS analog TopFluor PS was measured by FRAP microscopy on a spinning disk microscope. The recovery curve is presented and the T<sub>1/2</sub> and the mobile fraction was estimated after fitting and represented in (b). The normalized fluorescence value 1 corresponds to the fluorescence before photobleaching; N is the number of beads.

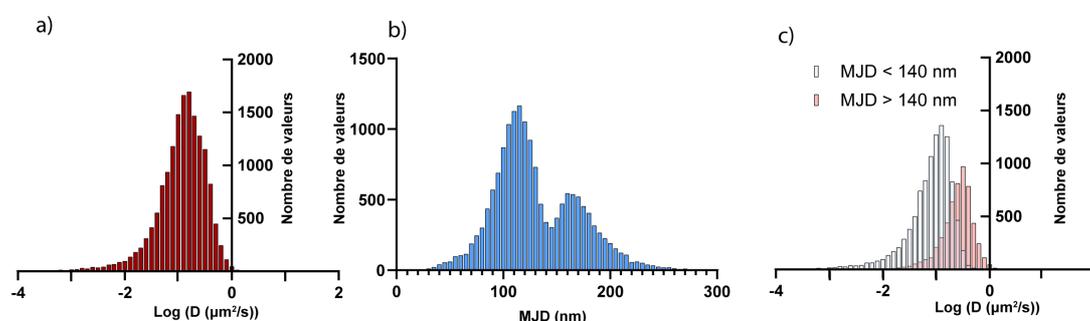
## 1.3 Analyses complémentaires de la dynamique de la protéine CD47 et de ses partenaires

### 1.3.1 Comparaison de l'analyse des coefficients de diffusion et des MJD

Dans le manuscrit CD47, nous nous sommes focalisés sur l'étude du déplacement moyen (MJD) pour caractériser la mobilité de la protéine CD47. Afin de valider cette approche nous l'avons comparée à une approche généralement utilisée : l'analyse du coefficient de diffusion (D).

- *A partir de données expérimentales*

Lors des expériences de suivi de molécule unique il est possible de caractériser la mobilité de la protéine d'intérêt à partir des traces reconstruites. L'une des méthodes couramment utilisées, consiste à déterminer le coefficient de diffusion à partir de la mesure du MSD pour différents temps de latence ( $t_{lag}$ ). En assumant que le mouvement étudié est Brownien dans un espace à deux dimensions, leur relation suit la formule suivante :  $MSD(t_{lag}) = 4Dt_{lag}$  (paragraphe II.3.2). A partir de la distribution des différents coefficients de diffusion estimés par l'analyse individuelle de chaque trace, il est possible de déterminer si la diffusion des molécules de la population étudiée est homogène ou non. Nous avons donc appliqué cette analyse à partir des traces reconstruites de la protéine CD47 à la surface d'une cellule viable HeLa et nous avons constaté que dans ces conditions, la distribution des coefficients de diffusion mesurés à la surface des cellules viables est homogène, avec un maximum d'environ  $0.158 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (Figure 27a). Si ce résultat pouvait laisser supposer que toutes les molécules de CD47 ont un comportement similaire, l'analyse de la répartition du déplacement moyen (MJD) nous a permis pourtant de caractériser deux sous populations selon la distribution des valeurs de MJD. L'une centrée autour d'une MJD de 115 nm et l'autre autour de 170 nm (Figure 27b). Ce résultat, nous a donc poussé à analyser de nouveau la distribution des coefficients de diffusion pour chacune des populations (MJD inférieures ou supérieures à 140 nm). Cela nous a conduit à l'estimation de deux coefficients de diffusion différents pour chaque population, l'une avec un maximum de  $0.125 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour la sous population de MJD inférieure à 140 nm tandis que l'autre sous population de MJD supérieure à 140 nm montre un maximum de  $0.316 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (Figure 27c). Ces deux populations se superposent, ce qui explique que l'analyse faite sur l'ensemble des molécules n'ait pas permis de distinguer ces deux populations de diffusion différente. Il semble donc que la caractérisation des MJD est plus pertinente pour discriminer les sous populations de CD47 dans nos conditions. Cela nous a amené à réaliser des expériences de simulation pour vérifier cette hypothèse.

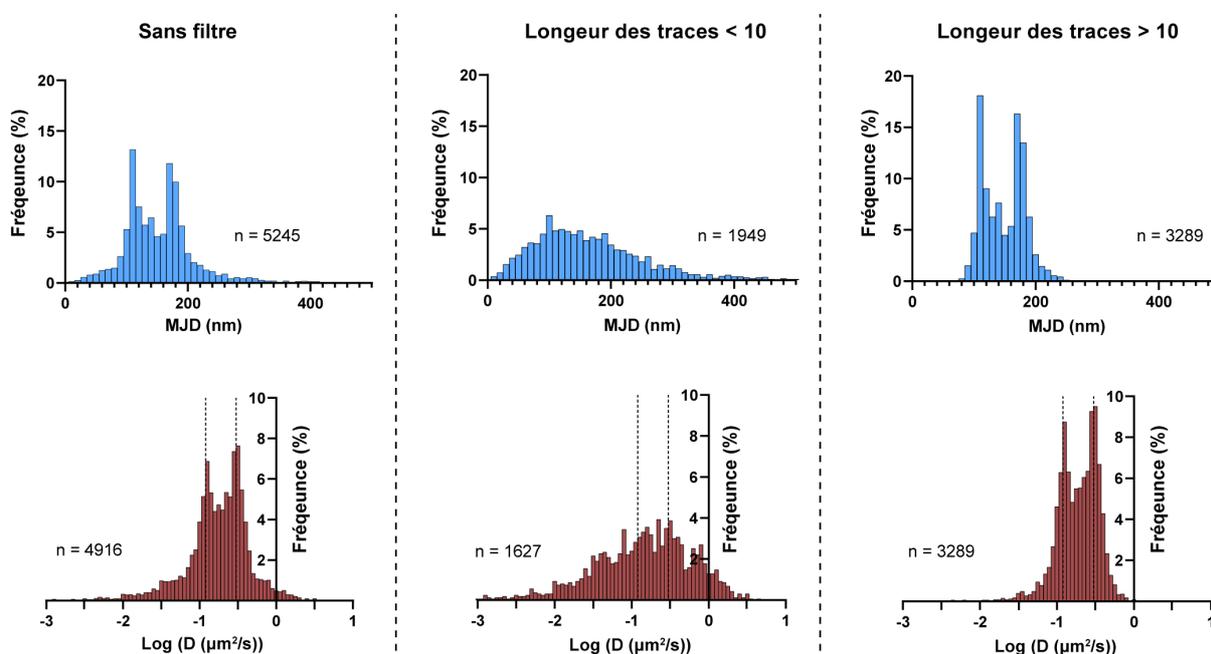


**Figure 27 :** Distribution des coefficients de diffusion et des MJD mesurés à partir de données expérimentales.

L'analyse comparative de l'étude de la mobilité de CD47 est réalisée à partir du jeu de données utilisé (Figure 2, manuscrit CD47). Les traces de moins de 10 localisations sont filtrées. (a) Le coefficient de diffusion est estimé pour chaque trace. (b) Le déplacement moyen (Mean Jump Distance, MJD) est calculé. (c) Enfin, les coefficients de diffusion estimés pour chaque trace sont séparés en fonction de leur valeur de MJD.

- A partir de données simulées

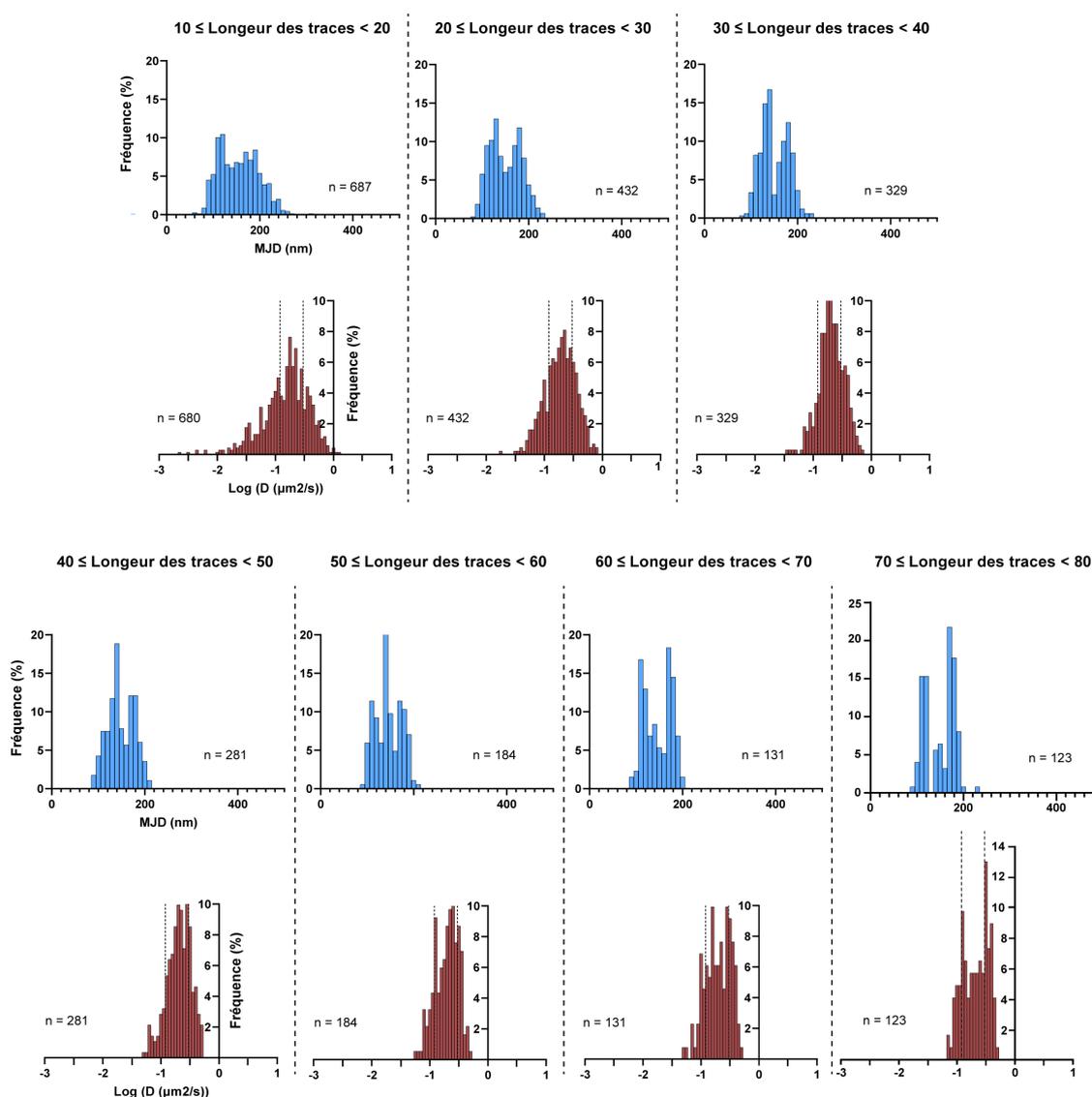
A la différence de l'estimation du coefficient de diffusion à partir de la mesure des MSD, la mesure de la MJD est indépendante de toute hypothèse quant au mode de diffusion. Afin de comparer ces deux approches, nous avons étudié la distribution des coefficients de diffusion et des MJD à partir d'un jeu de données simulé. Deux populations Browniennes aux proportions égales, avec un coefficient de diffusion de  $0.12$  et  $0.3 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ , ont été simulées. La densité des molécules a été définie de façon à se rapprocher des conditions expérimentales. Néanmoins, ce jeu de données diffère des données expérimentales dans la cinétique du blanchissement des fluorophores et aboutit à des traces plus longues, avec une médiane du nombre de localisation pour chaque trace de 19 pour les données simulées et de 6 pour les données expérimentales (mesurées à partir des jeux de données non filtrés). Les données ont ensuite été analysées de la même façon que les données expérimentales. A partir de notre jeu de données simulé, ces deux approches permettent de distinguer deux maximums, 110 nm et 170 nm à partir de la distribution des MJD ainsi que,  $0.125$  et  $0.316 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  à partir de la distribution des coefficients de diffusion. Ces deux maximums correspondent aux deux populations de diffusion simulées (Figure 28). Néanmoins, on observe que sur les données non filtrées, les distributions sont bruitées, avec la présence de valeurs s'écartant des maximums (Figure 28). En filtrant les traces contenant moins de 10 localisations, la silhouette des deux populations est affinée. En effet, à partir des traces qui comptent moins de 10 localisations, la distribution des MJD ou des coefficients de diffusion ne permet pas de distinguer la présence de deux populations (Figure 28). Ainsi, ces deux approches sont sensibles aux traces trop courtes, c'est pourquoi celles qui comptent moins de 10 localisations sont filtrées. A noter, que contrairement aux données expérimentales, la distribution des coefficients de diffusion permet de distinguer la présence de deux populations. Cette différence s'explique car les traces étudiées lors de la simulation sont plus longues que celles détectées expérimentalement.



**Figure 28 :** Distribution des coefficients de diffusion et des MJD mesurés sur des données simulées.

Deux populations aux proportions égales ont été simulées avec un coefficient de diffusion de  $0.12$  et  $0.3 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ . Pour chaque trace, le déplacement moyen (Mean Jump Distance, MJD) est calculé (bleu), ainsi que le coefficient de diffusion (rouge). Les lignes en pointillés indiquent la valeur des coefficients de diffusion simulés ( $0.12$  et  $0.30 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ ). La distribution des MJD et des coefficients de diffusion est représentée à partir de l'ensemble des données, ou bien, à partir des traces contenant moins ou plus de 10 localisations.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence de la longueur des traces sur la capacité de ces approches à discriminer la présence des deux populations. Comme énoncées précédemment, ces deux méthodes en sont incapables lorsque la longueur des traces n'excède pas 10 localisations (Figure 28). Cependant, lorsqu'on sélectionne des traces comportant entre 10 et 20 localisations, on commence à distinguer ces deux populations grâce à l'analyse de la distribution des MJD (Figure 29). Plus la longueur des traces augmente, plus cette différence s'intensifie. Comparativement à la distribution des MJD, la distribution des coefficients de diffusion permet de distinguer la présence de ces deux populations lorsque la longueur des traces est plus longue, à partir de 70 localisations (Figure 29). Par conséquent, même si l'analyse de la distribution des MJD ne permet pas d'estimer le coefficient de diffusion d'une population, elle est plus robuste que l'analyse de la distribution des coefficients de diffusion pour discerner plusieurs populations Browniennes lorsque les traces sont courtes (inférieures à 70 localisations).

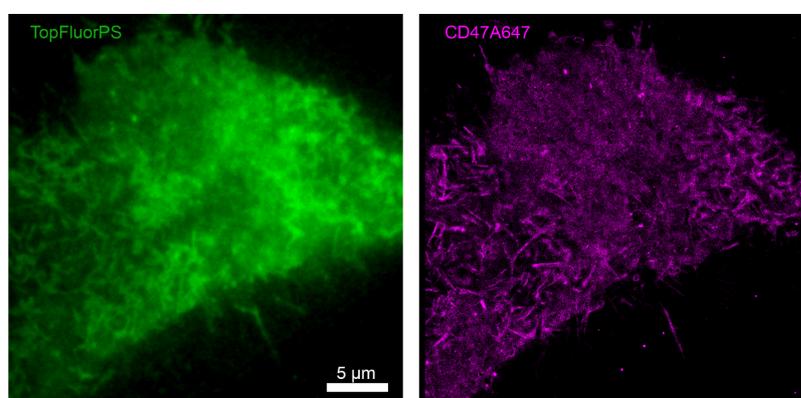


**Figure 29 :** Distribution des coefficients de diffusion et des MJD mesurés sur des données simulées à partir de différents intervalles de longueur de trace.

Deux populations aux proportions égales ont été simulées avec un coefficient de diffusion de  $0.12$  et  $0.3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Pour chaque trace, le déplacement moyen (Mean Jump Distance, MJD) est calculé (bleu), ainsi que le coefficient de diffusion (rouge). Les lignes en pointillés indiquent la valeur des coefficients de diffusion simulés ( $0.12$  et  $0.30 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). La distribution des MJD et des coefficients de diffusion est représentée pour différents intervalles de longueur de trace.

### 1.3.2 Diffusion de la protéine CD47 dans les microvillils

Les parcours des protéines CD47 ont révélé des structures longilignes s'apparentant aux microvillils (Figure 2, manuscrit CD47) présents à la surface des cellules HeLa (Fisher and Cooper, 1967). Dans le but de confirmer la diffusion de la protéine CD47 au sein de ces structures, la membrane des cellules HeLa a donc été marquée. Pour ce faire, elles ont été incubées avec un analogue synthétique fluorescent de la PS : le TopFluor PS. Ce lipide fluorescent détient les mêmes propriétés que la PS endogène. En plus de marquer la membrane plasmique lors de son incorporation, il offre l'avantage de pouvoir étudier la distribution de la PS (Kay et al., 2012). Après l'incubation avec le TopFluor PS et l'anticorps anti CD47 marqué par l'A647, les cellules ont été imagées par microscopie TIRF. La distribution du TopFluor PS a confirmé la présence des microvillils en membrane tout comme la diffusion de CD47 au sein de ces structures (Figure 30). Ces observations sont cohérentes avec celles de la littérature, puisque CD47 a été détecté dans les microvillils à la surface de la lignée cellulaire K562 (leucocyte) (Abitorabi et al., 1997).

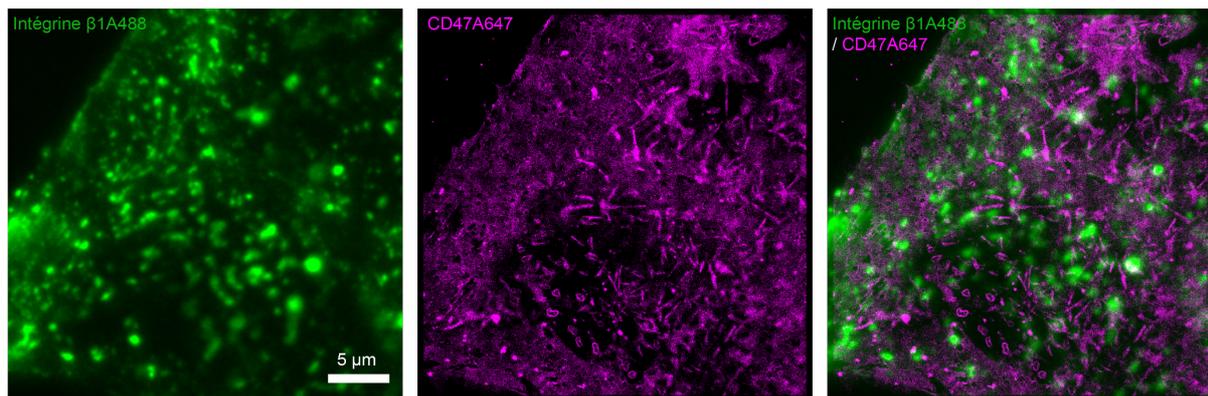


**Figure 30 :** Distribution de la PS et de la protéine CD47.

Les cellules HeLa ont été incubées à 37°C, pendant 15 min avec une solution de TopFluor PS (10 µmol) diluée en PBS, BSA 3%. Les protéines CD47 sont ensuite détectées après l'incubation des cellules avec l'anticorps de souris anti CD47 (B6H12) marqué par l'Alexa Fluor 647. Les cellules non-fixées sont imagées par microscopie TIRF à 37°C. Dans un premier temps, la fluorescence du TopFluor PS (vert) est collectée. Dans un deuxième temps, les localisations provenant de 4000 images de la fluorescence de l'anticorps anti CD47 sont compilées (magenta).

### 1.3.3 Diffusion de la protéine CD47 et distribution des intégrines exprimant la chaîne $\beta_1$

Le traitement des cellules avec l'EDTA et le  $Mn^{2+}$  a révélé que la mobilité de CD47 était sensible à l'état d'activation des intégrines (Figure 3, manuscrit CD47). En effet, la protéine CD47 est connue pour interagir avec différentes intégrines, notamment les intégrines  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_M\beta_2$  (Paragraphe I.2.3), bien que leur site d'interaction reste à caractériser. Naturellement, nous avons donc cherché à déterminer avec quelle intégrine CD47 pouvait interagir à la surface des cellules HeLa. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la détection des intégrines composées de la chaîne  $\beta_1$  et exprimées par les cellules HeLa. Les cellules ont donc été incubées avec l'anticorps 12G10 dirigé contre l'intégrine  $\beta_1$  afin de localiser l'intégrine et avec l'anticorps anti CD47 à faible concentration dans les conditions de suivi de molécule unique (SPT) permettant d'observer la diffusion de CD47. Ce double marquage a révélé des domaines riches en intégrines exprimant la chaîne  $\beta_1$  (Figure 31). Bien que CD47 puisse diffuser dans ces domaines riches en chaîne  $\beta_1$ , il n'y est pas enrichi (Figure 31). Cette observation suggère que les intégrines exprimant la chaîne  $\beta_1$  ne sont pas le partenaire de CD47 à la surface des cellules HeLa.



**Figure 31 :** Distribution des intégrines exprimant la chaîne  $\beta_1$  et de la protéine CD47.

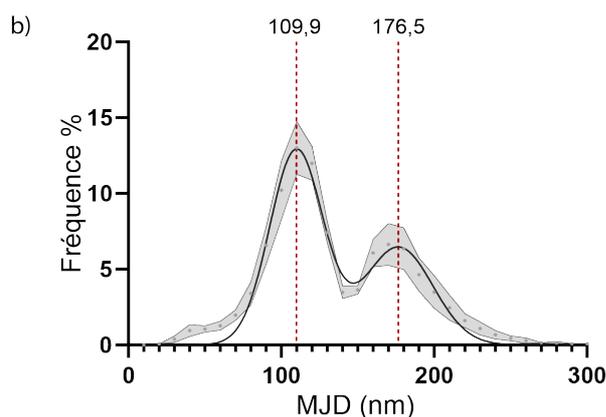
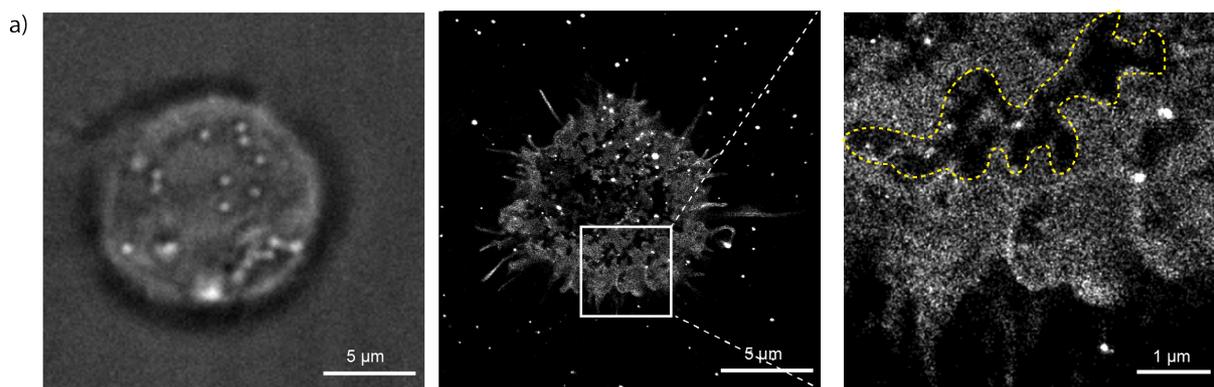
Les cellules HeLa ont été incubées avec l'anticorps 12G10 anti intégrine  $\beta_1$  marqué par l'Alexa Fluor 488. Les molécules de CD47 sont ensuite détectées par l'anticorps de souris anti CD47 (B6H12) marqué par l'Alexa Fluor 647. Les cellules non-fixées sont imagées par microscopie TIRF à 37°C. Dans un premier temps, la fluorescence de l'anticorps 12G10 marqué est collectée. Dans un deuxième temps, les localisations provenant de 4000 images de la fluorescence de l'anticorps anti CD47 sont compilées (magenta).

### 1.3.4 Diffusion de la protéine CD47 à la surface des cellules JurkaT

L'analyse de la diffusion des protéines CD47 à la surface des cellules HeLa a mis en évidence deux populations distinctes, l'une de faible mobilité et l'autre de haute mobilité (Figure 2, manuscrit CD47). Afin de déterminer si cette configuration est spécifique à cette lignée cellulaire, la mobilité de la protéine CD47 a également été étudiée à la surface des lymphocytes T JurkaT. Cette lignée cellulaire avait été utilisée par Gardai et ses collaborateurs pour étudier la localisation de CD47 durant le développement de l'apoptose (Gardai et al., 2005).

Pour pouvoir imager ces cellules par microscopie TIRF, les cellules JurkaT ont été rendues adhérentes après privation de sérum (Audiffred et al., 2010). Une fois adhérentes, les cellules ont été incubées avec l'anticorps anti CD47 et traitées de la même façon que les cellules HeLa. L'analyse de la diffusion de CD47 à la surface des cellules JurkaT a révélé que la majorité des protéines CD47 était mobile. Si on regarde plus en détail les localisations de CD47, on remarque des zones enrichies (Figure 32a), qui pourraient correspondre à des protéines CD47 immobiles. Néanmoins, il faut noter qu'en l'absence de sérum, nécessaire à l'induction de l'adhérence des cellules JurkaT, la fixation non spécifique de l'anticorps anti CD47 augmente à la surface du verre. Cela est particulièrement visible dans le panneau du milieu de la Figure 32a, où l'on observe l'accumulation de localisations, qui pourrait correspondre à des protéines CD47 immobiles alors qu'aucune cellule n'est présente. La reconstruction des localisations de CD47 a également permis de détecter des structures longilignes sur le pourtour de la cellule (Figure 32a). Cependant, de par leur distribution, ces structures s'apparentent plus à des filopodes qu'à des microvillis. Par ailleurs, la reconstruction des localisations de CD47 a mis en évidence des zones appauvries en CD47 (Figure 32a), suggérant qu'elles sont moins accessibles à la protéine CD47.

Enfin il faut noter que, la distribution des MJD a révélé deux populations (Figure 32b), semblables à celles observées pour les cellules HeLa (Figure 2, manuscrit CD47). Leurs moyennes sont similaires :  $109,9 \pm 17,4$  et  $176,5 \pm 22,6$  nm pour les cellules JurkaT contre  $111,9 \pm 20,1$  et  $172,7 \pm 20,7$  nm pour les cellules HeLa. La proportion relative des deux populations est également analogue, avec environ 40% des protéines CD47 qui font partie de la population de haute mobilité à la surface des cellules JurkaT (Figure 32).



**Figure 32 : Diffusion de la protéine CD47 à la surface des cellules JurkaT.**

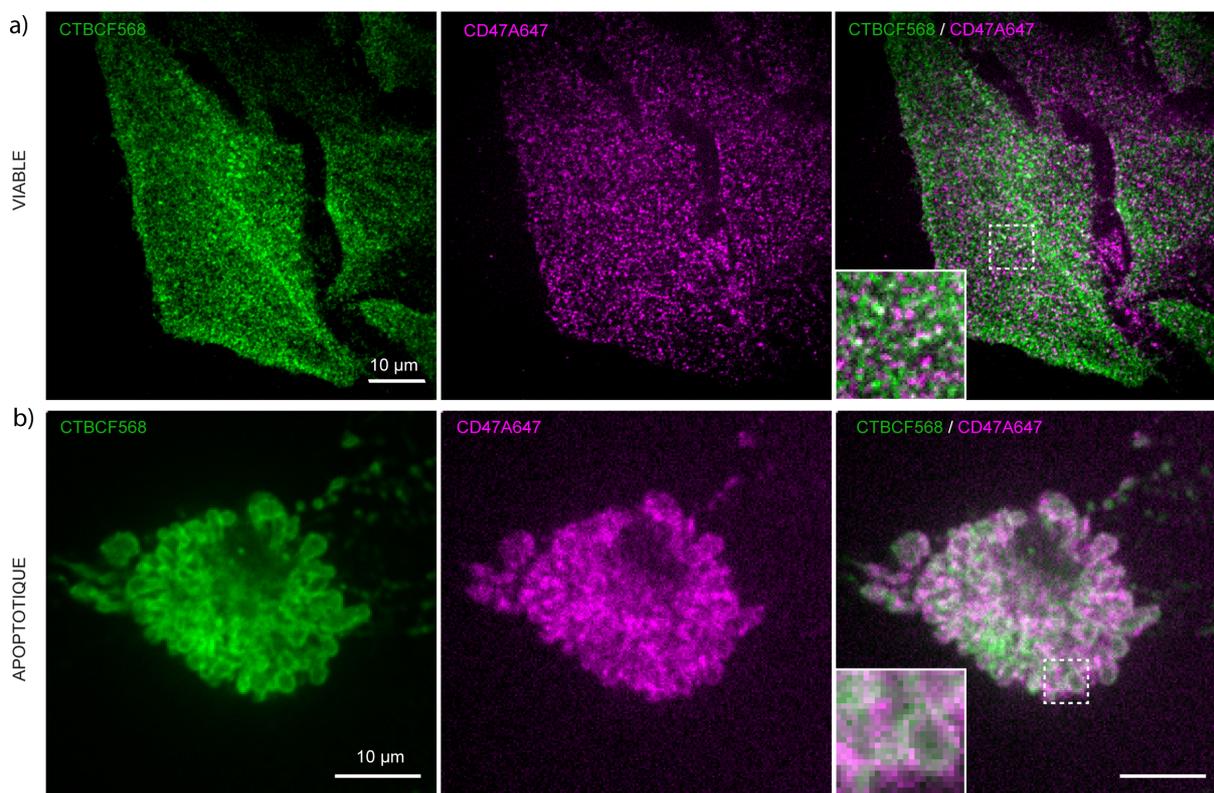
Les cellules JurkaT ont été incubées avec l'anticorps de souris anti CD47 (B6H12) marqué par l'Alexa Fluor 647. (a) Les cellules sont imagées par microscopie TIRF à 37°C. Une image en champ clair est capturée (panneau de gauche). La localisation de CD47 provenant de 4000 images est compilée pour reconstruire une image (panneau du milieu). Une zone appauvrie en CD47 détournée par des pointillés jaunes est agrandie (panneau de droite). (b) Les MJD de CD47 sont calculées pour chaque trace et représentées par un histogramme. Les données provenant de 5 cellules différentes ont été rassemblées, puis ajustées selon un modèle de deux gaussiennes. La ligne pointillée en rouge correspond à la moyenne estimée pour chaque population.

### 1.3.5 Distribution de la protéine CD47 et du lipide GM1

En parallèle des expériences de suivi de molécule unique, nous nous sommes également intéressés à la distribution relative de CD47 avec les radeaux lipidiques et les intégrines à la surface de cellules fixées. En effet, comme nous avons pu le voir, la mobilité de CD47 est à la fois sensible à la concentration en cholestérol qui est étroitement liée aux radeaux lipidiques, mais aussi à l'état d'activation des intégrines (Figure 3, manuscrit CD47).

L'une des stratégies souvent utilisée pour détecter les radeaux lipidiques à la surface d'une cellule repose sur le marquage, grâce à la sous unité B de la toxine du choléra (CTB), du ganglioside GM1 enrichi dans ces domaines. Les radeaux lipidiques sont très dynamiques et leur étude nécessite des techniques avec une résolution temporelle élevée, difficilement accessible dans nos conditions sur cellules vivantes. Leur marquage a donc été réalisé sur cellules fixées afin de figer leur distribution en membrane. Après fixation, les cellules viables et apoptotiques ont été incubées avec la CTB marquée par le fluorophore CF568 et l'anticorps anti CD47 marqué par le fluorophore A647. Les images réalisées par microscopie confocale ont révélé un marquage ponctué, homogène du lipide GM1 et de la protéine CD47 à la surface des cellules viables HeLa (Figure 33a). On constate des points de colocalisation entre ces deux marquages, même si dans l'ensemble toutes les molécules de CD47 ne colocalisent pas avec le marquage du lipide GM1. Cette répartition hétérogène de CD47, suggère qu'une seule fraction des molécules de CD47 est présente au sein des radeaux lipidiques. A la surface des blebs apoptotiques, le lipide GM1 est également détecté de façon homogène, tout comme la protéine CD47 (Figure 33b). Toutefois ces observations faites sur les cellules viables et apoptotiques doivent être nuancées. En effet la CTB est également capable de se fixer sur d'autres molécules glycosylées et même si CD47 et GM1 colocalisent, cela n'est pas une preuve définitive que la

protéine CD47 et le lipide GM1 sont bien distribués dans les radeaux lipidiques. D'autres méthodes de détection sont donc nécessaires pour confirmer ces observations [Pour revue (Klymchenko and Kreder, 2014)].

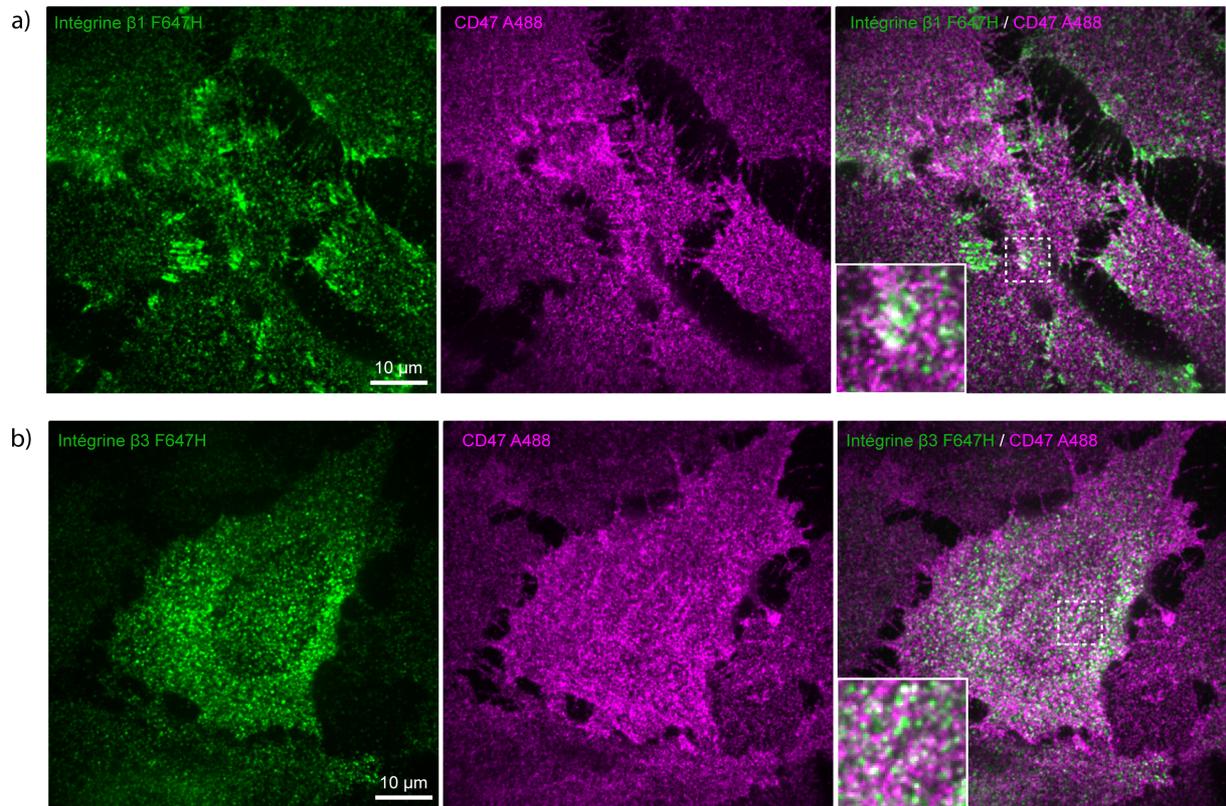


**Figure 33 : Distribution relative de la protéine CD47 et du lipide GM1 à la surface des cellules viables et apoptotiques.** Le lipide GM1 (Vert) et la protéine CD47 (magenta) ont été détectés à la surface de cellules HeLa viables (a) et apoptotiques (b). Les cellules ont été imagées avec un microscope spinning disk confocal. La zone en pointillée détoure la zone agrandie 3 fois en bas à gauche de l'image fusionnée. A noter que le grossissement par pixel n'est pas identique, les cellules apoptotiques ont été imagées avec un objectif X60 alors que les cellules viables ont été imagées avec un objectif X100.

### 1.3.6 Distribution de la protéine CD47 et des intégrines exprimant les chaînes $\beta 1$ et $\beta 3$

Les différents marquages ont été réalisés de la même façon que dans le paragraphe précédent, à l'exception de la détection de CD47 qui a été réalisée par un anticorps primaire et un anticorps secondaire couplé au fluorophore A488. Par ailleurs, les chaînes  $\beta 1$  et  $\beta 3$  ont été détectées par des anticorps primaires polyclonaux ainsi que des anticorps secondaires marqués par le fluorophore F647H. Les différents marquages ont été observés par microscopie confocale. Les intégrines à chaîne  $\beta 1$  s'accumulent dans des régions qui s'apparentent à des zones d'adhérence. Un marquage plus ponctué est également observé (Figure 34a). Bien que CD47 soit aussi détecté au niveau de ces zones d'adhérence, sa répartition est homogène à la surface de la cellule (Figure 34a). Le marquage des intégrines exprimant la chaîne  $\beta 3$  n'a révélé, quant à lui, aucun enrichissement de ces protéines au niveau de zones qui pourraient s'apparenter à des zones d'adhérence (Figure 34b). Leur distribution est homogène en surface. On remarque cependant des points de colocalisation entre les intégrines  $\beta 3$  et CD47 (Figure 34b). Cette observation est en accord avec les expériences de co-immunoprécipitation de la chaîne  $\beta 3$  et de la protéine CD47 (Figure 4a, manuscrit CD47).

Ces différents marquages auraient pu bénéficier du gain de résolution apporté par la microscopie à super résolution STORM. Cependant, chaque marquage doit être optimisé et nos expériences préliminaires n'ont pas abouti à l'acquisition de données exploitables.



**Figure 34 :** Distribution relative de la protéine CD47 et des intégrines exprimant les chaînes  $\beta 1$  et  $\beta 3$ .

Les intégrines (vert) exprimant les chaînes  $\beta 1$  (a) et  $\beta 3$  (b), ainsi que la protéine CD47 (magenta) ont été détectées à la surface de cellules viables. Les cellules ont été imagées avec un microscope spinning disk confocal. La zone en pointillés détoure la zone agrandie 3 fois en bas à gauche de l'image fusionnée.

## 2 Etude de l'interaction entre le récepteur SR-F1 et la protéine du complément C1q

### 2.1 Contexte

La protéine transmembranaire SR-F1 fut décrite pour la première fois par Ramirez et ses collaborateurs comme un nouveau récepteur de l'efferoctose chez la souris (Ramirez-Ortiz et al., 2013). Grâce à la création de souris Knock-out pour le gène SCARF1 codant pour ce récepteur, ils ont démontré que SR-F1 était indispensable à l'élimination des cellules apoptotiques mais aussi nécessaire au maintien de la tolérance. Au cours de leur analyse, ils ont montré que la fonction du récepteur SR-F1 était étroitement liée à celle de la protéine du complément C1q. En effet, la reconnaissance de la PS exposée à la surface de la cellule apoptotique par le récepteur SR-F1 est conditionnée par la présence de C1q. En effet, ils ont démontré que SR-F1 interagit avec la protéine C1q fixée à la surface des cellules apoptotiques. Néanmoins, bien que C1q reconnaisse d'autres « motifs apoptotiques », notamment la CRT, l'initiation de la phagocytose par le récepteur SR-F1 est strictement dépendante de l'interaction de C1q avec la PS. Chez la souris, le récepteur SR-F1 est exprimé par différents types cellulaires tels que les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules dendritiques, notamment celles de la rate positives pour le marqueur CD8 $\alpha$ . Chez ces dernières, la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques est principalement dépendante de l'expression de ce récepteur. Par ailleurs, les souris déficientes pour SR-F1 développent spontanément des autoanticorps anti nucléaires (ANA), favorables à l'apparition d'un terrain inflammatoire et au développement d'une néphrite caractérisée par la déposition des complexes immuns dans les reins.

Au travers de cette publication, Ramirez et ses collaborateurs ont dressé un portrait cellulaire de l'influence du récepteur SR-F1 et de son partenaire C1q sur l'élimination des cellules apoptotiques et sur le maintien de la tolérance chez la souris. Ces travaux nous ont conduit à analyser l'interaction entre C1q et SR-F1, dans un système isolé et dans un contexte cellulaire humain. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Y. Delneste et les résultats de cette étude ont abouti à une publication dans la revue *Frontiers in immunology* (Wicker-Planquart et al., 2020).

**Publication :** Wicker-Planquart C, Dufour S, Tacnet-Delorme P, Bally I, Delneste Y, Frachet P, Housset D and Thielens NM (2020) Molecular and Cellular Interactions of Scavenger Receptor SR-F1 With Complement C1q Provide Insights Into Its Role in the Clearance of Apoptotic Cells. *Front. Immunol.* 11:544. doi: 10.3389/fimmu.2020.00544

**Contribution :** J'ai été impliqué dans l'aspect cellulaire de cette étude. J'ai établi une nouvelle lignée de monocytes THP-1 surexprimant le récepteur SR-F1 (THP-1 SR-F1) ainsi que son contrôle (THP-1 MOCK). Cette opération a nécessité la conception des plasmides pCMV6-AC-SR-F1 et pCMV6-AC, ainsi que la transfection, la sélection et la caractérisation des lignées stables. A partir de ces cellules, j'ai réalisé les immunofluorescences nécessaires à la localisation du récepteur SR-F1 ainsi que son partenaire C1q à la surface des macrophages THP-1 SR-F1 par microscopie de fluorescence.

## 2.2 Article SR-F1



# Molecular and Cellular Interactions of Scavenger Receptor SR-F1 With Complement C1q Provide Insights Into Its Role in the Clearance of Apoptotic Cells

Catherine Wicker-Planquart<sup>1</sup>, Samy Dufour<sup>1</sup>, Pascale Tacnet-Delorme<sup>1</sup>, Isabelle Bally<sup>1</sup>, Yves Delneste<sup>2,3</sup>, Philippe Frachet<sup>1\*</sup>, Dominique Housset<sup>1</sup> and Nicole M. Thielens<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IBS, Grenoble, France, <sup>2</sup>CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France, <sup>3</sup>CHU Angers, Département d'Immunologie Allergologie, Angers, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Robert Braidwood Sim,  
University of Oxford, United Kingdom

### Reviewed by:

Gunnar Houen,  
Statens Serum Institut (SSI), Denmark  
Jinhua Lu,  
National University of  
Singapore, Singapore

### \*Correspondence:

Philippe Frachet  
philippe.frachet@ibs.fr  
Nicole M. Thielens  
nicole.thielens@ibs.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Innate Immunity,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 06 January 2020

**Accepted:** 10 March 2020

**Published:** 31 March 2020

### Citation:

Wicker-Planquart C, Dufour S,  
Tacnet-Delorme P, Bally I, Delneste Y,  
Frachet P, Housset D and  
Thielens NM (2020) Molecular and  
Cellular Interactions of Scavenger  
Receptor SR-F1 With Complement  
C1q Provide Insights Into Its Role in  
the Clearance of Apoptotic Cells.  
*Front. Immunol.* 11:544.  
doi: 10.3389/fimmu.2020.00544

The scavenger receptor SR-F1 binds to and mediates the internalization of a wide range of ligands, and is involved in several immunological processes. We produced recombinant SR-F1 ectodomain and fragments deleted from the last 2 or 5 C-terminal epidermal growth factor-like modules and investigated their role in the binding of acetylated low density lipoprotein (AcLDL), complement C1q, and calreticulin (CRT). C1q measured affinity was in the 100 nM range and C1q interaction occurs *via* its collagen-like region. We identified two different binding regions on SR-F1: the N-terminal moiety interacts with C1q and CRT whereas the C-terminal moiety binds AcLDL. The role of SR-F1 N-linked glycans was also tested by mutating each of the three glycosylated asparagines. The three mutants retained binding activities for both AcLDL and C1q. A stable THP-1 cell line overexpressing SR-F1 was generated and C1q was shown to bind more strongly to the surface of SR-F1 overexpressing macrophages, with C1q/SR-F1 colocalization observed in some membrane areas. We also observed a higher level of CRT internalization for THP-1 SR-F1 cells. Increasing SR-F1 negatively modulated the uptake of apoptotic cells. Indeed, THP-1 cells overexpressing SR-F1 displayed a lower phagocytic capacity as compared with mock-transfected cells, which could be partially restored by addition of C1q in the extracellular milieu. Our data shed some light on the role of SR-F1 in efferocytosis, through its capacity to bind C1q and CRT, two proteins involved in this process.

**Keywords:** scavenger receptor SR-F1, complement C1q, interaction, SPR, phagocytosis, apoptosis

## INTRODUCTION

The class F scavenger receptor SR-F1 (1), previously named SREC-I [scavenger receptor expressed by endothelial cells (2)] or SCARF1 [as the product of the *SCARF1* gene (3)], is expressed in various cell types, such as endothelial cells (2), macrophages (4), and dendritic cells (DC) (5), and shows variable expression profiles, being most abundant in heart, placenta, lung, and spleen (6, 7).

Scavenger receptors were first defined by their ability to bind and induce metabolism of modified low density lipoproteins (LDLs) such as acetylated LDL (AcLDL) and oxidized LDL

(OxLDL) (8). SR-F1 is now viewed as a multifaceted receptor (9), which can bind and mediate cell internalization of a wide range of endogenous and exogenous ligands, suggesting key roles in immune responses and tissue homeostasis.

The mature SR-F1 protein is made of a 402 amino acids extracellular domain which contains 10 epidermal growth factor (EGF)-like repeats, with seven of them containing exactly the EGF consensus sequence (CXCXXXXXGXXC), a short (24 amino acids) transmembrane domain and a relatively long (385 amino acids) cytoplasmic tail. The latter comprises a serine/proline-rich region followed by a glycine-rich region and contains numerous potential phosphorylation sites (2), strongly suggesting of a role in intracellular signaling. This long tail is only shared with another member of the class F family, a SR-F1 homolog, named SREC-II (1), or SCARF2. SREC-II is also a transmembrane protein that shares 52% identity over the extracellular domain with SR-F1 (7). Interestingly, the extracellular domain of SR-F1 engages in a heterophilic trans-interaction with SREC-II and SR-F1/SREC-II heterodimerization has been suggested to suppress the ligand binding properties of SR-F1 (7).

Alternative splicing during *SCARF1* gene expression results in multiple transcript variants (10). All membrane-bound splice variants showed receptor activity toward fluorescent AcLDL when expressed transiently in COS-1 cells (10). A SR-F1 soluble form of ~60 kDa was recently identified by Patten et al. (11) in human serum (1–20 ng/ml) and proposed to result from SR-F1 proteolysis.

SR-F1 recognizes numerous non-self molecules of invading pathogens (exogenous ligands) thus suggesting a role in host innate immunity although the fate of these interactions still needs to be clarified. SR-F1 is a receptor for bacterial proteins, including the outer membrane protein A (OmpA) from *Klebsiella pneumoniae* (12) and the outer membrane porin PorB from *Neisseria gonorrhoeae* (13), for cell wall teichoic acid from *Staphylococcus aureus* (14), for  $\beta$ -glucan residues exposed on the cell surface of *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* (3), and for hepatitis C virus non-structural protein 3 (15). SR-F1 interaction with its microbial ligands has been shown to elicit bacterial adherence to epithelial cells (13, 14) and/or to promote an inflammatory response in cooperation with toll-like receptor 2 (3, 12, 15).

Endogenous ligands for SR-F1 include heat-shock proteins Hsp70 (16, 17) and Hsp90 (18, 19). SR-F1 mediates presentation and cross-presentation of Hsp90/ovalbumin peptide complexes via the MHC-II and MHC-I molecules, respectively (18, 19). SR-F1 also binds with high affinity and internalizes the Tamm-Horsfall protein (THP), an urinary protein involved in several immunological processes (20) and the pancreatic zymogen GP2 (21), which is a close homolog of THP.

**Abbreviations:** AcLDL, acetylated low density lipoprotein; CLR, collagen-like region of C1q; CRT, calreticulin; DC, dendritic cells; EGF, epidermal growth factor; GFP, green fluorescent protein; GR, globular region of C1q; LDL, low density lipoprotein; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PNGase F, N-glycosidase F; PS, phosphatidylserine; SPR, surface plasmon resonance; SREC, scavenger receptor expressed by endothelial cells; SR-F, scavenger receptor class F; TSA, thermal shift assay.

In addition, SR-F1 was shown to interact with molecules involved in the clearance of apoptotic cells, a process called efferocytosis, which is essential for the maintenance of tissue homeostasis and immune tolerance. Defects in this role are linked to the pathophysiology of autoimmune and inflammatory diseases (e.g., systemic lupus, atherosclerosis, rheumatoid arthritis) (9, 22). SR-F1 was shown to contribute to apoptotic cell removal through interaction with complement protein C1q (23). This process requires C1q binding to newly exposed phosphatidylserine (PS) on the apoptotic cell surface (24). Other proteins containing multiple EGF-like repeats in the extracellular domain, such as CED-1 (a transmembrane receptor with 16 EGF-like repeats from *Caenorhabditis elegans*) and mammalian MEGF10 (multiple EGF-like domains-10), now called SR-F2 (1), have also been reported to play a role in host defense and in the clearance of apoptotic cells (25–27) through interaction with C1q.

Of interest, we have shown previously that C1q, calreticulin (CRT) and PS interact with each other to enhance the clearance of apoptotic cells and to modulate phagocyte functions (28, 29). PS and CRT serve as C1q ligands on the apoptotic cell surface, but also interact directly with receptors of the phagocyte surface. Although initially identified as a receptor for the collagen-like regions of C1q and collectins (30), CRT was subsequently shown to bind to the globular regions of C1q (31, 32). We have confirmed the ability of CRT to interact with both the globular and collagen-like regions derived from serum C1q (28) and with a recombinant form of C1q globular regions (33). Berwin et al. (34) first reported binding of SR-F1 to CRT, a result later contradicted by Ramirez-Ortiz et al. (23) who reported negligible binding of SR-F1 to CRT. The fact that SR-F1 was involved in the uptake of apoptotic cells, together with our previous studies on CRT and C1q, prompted us to examine the molecular properties of SR-F1 in order to decipher its role during the phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. In this study, we have revisited SR-F1 interactions with its endogenous ligands AcLDL, C1q, and CRT using its recombinant extracellular domain and we examined the role of full length SR-F1 on transfected THP-1 macrophages.

## MATERIALS AND METHODS

### Proteins and Reagents

C1q was purified from human serum as described by Arlaud et al. (35). C1q-collagen-like regions (CLR) and globular regions (GR) were prepared as described previously (36). MW and  $A_{1\%}^{1\text{cm}}$  at 280 nm used for protein quantification were 459,300 g/mol and 6.8 for C1q, 189,900 g/mol and 2.1 for C1q-CLR, and 48,000 g/mol and 9.3 for C1q-GR. Recombinant human CRT was produced and quantified (MW = 49,431 g/mol and  $A_{1\%}^{1\text{cm}}$  = 16.5) as described by Païdassi et al. (28). Low density lipoprotein (LDL) was from Sigma-Aldrich and AcLDL was from Acris Antibodies. LDL and AcLDL concentrations were determined using the Quick Start Bradford 1x Dye Reagent (Biorad). The protein contents represent approximately a quarter of the total weight of the LDL samples. Alexa Fluor 568-succinimidyl ester was obtained from Molecular probes. Recombinant human CRT labeling with the succinimidyl

ester conjugate was performed according to the manufacturer's protocol. N-glycosidase F (PNGase F) was purified from cultures of *Flavobacterium meningosepticum* according to the method of Tarentino et al. (37), with the modification by Aude et al. (38).

Oligonucleotides were from Eurogentec. The list of primers used is provided in Table S1. Restriction and modification enzymes were from New England Biolabs. The pCMV6-SR-F1 plasmid was from Origene. Pfu polymerase was from Stratagene.

### Construction of the Expression Plasmids Encoding SR-F1 Extracellular Domains SR-F1(1-421)

SR-F1 cDNA clone in a pcDNA3.1 vector was from Origene. We introduced a Pac I restriction site followed by a short sequence coding for 8 His residues and a stop codon just before the sequence coding for the transmembrane domain (amino acid 422): two primary PCR reactions were done, which generated overlapping DNA fragments. Using T7 and Pac R2 oligonucleotides (Table S1), a first fragment containing the sequence coding for SR-F1 extracellular domain and at the 3' end a Pac I restriction site was generated. A second overlapping fragment was synthesized using BGHRev and PacF2 oligonucleotides (Table S1). Both PCR products were combined and added to a PCR mix with T7 and BGH Rev primers. The final PCR product joined the 2 fragments into a single fragment spanning the whole region and was inserted in a pcDNA3.1 vector (with zeocin resistance) using EcoRI and XhoI restriction sites. The protein encoded by the SR-F1-pcDNA3.1 plasmid ends at amino acid 421 (Thr) of the SR-F1 protein sequence followed by 3 amino acid (Leu-Ile-Lys) and 8 His residues. All sequences were verified by DNA sequencing (GATC Biotech).

### SR-F1(1-221) and SR-F1(1-353)

DNA fragments coding for the 221 or 353 first amino acid residues of SR-F1 were generated by PCR using T7 and either 221R or 353R oligonucleotides (Table S1) and were inserted in the SR-F1-pcDNA3.1 plasmid in place of the extracellular SR-F1 sequence using EcoRI and PacI restriction sites.

### Site-Directed Removal of N-Glycosylation Sites in SR-F1

Codons for asparagine at the three potential N-glycosylation sites (Asn 289, 382, and 393) in human SR-F1 cDNA were replaced with those for glutamine. The expression plasmids coding for SR-F1 N289Q, N382Q, and N393Q were generated using the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies), according to the manufacturer's protocol for simple mutations, using the oligonucleotides 289F and 289R, 382F, and 382R, or 393F and 393R (Table S1), and the pcDNA3.1 template containing the DNA coding sequence for SR-F1(1-421). The sequences of all constructs were checked by DNA sequencing (GATC Biotech).

### SR-F1 Production in 293-F Cells and Purification

Recombinant SR-F1 was produced in the FreeStyle 293 Expression System (Thermo Fisher). 293-F cells grown in

FreeStyle 293 medium were transfected with pcDNA3.1-SR-F1 plasmids, using 293-fectin according to the manufacturer's instructions. Stable transformant cells were obtained following selection with 10 µg/ml zeocin (Thermo Fisher). The culture supernatants were harvested every 3–4 days.

In order to purify the secreted recombinant proteins, 2 ml of Ni-NTA resin (Qiagen) were added to cell culture supernatants (100 ml) and gently mixed for 3 h at 4°C. The mixture was loaded into a column, and the resin washed with 50 mM Tris-HCl pH 7.4, containing 0.3 M NaCl and 30 mM imidazole (50 ml). The protein was eluted with 5 ml elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, containing 0.3 M NaCl and 150 mM imidazole), dialyzed against TBS (50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4), then concentrated to 0.2–1 mg/ml by ultrafiltration on Amicon Ultra-4 centrifuged filters (ultra cel-30K).

The molar concentration of SR-F1(20-421) was estimated using an absorption coefficient ( $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) at 280 nm of 16.7 and a mass value of 49.0 kDa, as determined by mass spectrometry. A molecular mass of 47.3 kDa was used for SR-F1(20-421) N289Q, N382Q, and N393Q, by assuming the loss of 1 N-linked-glycan chain of ~1.7 kDa.

Molecular masses of 39.0 kDa for SR-F1(20-353) and 23.4 kDa for SR-F1(20-221) were used, as determined by mass spectrometry analysis. Absorption coefficients ( $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) at 280 nm of 17.6 and 22.7 were used for SR-F1(20-353) and SR-F1(20-221), respectively (<https://web.expasy.org/protparam/>).

### Biochemical and Biophysical Characterization

Recombinant SR-F1 proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under non-reducing conditions using Tris-HCl gels containing 10 to 14% polyacrylamide, using the method of Laemmli (39).

PNGase F treatment of purified SR-F1 proteins was performed by two successive additions of 10% (w/w) enzyme followed by incubations at 30°C for 3 h.

N-terminal sequence determination was performed using an Applied Biosystems gas-phase sequencer model 492 coupled online with an Applied Biosystems Model 140C HPLC system. Mass spectrometry analyses were performed on a Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (Autoflex, Bruker Daltonics), operated in linear positive mode. The proteins (1 mg/ml) were diluted 1:2 to 1:10 in SA matrix [sinapinic acid (Sigma-Aldrich) 10 mg/ml in acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (50/50/0.1 (v/v/v))] and 2 µl were deposited directly on the target.

Circular dichroism (CD) spectra were recorded on a thermostated Jasco J-810 spectropolarimeter at 20°C using a 1 mm pathlength cuvette (Hellma France). Protein was dialyzed against a 10 mM sodium phosphate, 150 mM NaF (pH 8) buffer and used at a concentration of 8 mM. Ten spectra were acquired in the far-UV region (200–260 nm) at a scan rate of 20 nm/min.

Thermal shift assay (TSA) was performed using a real-time PCR machine (CFX Manager) and the iCycler iQ Real-Time Detection System (Bio-Rad). Two microliter of the fluorescent Sypro orange dye solution (Molecular Probes, 500 × in DMSO,

diluted 5 times in water) were added to 2  $\mu\text{g}$  of protein in TBS (25  $\mu\text{l}$  final volume) in thin-walled 96-well PCR plates and the mixtures were heated from 20 to 100°C in 0.2°C steps. The melting temperature ( $T_m$ ), at which 50% of the protein is unfolded, is identified as the peak minimum when plotting the first derivative of the fluorescence emission as a function of temperature ( $-dF/dT$ ).

### Analysis of Binding of SR-F1 and Its Variants by Surface Plasmon Resonance (SPR)

#### Interaction Measurements

Interaction analyses were performed at 25°C on a Biacore X, a Biacore 3000 or a T200 instrument (GE Healthcare). Proteins were immobilized on CM5 sensor chips (GE Healthcare) in HBS-P (0.01 M Hepes pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% (Biacore X and 3000) or 0.05% (T200) surfactant P20) using the amine coupling chemistry according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). Before covalent immobilization, protein ligands were diluted in 10 mM sodium acetate at the following concentrations and pH values: SR-F1(20-421) 7–40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , pH 4.5; CRT 20–40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , pH 4; Penta-His antibody (Qiagen) 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , pH 4.5; C1q 30–35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , pH 5.5; BSA 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , pH 4. The immobilization levels for covalently immobilized proteins were 1,800–5,000 RU for SR-F1(20-421), 3,300 RU for CRT, 1,300–1,500 RU for Penta-His antibody, 16,000–18,300 RU for C1q, 3,000–8,600 RU for BSA. About 500 RU of SR-F1(20-421) or the deglycosylation mutants were captured on the Penta-His antibody by injecting the proteins at 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in the running buffer and 370 RU and 180 RU of SR-F1(20-421), SR-F1(20-353), and SR-F1(20-221) were captured on the Penta-His antibody by injecting the proteins at 16 and 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. A flow cell submitted to the coupling steps without immobilized protein was used as a reference for CRT. Immobilized BSA was used as the reference surface for C1q and a flow cell with immobilized Penta-His antibody was used as a blank for proteins captured through their His Tag.

Binding was measured at a flow rate of 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  (30  $\mu\text{l}/\text{min}$  for CRT) in TBS buffer, pH 7.4, containing 0.005% (Biacore X and 3000) or 0.05% (T200) surfactant P20 and 2 mM  $\text{CaCl}_2$  (referred to as TBS-Ca-P) or 2 mM EDTA (TBS-E-P). Analyses of LDL or AcLDL interactions were performed in the absence of surfactant. The specific binding signal was obtained by subtracting the signal from the reference surface. Regeneration of the surfaces was achieved by 10  $\mu\text{l}$  injections of 1 M NaCl, 10 mM EDTA for all experiments, with the exception of proteins captured *via* the Penta-His antibody, where 10  $\mu\text{l}$  injections of 10 mM glycine pH 2 were used.

#### SPR Data Evaluation

Kinetic data were analyzed by global fitting of both the association and dissociation phases for at least five concentrations simultaneously, either to a 1:1 Langmuir binding model (multiple cycle kinetics) or to a two-state reaction binding model (single cycle kinetics), using the BIA evaluation 3.2 (Biacore X and 3000) or Biacore T200 evaluation 2.0 software (GE Healthcare). Buffer

blanks were subtracted from the data sets (double referencing). For the Langmuir binding model, the apparent equilibrium dissociation constants ( $K_D$ ) were calculated from the ratio of the dissociation and association rate constants ( $k_d/k_a$ ). For the two-state reaction (conformational change) model, the apparent dissociation constants were calculated from the rate constants:  $K_D = 1/[(k_{a1}/k_{d1})(1 + k_{a2}/k_{d2})]$ .  $\chi^2$  values were below 5 in all cases.

### THP-1 and JurkaT Cells Culture

THP-1 and JurkaT cells were cultured in RPMI-1640 medium (Thermo Fisher). Medium was supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (v/v), penicillin (3 U/ml), and streptomycin (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). All cell lines were maintained at 37°C, under a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. THP-1 monocytes were differentiated into macrophage-like cells by treatment with 10 nM PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) for 48 h (40).

### Production of a THP-1 Cell Line Overexpressing SR-F1

The pCMV6-AC-SR-F1 plasmid was generated from the pCMV6-AC-SR-F1-GFP plasmid (Origene, RG207919) by inserting a stop codon at the end of SR-F1 coding sequence, using the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit and oligonucleotides SRF1-stopF and SRF1-stopR (Table S1). The pCMV6-AC plasmid was generated from the pCMV6-AC-GFP plasmid (Origene, PS100010) by cleavage with HindIII and PmeI (to remove the GFP coding sequence) followed by blunting and ligation with Klenow fragment of polymerase I (Thermo Fisher). The sequences of both constructs were checked by DNA sequencing (GATC Biotech).

THP-1 cells were transfected with pCMV6-SR-F1 or the empty pCMV6 vector (Mock-transfected cells) using lipofectamine LTX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Transfected cells were selected with G418 (400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and individual clones were selected and expanded. The level of SR-F1 expression was confirmed by western blotting of cell lysates (RIPA lysis buffer, Sigma-Aldrich) under reducing conditions with a rabbit monoclonal anti-SR-F1 antibody (Abcam, ab92308) and by flow cytometry with a goat anti-SR-F1 antibody (R&D systems, AF 2409), and detected by a goat anti-rabbit IgG, HRP conjugate (Sigma-Aldrich) or a donkey anti-goat IgG, DyLight 594 labeled (Agrisera).

### Fluorescence Microscopy and Flow Cytometry Analysis

Immunostaining  
For all experiments on THP-1 cells, Fc $\gamma$ R blockade was performed with the Fc $\gamma$ R-blocking solution (Miltenyi Biotec). Cells were incubated with C1q [final concentration 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS containing 3% (w/v) BSA] on ice for 40 min and then incubated for 30 min with mouse anti-C1q Abs (A201, Quidel) diluted 1:100, and a goat anti-SR-F1 (R&D systems; AF 2409) diluted 1:100 followed by AF405-labeled anti-goat IgG and Cy-3-labeled anti-mouse antibodies (Jackson ImmunoResearch). FACS analyses were performed on a MACSQuant VYB Cytometer (Miltenyi Biotec) and collected data were analyzed with the

MACSQuantify software. Results were expressed as MFI (median fluorescence intensity) ratio (MFI of the labeled sample/MFI of the control). For immunofluorescence imaging, cell samples were fixed for 10 min with 3% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in PBS at 37°C. Reduction of aldehyde groups was then done by 0.1% NaBH<sub>4</sub> in PBS, 7 min at RT before immunolabeling. Slides were mounted using DABCO solution (1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane, 25 mg/ml; Sigma- Aldrich) in PBS/glycerol 1:9 (v/v) and were visualized under an inverted Olympus IX81 fully motorized microscope equipped with a piezo stage [Olympus and Perkin Elmer, M4D cell imaging platform, Integrated Structural Biology Grenoble (ISBG)]. Acquisition was achieved with a sCMOS camera (Hamamtsu Orca Flash4; Volocity).

#### Phagocytosis Assay and Apoptosis Induction

Mock-transfected or SR-F1 overexpressing THP-1 cells were labeled with CFSE (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Life Technologies) as follows : cells were washed with PBS and then resuspended at  $2 \times 10^6$  cells/ml in PBS-CFSE 1 μM and incubated at 37°C for 15 min. The remaining CFSE was quenched by the addition of RPMI 1640, 10% FCS for at least 10 min. THP-1 cells were then differentiated into macrophage-like cells by treatment with 10 nM PMA for 48 h at 37°C in a 24-well tissue culture plate. JurkaT cells were labeled with PKH26 dye (Sigma-Aldrich) and apoptosis was induced in culture plates ( $9 \times 10^6$  cells in 12 ml of fresh RPMI medium) by UVB irradiation (1,000 mJ/cm<sup>2</sup>) at 312 nm for 9 min. Cells were then incubated for 16 h at 37°C. The apoptosis state of cells was assessed by flow cytometry using the Annexin V-FITC Kit (MiltenyiBiotec) according to the manufacturer's instructions (representative experiment shown in Figure S1).

Apoptotic JurkaT cells were then added to THP1-derived macrophages at a ratio of 5:1 (JurkaT:THP-1), without or with 80 μg/ml of C1q for 2 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in serum-free RPMI. Cells were then washed and harvested with 0.25% trypsin/EDTA and immediately analyzed by flow cytometry. Phagocytosis is expressed as the percentage (%) of the CFSE- and PKH26-labeled cells in the THP-1 macrophage population. For each condition, negative controls corresponding to phagocytosis performed at 37°C in the presence of 5 μM cytochalasin D (Sigma-Aldrich) were subtracted.

#### Quantitation of Endocytosis by Flow Cytometry

Purified CRT was labeled with Alexa fluor 568 (A568) by using Alexa Fluor Protein labeling Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. THP-1 macrophages in 12-well plates ( $0.5 \times 10^6$  cells/well) were incubated with 0.5 ml of complete RPMI 1640 containing A568-labeled recombinant CRT at 5 and 10 μg/ml. Uptake of the protein was allowed to proceed for 30 min at 37°C and internalization was stopped by rapid washing with PBS. Cells were then harvested with 0.25% trypsin/EDTA and immediately analyzed by flow cytometry. Results are expressed as MFI ratio (MFI of experiment with CRT-A568/MFI of experiment without CRT).

#### Statistical Analysis

Significance was tested using non-parametric Wilcoxon signed-rank test for paired samples (Graph Pad Prism 5.0).

## RESULTS

### Biochemical Characterization of SR-F1 Ectodomain

#### Production and Purification of Soluble Scavenger Receptor

Soluble scavenger protein constructs SR-F1(20-421), SR-F1(20-353), and SR-F(20-221), comprising EGF-like repeats 1–10, 1–8, and 1–5, respectively, were produced in 293-F cells and purified from cell culture supernatant by affinity chromatography on Ni-NTA resins. SR-F1(20-353) corresponds to alternative spliced forms of SR-F1 (isoform 4, Uniprot identifier Q14162-4 and isoform 5, Uniprot identifier Q14162-5) isolated from a peripheral blood leukocyte cDNA library (10), where EGF-like modules 9 and 10 were missing, and contains the first putative N-glycosylation site (Asn 289). To ascertain the influence of glycosylation on SR-F1 binding activities, we also produced SR-F1(20-221), which lacks EGF-like modules 6 to 10 and thus the three putative N-glycosylation sites (Figure 1A).

The mean amounts of receptor purified from 100 ml of supernatant were 450, 55, and 20 μg, for SR-F1(20-421), SR-F1(20-353), and SR-F1(20-221), respectively. SDS-PAGE analysis of the proteins revealed single protein bands for the three samples with noticeable differences in the apparent molecular weights of the unreduced and reduced protein samples (Figure 1B), which can be related to the high number of predicted cysteines, i.e., 36, 30, and 18, in SR-F1(20-421), SR-F1(20-353), and SR-F1(20-221), respectively. The width of the Coomassie blue-stained protein bands observed for SR-F1(20-421) and SR-F1(20-353) probably reflected the heterogeneous glycosylation state of both proteins, in contrast to the non-glycosylated SR-F1(20-221) migrating as a thin band under non-reducing conditions.

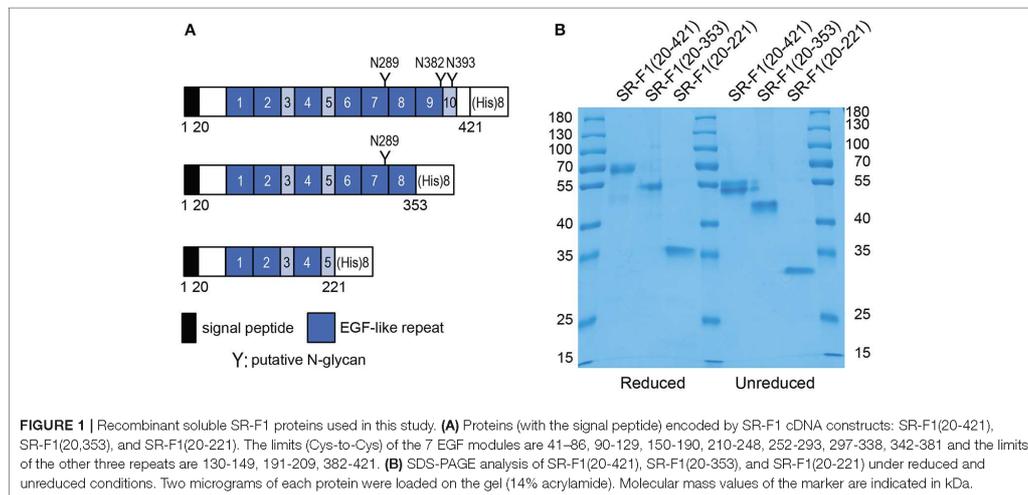
#### Physicochemical Properties

N-terminal sequence determination of SR-F1(20-421) indicated the following sequence: SELDPKGQ, in agreement with SR-F1 sequence from residue 20. Circular dichroism was used to assess the correct folding of SR-F1(20-421). The far-UV CD spectrum of SR-F1(20-421) was typical of proteins containing EGF modules (41), displaying a negative band with a minimum at 202 nm and a weakly positive maximum around 225 nm (Figure S2A) which can be attributed to tryptophan and tyrosine residues in recombinant EGF modules (41).

SR-F1(20-421) stability was also analyzed by thermal shift assay (TSA) (Figure S2B) and a  $T_m$  of  $46 \pm 1^\circ\text{C}$  was measured in TBS. Addition of NaCl up to 1 M, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, or 2 mM EDTA to SR-F1(20-421) did not substantially change its  $T_m$  value (Figure S2B and data not shown).

#### SR-F1 Is an N-Glycosylated Protein

MALDI-TOF mass spectrometry analysis of SR-F1(20-421) indicated a measured mass of  $49.1 \pm 0.4$  kDa (average of three independent determinations), accounting for the polypeptide



chain (44.0 kDa) plus an extra mass of 5 kDa putatively corresponding to N-linked glycans. Site directed mutagenesis and digestion experiments were conducted in order to confirm the presence of N-glycosylation on the three potential glycosylation sites located at asparagine residues 289, 382, and 393 (see below).

#### Receptor Deglycosylation by Peptide N-Glycosidase F Digestion

SR-F1(20-421) was subjected to digestion by PNGase F, which catalyzes the cleavage of asparagine-linked complex, hybrid, or high mannose oligosaccharides. Analysis of digestion products by SDS-PAGE revealed a shift in the molecular mass of PNGase F-treated SR-F1 (Figure 2A), confirming SR-F1 glycosylation. Glycosylation of N289 was directly demonstrated by the shift observed in the molecular mass of SR-F1(20-353) upon PNGase F treatment (Figure 2B).

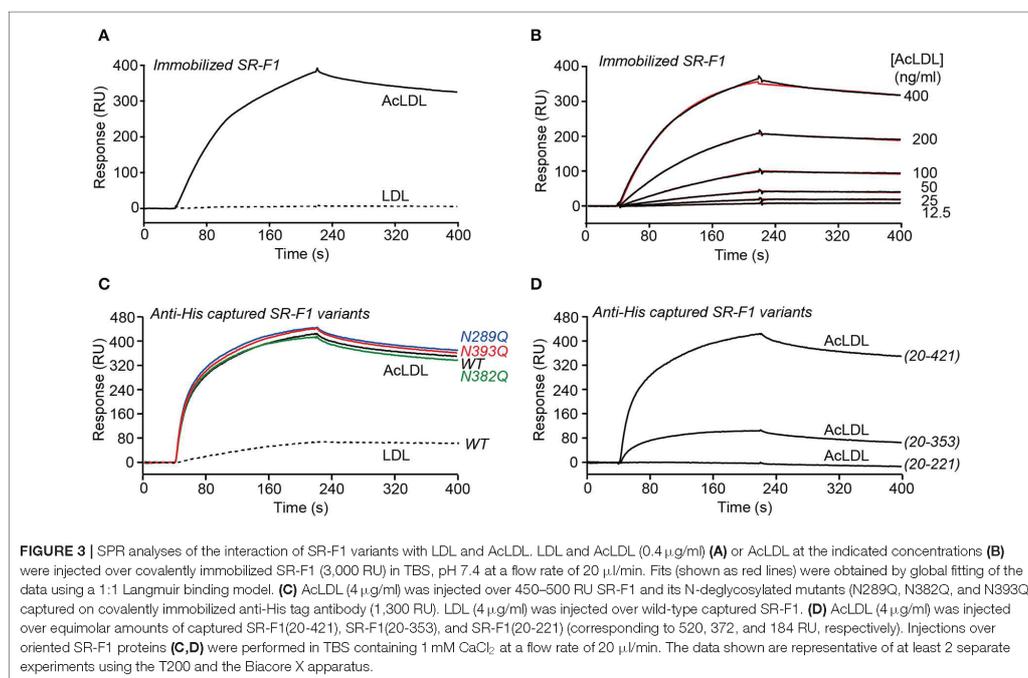
#### Characterization of SR-F1 Mutants Lacking One Potential N-Glycosylation Site

Three SR-F1(20-421) mutants, each with one asparagine glycosylation site (N289, N382, or N393) replaced by a glutamine residue were produced and purified in the same way as wild-type SR-F1(20-421). The amounts of proteins purified from 100 ml of supernatant were 70, 85, and 200 µg, for the N289Q, N382Q, and N393Q mutants, respectively. All these mutated receptors were less secreted than their wild-type counterpart [450 µg for SR-F1(20-421) purified from 100 ml supernatant].

The purified proteins were analyzed by SDS-PAGE (Figure 2C) and MALDI-TOF mass spectrometry. The molecular masses for the N382Q and N393Q mutants were

48.0 and 47.6 kDa, respectively. The differences between the measured mass of SR-F1 mutants and the predicted mass for unglycosylated SR-F1(20-421) (44.0 kDa) are consistent with the presence of N-linked glycans on the two remaining predicted sites. This confirms that N-glycosylation is occurring on the three sites in the wild-type protein, in agreement with previous data obtained with full-length SR-F1 at the surface of Chinese hamster ovary (CHO) cells (42). PNGase F digestion of SR-F1 variants (N289Q, N382Q, and N393Q) further confirmed the N-glycan occupancy of the three putative SR-F1 sites since a similar shift of deglycosylated variants could be observed when analyzed by SDS-PAGE (Figure S3). MALDI-TOF analysis of SR-F1(20-421) N289Q yielded a molecular mass of 45.3 kDa, suggesting a possible proteolytic cleavage, which was confirmed by SDS-PAGE analysis (Figure 2C). The N-terminal sequence of this mutant was determined and was identical to that of the glycosylated receptor, suggesting that the loss of amino acids occurred in the C-terminal part of the protein. The extra loss of 2.3–2.6 kDa compared with the N382Q and N393Q mutants could be accounted for by the loss of 20–24 amino acids (considering that the average molecular weight of an amino acid is 110 Da). The absence of glycosylation at position 289 might have slightly modified SR-F1 folding, resulting in a better accessibility for proteases in the amino acids 405–409 region.

The conformation of purified SR-F1(20-421) mutants was also probed by limited tryptic and chymotryptic proteolysis where protein digestion products were analyzed by SDS-PAGE and direct Coomassie blue staining (Figures S4A,B). All mutants showed the same digestion profiles as the wild-type receptor, indicating that loss of one N-glycosylation site did not affect the receptor sensitivity to these proteases.



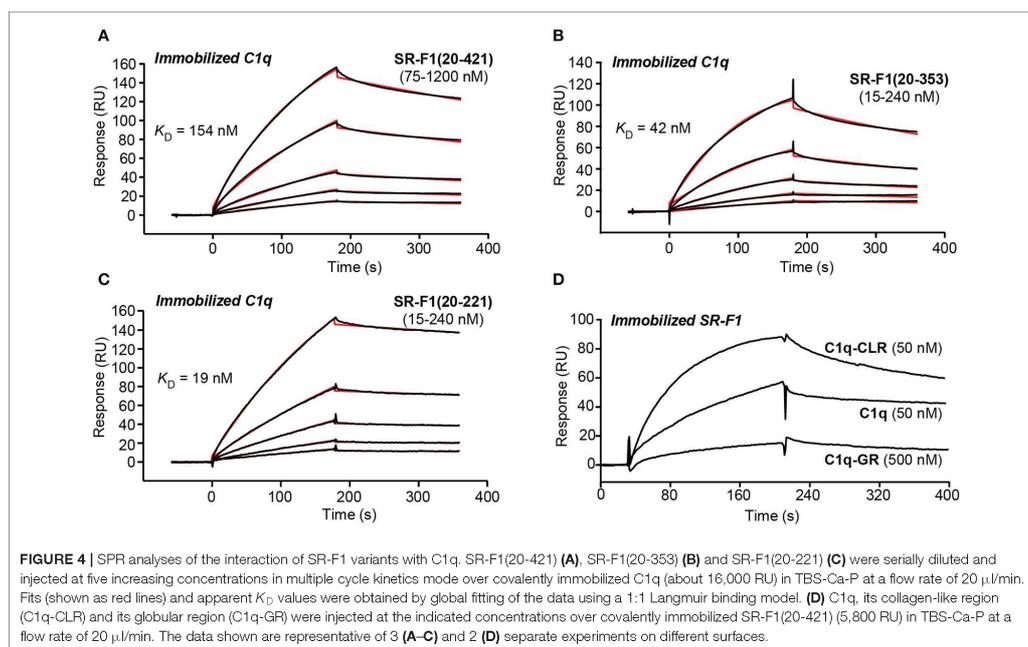
### The Expression of SR-F1 Modulates the Efferocytosis Capacity of Macrophages

In order to investigate the potential role of SR-F1 on the C1q-dependent modulation of the clearance of apoptotic cells, monocyte THP-1 cells were transfected with full length SR-F1 cDNA and a stable SR-F1 overexpressing THP-1 cell line was generated as described in Materials and Methods. These cells expressed a higher level of SR-F1 than wild type THP-1 cells, as demonstrated by western blot analysis (Figure 5A). In addition, as shown by flow cytometry analysis in Figure 5B, the SR-F1 receptor was efficiently exposed at the surface of the cell. Of note, the ectopic expression of SR-F1 increased on PMA-treated THP-1 cells, which might result from the known PMA-mediated activation of the CMV promoter (47).

Further experiments were then conducted to analyze the consequences of SR-F1 overexpression on C1q binding. As shown in Figure 5C, C1q bound more strongly to the surface of SR-F1 overexpressing macrophages. Binding was dependent on the amount of surface SR-F1 as double C1q/SR-F1 labeling experiments, analyzed by flow cytometry, showed that the more THP-1 cells expressed SR-F1, the more they were recognized by C1q (Figure 5D). We then examined the possible colocalization of SR-F1 and C1q at the surface of the macrophage using the new SR-F1 overexpressing THP-1 cell line. As shown in Figure 5E, C1q and SR-F1 colocalized in some membrane areas (yellow in

the merge view), suggesting their possible direct interaction at the surface of the cell. Further supporting this direct interaction, recombinant SR-F1(20-421), when added to soluble C1q, was able to partly inhibit C1q binding to SR-F1 overexpressing cells (flow cytometry analysis shown in Figure S6).

As SR-F1 has been reported to trigger the endocytosis of CRT (34) and in view of our previous demonstration that soluble CRT, released from apoptotic cells, was effectively endocytosed by macrophages (40), we analyzed the direct molecular SR-F1/CRT interaction. SPR analysis showed that CRT bound to the immobilized ectodomain of SR-F1 with apparent  $K_D$  values of  $345 \pm 8$  nM (Figure 6A). The interaction was also observed in the reverse configuration using immobilized CRT (3,320 RU) and soluble SR-F1(20-421) and an apparent  $K_D$  of 770 nM was obtained (not shown). Interestingly, SR-F1(20-353) and SR-F1(20-221) fragments retained a similar capacity to interact with CRT, suggesting that the CRT binding site is located in the 20-221 SR-F1 fragment (Figure S7). We then investigated the efficiency of THP-1 macrophages in CRT endocytosis and observed a higher level of CRT internalization for SR-F1 overexpressing THP1 cells (Figure 6B). Our results are in agreement with those of Berwin et al. (34) obtained using a CHO cell line expressing the SR-F1 receptor. Together, these data strongly support the fact that the SR-F1 receptor is expressed by THP-1 cells in an active form.



**FIGURE 4 |** SPR analyses of the interaction of SR-F1 variants with C1q. SR-F1(20-421) (**A**), SR-F1(20-353) (**B**) and SR-F1(20-221) (**C**) were serially diluted and injected at five increasing concentrations in multiple cycle kinetics mode over covalently immobilized C1q (about 16,000 RU) in TBS-Ca-P at a flow rate of 20  $\mu$ l/min. Fits (shown as red lines) and apparent  $K_D$  values were obtained by global fitting of the data using a 1:1 Langmuir binding model. (**D**) C1q, its collagen-like region (C1q-CLR) and its globular region (C1q-GR) were injected at the indicated concentrations over covalently immobilized SR-F1(20-421) (5,800 RU) in TBS-Ca-P at a flow rate of 20  $\mu$ l/min. The data shown are representative of 3 (**A-C**) and 2 (**D**) separate experiments on different surfaces.

**TABLE 1 |** Kinetic and dissociation constants for binding of SR-F1 to immobilized C1q.

SR-F1 variant	$k_a$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_d$ ( $s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$K_D$ (nM) <sup>a</sup>	$t_{1/2}$ (s) <sup>b</sup>
(20-421)	$6.84 \pm 0.99 \times 10^3$	$1.26 \pm 0.20 \times 10^{-3}$	$186 \pm 21$	550
(20-353)	$7.00 \pm 2.41 \times 10^4$	$2.09 \pm 0.44 \times 10^{-3}$	$32.4 \pm 6.4$	331
(20-221)	$1.85 \pm 0.39 \times 10^5$	$3.03 \pm 0.74 \times 10^{-3}$	$17.7 \pm 0.9$	229

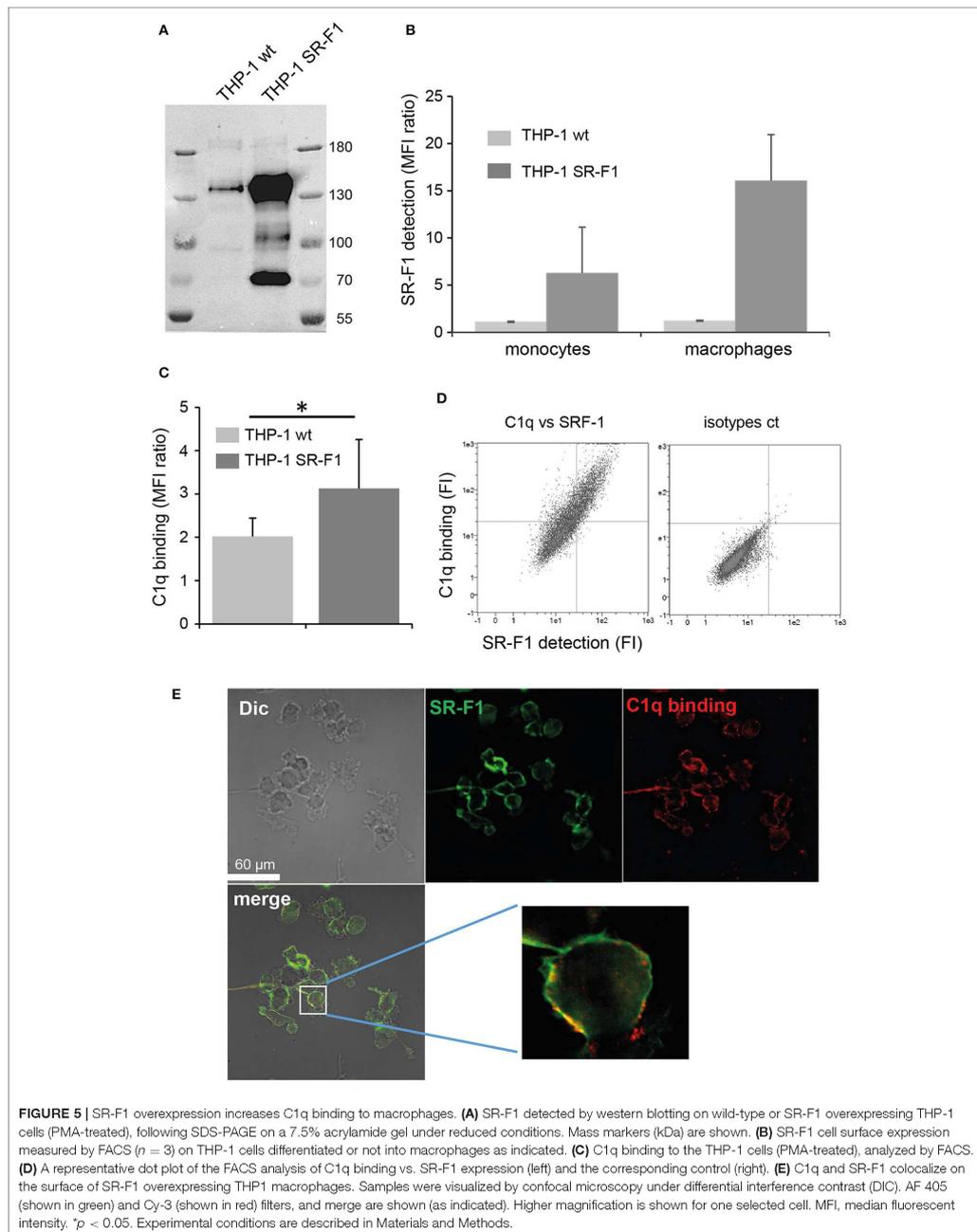
<sup>a</sup>Values are the means  $\pm$  SE of three experiments on different surfaces.  
<sup>b</sup>Half-lives of complexes were determined from the  $k_d$  values using the formula  $t_{1/2} = \ln 2/k_d$ .

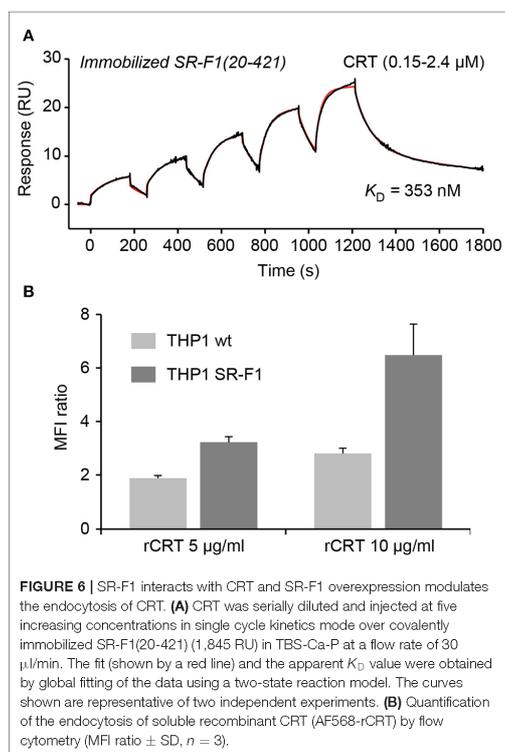
We next investigated the effect of SR-F1 overexpression on the phagocytosis of an apoptotic cell population by comparison with mock-transfected cells. THP-1 macrophages were fed for 2h with late apoptotic JurkaT cells obtained by UVB irradiation (>85% Annexin V positive and >60% Annexin V positive and PI positive, **Figure S1**). The uptake of apoptotic cells by THP-1 macrophages was analyzed in the absence or presence of C1q used at a physiological concentration (80  $\mu$ g/ml) (**Figure 7**). Flow cytometry data showed that THP-1 cells that overexpressed SR-F1 presented a 1.6 fold significant decrease in the phagocytosis efficiency compared to the mock-transfected cells (phagocytosis of 28.8% vs. 45.9%,  $n = 8$ ). This observation suggests that increasing cell surface SR-F1 could negatively modulate the function of other molecules involved in the engulfment of apoptotic cells. Interestingly, we observed a slight but statistically

significant (31.7% vs. 28.8%,  $p = 0.0156$ ,  $n = 8$ ) increase due to the addition of C1q in the phagocytic milieu of the SR-F1 overexpressing THP-1 macrophages. This is consistent with the putative bridging function of C1q.

**DISCUSSION**

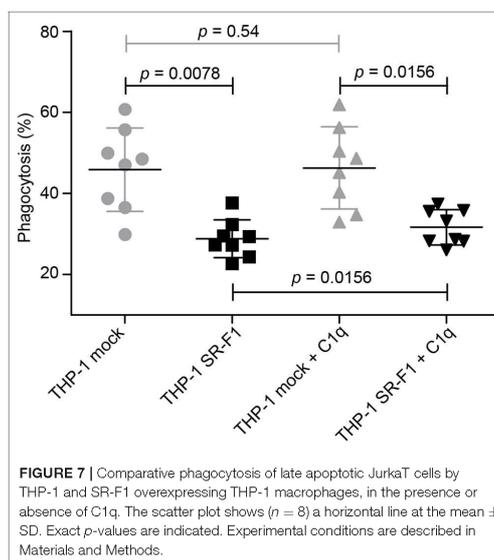
The purpose of this work was to investigate the interaction of scavenger receptor SR-F1 with three different partners, AcLDL, C1q, and CRT, and to clarify the functional fate of these interactions at the cellular level. The present work first provides a clear picture of the interactions underlying the bridging role of C1q. The N-terminal half of the ectodomain of SR-F1 is interacting with the collagen tail of C1q, whereas the globular heads of C1q bind phosphatidylserine, DNA or CRT. In this configuration, SR-F1 holds C1q quite tightly through its collagen tail and the six globular heads of C1q can capture the apoptotic cell, thanks to its avidity for several “eat me” signal molecules at the surface of apoptotic cells. The half-life of the SR-F1-C1q complex as derived from the  $k_d$  value is about 10 min (**Table 1**), and the half-life of C1q/CRT complex is about 16 min (28), values compatible with the duration of cell-cell interactions and the phagocytosis process. Thus, the kinetics parameters of SR-F1 binding argue in favor of a genuine capture of C1q by SR-F1. In addition, SR-F1 was able to interact with ficolins, other complement recognition proteins with collagen-like regions (our unpublished observations), which suggests that this receptor





might be shared with other innate immune proteins of the defense collagens family (collectins, ficolins). These observations add SR-F1 to the list of C1q/collectin receptors for collagen-like regions, including leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1 (LAIR-1),  $\alpha$ 2- $\beta$ 1 integrin, CD91 or complement receptor 1 [reviewed in (48)]. Further studies will be needed to identify the precise binding sites in C1q CLR and in SR-F1 EGF-like modules.

Our results identify two different binding regions on SR-F1: one is located in the N-terminal end that contains the first 5 EGF like modules of SR-F1 and includes C1q and CRT binding site(s). The second one is located in the C-terminal end that contains the 5 last EGF like modules and includes the AcLDL binding site. The SR-F1 binding site that is the more distal from the membrane is dedicated to interaction with molecules involved in the uptake of apoptotic cells. On the other hand, the binding site closer to the membrane is involved in the internalization of protein complexes. This thus suggests that the two regions may have different functions, although the binding of more partners such as hsp70 or hsp90 needs to be investigated to test the general character of this hypothesis.



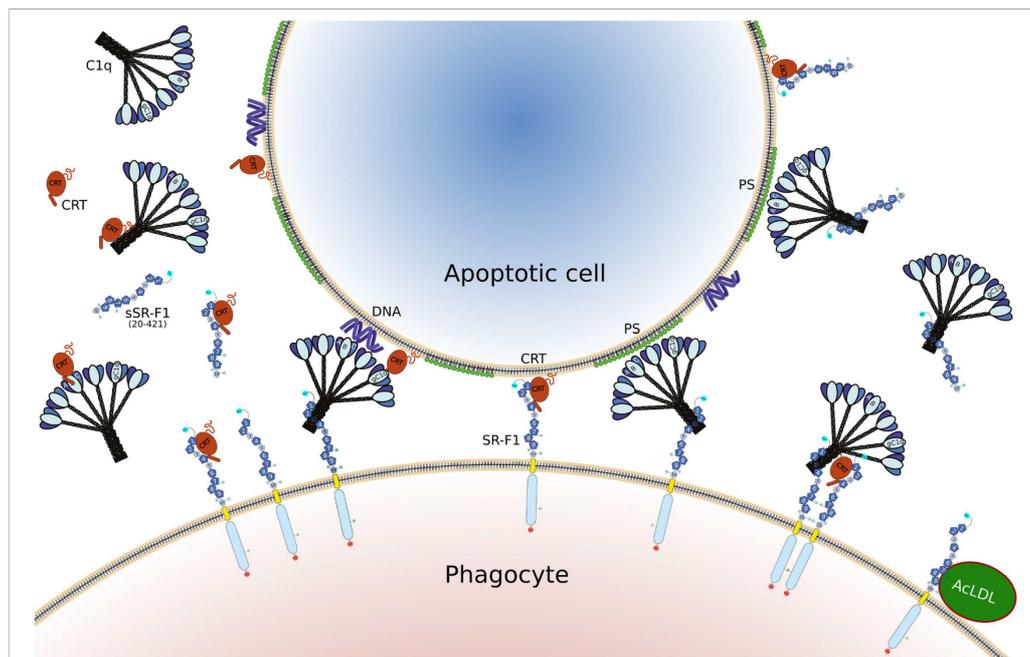
Our data also suggest that the binding properties of SR-F1 for either AcLDL or C1q do not strongly depend on the presence of glycosylation on asparagine 289, 382, or 393. The mutation of any of these asparagines to glutamines does not impact at all the interaction with AcLDL, whereas the affinity of SR-F1 mutants for C1q is only decreased by a factor 3. These findings are not in full accordance with the data of Sano et al. (42) who reported that mutations of N382 and N393 increased the binding of fluorescent AcLDL (DiI-AcLDL) to CHO cells transfected with SR-F1 variants. However, cell surface SR-F1 quantification is not as accurate as that of SR-F1 immobilized at the sensor chip surface and reported affinities by these authors only differed by a factor 2 (mean  $K_D$  values of 0.35 and 0.37  $\mu$ g/ml for N382Q and N393Q cells, respectively and of 0.72 and 0.66  $\mu$ g/ml for wild type and N289Q cells, respectively).

The data presented in this work suggest that a change in the SR-F1 conformation is induced upon C1q binding. Indeed, the higher affinity of C1q for the SR-F1(20-353) and SR-F1(20-221) constructs, in comparison to the full ectodomain (20-421) can be explained by a conformational change of the latter upon C1q binding. A more detailed analysis further supports this hypothesis. The similar dissociation rates ( $k_d$ ) observed for all three constructs (Table 1) support the idea of a conserved molecular interface between any of the SR-F1 constructs and C1q. The higher association rates observed for the 20-221 and the 20-353 constructs (25 times and 10 times higher  $k_a$ , respectively) suggest that the access to the binding site is facilitated. In its native state, SR-F1 may not be fully elongated but most likely folded, with the C-terminal end partially masking C1q and CRT binding site in the N-terminal half on the SR-F1 ectodomain.

Two of the SR-F1 constructs studied in this work (20-421) and (20-353) correspond to soluble SR-F1 fragment expressed *in vivo* (10, 11). The expression of soluble forms of SR-F1 may be a mechanism to antagonize the role of the membrane-bound form of SR-F1. The reduced AcLDL binding capacity of the SR-F1(20-353) construct suggests that different soluble isoforms may selectively antagonize either only the interaction with C1q or CRT (20-353) or interactions with all types of partners (20-421). Thus, the functions of the membrane-bound SR-F1 may be selectively regulated by the production of one of these soluble forms.

Another goal of our study was to examine the effect of SR-F1 on efferocytosis. We showed that C1q binds more efficiently to THP-1 macrophages that overexpress SR-F1, than to wild-type THP-1 cells. This is consistent with a direct interaction between C1q and SR-F1 at the surface of the cell. The observation of colocalizations between C1q and SR-F1 after immunolabeling supports this idea and is in line with the published data from

Ramirez-Ortiz et al. (23) which demonstrated that C1q binds to SR-F1-TNF-R1 chimeric receptor expressed on HEK293T cells. However, the fact that our colocalization experiment shows that C1q does not exclusively colocalize with SR-F1 strongly suggests that C1q also binds to other receptors at the THP-1 macrophage surface, such as CD91, LAIR-1, and CD33 (49-51). In the same study, Ramirez-Ortiz et al. (23) also demonstrated that SR-F1 mediates apoptotic cell recognition and capture by CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC subset in mice from the comparison of *SCARF1*<sup>-/-</sup> and *SCARF1*<sup>+/+</sup> DC. It is nevertheless important to note that, in apparent contradiction with the above observation, our phagocytosis assays showed that increasing SR-F1 on THP-1 macrophages negatively modulates the uptake of apoptotic cells. This difference may be attributed to differences in the cellular model (human macrophages instead of mouse DC) or in the experimental setup. Indeed, because wild type THP-1 cells express endogenous SR-F1, it can be speculated that increasing cell production of SR-F1 molecules could affect the equilibrium



**FIGURE 8** | Illustration of the different interactions involving SR-F1, C1q, CRT, and AcLDL, as discussed in the present article. The full length SR-F1 includes 7 EGF like domains (dark blue pentagons numbered 1, 2, 4, 6-9), 3 EGF repeats containing domains (small medium blue pentagons numbered 3, 5, 10), a transmembrane domain (yellow) and a cytosolic domain (light blue). The N- and C-terminal extremities of SR-F1 are indicated by a cyan and red circle, respectively, and the N-linked glycans by a circled N. Soluble forms of SR-F1 extracellular domain (sSR-F1) are also shown but for the sake of simplicity only the soluble SR-F1(20-421) form has been depicted. In the center, possible phagocyte-apoptotic cell interactions mediated by SR-F1 are shown. On the left and on the right, molecular interactions interfering with the phagocyte-apoptotic cell interaction involving soluble CRT and sSR-F1, respectively. On the lower right, the SR-F1-AcLDL complex is shown as well as a putative hetero-tetramer in which soluble CRT may enhance anchoring of C1q to SR-F1 and SR-F1 clustering with possible consequences on phagocyte-apoptotic cell interactions.

in molecular interactions that control the binding and the uptake of the phagocyte's target. Thus, this could suggest that SR-F1 interferes with other molecules crucial for this process. CRT, which is known as an "eat-me signal" when exposed at the surface of apoptotic cells and is able to bind to macrophage's surface, is thus one possible candidate. To support this hypothesis, we demonstrated direct CRT-SR-F1 interaction by SPR experiments (Figure 6A) and, in line with this data, we observed that cells overexpressing SR-F1 increase their endocytic capacity for exogenous CRT, in agreement with previously published data using a mouse macrophage cell line overexpressing SR-F1 (34). This observation may explain the decrease in phagocytic efficiency. Indeed, increasing SR-F1 at the macrophage surface will increase endocytosis of CRT, regardless of whether this CRT was present at the apoptotic cell surface, or in solution. A possible consequence may be to diminish CRT availability at the apoptotic cell-phagocyte interface and consequently reduce its ability to trigger "eat-me signaling." A possible complementary explanation for the decrease of phagocytic efficiency is provided by our previous demonstration (40) that exogenous CRT, added to wild type THP-1 macrophages and endocytosed, triggers a peculiar polarization and affects engulfment of apoptotic cells. A third hypothesis might be a possible increase of the proteolytic release of soluble SR-F1 from the cell surface, a phenomenon recently described by Patten et al. (11). Soluble SR-F1 shed from the surface of SR-F1 overexpressing cells might compete with C1q and CRT for binding to cell surface SR-F1. Alternatively, it could also be proposed that a higher concentration of apoptotic cells could be required to activate SR-F1-dependent phagocytosis in cells that overexpress SR-F1 compared to wild type macrophages. Although apoptotic cells were added in excess to THP-1 macrophages and were not all engulfed, we cannot exclude this possibility.

Given that CRT is known to bind to C1q with slightly higher affinity ( $K_D \sim 120$  nM) (28) than to SR-F1 ( $K_D \sim 345$  nM), we might also consider a role for possible multimolecular interactions involving C1q, CRT, and SR-F1 at the surface of the macrophage. Although CRT and C1q bind to the same half of the SR-F1 ectodomain, their respective exact binding site remains to be determined. Such an information is required to assess the possible intermolecular interaction network involving these three molecular partners.

Overall, the data presented here shed some light into the role of SR-F1 in efferocytosis, through its capacity to bind C1q and CRT, two proteins known to participate in the clearance of apoptotic cells, as illustrated schematically in Figure 8. It is clear that these interactions are mediated by a region of SR-F1 not involved in its typical scavenging function for modified LDL, but further experiments are needed to elucidate their functional consequences in different cellular environments. SR-F1 interacts

with C1q, a bridging molecule facilitating apoptotic cell uptake by the phagocyte and involved in signaling events during the elimination of apoptotic cells. In addition, SR-F1 can trigger internalization of CRT, identified as an eat-me signal, but also able to modulate macrophage function.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding authors.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CW-P, NT, PF, and DH designed the study. CW-P, IB, SD, PT-D, NT, and PF performed the research. CW-P, NT, PF, PT-D, and DH analyzed the data. YD contributed key reagents. CW-P, NT, PF, and DH wrote the manuscript draft. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

## FUNDING

This work was supported by the French National Research Agency (grant ANR-16-CE11-0019). This work used the platforms of the Grenoble Instruct-ERIC center (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB), supported by FRISBI (ANR-10-INBS-05-02) and GRAL, financed within the University Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Anne Chouquet and Jean-Baptiste Reiser for assistance and access to the SPR facility, Anne-Marie Villard for assistance and access to the TSA platform, Caroline Mas and Marc Jamin for assistance and access to the CD facility, Rose-Laure Revel-Goyet, Françoise Lacroix, and Jean-Philippe Kleman for the support and access to the Cell Imaging platform, and Jean-Pierre Andrieu and Luca Signor for performing N-terminal sequencing and mass spectrometry analyses, respectively. We thank Rim Osman for help in SR-F1-CRT interaction measurements. IBS acknowledges integration into the Interdisciplinary Research Institute of Grenoble (IRIG, CEA).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00544/full#supplementary-material>

## REFERENCES

1. PrabhuDas MR, Baldwin CL, Bollyky PL, Bowdish DME, Drickamer K, Febbraio M, et al. A consensus definitive classification of scavenger receptors and their roles in health and disease. *J Immunol.* (2017) 198:3775–89. doi: 10.4049/jimmunol.1700373
2. Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells.

- J Biol Chem.* (1997) 272:31217–20. doi: 10.1074/jbc.272.50.31217
3. Means TK, Mylonakis E, Tampakakis E, Colvin RA, Seung E, Puckett L, et al. Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *J Exp Med.* (2009) 206:637–53. doi: 10.1084/jem.20082109
  4. Tamura Y, Osuga J, Adachi H, Tozawa R, Takanezawa Y, Ohashi K, et al. Scavenger receptor expressed by endothelial cells I (SREC-I) mediates the uptake of acetylated low density lipoproteins by macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* (2004) 279:30938–44. doi: 10.1074/jbc.M313088200
  5. Pfistershammer K, Klausner C, Leitner J, Stöckl J, Majdic O, Weichhart T, et al. Identification of the scavenger receptors SREC-I, Cla-1 (SR-BI), and SR-AI as cellular receptors for Tamm-Horsfall protein. *J Leukoc Biol.* (2008) 83:131–8. doi: 10.1189/jlb.0407231
  6. Nagase T, Seki N, Tanaka A, Ishikawa K, Nomura N. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IV. The coding sequences of 40 new genes (K1AA0121-K1AA0160) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res.* (1995) 2:167–74. doi: 10.1093/dnares/2.4.167
  7. Ishii J, Adachi H, Aoki J, Koizumi H, Tomita S, Suzuki T, et al. SREC-II, a new member of the scavenger receptor type F family, trans-interacts with SREC-I through its extracellular domain. *J Biol Chem.* (2002) 277:39696–702. doi: 10.1074/jbc.M206140200
  8. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1979) 76:333–7. doi: 10.1073/pnas.76.1.333
  9. Patten DA. SCARF1: a multifaceted, yet largely understudied, scavenger receptor. *Inflamm Res.* (2018) 67:627–32. doi: 10.1007/s00011-018-1154-7
  10. Adachi H, Tsujimoto M. Characterization of the human gene encoding the scavenger receptor expressed by endothelial cell and its regulation by a novel transcription factor, endothelial zinc finger protein-2. *J Biol Chem.* (2002) 277:24014–21. doi: 10.1074/jbc.M201854200
  11. Patten DA, Kamarajah SK, Rose JM, Tickle J, Shepherd EL, Adams DH, et al. SCARF-1 promotes adhesion of CD4+ T cells to human hepatic sinusoidal endothelium under conditions of shear stress. *Sci Rep.* (2017) 7:17600. doi: 10.1038/s41598-017-17928-4
  12. Jeannin P, Bottazzi B, Sironi M, Doni A, Rusnati M, Presta M, et al. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity.* (2005) 22:551–60. doi: 10.1016/j.immuni.2005.03.008
  13. Rechner C, Kühlewein C, Müller A, Schild H, Rudel T. Host glycoprotein Gp96 and scavenger receptor SREC interact with PorB of disseminating *Neisseria gonorrhoeae* in an epithelial invasion pathway. *Cell Host Microbe.* (2007) 2:393–403. doi: 10.1016/j.chom.2007.11.002
  14. Baur S, Rautenberg M, Faulstich M, Faulstich M, Grau T, Severin Y, et al. A nasal epithelial receptor for *Staphylococcus aureus* WTA governs adhesion to epithelial cells and modulates nasal colonization. *PLoS Pathog.* (2014) 10:e1004089. doi: 10.1371/journal.ppat.1004089
  15. Beauvillain C, Meloni F, Sirard J-C, Blanchard S, Jarry U, Scotet M, et al. The scavenger receptors SRA-1 and SREC-I cooperate with TLR2 in the recognition of the hepatitis C virus non-structural protein 3 by dendritic cells. *J Hepatol.* (2010) 52:644–51. doi: 10.1016/j.jhep.2009.11.031
  16. Thériault JR, Adachi H, Calderwood SK. Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70. *J Immunol.* (2006) 177:8604–11. doi: 10.4049/jimmunol.177.12.8604
  17. Facciponte JG, Wang X-Y, Subjeck JR. Hsp110 and Grp170, members of the Hsp70 superfamily, bind to scavenger receptor-A and scavenger receptor expressed by endothelial cells-I. *Eur J Immunol.* (2007) 37:2268–79. doi: 10.1002/eji.200737127
  18. Murshid A, Gong J, Calderwood SK. Heat shock protein 90 mediates efficient antigen cross presentation through the scavenger receptor expressed by endothelial cells-I. *J Immunol.* (2010) 185:2903–17. doi: 10.4049/jimmunol.0903635
  19. Murshid A, Gong J, Calderwood SK. Hsp90-peptide complexes stimulate antigen presentation through the class II pathway after binding scavenger receptor SREC-I. *Immunobiology.* (2014) 219:924–31. doi: 10.1016/j.imbio.2014.08.001
  20. Hözl MA, Hofer J, Steinberger P, Pfistershammer K, Zlabinger GJ. Host antimicrobial proteins as endogenous immunomodulators. *Immunol Lett.* (2008) 119:4–11. doi: 10.1016/j.imlet.2008.05.003
  21. Hözl MA, Hofer J, Kovarik JJ, Roggenbuck D, Reinhold D, Goihl A, et al. The zymogen granule protein 2 (GP2) binds to scavenger receptor expressed on endothelial cells I (SREC-I). *Cell Immunol.* (2011) 267:88–93. doi: 10.1016/j.cellimm.2010.12.001
  22. Murshid A, Borges TJ, Calderwood SK. Emerging roles for scavenger receptor SREC-I in immunity. *Cytokine.* (2015) 75:256–60. doi: 10.1016/j.cyto.2015.02.009
  23. Ramirez-Ortiz ZG, Pendergraft WF, Prasad A, Byrne MH, Iram T, Blanchette CJ, et al. The scavenger receptor SCARF1 mediates the clearance of apoptotic cells and prevents autoimmunity. *Nat Immunol.* (2013) 14:917–26. doi: 10.1038/ni.2670
  24. Páidassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehwet B, Gaboriaud C, et al. C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *J Immunol.* (2008) 180:2329–38. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2329
  25. Zhou Z, Hartwig E, Horvitz HR. CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell.* (2001) 104:43–56. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00190-8
  26. Kinchen JM, Cabello J, Klinge D, Wong K, Feichtinger R, Schnabel H, et al. Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature.* (2005) 434:93–9. doi: 10.1038/nature03263
  27. Iram T, Ramirez-Ortiz Z, Byrne MH, Coleman UA, Kingery ND, Means TK, et al. Megf10 is a receptor for C1q that mediates clearance of apoptotic cells by astrocytes. *J Neurosci.* (2016) 36:5185–92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3850-15.2016
  28. Páidassi H, Tacnet-Delorme P, Verneret M, Gaboriaud C, Houen G, Duus K, et al. Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition. *J Mol Biol.* (2011) 408:277–90. doi: 10.1016/j.jmb.2011.02.029
  29. Verneret M, Tacnet-Delorme P, Osman R, Awad R, Grichine A, Klemm J-B, et al. Relative contribution of C1q and apoptotic cell-surface calreticulin to macrophage phagocytosis. *J Innate Immun.* (2014) 6:426–34. doi: 10.1159/000358834
  30. Malhotra R, Willis AC, Jensenius JC, Jackson J, Sim RB. Structure and homology of human C1q receptor (collectin receptor). *Immunology.* (1993) 78:341–8.
  31. Kishore U, Sontheimer RD, Sastry KN, Zaner KS, Zappi Eugene G, Hughes GRV, et al. Release of calreticulin from neutrophils may alter C1q-mediated immune functions. *Biochem J.* (1997) 322:543–50. doi: 10.1042/bj3220543
  32. Kovacs H, Campbell ID, Strong P, Johnson S, Ward FJ, Reid KB, et al. Evidence that C1q binds specifically to CH2-like immunoglobulin gamma motifs present in the autoantigen calreticulin and interferes with complement activation. *Biochemistry.* (1998) 37:17865–74. doi: 10.1021/bi973197p
  33. Moreau C, Bally L, Chouquet A, Bottazzi B, Ghebrehwet B, Gaboriaud C, et al. Structural and functional characterization of a single-chain form of the recognition domain of complement protein C1q. *Front Immunol.* (2016) 7:79. doi: 10.3389/fimmu.2016.00079
  34. Berwin B, Delneste Y, Lovinood RV, Post SR, Pizzo SV. SREC-I, a type F scavenger receptor, is an endocytic receptor for calreticulin. *J Biol Chem.* (2004) 279:51250–7. doi: 10.1074/jbc.M406202200
  35. Arlaud GJ, Sim RB, Duplaa AM, Colomb MG. Differential elution of C1q, C1r and C1s from human C1 bound to immune aggregates. Use in the rapid purification of C1 subcomponents. *Mol Immunol.* (1979) 16:445–50. doi: 10.1016/0161-5890(79)90069-5
  36. 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) 167:6374–81. doi: 10.4049/jimmunol.167.11.6374
  37. Tarentino AL, Gómez CM, Plummer TH. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry.* (1985) 24:4665–71. doi: 10.1021/bi00338a028

38. Aude CA, Lacroix MB, Arlaud GJ, Gagnon J, Colomb MG. Differential accessibility of the carbohydrate moieties of CIs-Clr-Clr-Cls, the catalytic subunit of human Cl. *Biochemistry*. (1988) 27:8641–8. doi: 10.1021/bi00423a020
39. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. (1970) 227:680–5. doi: 10.1038/227680a0
40. Osman R, Tacnet-Delorme P, Kleman J-P, Millet A, Frachet P. Calreticulin release at an early stage of death modulates the clearance by macrophages of apoptotic cells. *Front Immunol*. (2017) 8:1034. doi: 10.3389/fimmu.2017.01034
41. Liu Y, Annis DS, Mosher DF. Interactions among the epidermal growth factor-like modules of thrombospondin-1. *J Biol Chem*. (2009) 284:22206–12. doi: 10.1074/jbc.M109.026120
42. Sano M, Korekane H, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Kato M, Shibukawa Y, et al. N-glycans of SREC-I (scavenger receptor expressed by endothelial cells): essential role for ligand binding, trafficking and stability. *Glycobiology*. (2012) 22:714–24. doi: 10.1093/glycob/cws010
43. Fisher WR, Hammond MG, Warmke GL. Measurements of the molecular weight variability of plasma low density lipoproteins among normals and subjects with hyper-lipoproteinemia. Demonstration of macromolecular heterogeneity. *Biochemistry*. (1972) 11:519–25. doi: 10.1021/bi00754a006
44. Crossley J, Jones M, Spragg SP, Noble N, Slack J, Smethurst PR, et al. Measurements of molecular weights of low-density lipoprotein (LDL) from homozygotes for familial hypercholesterolemia and controls. *Biochem Med*. (1981) 26:47–59. doi: 10.1016/0006-2944(81)90029-6
45. Crouse JR, Parks JS, Schey HM, Kahl FR. Studies of low density lipoprotein molecular weight in human beings with coronary artery disease. *J Lipid Res*. (1985) 26:566–74.
46. Reid KBM. Complement component C1q: historical perspective of a functionally versatile, and structurally unusual, serum protein. *Front Immunol*. (2018) 9:764. doi: 10.3389/fimmu.2018.00764
47. Lebkowski JS, McNally MA, Okarma TB, Lerch LB. Inducible gene expression from multiple promoters by the tumor-promoting agent, PMA. *Nucleic Acids Res*. (1987) 15:9043–55.
48. Thielens NM, Tedesco F, Bohlson SS, Gaboriaud C, Tenner AJ. C1q: A fresh look upon an old molecule. *Mol Immunol*. (2017) 89:73–83. doi: 10.1016/j.molimm.2017.05.025
49. Jin J, Wang Y, Ma Q, Wang N, Guo W, Jin B, et al. LAIR-1 activation inhibits inflammatory macrophage phenotype *in vitro*. *Cell Immunol*. (2018) 331:78–84. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.05.011
50. Michée S, Brignole-Baudouin F, Riancho L, Rostene W, Baudouin C, Labbé A. Effects of benzalkonium chloride on THP-1 differentiated macrophages *in vitro*. *PLoS ONE*. (2013) 8:e72459. doi: 10.1371/journal.pone.0072459
51. Fox S, Ryan KA, Berger AH, Petro K, Das S, Crowe SE, et al. The role of C1q in recognition of apoptotic epithelial cells and inflammatory cytokine production by phagocytes during *Helicobacter pylori* infection. *J Inflamm*. (2015) 12:51. doi: 10.1186/s12950-015-0098-8

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Wicker-Planquart, Difour, Tacnet-Delorme, Bally, Delneste, Frachet, Housset and Thielens. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



*Supplementary Material*

**Molecular and cellular interactions of scavenger receptor SR-F1 with complement C1q provide insight into its role in the clearance of apoptotic cells**

Catherine Wicker-Planquart, Samy Dufour, Pascale Tacnet-Delorme, Isabelle Bally, Yves Delneste, Philippe Frachet\*, Dominique Housset, Nicole M Thielens\*

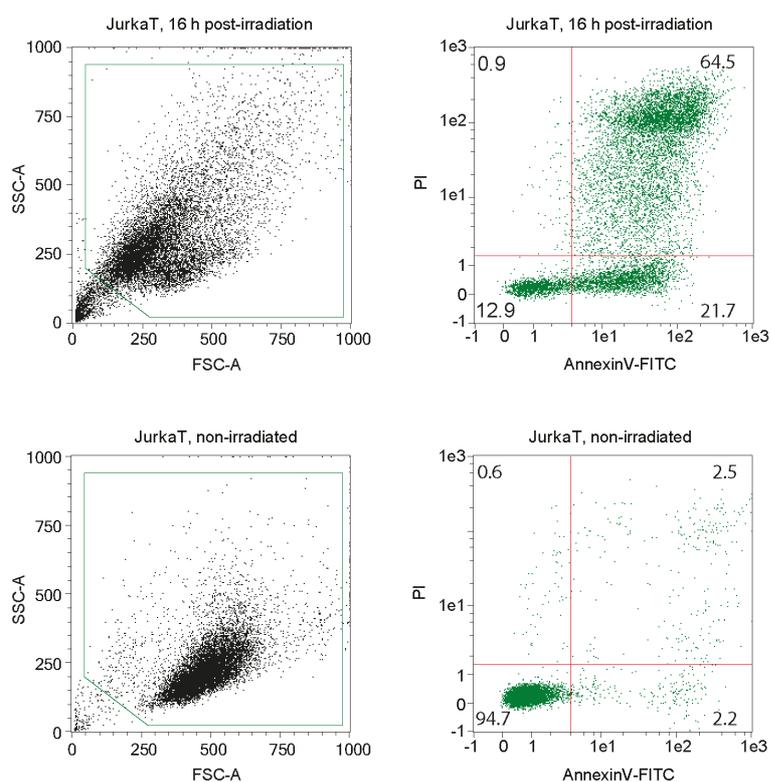
\* Correspondence: Nicole M. Thielens: [nicole.thielens@ibs.fr](mailto:nicole.thielens@ibs.fr)  
Philippe Frachet: [philippe.frachet@ibs.fr](mailto:philippe.frachet@ibs.fr)

**1 Supplementary Tables**

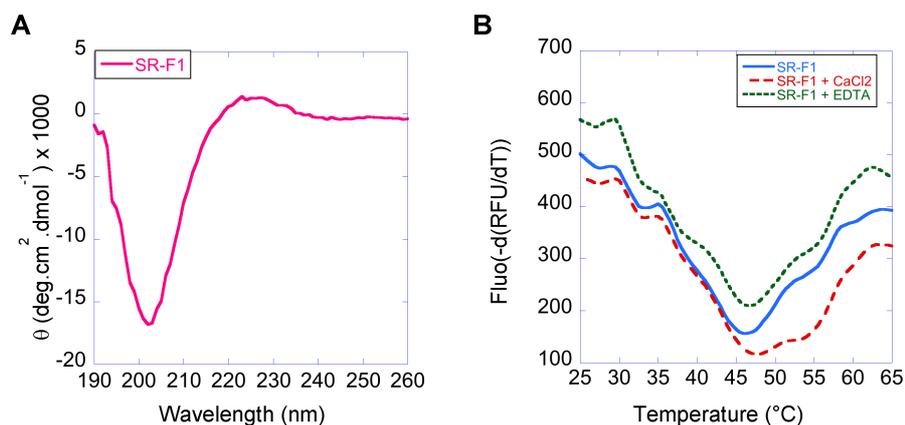
**Table S1 : Oligonucleotides**

Name	Sequence
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Pac R2	CATCAGTGATGGTGATGATGATGATGATGCTTAATTAAGTGTCCCGA CTGCCAGAGCC
BGHRRev	TAGAAGGCACAGTCGAGG
PacF2	CACTTTAATTAAGCATCATCATCATCACCATCACTGATGACCTTG AATTTGGGGAGTGGG
221R	CATCAGTGATGGTGATGATGATGATGATGCTTAATTAAGTGTGGCAT TCGGGACCCAC
353R	CATCAGTGATGGTGATGATGATGATGATGCTTAATTAAGAGCCACAG TCTTCCCAAAGGTAC
289F	CTGCGAGCCGGGCTGGCAAGGTACCCAGTGCCAGCAGC
289R	GCTGCTGGCACTGGGTACCTTGCCAGCCCGGCTCGCAG
382F	GGGCCCAGCTGCCAAGCTTCCTGCCAGCCG
382R	CGGCTGGCAGGAAGCTTGGCAGCTGGGCCCC
393F	CCCAGCCGGTTTCCATGGTAACCAATGCTCAGTTCCTTGTGAATG
393R	CATTCACAAGGAACTGAGCATTGGTTACCATGGAAACCGGCTGGG
SRF1-stopF	CCAGGCCACCAGAACCCTAGTTTAAACGGCCGCTCGAGATGGAGAGC
SRF1-stopR	GCTCTCCATCTCGAGCGGCCGTTTAAACTAGGGTTCTGGTGGCCTGG

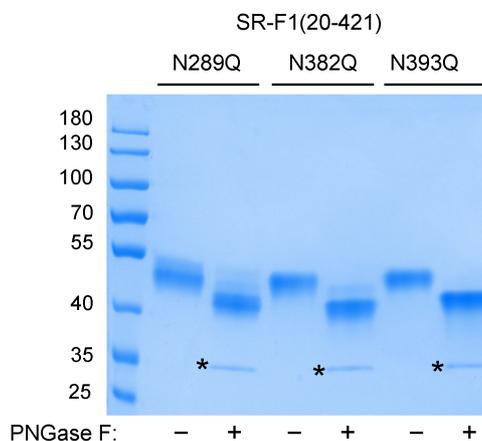
2 Supplementary Figures



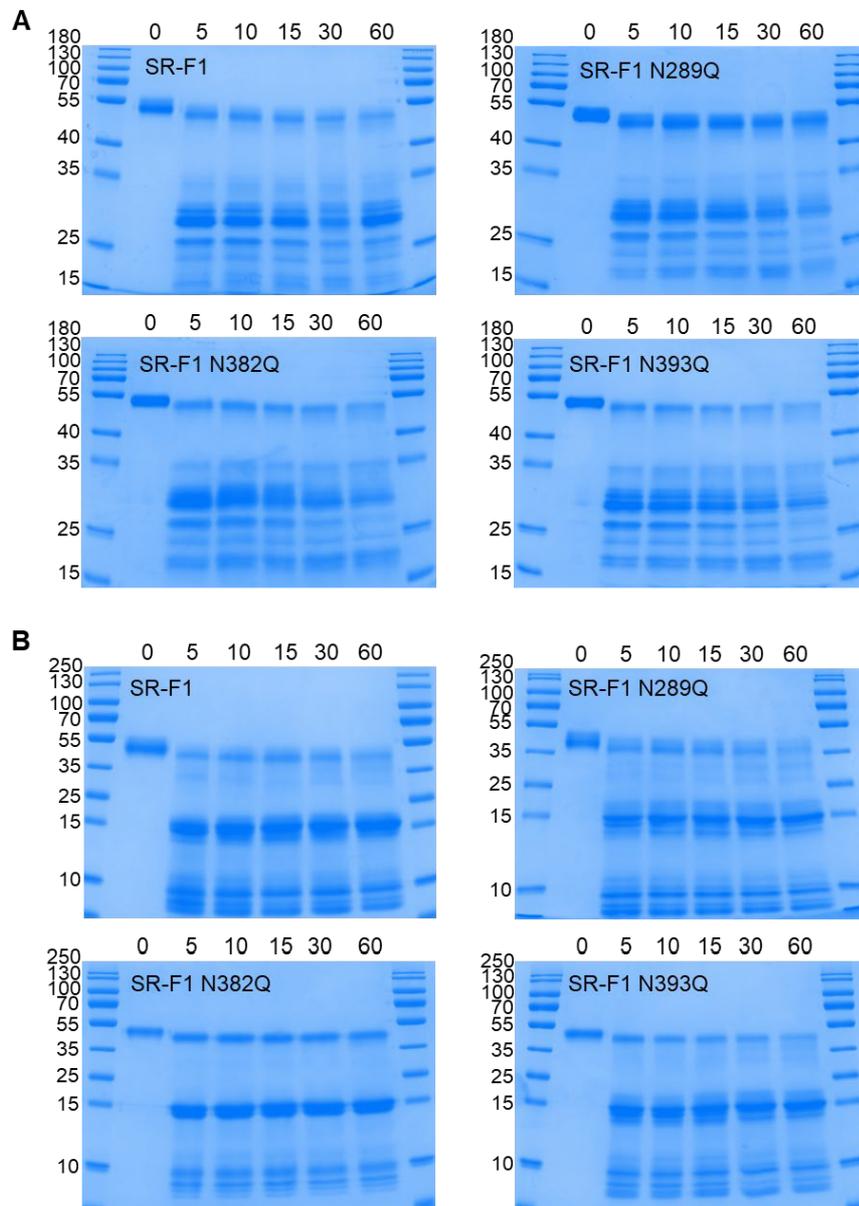
**Figure S1: Analysis of the apoptotic state of JurkaT cells used in the phagocytosis assays.** JurkaT cells were UVB-irradiated (312 nm) and then maintained for 16 h in cell culture. Apoptosis was assessed by flow cytometry using the Annexin V-FITC Kit (MACS MiltenyiBiotec) according to the manufacturer's instructions. FSC/SSC and AnnexinV/PI dot plots are shown for the irradiated and the control populations. The percent of AnnexinV-/PI-, AnnexinV-/PI+, AnnexinV+/PI- and AnnexinV+/PI+ in the selected population (green gates) are indicated. A representative experiment is shown.



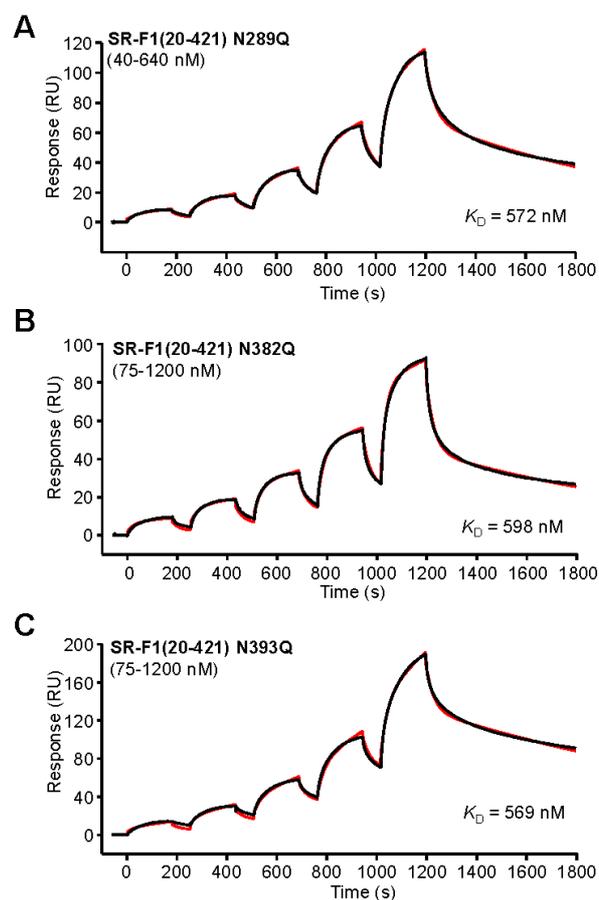
**Figure S2.** (A) CD spectra of SR-F1(20-421). Protein was dialyzed against 10 mM sodium phosphate, 150 mM NaF (pH 8) and used at a concentration of 8  $\mu$ M. Ten spectra were acquired in the far-UV region (200-260 nm) at a scan rate of 20 nm/min. (B) Thermal shift analysis of SR-F1 stability in TBS buffer, in the presence of 2 mM CaCl<sub>2</sub> or 2 mM EDTA.



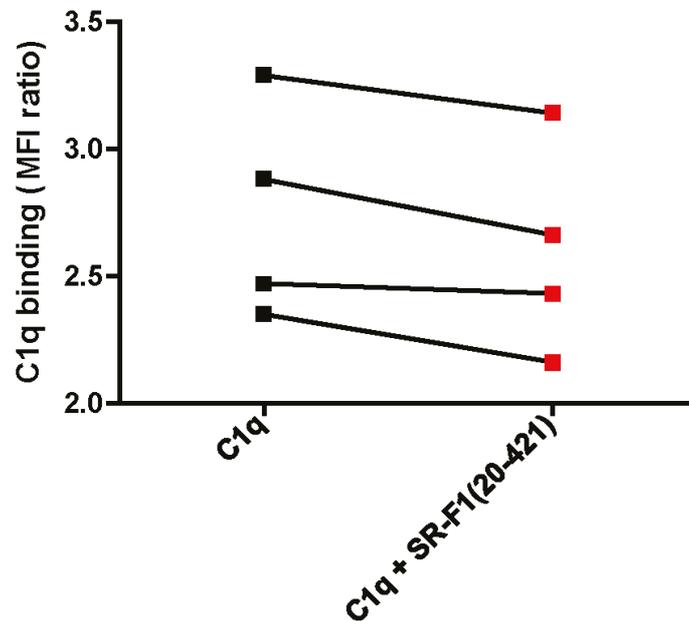
**Figure S3. PNGase F deglycosylation of SR-F1(20-241) proteins.** Proteins were digested by PNGase F as indicated in Materials and Methods and analysed by SDS-PAGE on a 12% acrylamide gel under unreduced conditions. Two  $\mu$ g of each protein were loaded on the gel. The molecular masses (kDa) of the marker are indicated. The band corresponding to PNGase F is indicated by a star.



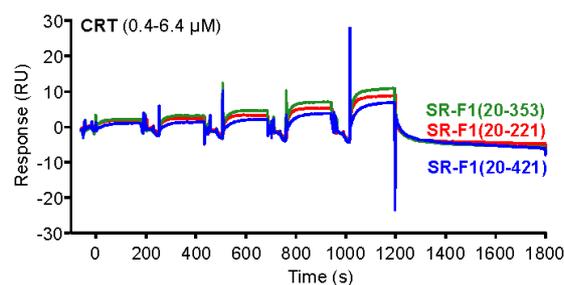
**Figure S4. SDS-PAGE analysis of the proteolytic digestion of SR-F1(20-421) and its mutants lacking one N-glycosylation site.** Limited proteolysis of the recombinant proteins (2  $\mu$ g) was performed in TBS-2 mM  $\text{CaCl}_2$  at 37  $^\circ\text{C}$  by addition of 0.1% trypsin (A) or chymotrypsin (B) for 0, 5, 10, 15, 30, and 60 min (indicated above the wells). The molecular masses of the protein mass markers (Fermentas) are indicated.



**Figure S5. SPR analyses of the interaction of SR-F1 deglycosylation mutants with C1q.** SR-F1(20-421) mutants N289Q (A), N382Q (B), N393Q (C) were serially diluted and injected at five increasing concentrations in single cycle kinetics mode over immobilized C1q (16,000 RU) in TBS-Ca-P at a flow rate of 20  $\mu$ l/min. Fits are shown as red lines and apparent  $K_D$  values were obtained by global fitting of the data to a two-state reaction model. The data shown are representative of 2 separate experiments on different surfaces.



**Figure S6. SR-F1(20-241) inhibits C1q binding to SR-F1 overexpressing THP-1 macrophages.** C1q was preincubated for 30 min at 37°C without or with soluble SR-F1(20-241) protein at a 1:10 molar ratio (C1q:SR-F1) before its binding to SR-F1 overexpressing THP-1 macrophages. Incubation with PMA-treated THP-1 cells and C1q immunostaining were performed as described in Materials and Methods. Four independent experiments are shown. Decreased C1q binding is observed in the presence of soluble SR-F1 compared to controls. MFI ratio: MFI in the presence of C1q/MFI without C1q. MFI, median fluorescence intensity.



**Figure S7. SPR analyses of the interaction of CRT with SR-F1(20-421), SR-F1(20-353) and SR-F1(20-221).** CRT was serially diluted and injected in single cycle mode over covalently immobilized SR-F1(20-421) (4500 RU), SR-F1(20-353) (5800 RU) and SR-F1(20-221) (4700 RU) in TBS-Ca-P at a flow rate of 20  $\mu$ l/min.

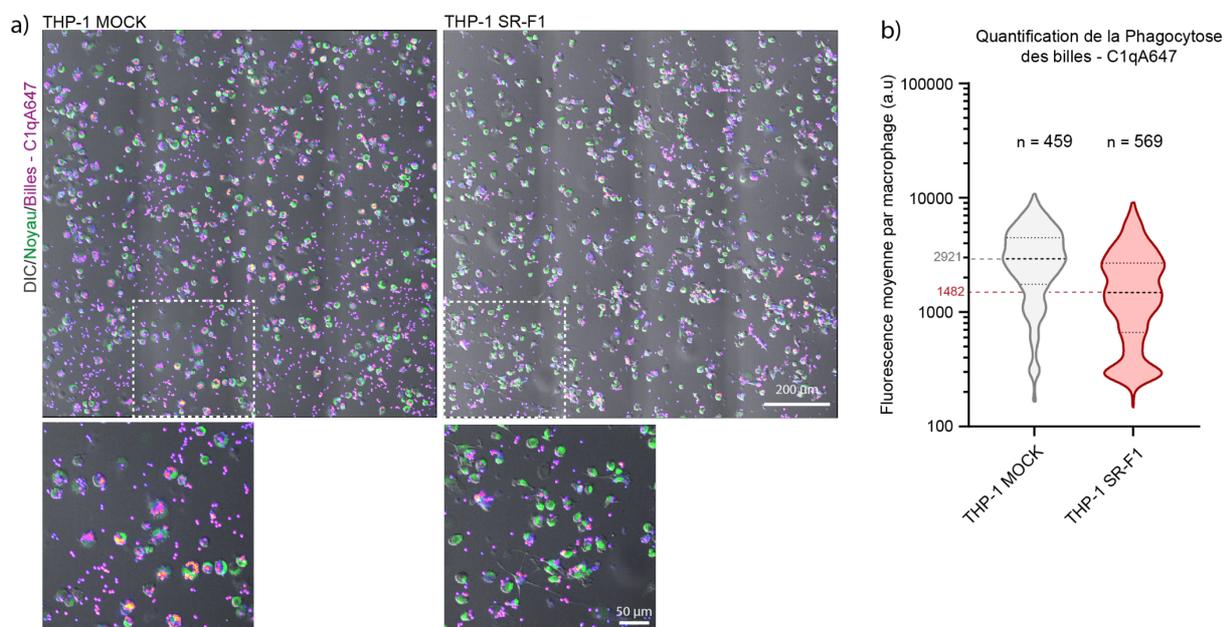
## 2.3 Résultats complémentaires : influence de l'interaction entre le récepteur SR-F1 et la protéine du complément C1q

Dans le but d'étudier le rôle spécifique du récepteur SR-F1 et de son partenaire C1q dans la phagocytose des cellules apoptotiques, des monocytes THP-1 ont été transfectés avec un vecteur portant la séquence d'ADN du gène SCARF1 codant pour le récepteur SR-F1. Des lignées stables exprimant de façon constitutive le récepteur SR-F1 ont été générées et appelées THP-1 SR-F1. En parallèle, des monocytes ont été transfectés avec le vecteur ne contenant pas le gène SCARF1. Le clone obtenu appelé THP-1 MOCK sert de contrôle dans les expériences.

Les expériences menées précédemment ont montré que la phagocytose des cellules Jurkat apoptotiques tardives diminuait chez les macrophages THP-1 surexprimant le récepteur SR-F1. Néanmoins, en présence de C1q, seuls ces macrophages ont montré une augmentation de la phagocytose (Figure 7, article SR-F1). Cette observation suggérait l'implication coordonnée du récepteur SR-F1 et son partenaire C1q, dans la reconnaissance des cellules apoptotiques. Cependant, bien que significative, cette augmentation est relativement faible. C'est pourquoi, afin d'étudier plus directement la contribution de la protéine C1q en s'affranchissant de l'influence des différentes molécules présentes à la surface de la cellule apoptotique, un modèle de phagocytose de billes de silice a été mis au point.

### 2.3.1 Impact du récepteur SR-F1 sur la phagocytose de billes recouvertes par la protéine C1q

Des billes de silice ont été recouvertes avec la protéine C1q préalablement marquée avec le fluorophore A647 (C1qA647). Les monocytes différenciés en macrophage, ont ensuite été incubés pendant 1h avec les billes de silice C1qA647.

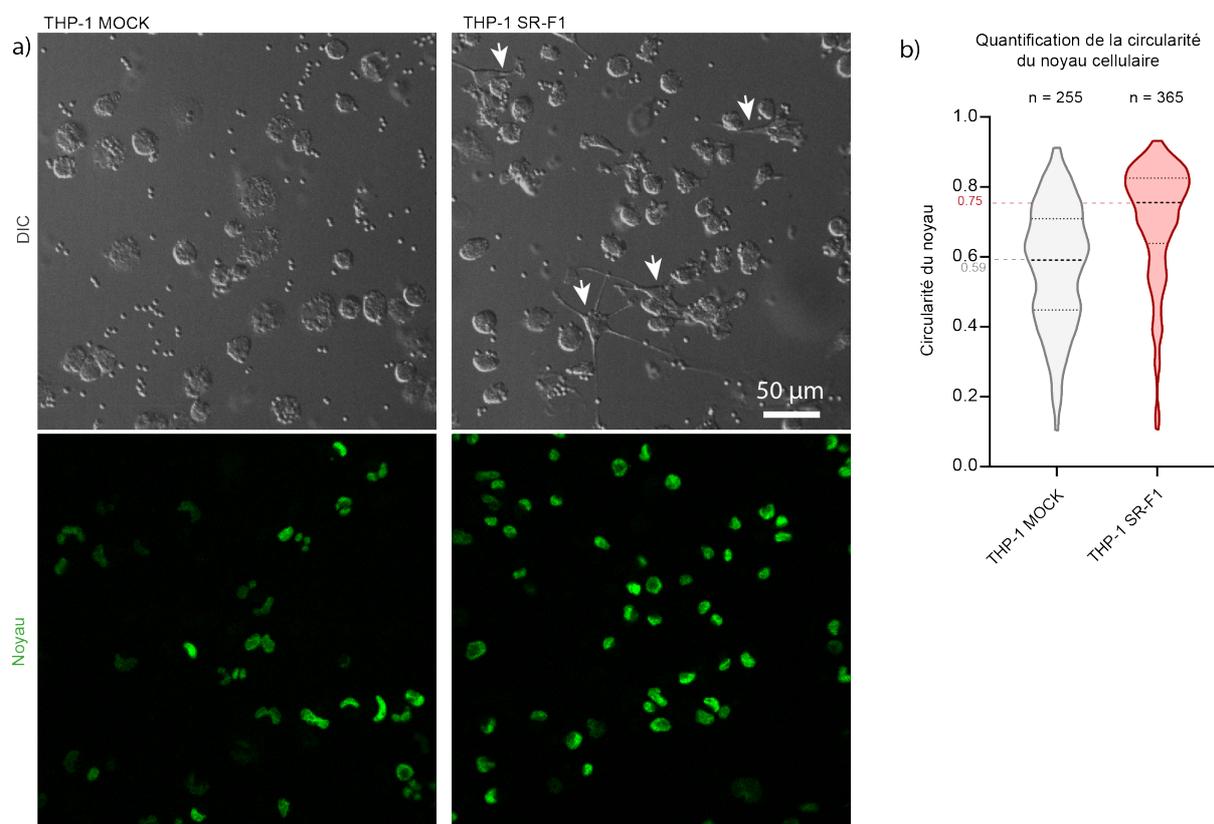


**Figure 35 : Phagocytose des billes - C1qA647 par les macrophages THP-1 MOCK & SR-F1.**

Les macrophages THP-1 MOCK et THP-1 SR-F1 sont incubés pendant 1h avec des billes de silice recouvertes avec du C1qA647. (a) Les cellules sont imagées sur un microscope spinning disk confocal. Les noyaux sont colorés avec du DAPI (vert) et les billes sont détectées grâce à la fluorescence du C1qA647 (magenta). Les carrés en pointillés délimitent les images agrandies. (b) Le contact ainsi que la phagocytose des billes C1qA647 sont quantifiés au travers de la mesure de la fluorescence moyenne par macrophage. Le premier quartile, la médiane et troisième quartile sont représentés.

L'analyse de la fluorescence des macrophages par microscopie a permis d'estimer leur capacité à reconnaître et internaliser des billes. L'analyse a montré que les macrophages THP-1 MOCK phagocytent davantage de billes que les macrophages THP-1 SR-F1 (Figure 35). Cette observation est en accord avec nos analyses précédentes faites avec des cellules en apoptose tardive qui ont montré que la phagocytose réalisée par les THP-1 SR-F1 est diminuée par rapport à celle des THP-1 contrôle, même en présence de C1q (Figure 7, article SR-F1). Comme dans le cas des expériences publiées, cela est en apparence contradiction avec la proposition que SR-F1 est un récepteur favorisant l'efferocytose. Néanmoins, cela pourrait s'expliquer par le fait que la surexpression du récepteur SR-F1 altère les capacités de phagocytose du macrophage THP-1, pour des raisons qui restent à comprendre.

Au cours de nos analyses, nous avons également remarqué que la surexpression du récepteur SR-F1 favorisait l'apparition de macrophages avec de longs prolongements membranaires (Figure 36a). D'autre part, les noyaux des cellules THP-1 SR-F1 sont, pour la plupart, homogènes et circulaires alors que ceux des THP-1 MOCK sont polylobés (Figure 36b). Ces deux dernières observations suggèrent des modifications de l'état de différenciation des cellules, pouvant être l'une des raisons de l'altération des capacités des macrophages THP-1 SR-F1 à phagocyter.

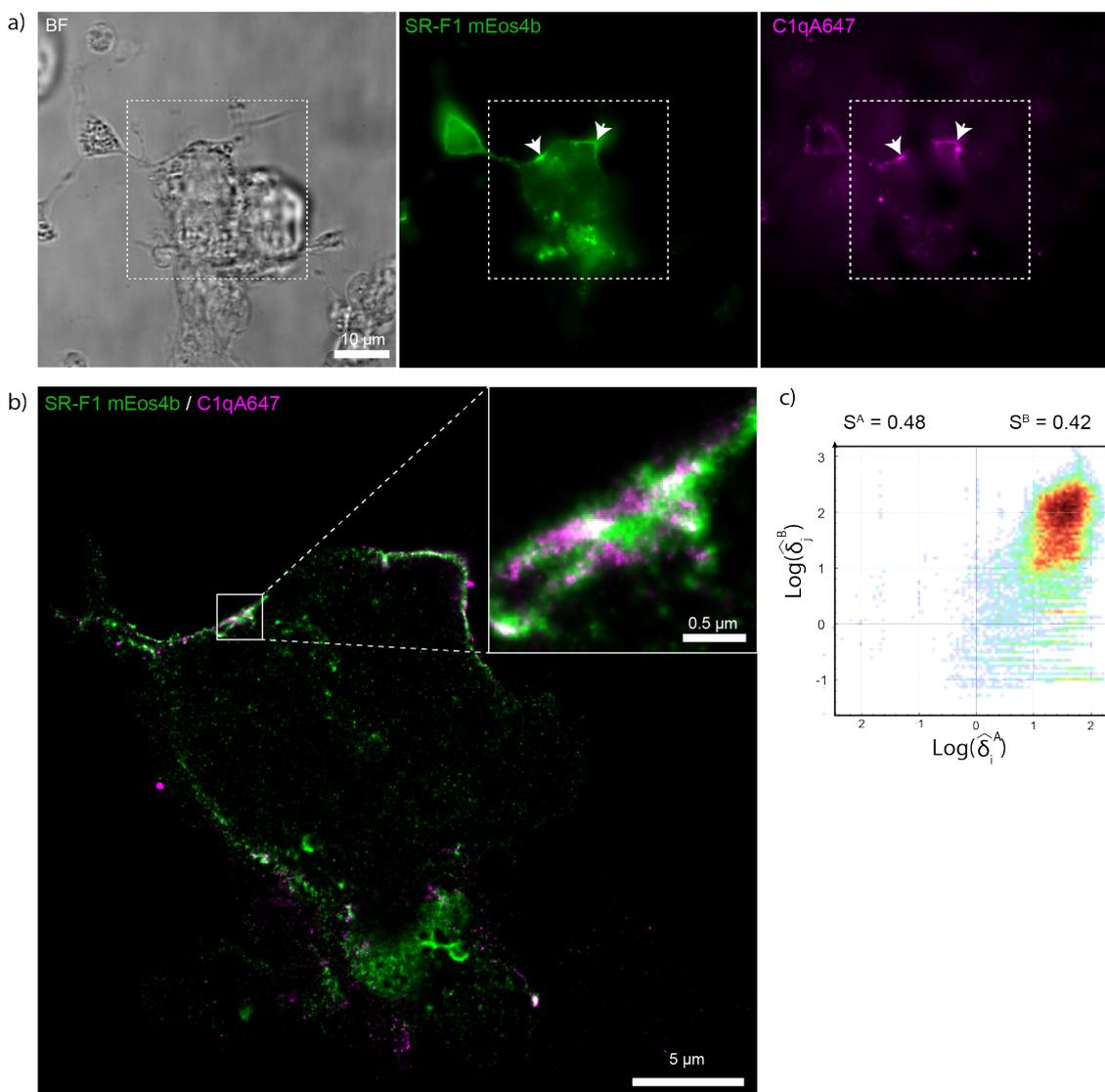


**Figure 36 : Phénotype des macrophages THP-1 MOCK & SR-F1.**

Les monocytes THP-1 MOCK et THP-1 SR-F1 sont différenciés en macrophage en présence de 10 nM de PMA pendant 48 h. Le noyau est coloré avec du DAPI (vert). (a) Les images représentées, correspondent aux images agrandies Figure 33a. (b) La forme des noyaux est quantifiée grâce à la mesure de la circularité (la valeur 1 correspond à un cercle parfait).

### 2.3.2 Distribution du récepteur SR-F1 et la protéine C1q à la surface cellulaire

Bien que les THP-1 SR-F1 phagocytent moins efficacement les billes C1qA647, les expériences réalisées précédemment ont démontré la fixation de la protéine C1q dans des zones enrichies en SR-F1 (Figure 5, article SR-F1), suggérant une possible interaction des deux protéines à la surface cellulaire. Dans le but de vérifier l'interaction entre C1q et SR-F1, des monocytes THP-1 ont été transfectés avec le récepteur SR-F1 fusionné à la protéine fluorescente mEos4b. Cette protéine fluorescente photoconvertible est adaptée à l'imagerie à super résolution PALM. Ainsi, l'incubation de ces cellules avec la protéine C1q couplée au fluorophore A647 nous a permis d'obtenir des images STORM/PALM et d'observer à l'échelle nanométrique la localisation relative du récepteur SR-F1 et son partenaire, indépendamment de l'utilisation d'anticorps.

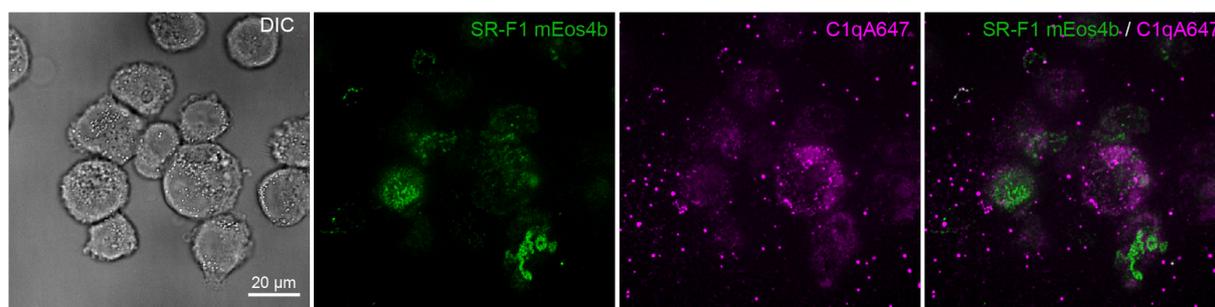


**Figure 37 :** Localisation du récepteur SR-F1 et de la protéine C1q à la surface du macrophage THP-1.

Les macrophages THP-1 SR-F1 mEos4b sont incubés à 4°C, pendant 30 min avec 80 μg/mL de C1q préalablement marqué par l'A647 (C1qA647). Après fixation les cellules sont imagées. (a) Des images en champ clair (BF) et en champ large de la fluorescence de SR-F1 mEos4b (vert) et de C1qA647 (magenta) sont acquises. (b) Les cellules sont ensuite imagées par microscopie PALM/STORM. (c) La colocalisation de SR-F1 avec C1q dans la zone agrandie est estimée grâce à la mesure du coefficient de corrélation de Spearman. La densité relative pour chaque cordonnée de SR-F1 (A) et C1q (B) est représentée sur un diagramme de dispersion.

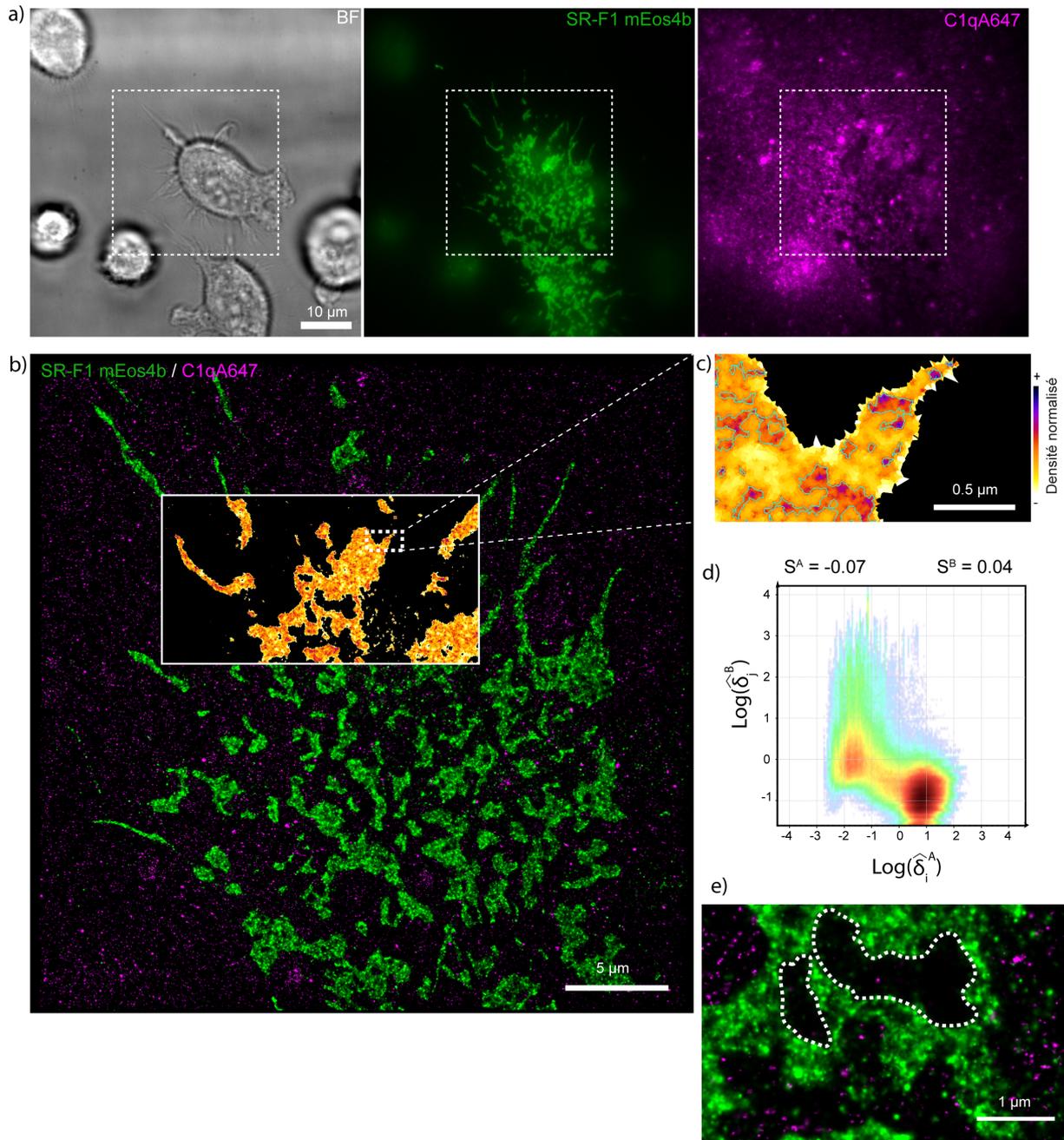
Avec cette méthode de marquage, on a constaté que la protéine C1qA647 se fixait également dans des zones enrichies en SR-F1 (Figure 37b), ce qui prouve que la fusion du récepteur SR-F1 avec la protéine mEos4b n'altère pas sa fonction. D'autre part, les images super résolues ont permis de quantifier à l'échelle nanométrique la colocalisation de C1q avec le récepteur SR-F1. Le coefficient de corrélation de Spearman mesuré est de 0.48 pour SR-F1 et de 0.42 pour C1q (Figure 37c). Ces valeurs sont proches de celles qui ont été obtenues lors du contrôle expérimental positif où un même anticorps primaire a été détecté par deux anticorps secondaires marqués par deux fluorophores différents (Figure 1e, Manuscrit CD47). Elles sont par conséquent, en faveur d'une interaction directe de C1q avec SR-F1 à la surface des cellules THP-1 transfectées.

En revanche, les analyses de ces marquages en microscopie confocale ont également révélé l'accumulation du récepteur SR-F1 dans les zones d'adhérence du macrophage THP-1 (Figure 38). Malgré la forte densité de SR-F1 au contact de la lamelle, aucune colocalisation avec C1qA647 n'a été observée. Cela suggère, d'une part que SR-F1 pourrait être impliqué dans l'adhérence cellulaire, et d'autre part, que C1q n'a pas accès à ces régions enrichies en SR-F1 (Figure 38).



**Figure 38 : Organisation du récepteur SR-F1 et de la protéine C1q au contact entre le macrophage THP-1 et la lamelle.** Les macrophages THP-1 SR-F1 mEos4b sont incubés à 4°C pendant 30 min avec 80 µg/mL de C1q préalablement marqué par l'A647 (C1qA647). Après fixation les cellules sont imagées avec un microscope spinning disk confocal, une image DIC ainsi que la fluorescence du récepteur SR-F1 mEos4b (vert) et C1qA647 (magenta) est collectée au niveau de la lamelle.

Afin de déterminer, si l'enrichissement du récepteur SR-F1 au contact de la lamelle est dépendant du type cellulaire, des cellules adhérentes CHO ont été utilisées comme modèle et une population exprimant le récepteur SR-F1 mEos4b a été obtenue après transfection. Comme précédemment, on a constaté l'enrichissement du récepteur SR-F1 à l'interface entre la cellule et la lamelle, avec l'exclusion de la protéine C1qA647 (Figure 39a). De plus, l'analyse par microscopie PALM/STORM a révélé, d'une part, que la distribution du récepteur SR-F1 était hétérogène dans ces domaines, avec l'organisation de SR-F1 sous forme de clusters (Figure 39c). D'autre part, la valeur des coefficients de corrélation proche de zéro a confirmé l'absence de la protéine C1qA647 au niveau des domaines enrichis en SR-F1 ( $S^{SR-F1} = -0.07$  et  $S^{C1q} = 0.04$ ) (Figure 39d). Enfin, grâce au gain de résolution apporté par l'imagerie PALM/STORM, on a constaté dans des domaines enrichis en SR-F1 des zones insulaires dépourvues de SR-F1 (Figure 39e). Bien que la protéine C1qA647 se fixe à lamelle, ces zones insulaires sont également caractérisées par l'absence de la protéine du complément (Figure 39e). Ces observations suggèrent donc que l'organisation de ces zones d'adhérence riches en SR-F1 constitue un obstacle à la fixation du C1q soluble, mais aussi à sa diffusion à partir de zones membranaires adjacentes.



**Figure 39 : Localisation du récepteur SR-F1 et de la protéine C1q au contact entre la cellule CHO et la lamelle.** Les CHO SR-F1 mEos4b sont incubées à 4°C, pendant 30 min avec 80 μg/mL de C1q préalablement marqué par l'A647 (C1qA647). Après fixation les cellules sont imagées. (a) Des images en champ large de la fluorescence de SR-F1 mEos4b (vert) et C1qA647 (magenta) sont acquises. (b) Les cellules sont ensuite imagées par microscopie PALM/STORM. (c) Représentation de la clusterisation du récepteur SR-F1 sous forme de carte de densité à partir d'un diagramme de Voronoï. Les lignes bleues délimitent les clusters de SR-F1 au sein de domaine moins dense. (d) La colocalisation de SR-F1 avec C1q est estimée grâce à la mesure du coefficient de corrélation de Spearman. La densité relative pour chaque coordonnée de SR-F1 (A) et C1q (B) est représentée sur un digramme de dispersion. (e) Agrandissement de deux zones insulaires (ligne en pointillée blanc) dépourvues de SR-F1 et de C1q.

CHAPITRE

# IV

## Discussion

Dans le but de caractériser l'efferosynapse dont la dimension est inférieure à la limite de résolution de la microscopie conventionnelle, nous avons adapté différentes approches de microscopie à super résolution à notre modèle cellulaire. La formation de l'efferosynapse étant un processus dynamique, sa caractérisation nécessite le suivi dans le temps des différentes molécules qui la composent. Les techniques de microscopie à super résolution STORM et PALM associées à la technique de suivi de molécule unique (SPT), sont des méthodes puissantes qui permettent de caractériser l'organisation des molécules dans un contexte cellulaire et d'analyser leur mobilité au cours du temps. Du fait de la complexité de l'efferosynapse qui s'organise au contact de la membrane du phagocyte et de sa cible, nous avons procédé en séparant l'analyse de la cellule apoptotique de celle du phagocyte, en ciblant quelques molécules connues pour leur rôle essentiel dans le processus d'efferocytose. Nos observations ont permis I/ de décrire la distribution relative de la CRT, de la PS et de CD47 à la surface de la cellule apoptotique et II/ de suivre la dynamique et la fonction de CD47 en lien avec les modifications de la membrane plasmique lors de l'apoptose. Ces données sont importantes pour comprendre comment ces signaux moléculaires sont modifiés à la surface de la cellule lors de l'apoptose et comment cela favorise la formation de l'efferosynapse. Par ailleurs, côté phagocyte, nous avons analysé l'interaction du récepteur SR-F1 avec C1q, deux molécules également connues pour leur rôle dans la mise en place des contacts entre la cellule apoptotique et le macrophage, et dans la phagocytose.

Une partie des résultats présentés dans cette thèse est discutée dans le manuscrit CD47 (*Nanoscale imaging of CD47 informs how plasma membrane modifications shape apoptotic cell recognition*) et l'article SR-F1 publié (*Molecular and Cellular Interactions of Scavenger Receptor SR-F1 With Complement C1q Provide Insights Into Its Role in the Clearance of Apoptotic Cells*). Dans cette discussion je réintroduirai donc brièvement certains résultats afin d'y inclure les observations faites à partir des analyses complémentaires ne faisant pas partie des articles. Enfin, je proposerai des pistes de réflexion.

# 1 Evolution de l'interaction CD47 - SIRP $\alpha$ durant l'apoptose

Durant l'apoptose, l'équilibre entre les signaux « don't eat-me » et « eat-me » est modifié en faveur de la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques. A la surface des cellules HeLa en apoptose, cela se traduit par l'augmentation de l'exposition de la CRT et de sa clusterisation, en particulier sur les blebs apoptotiques, ainsi que par la translocation de la PS sur le feuillet externe de la membrane (Figure 1, S4, manuscrit CD47). Cette configuration favorise l'engagement et l'enrichissement de récepteurs exprimés par le macrophage au contact de la cellule apoptotique. Toutefois, la signalisation nécessaire à l'initiation de la phagocytose est conditionnée par l'absence de signaux inhibiteurs tels que celui dû à CD47. A la surface des cellules HeLa, le niveau d'exposition de CD47 reste constant (Figure S4, manuscrit CD47) qu'elles soient en apoptose ou non. De plus, CD47 est bien présent à la surface des blebs apoptotiques (Figure 1, manuscrit CD47). Bien que sa présence devrait favoriser le recrutement du récepteur SIRP $\alpha$  et donc l'inhibition de la phagocytose, nous avons observé que SIRP $\alpha$  n'interagit plus avec CD47 présent à la surface des blebs apoptotiques (Figure 5d, manuscrit CD47). Ce résultat est cohérent avec la diminution de phosphorylation du récepteur SIRP $\alpha$  à la surface du macrophage durant la phagocytose des cellules apoptotiques (Gardai et al., 2005). De façon intéressante, Lv et collaborateurs (Lv et al., 2015) ont proposé que l'interaction CD47-SIRP $\alpha$  dépende de la clusterisation de CD47 dans les radeaux lipidiques. Ceux-ci étant déstabilisés durant l'apoptose, cela pourrait expliquer l'absence de reconnaissance de CD47 par SIRP $\alpha$ . Contrairement aux observations réalisées par Lv et ses collaborateurs, nous n'avons pas constaté la clusterisation de CD47. Sa distribution est homogène à la surface des cellules viables, sans évolution significative durant l'apoptose (Figure 1, manuscrit CD47).

Ces observations suggèrent que des propriétés autres que la simple clusterisation de CD47 pourraient être responsables de la perte de l'interaction SIRP $\alpha$ -CD47. Dans nos expériences de SPT, nous avons constaté l'augmentation de la mobilité de CD47 durant l'apoptose (Figure 3, manuscrit CD47). Afin de déterminer si cela pouvait avoir une influence sur la reconnaissance de CD47, nous avons cherché à reproduire cet effet à la surface de cellules viables en agissant sur différents éléments susceptibles de moduler la distribution de CD47 à la membrane plasmique. L'activation des intégrines par le manganèse augmente la mobilité de CD47 à la surface des cellules viables. Cependant, la fixation de SIRP $\alpha$  à CD47 reste équivalente aux cellules contrôles (Figure 3, manuscrit CD47). La mobilité de CD47 ne peut donc pas être à elle seule, la cause de la perte d'interaction avec SIRP $\alpha$  ni de l'induction de la phagocytose. Cette observation va à l'inverse de ce qui a été constaté pour la PS. En effet l'augmentation de la mobilité de la PS, en lien avec l'augmentation de la fluidité de la membrane dû à l'apoptose (Bailey et al., 2009; Gibbons et al., 2013), augmente quant à elle la phagocytose (Figure 5, manuscrit CD47). L'évolution de la dynamique des molécules à la surface de la cellule en apoptose n'a donc pas les mêmes effets sur la fonction des signaux « eat-me » et « don't eat-me ».

Green et ses collaborateurs ont proposé, à partir d'expériences faisant appel à des anticorps spécifiques d'états conformationnels, un changement de la conformation de CD47 lorsque les radeaux lipidiques sont déstabilisés (Green et al., 1999). Il est possible que l'interaction de SIRP $\alpha$  avec CD47 soit dépendante de la conformation de CD47. Bien que la co-cristallisation de domaines de SIRP $\alpha$  et de CD47 ait permis d'identifier leur site d'interaction (Hatherley et al., 2008), il est difficile d'anticiper comment l'interaction SIRP $\alpha$ -

CD47 peut être influencé par la conformation de CD47. Cependant, grâce aux données très récemment publiées de la structure complète de CD47 (Fenalti et al., 2021) on constate que l'alignement de SIRP $\alpha$  par rapport à CD47 est défavorable à l'interaction de leur domaine extracellulaire, si on positionne ces deux protéines au contact entre deux cellules (Figure 40). En effet, il semble que l'accessibilité du site de fixation à CD47 ne soit possible que suite à un changement de conformation d'un, ou des deux partenaires. Afin de rétablir une orientation cohérente avec un contact cellulaire, cela suppose que les domaines extracellulaires de ces deux protéines soient flexibles donnant suffisamment de liberté à ces deux protéines pour qu'elles puissent interagir ensemble. De façon intéressante, des simulations de SIRP $\alpha$  ont montré un degré élevé de flexibilité à la surface du macrophage (Hayes et al., 2020). A noter cependant que la structure du domaine transmembranaire de SIRP $\alpha$  est inconnue, ce qui limite l'interprétation de ces données. D'autre part, Fenalti et ses collaborateurs ont révélé la flexibilité de l'inter-domaine reliant le domaine extracellulaire au domaine transmembranaire de CD47 à l'origine de deux conformations possibles, reflétant principalement une orientation différente du domaine extracellulaire par rapport au domaine intracellulaire. Ils ont également montré que la perturbation du pont disulfure (Cys33-Cys263), augmente la dynamique de l'inter-domaine. Ce pont disulfure a été caractérisé comme étant favorable à l'interaction de CD47 avec le récepteur SIRP $\alpha$  (Rebres et al., 2001). Ensemble, ces observations sont cohérentes avec l'hypothèse selon laquelle la conformation de CD47, et principalement la flexibilité de son domaine extracellulaire, influence son interaction avec SIRP $\alpha$ . Même si aucune molécule de cholestérol n'a été détectée dans l'analyse des données structurales au niveau du domaine transmembranaire de CD47, nous avons constaté qu'il est nécessaire pour maintenir la liaison de SIRP $\alpha$  à CD47 à la surface des cellules viables (Figure 5, manuscrit CD47), en accord avec les observations faites par Lv et collaborateurs (Lv et al., 2015). En tant que constituant majeur des radeaux lipidiques, le cholestérol pourrait stabiliser directement ou indirectement une conformation de CD47, favorable à l'interaction SIRP $\alpha$ .

Ces différentes observations permettent de mieux comprendre comment la membrane plasmique de la cellule apoptotique est modifiée, et en particulier comment sa réorganisation conditionne la fonctionnalité des signaux « eat-me » et « don't eat-me ». A la suite de ces résultats plusieurs questions se posent :

- **L'apoptose induit-elle d'autre(s) modification(s) de la fonction de CD47 ?** Il serait important de déterminer si les conséquences de l'apoptose sur CD47 modifient aussi sa reconnaissance par d'autres partenaires, notamment la thrombospondine 1 (TSP1). En effet, il a été montré que la protéine CD47 exposés par les érythrocytes âgés est davantage reconnue par la TSP1 et favorise ainsi leur l'élimination. Il a été proposé que cela pouvait dépendre d'un changement de conformation de CD47 (Burger et al., 2012). Paradoxalement à sa fonction de « don't eat-me », l'absence de CD47 est associée à une diminution de la phagocytose des cellules apoptotiques (Nilsson and Oldenborg, 2009; Tada et al., 2003). D'après Gardai et ses collaborateurs, cet effet pourrait être lié à un composant présent dans le sérum (Gardai et al., 2005). Ce composant pourrait-être la TSP1, dont la fixation favorise l'élimination des cellules apoptotiques (Moodley et al., 2003). Ainsi, il est envisageable que le changement conformation de CD47 favorise son interaction avec la TSP1 entraînant par conséquent l'élimination des cellules apoptotiques.

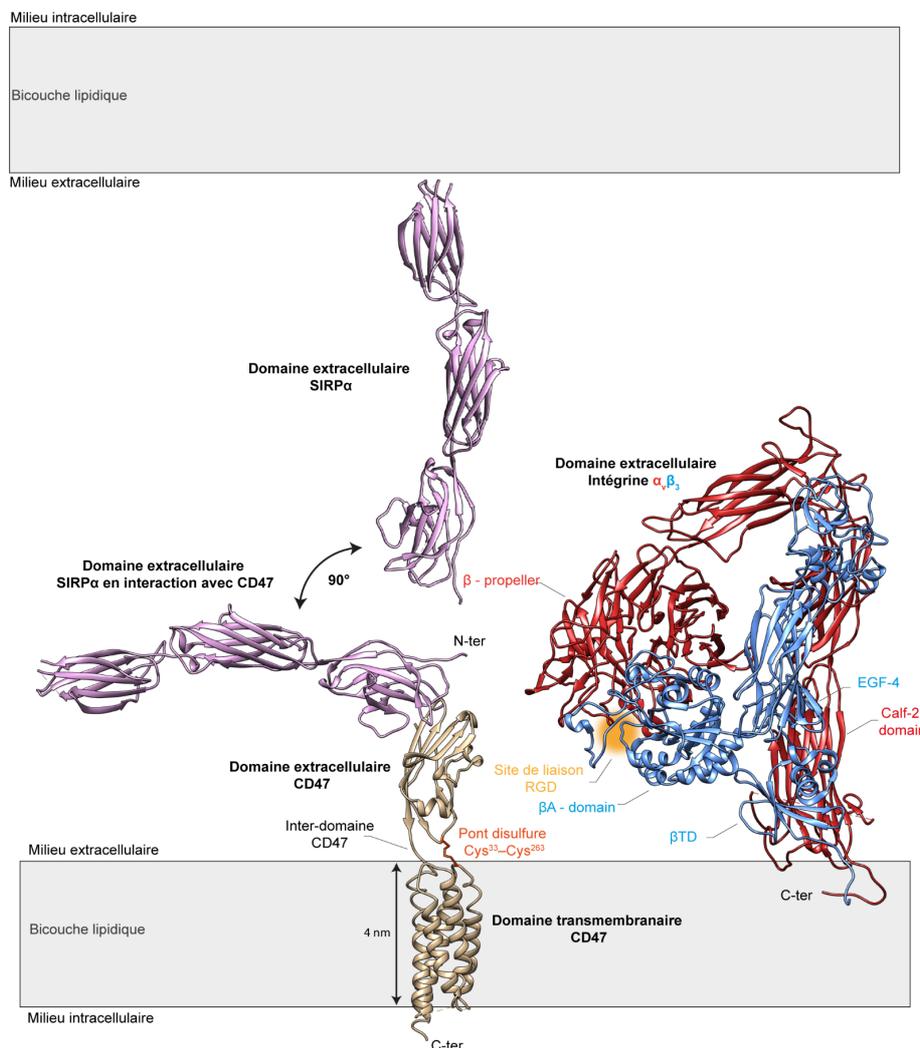
- **Comment la présence du cholestérol influence la conformation de CD47 ?** Nous avons montré que la liaison CD47-SIRP $\alpha$  est dépendante du cholestérol mais à ce jour l'interaction cholestérol-CD47 n'est pas démontrée. En particulier les récentes données structurales n'ont pas permis de détecter de cholestérol [données supplémentaires (Fenalti et al., 2021)]. Cela ne signifie pas pour autant que le cholestérol n'est pas présent dans un contexte cellulaire car son absence peut être due aux conditions de cristallisation. D'autres expériences sont nécessaires pour rechercher si cette interaction existe, même s'il est possible que l'action du cholestérol sur CD47 soit indirecte.
- **La fonction d'autres « don't eat-me » subit elle des modifications similaires à CD47 ?** A l'image de nos observations sur la perte de fonction de CD47 durant l'apoptose, il serait important de déterminer comment les autres signaux « don't eat-me » sont inactivés durant l'apoptose. Par exemple, si on considère l'interaction du « don't eat-me » CD24 avec le récepteur Siglec-10, leur interaction est dépendante des acides sialiques de CD24 (Chen et al., 2011). Durant l'apoptose, les glycoalyx, composés en partie d'acide sialique, sont digérés par des enzymes glycolytiques, notamment la sialidase Neu 1 (Bilyy et al., 2012; Ucker et al., 2012). On peut donc envisager que reconnaissance de CD24 est altérée par la digestion de son groupement acide sialique durant l'apoptose.

## 2 Rôle de l'interaction de CD47 avec les intégrines

Deux populations de CD47 aux mobilités différentes coexistent à la surface des cellules HeLa (Figure 2, manuscrit CD47). En cherchant à caractériser ces deux populations, nous avons constaté que leur proportion est sensible à l'état d'activation des intégrines (Figure 3, manuscrit CD47), en accord avec la capacité de CD47 à interagir avec les intégrines [pour revue (Oldenborg, 2013)]. A la surface des cellules HeLa, nous avons observé que la protéine CD47 colocalise partiellement avec les intégrines à chaîne  $\beta 3$  et nous avons pu co-immunoprécipiter CD47 avec la chaîne  $\beta 3$  (Figure 4, manuscrit CD47 & Figure 34). A l'inverse, bien qu'il ait été proposé que CD47 puisse interagir avec l'intégrine  $\beta 1$ , nous n'avons pas observé de colocalisation ni même la diffusion de la protéine CD47 dans les zones enrichies en intégrine  $\beta 1$  (Figure 31, 34a). Nous nous sommes ensuite focalisés sur l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  dont l'interaction avec CD47 favorise l'activation et augmente son avidité vis à vis de la vitronectine (McDonald et al., 2004). A partir des expériences de suivi de molécule unique deux couleurs, nous avons constaté la diffusion de CD47 et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  dans les mêmes structures caractéristiques : des microvillis et des microvésicules (Figure 4b, manuscrit CD47). En ce qui concerne les microvillis, cette observation concorde avec la localisation prédominante de CD47 et de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  à la surface des microvillis des leucocytes (Abitorabi et al., 1997).

Outre la population d'intégrines  $\alpha_v\beta_3$  mobiles, on distingue une population d'intégrines immobiles avec une MJD inférieur à 60 (Figure 4c). Ces intégrines correspondent vraisemblablement aux intégrines activées en interaction avec la matrice extracellulaire. Bien que CD47 interagisse avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  à la surface des cellules HeLa, nous avons constaté aucun enrichissement en CD47 dans des régions qui pourraient correspondre à des zones d'adhérence où des intégrines immobiles sont détectées (Figure 4b, manuscrit CD47). Ces données suggèrent que lorsque les intégrines sont activées, l'interaction avec CD47 est défavorisée. Cette hypothèse est par ailleurs confortée par la très faible proportion de CD47 immobiles et par l'observation d'événements de co-diffusion de CD47 et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , témoignant d'une interaction transitoire entre CD47 et l'intégrine mobile (Vidéos S1, S2, manuscrit CD47). Ensemble, ces données sont en faveur de l'interaction de CD47 avec

l'intégrine sous ses formes inactives qui ont été décrites sous deux conformations différentes : pliée-fermée et étendue-pliée. Toutefois à partir de nos données, nous ne pouvons pas dissocier ces deux conformations. Il est possible que CD47 interagisse avec les deux ou seulement avec une. Dans l'hypothèse où CD47 interagit avec les deux formes, cela suggère que le site d'interaction de CD47 se trouve au niveau des domaines accessible dans les deux conformations à savoir : « calf2 » de la chaîne  $\alpha$  et « BTD » et « EGF-4 » de chaîne  $\beta$  (Figure 40). Dans l'hypothèse où CD47 interagit seulement avec l'intégrine pliée-fermée, on pourrait imaginer un site de fixation proche du site de liaison RGD composé du domaine «  $\beta$ -propeller » de la chaîne  $\alpha$  et le domaine «  $\beta$ A » de la chaîne  $\beta$  (Figure 40). Afin de vérifier ces hypothèses, il serait nécessaire de caractériser en détail l'interaction de CD47 avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . En effet, la grande majorité des expériences témoignant de l'interaction de CD47 avec les intégrines proviennent d'expériences de co-immunoprécipitations. Aucune étude d'interaction directe à partir de molécules purifiées n'a été publiée à ce jour. Ces expériences seront cependant essentielles pour mieux comprendre l'implication de la protéine CD47 sur la fonction des intégrines, notamment l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .



**Figure 40 :** Structures de la protéine CD47, du récepteur SIRP $\alpha$  et de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

Représentation de l'interaction de CD47 avec SIRP $\alpha$  réalisée à partir de la structure du domaine extra et transmembranaire de CD47 (Beige, PDB : 7MYZ) ainsi que la structure du domaine extracellulaire de SIRP $\alpha$  (Rose, PDB : 2WNG) alignées à partir de la structure des domaines N terminaux de CD47 et SIRP $\alpha$  (PDB : 2JJS) obtenues après co-cristallisation. Le domaine cytoplasmique de CD47, ainsi que le domaine transmembranaire et cytoplasmique de SIRP $\alpha$  sont absents. La structure du domaine extracellulaire de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Chaîne  $\alpha$  : rouge & chaîne  $\beta$  : bleu, PDB : 3IJE) est également représentée. Les domaines transmembranaires et cytoplasmiques des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont absents. Les structures sont visualisées grâce au logiciel (UCSF Chimera).

### 3 Fonction du récepteur SR-F1 dans l'efferocytose

Durant la rédaction de mon manuscrit de thèse, Ramirez-Ortiz et son équipe ont déposé un article sur la plateforme bioRxiv ([Jorge et al., 2021](#)), ce qui signifie que ce manuscrit n'a pas encore été évalué par les pairs. Dans ce manuscrit, ils détaillent la fonction du récepteur SR-F1 chez l'Homme et son implication chez les patients atteints de lupus érythémateux. Ils montrent que le récepteur SR-F1 est exprimé par les cellules endothéliales humaines et participe à l'élimination des cellules apoptotiques comme chez la souris [[travaux publiés précédemment, \(Ramirez- Ortiz et al., 2013\)](#)]. Ils montrent également que ce récepteur est exprimé par les cellules mononucléées du sang périphérique, notamment les monocytes et les cellules dendritiques BDCA1<sup>+</sup>. Au sein de cette classe spécifique de cellule dendritique, la délétion du récepteur SR-F1 affecte l'élimination des cellules apoptotiques. Cependant et contrairement à leur précédente étude réalisée chez la souris ([Ramirez-Ortiz et al., 2013](#)), ils indiquent que la fonction de SR-F1 dans la phagocytose est indépendante de C1q. Bien que cette affirmation demande à être confirmée, cela suggère que la fonction de C1q vis-à-vis de SR-F1 ait évolué différemment chez la souris et chez l'Homme, comme cela a été démontré pour d'autres fonctions du système immunitaire [[Pour revue \(Mestas and Hughes, 2004\)](#)]. Néanmoins, il faut souligner que nos expériences ont montré que : I/ les deux protéines humaines purifiées (SR-F1 et C1q) interagissent entre elles ([figure 4, article SR-F1](#)), II/ la fixation de C1q à la surface des THP-1 est corrélée avec le niveau d'expression de SR-F1 ([figure 5D, article SR-F1](#)), III/ SR-F1 et C1q colocalisent à la surface cellulaire par microscopie à super résolution ([figure 37](#)) et IV/ la présence de C1q augmente la phagocytose médiée par le récepteur SR-F1 ([Figure 6, article SR-F1](#)). Ensemble, ces résultats restent en faveur de la dépendance de SR-F1 vis-à-vis de C1q lors de la reconnaissance des cellules apoptotiques chez l'Homme.

Au cours de nos investigations nous avons constaté la modification du phénotype des macrophages THP-1 lorsqu'ils surexpriment le récepteur SR-F1. Cela se manifeste par des noyaux peu ou pas polylobés, dont la forme reste circulaire et par la formation de longs prolongements membranaires après différenciation des THP-1 au PMA ([Figure 36](#)). De tels prolongements rappellent ceux des THP-1 différenciés en cellules dendritiques immatures ([Berges et al., 2005](#)). Cette analogie laisse sous-entendre que l'expression du récepteur SR-F1 pourrait orienter la différenciation des monocytes vers un phénotype proche de celui des cellules dendritiques. Bien que cette hypothèse demande à être vérifiée, elle est cohérente avec l'expression du récepteur SR-F1 par différentes classes de cellules dendritiques chez la souris (CD8 $\alpha^+$ ), comme chez l'Homme (BDCA1<sup>+</sup>) dont la fonction d'efferocyte dépend étroitement de ce même récepteur ([Jorge et al., 2021](#); [Ramirez-Ortiz et al., 2013](#)). Par ailleurs, cette hypothèse est soutenue par les observations récentes, faites par Ramirez-Ortiz et son équipe, qui ont constaté la production de la cytokine anti inflammatoire IL-10 lors de l'engagement du récepteur SR-F1 au cours de la reconnaissance des cellules apoptotiques ([Jorge et al., 2021](#)). Ils ont également remarqué l'expression de gènes impliqués dans la migration cellulaire incluant ceux des chimiokines mais aussi des récepteurs Toll-like (TLR, Toll-like receptors) associés à l'expression du récepteur SR-F1. Ces observations suggèrent que l'engagement du récepteur SR-F1 serait impliqué dans la régulation de ces différents gènes, même si cela reste à démontrer. On peut donc imaginer que si le récepteur SR-F1 influence l'expression de ces différents gènes, il peut également influencer la différenciation des monocytes.

A partir des différentes observations, plusieurs perspectives se dessinent :

- Il serait nécessaire de caractériser la signalisation médiée par le récepteur SR-F1 en lien avec le processus de phagocytose. Pour l'heure, aucun motif de signalisation n'a été identifié et à la différence de son homologue CED-1 chez *C.elegans*. Les motifs NPXY et YXXL nécessaires à la fixation de la protéine CED-6/ GLUP, à l'origine de l'activation de Rac1 et de l'initiation de la phagocytose, sont absents (Suzuki and Nakayama, 2007). Il est aussi envisageable que celle-ci puisse dépendre d'un corécepteur.
- Au regard des nouvelles informations apportées par l'équipe de Ramirez-Ortiz, il serait intéressant de comparer la fonction des récepteurs SR-F1 humain et murin qui présentent au niveau de leur séquence protéique, 71,4 % d'identité (BLAST Align, numéro d'accension : Q14162 & Q5ND28). L'objectif étant de déterminer si les différences observées dans leur séquence protéique peuvent influencer la fonction du récepteur SR-F1 durant l'efférocytose.
- Au vu de l'implication du récepteur SR-F1 dans la production de la cytokine IL-10 liée à la phagocytose des cellules apoptotiques par les cellules dendritiques BDCA1<sup>+</sup>, l'une des interrogations est de savoir si cela dépend de son interaction avec C1q. En effet, il a été montré que la protéine C1q influence à la fois la réponse immune et la polarisation du macrophage, en favorisant notamment la production de l'IL-10 (Benoit et al., 2012). Il serait donc intéressant d'analyser l'influence de C1q, soluble ou bien fixé à la surface d'une cellule apoptotique, sur cette voie de signalisation.
- Il est également important de mieux comprendre les conditions dont dépend l'interaction SR-F1/C1q. Par exemple, l'interaction de C1q avec les protéases à sérine C1r<sub>2S2</sub> du sérum influence-t-elle sa fixation à SR-F1 ? En effet, il a été décrit récemment que l'interaction C1r<sub>2S2</sub> à C1q inhibe la fixation de la partie collagène de C1q à ses récepteurs LRP1 et LAIR-1 (Fouët et al., 2020, 2021). Nous savons que SR-F1 interagit également avec les domaines collagène de C1q (Wicker-Planquart et al., 2020), il est donc possible que la fixation C1q-SR-F1 soit également modulée par la présence des protéases à sérines.

## 4 Rôle du récepteur SR-F1 dans l'adhérence cellulaire

Nous avons observé de larges domaines riches en SR-F1 à l'interface entre les cellules (THP-1 & CHO) et au contact de la lamelle (Figure 38, 39). Ce type d'organisation a également été caractérisé pour le récepteur MEGF10 surexprimé par des HEK293 (Suzuki and Nakayama, 2007). Il faut noter que SR-F1 et MEGF10 sont, tous deux, des homologues de la protéine CED-1 de *C.elegans*. Néanmoins, que ce soit pour SR-F1 ou MEGF10, les conditions nécessaires à cette organisation particulière demandent à être mieux comprises. Concernant MEGF10, il a été démontré que la clusterisation de la protéine est due à des interactions homotypiques du domaine extracellulaire. Il est possible qu'il en soit de même pour SR-F1. En effet, Ishii et ses collaborateurs ont montré que SR-F1 interagit avec lui-même (Ishii et al., 2002). De plus, dans ces régions enrichies en SR-F1 au contact de la lamelle, nous avons constaté l'exclusion de la protéine C1q, alors qu'elle interagit avec SR-F1 en dehors de ces zones d'adhérences (Figure 39). Le fait que nous n'observons pas de fixation de C1q dans ces régions, suggère que le site impliqué dans la fixation de C1q est caché. De plus, ces régions délimitent des zones insulaires caractérisées par l'absence de SR-F1 et de C1q (Figure 39e), laissant penser que leur organisation empêche la libre diffusion de C1q.

### **Quelle est la fonction de ces zones de forte clusterisation du récepteur SR-F1 ?**

Concernant la protéine MEGF10, elle semble avoir un rôle dans l'adhérence cellulaire puisque la surexpression de MEGF10 immobilise la cellule, l'empêchant de migrer (Suzuki and Nakayama, 2007). Dans le cas des cellules CHO exprimant SR-F1 après transfection, nous avons remarqué une plus forte résistance à la trypsine lors du décollement des cellules par comparaison aux CHO de type sauvage (données non montrées). Ce type d'observation a également été rapporté pour les cellules CHO qui surexpriment le récepteur « scavenger » SR-AI. Ces observations sont en faveur d'un rôle du récepteur SR-F1 dans l'adhérence cellulaire. Néanmoins, si dans le cas du récepteur SR-AI les ligands sont les protéoglycanes de la matrice extracellulaire (Santiago-García et al., 2003), ils restent à être caractérisés pour les récepteurs SR-F1 et MEGF10.

## 5 Mots de la fin

Les données obtenues par microscopie à super résolution STORM, PALM accompagnée des expériences de suivi de molécule unique nous ont permis de décrire avec précision la distribution et la dynamique de quelques protéines et lipides impliqués dans la reconnaissance de la cellule apoptotique par le phagocyte. L'utilisation de ces techniques a également permis d'identifier certains paramètres qui influencent la reconnaissance d'une protéine par son récepteur. En effet, si nous savons que deux protéines purifiées peuvent interagir l'une avec l'autre dans un système isolé, cela ne nous informe pas suffisamment des conditions de leur interaction dans un contexte cellulaire, ni d'en suivre l'évolution dans une situation physiologique. L'exemple de CD47 - SIRP $\alpha$  ou encore C1q – SR-F1 sont ici pour en témoigner. Bien que CD47 et SIRP $\alpha$  interagissent en condition *in vitro* à la surface des blebs apoptotiques CD47 n'est plus reconnu par son récepteur SIRP $\alpha$ . De la même façon, le récepteur SR-F1 enrichi au contact du macrophage avec la lamelle n'interagit plus avec la protéine du complément C1q. C'est pourquoi, même s'il est important de mesurer les interactions dans un système purifié *in vitro*, il est ensuite primordial de confronter ces différentes données à une échelle plus complexe, dans un système *in cellulo*, comme nous avons pu le faire en étudiant séparément ces molécules à l'échelle de la cellule apoptotique et du phagocyte. En poursuivant ce raisonnement, il reste désormais à étendre ces analyses à l'échelle de l'efferosynapse, qui se met en place au contact entre la cellule apoptotique et le phagocyte, composée de part et d'autre de protéines membranaires et solubles. Par ailleurs, les techniques de microscopie STORM, PALM et suivi de molécule unique ont été adaptées à l'étude de la PS, de la CRT, de CD47, de C1q et de SR-F1. Elles peuvent désormais être étendues à l'étude de l'ensemble des constituants de l'efferosynapse, même si de nombreuses mises au point vont encore être nécessaires.

**Comment adapter les marquages afin de détecter des complexes moléculaires au contact cellulaire ?** Les techniques de microscopie à super résolution que sont le STORM, le PALM ou encore le suivi de molécule unique reposent sur la détection avec précision des protéines d'intérêt marquées par un élément fluorescent. Pour cela on peut utiliser des anticorps, comme ce fut le cas pour l'étude de la protéine CD47. Trouver des anticorps adaptés reste délicat si l'on veut faire des expériences de suivi molécule unique. Il faut qu'ils soient capables de reconnaître la protéine d'intérêt dans sa forme native et qu'ils interfèrent au minimum avec les propriétés de celle-ci. C'est pourquoi, d'autres alternatives existent et sont basées sur la fusion d'une protéine rapportrice telle que la protéine fluorescente mEos4b adaptée au sptPALM que nous avons utilisée pour détecter le récepteur SR-F1. Si pour les différentes protéines qui composent l'efferosynapse, le challenge réside dans la construction de molécules

chimériques fonctionnelles, cela se complexifie pour la PS qui est un lipide. Ainsi, dans le cas de la PS son étude est limitée par la nécessité d'utiliser des protéines solubles capables de s'y fixer et de participer à l'efférosynapse telles que : MFG-E8, C1q, Gas6 et protéine S. L'avantage de ces protéines solubles c'est qu'il est possible de les marquer directement et de les rajouter ensuite dans le milieu extracellulaire comme nous avons pu le faire pour la protéine C1q marquée par l'Alexa Fluor 647. Par ailleurs, il est également envisageable de les faire exprimer par le phagocyte lui-même. Ensuite, au cœur de l'efférosynapse il est primordial de discriminer les protéines exposées en membrane de celles présentes dans le cytoplasme. Cela peut être possible si on utilise des procédures de marquage en deux étapes comme celle proposée par la technologie HaloTag (Los et al., 2008). Cette procédure est basée sur la formation d'une liaison covalente hautement spécifique, rapide et irréversible avec un ligand synthétique HaloTag. Ainsi en utilisant un ligand marqué incapable de diffuser au travers de la membrane plasmique de la cellule, il est possible de détecter de façon exclusive les molécules exposées qui expriment le groupement HaloTag. Cette stratégie permettrait également dans le cas de la CRT, de différencier la CRT de la cellule apoptotique de celle exprimée par le macrophage. De plus, l'approche HaloTag permet de fixer différentes molécules fluorescentes au ligand, adaptées à la microscopie STORM, PALM ou au suivi de molécule unique. Enfin, avec le développement de la technologie de ciseaux moléculaire (Crispr-Cas9) il est maintenant aisé de remplacer totalement la protéine endogène par une version chimérique afin d'étudier la protéine chimérique à un niveau d'expression physiologique (Adli, 2018). Par ailleurs, on pourrait imaginer utiliser des techniques comme la complémentation biomoléculaire de fluorescence (Kerppola, 2008). Comme son nom l'indique, cette technique repose sur l'expression de deux moitiés complémentaires par deux protéines d'intérêts différentes. Lorsque que ces deux protéines d'intérêts interagissent, cela permet l'assemblage des deux moitiés complémentaires en une protéine fonctionnelle telle qu'une protéine fluorescente. Ainsi, les mesures ne sont pas parasitées par le bruit de fond que peut générer le marquage des protéines et se focalise seulement sur les événements d'interaction qui seront à l'origine de la signalisation des récepteurs nécessaire à l'engagement de la phagocytose.

# Diffusion scientifique

Le travail présenté dans ce manuscrit de thèse a fait l'objet d'une publication, ainsi que de différentes présentations et posters :

## Publication publiée :

- Wicker-Planquart C, Dufour S, Tacnet-Delorme P, Bally I, Delneste Y, Frachet P, Housset D, Thielens NM. Molecular and Cellular Interactions of Scavenger Receptor SR-F1 With Complement C1q Provide Insights Into Its Role in the Clearance of Apoptotic Cells. *Front Immunol.* 2020 Mar 31;11:544. doi: 10.3389/fimmu.2020.00544. PMID: 32296440; PMCID: PMC7137648.

## Manuscrit soumis pour publication :

- Samy Dufour, Pascale Tacnet-Delorme, Jean-Philippe Kleman, Oleksandr Glushonkov, Nicole Thielens, Dominique Bourgeois & Philippe Frachet. Nanoscale imaging of CD47 informs how plasma membrane modifications shape apoptotic cell recognition.

## Publication publiée annexe :

- Wicker-Planquart C, Tacnet-Delorme P, Preisser L, Dufour S, Delneste Y, Housset D, Frachet P, Thielens NM. Insights into the ligand binding specificity of SREC-II (scavenger receptor expressed by endothelial cells). *FEBS Open Bio.* 2021 Oct;11(10):2693-2704. doi: 10.1002/2211-5463.13260. Epub 2021 Sep 12. PMID: 34328698; PMCID: PMC8487046.

## Présentations & posters :

- École thématique MIFOBIO 2021 (poster : annexe 4), Presqu'île de Giens 2021
- PSB symposium 2021 « Frontiers in Bioimaging » (présentation, prix de la meilleure présentation), Grenoble 2021
- Journée de l'IBS 2021 (poster : annexe 4), Grenoble 2021
- 17<sup>TH</sup> European Meeting on Complement in Human Disease 2019 (EMCHD 2019), Madrid 2019 (abstract : annexe 5, poster : annexe 3, travel award)
- FluoDay 2019 (poster : annexe 3), Grenoble 2019
- Journée de l'IBS 2019 (présentation en collaboration avec Virgile ADAM, équipe PIXEL, IBS), Grenoble 2019
- École thématique MIFOBIO 2018 (poster : annexe 2), Seignosse 2018

# Annexes

Annexe 1 : Single particle tracking movies of integrin  $\alpha\beta3$  and CD47.

L'annexe 1 regroupe les deux vidéos (Movie 1 & Movie 2) présentées dans le manuscrit CD47.

Ces vidéos représentent un exemple de suivi de molécules uniques de l'intégrine  $\alpha\beta3$  et CD47 à la surface d'une cellule viable HeLa imagée sur la figure 4b (manuscrit CD47). Les vidéos comportent chacune 500 images, défilant à une vitesse de 12 images/s. Chaque image correspond à un temps d'exposition de 34 ms. Les traces ont été reconstruites avec le logiciel SWIFT sur la gauche de la vidéo. Elles correspondent au parcours d'une molécule sur un intervalle de 10 images. Les localisations correspondantes à chaque trace sont quant à elles représentées sur la droite. Le carré présent dans la vidéo 1 délimite la zone agrandie dans la vidéo 2. L'analyse des données révèle que 3.4 % des protéines  $\alpha\beta3$  et 1.9 % des protéines CD47 présentent des motifs de co-diffusion partiel (vidéo 1). La rareté de l'observation d'évènements de co-diffusion s'explique par la faible densité de marquage des deux partenaires, nécessaire pour suivre correctement des molécules diffusant de façon isolée.

## Annexe 2 : Poster présenté durant l'école thématique MIFOBIO 2018 (Seignosse)



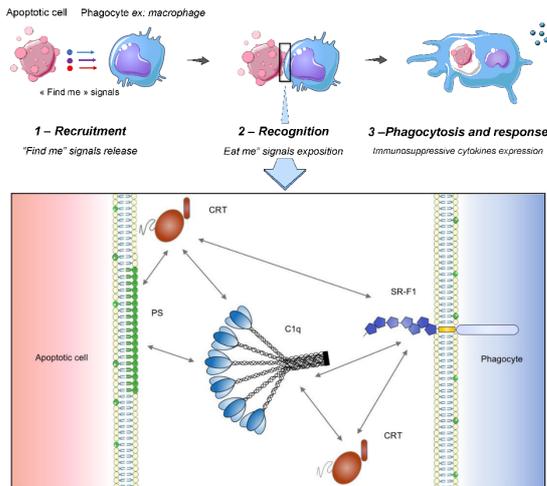
### TOWARD NANOSCALE MOLECULAR ORGANIZATION OF THE EFFEROSYNAPSE

Samy Dufour<sup>1</sup>, Pascale Tacnet-Delorme<sup>1</sup>, Jean-Philippe Kleman<sup>1</sup>, Dominique Bourgeois<sup>1</sup> and Philippe Frachet<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Institut de Biologie Structurale, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France

**Efferocytosis**<sup>1</sup> is the process of apoptotic cells clearance by phagocytes and is crucial during the development, tissue homeostasis and resolution of inflammation<sup>2</sup>. A key element of efferocytosis is the constitution of a phagocytic “synapse”<sup>3</sup> also called “**efferosynapse**”. Molecular interactions within this structure induce the formation of an appropriate junction between a macrophage and an apoptotic cell and then orchestrate the **regulation of the immune response** elaborated by the phagocyte. The serum protein **C1q** which is a ligand for several molecules involved in the efferocytosis process acts as a bridge between the phagocyte and its prey and is a key element for the maintenance of the immune tolerance<sup>4</sup>. However, its interactions, its localization and its effects on the molecular organization of the efferosynapse remain to be investigated at the cellular level. Consequently, an in-depth characterization of the **architecture of the “efferosynapse”** is a primary need to gain insights into the function, the link to immune diseases of C1q and its partners.

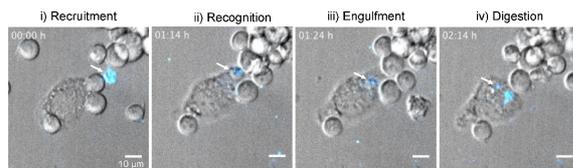
With the aim to investigate the spatial organization of the “efferosynapse” (panel A) at the nanoscale, we develop an approach using the STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) super-resolution microscopy. We first established an effective model of efferocytosis to visualize the efferosynapse between the JurkaT apoptotic cell and the THP1 macrophage (Panel B). Then we optimized imaging conditions for two colors super-resolution microscopy (Panel C). To fine tune the protocol, we labelled two extensively studied structures: microtubules and actin in podosomes. Microtubules were labelled with primary and secondary antibody coupled with Alexa 647 and actin was labelled with Alexa 532-coupled phalloidin. Finally, we obtained the first images of C1q at the nanoscale (Panel D), using a C1q molecule purified from human serum and directly labelled with AF647 dye. Our analysis revealed the clustering of C1q at the efferosynapse.

#### A - THE DIFFERENT STEPS OF EFFEROCTOSIS & SCHEMATIC REPRESENTATION OF AN EFFEROSYNAPSE FOCUSED ON C1Q MOLECULE AND THREE PARTNERS



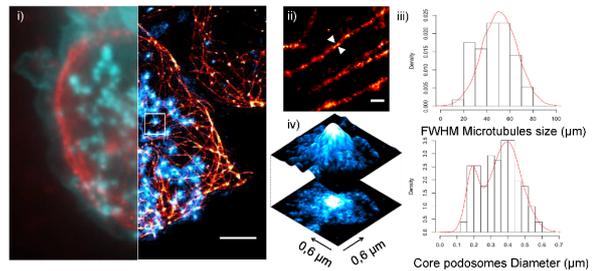
First the apoptotic cell releases “find me” signals, stimulating the recruitment of the phagocyte. Second, “eat me” signals exposition allows the recognition of the target initiating, third, the phagocytosis of the target and cytokine response by the phagocyte. PS: phosphatidylserine. CRT: calreticulin. SR-F1: Scavenger receptor class F (member 1). C1q: Complement molecule. C1q. Arrows represents interactions between these different molecules.

#### B - PHAGOCYTOSIS OF UVB IRRADIATED CELLS BY THP1 MACROPHAGES



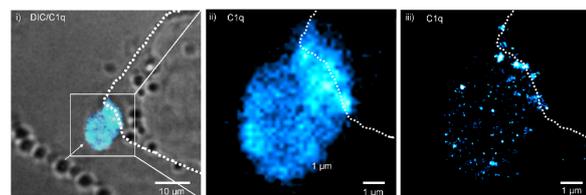
UVB irradiated JurkaT phagocytosis by THP1 macrophage. Cells were mixed after irradiation and C1qA647 molecule (blue) was added in the culture medium at 80 µg/mL. White arrows points apoptotic cell opsonized by C1q. Time lapse acquisition began 1 hour after contact between apoptotic JurkaT and THP1 cells.

#### C - STORM IMAGE OF MICROTUBULES AND PODOSOMES IN THP1 MACROPHAGE



STORM image of microtubule stained by primary and secondary antibody coupled with Alexa 647 (red) and podosomes stained Alexa 532 coupled phalloidin (blue) (i). The left part corresponds to the wide field image, and the right part corresponds to STORM image. Small region of the cell outlined by the white box in (A) showing 3 microtubules (ii). Arrows indicate an example of transverse profile measurement FWHM (Full width at half maximum) transversal size were determined for 60 microtubules (iii). The distribution was fitted with on Gaussian curve. Three-dimensional projection of a STORM image that displays a central podosome core and radiating actin filaments (iv). The core podosome is represented in white. The white box in (i) is used for this projection. The podosomes core perimeter were determined for 130 individual podosomes (v). The distribution was fitted with a sum of two Gaussians curves.

#### D - C1Q CLUSTERIZATION ON APOPTOTIC CELL MEMBRANE AND AT THE EFFEROSYNAPSE



THP1 macrophage (delimited by dashed line) in contact with an apoptotic JurkaT cell opsonized by C1qA647 (in blue) pointed by the arrow. Samples were visualized by differential interference contrast (DIC) (i) merge with wide field microscopy (ii), and the STORM image (iii)

#### REFERENCES

1. deCathelineau, A. M., and P. M. Henson. 2003. The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays Biochem.* 39: 105–117.
2. Arandjelovic, S., and K. S. Ravichandran. 2015. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat. Immunol.* 16: 907–917.
3. Barth, N. D., J. A. Marwick, M. Vendrell, A. G. Rossi, and I. Dransfield. 2017. The “Phagocytic Synapse” and Clearance of Apoptotic Cells. *Front. Immunol.* 8.
4. Frachet, P., P. Tacnet-Delorme, and C. G. and N. M. Thielen. 2015. Role of C1q in Efferocytosis and Self-Tolerance — Links With Autoimmunity.



**Acknowledgements:**  
 IBS/IRPAS group  
 ISBG platforms:

Grant ANR16-CE11-0019

# Annexe 3 : Poster présenté durant la 17<sup>ème</sup> rencontre européenne sur le complément dans les maladies humaines (EMCHD 2019, Madrid)



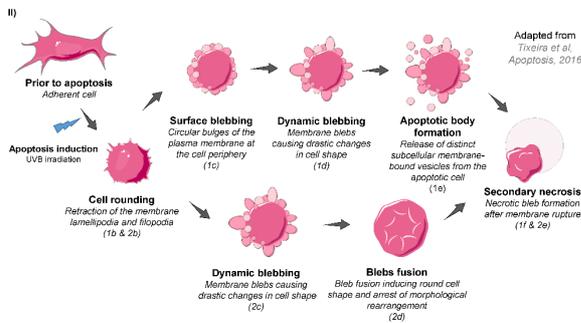
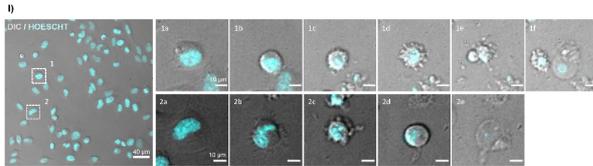
## INVESTIGATING THE ARCHITECTURE OF APOPTOTIC CELLS ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS RECOGNIZED BY C1q AT THE NANOSCALE

Samy Dufour<sup>1\*</sup>, Pascale Tacnet-Delorme<sup>1</sup>, Nicole Thielens<sup>1</sup>, Jean-Philippe Kleman<sup>1</sup>, Dominique Bourgeois<sup>1</sup> and Philippe Frachet<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Institut de Biologie Structurale, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France  
 \*samy.dufour@ibs.fr

### INTRODUCTION

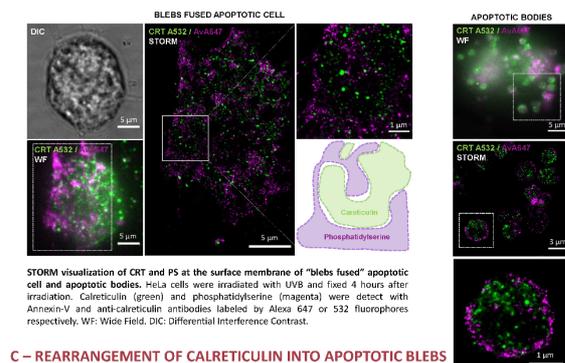
It is now admitted that the mechanism of the **inflammatory-silent clearance of apoptotic cells** is an essential process during **development and tissue homeostasis**. Dying cells are recognized and then **engulfed by phagocytes** and this determines the immunological response. Numerous interacting molecules present on the macrophage membrane and on the apoptotic cell surface have been discovered but how they participate to the “immunological symphony” remains mysterious. **C1q** senses various **ACAMPs** (Apoptotic Cells Associated-Molecular Patterns) and is recognized by macrophage receptors thus modulating the uptake and signaling events. Since C1q is believed to be one of the key elements that would organize the **phagocytic synapse**, it is crucial to decipher the organization of the multi-molecular complexes involving C1q at the phagocyte-apoptotic interface, to learn more about the functional relationship with the immune response. Until now, the architectures of these structures are poorly understood because they are organized into **multi-molecular complexes** typically much smaller than the diffraction limit of light. We decided to take advantage of advanced microscopy techniques to reach the nanoscale. Building on our previous data on the role of **phosphatidylserine** (Païdassi et al, *J.Immunol.*, 2008), **calreticulin** (Païdassi et al, *J.Mol.Biol.*, 2011), and **C1q** in the clearance of apoptotic cells, we investigated their **localization on cell surface** using **STORM** (STochastic Optical Reconstruction Microscopy).

### A- HeLa CELLS DEVELOP APOPTOSIS IN TWO WAYS AFTER UVB IRRADIATION



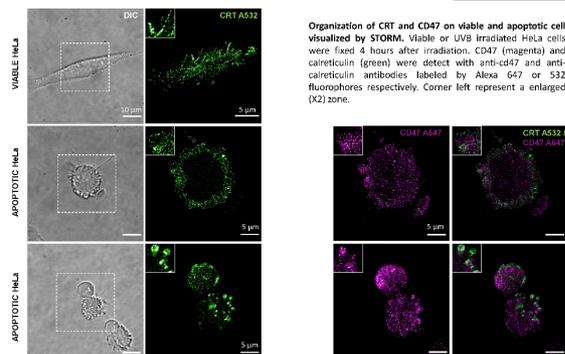
Observation and description of the different steps of apoptosis. (I) Time lapse imaging of apoptotic HeLa. Cells were irradiated with UVB and then stained with Hoescht 33342 (cyan) to detect the nucleus. After irradiation cells were visualized during 16 hours with a spinning disk confocal microscope. Two representative cells (1&2) were chosen to represent the different stages of apoptosis. (II) Schematic representation of apoptosis based on time lapse acquisition.

### B – CALRETICULIN (CRT) AND PHOSPHATIDYLSERINE (PS) ARE LOCALIZED INTO DISTINCT DOMAINS ON APOPTOTIC CELLS SURFACE



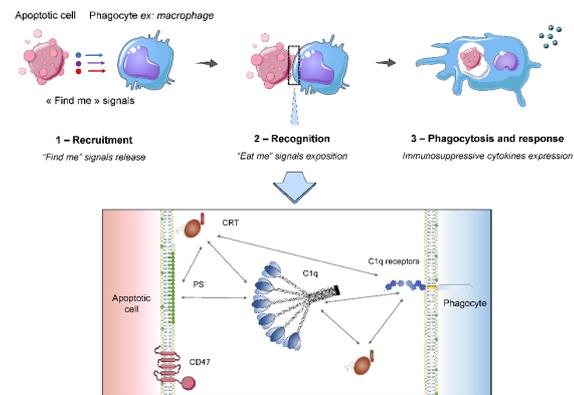
STORM visualization of CRT and PS at the surface membrane of “blebs fused” apoptotic cell and apoptotic bodies. HeLa cells were irradiated with UVB and fixed 4 hours after irradiation. Calreticulin (green) and phosphatidylserine (magenta) were detected with Annexin-V and anti-calreticulin antibodies labeled by Alexa 647 or 532 fluorophores respectively. WF: Wide Field. DIC: Differential Interference Contrast.

### C – REARRANGEMENT OF CALRETICULIN INTO APOPTOTIC BLEBS



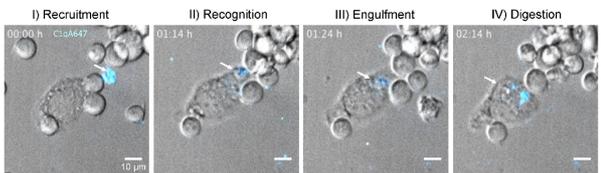
Organization of CRT and CD47 on viable and apoptotic cell visualized by STORM. Viable or UVB irradiated HeLa cells were fixed 4 hours after irradiation. CD47 (magenta) and calreticulin (green) were detected with anti-cd47 and anti-calreticulin antibodies labeled by Alexa 647 or 532 fluorophores respectively. Corner left represent an enlarged (X2) zone.

### D - SCHEMATIC REPRESENTATION OF EFFEROCYTOSIS AND AN EFFEROSYNAPE FOCUSED ON C1q MOLECULE



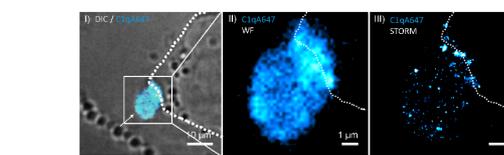
First the apoptotic cell releases “find me” signals, stimulating the recruitment of the phagocyte. Second, “eat me” signals exposition allows the recognition of the target (initiating), third, the phagocytosis of the target and cytokine response by the phagocyte. PS: phosphatidylserine, CRT: calreticulin, CD47: categorized as a “don’t eat me” signal, C1q: Complement molecule C1q. C1q receptors e.g. CR1 (class F member 1), CD91... Arrows represents interactions between these different molecules.

### E – PHAGOCYTOSIS OF AN APOPTOTIC CELL OPSONIZED BY C1Q



UVB irradiated Jurkat phagocytosis by THP1 macrophage. Cells were mixed after irradiation and C1qA647 molecule (cyan) was added in the culture medium at 80 µg/mL. White arrows points apoptotic cell opsonized by C1q. Time lapse acquisition began 1 hour after contact between apoptotic Jurkat and THP1 cells.

### F - C1q CLUSTERIZES ON APOPTOTIC CELL MEMBRANE AND AT THE EFFEROSYNAPE



Macrophage (delimited by dashed line) in contact with an apoptotic Jurkat cell opsonized by C1qA647 (cyan) pointed by the arrow. Samples were visualized by differential interference contrast (DIC (i)) merge with wide field microscopy (WF) (ii), and the STORM image (iii)

### CONCLUSION & PERSPECTIVES

UV-irradiated HeLa cells develop apoptosis in different ways, with distinct morphological changes.

Analysis at the **nanoscale** reveals that:

- Despite their ability to interact (Païdassi et al, *J.Mol.Biol.*, 2011), calreticulin and PS localize to distinct domains both on blebs fused cells and apoptotic bodies.
- Calreticulin re-localize in dense clusters on apoptotic blebs.
- The “don’t eat me” signal CD47 does not seem to show specific rearrangement but stay in close proximity to calreticulin.
- C1q is organized in larger clusters (diameter ±200-300 nm) at the contact zone between the apoptotic cell and the macrophage.

Further analysis will be done to analyse the redistribution of C1q and its partners throughout the phagocytosis process (e.g. using a single-particle tracking strategy)



Acknowledgements: IRPAS group, ISBG platforms  
 No relevant conflicts of interest to disclose

# Annexe 4 : Poster présenté durant MIFOBIO 2021 (Presqu'île de Giens)

## NANOSCALE DISTRIBUTION OF CALRETICULIN, PHOSPHATIDYLSERINE «EAT-ME» SIGNALS, AND THE CD47 «DON'T EAT-ME» SIGNAL ENLIGHTENS ON HOW PLASMA MEMBRANE MODIFICATIONS SHAPE APOPTOTIC CELL RECOGNITION

Samy Dufour<sup>1\*</sup>, P. Tacnet<sup>1</sup>, JP. Klemm<sup>1</sup>, O. Glushonkov<sup>1</sup>, N. Thielens<sup>1</sup>, D. Bourgeois<sup>1</sup> & P. Frachet<sup>1</sup>

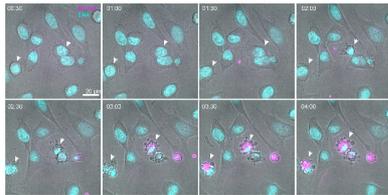
<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IBS, Grenoble, France. \*samy.dufour@ibs.fr



Apoptotic cell clearance, essential for tissue homeostasis, is a routine process managed by phagocytes and especially by macrophages, from smelling and testing to the final uptake decision of the selected prey (Hochreiter-Hufford and Ravichandran, 2013). This last event is achieved by a set of interactions occurring at the phagocyte-prey interface. Numerous molecules with different roles have been characterized and proposed to be part of "the phagocytic synapse", such as calreticulin and phosphatidylserine which act as "eat-me" and CD47 which can suppress engagement when interacting with the macrophage receptor SIRPα. However, little is known on how these signals are balanced during apoptosis to control the engulfment decision.

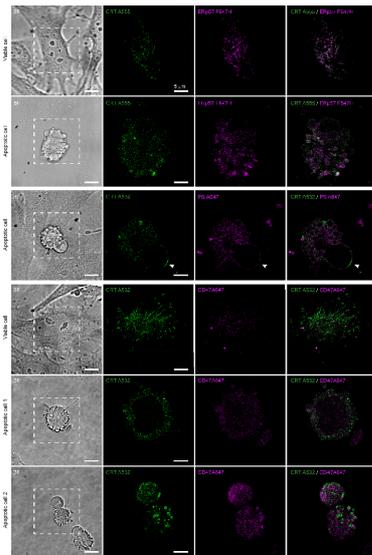
**We interrogate how the nanoscale distribution of calreticulin, phosphatidylserine and CD47 influence apoptotic cell recognition?**

### A - Characterization of our UVB-induced apoptosis cellular model

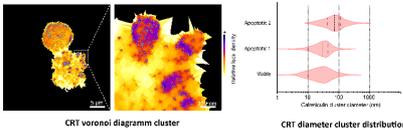


**Time lapse imaging of UVB irradiated HeLa cell**  
The first step of apoptosis is the cell rounding resulting from the retraction of the cell (2:00). After that, apoptotic membrane blebbing begins, which involves the formation of circular bulges at the plasma membrane (2:30). Then at a later stage, drastic changes in cell shape occur and are called **dynamic blebbing** (3:00 - 4:00)

### B - The relative distribution of PS and acto-CRT "eat me" signals and of CD47 "don't eat me" signal depends on the local reorganisation of the membrane



Evolution of the nanoscale organization of calreticulin during apoptosis in function to its partners imaged by eSTORM



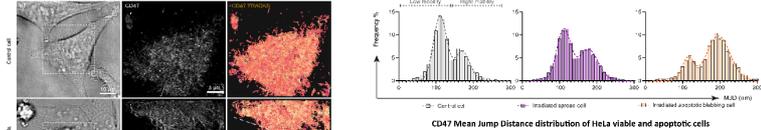
#### How the organization of CRT with its partners evolve during apoptosis?

- CRT colocalizes on apoptotic blebs to form large cluster
- CD47 shows no specific rearrangement during apoptosis
- CRT shows heterogeneous co-localization with phosphatidylserine

Acknowledgments: I2SR group, CAID group, I2SRG platform  
No relevant conflicts of interest to disclose



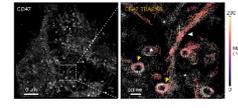
### C - The mobility of CD47 is enhanced on apoptotic cell surface



#### CD47 single particle tracking on HeLa viable and apoptotic cells

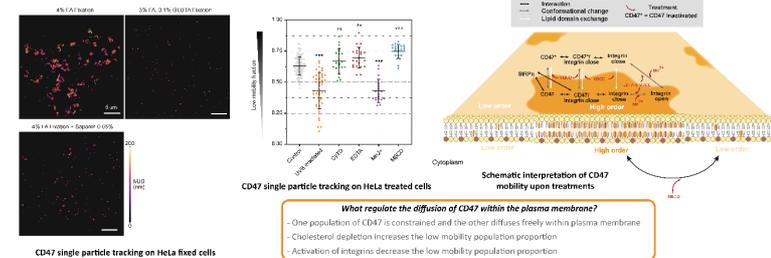
##### How the mobility of CD47 evolve during apoptosis?

- Two diffusive populations of CD47 coexist within the membrane: low and high mobility population
- Low mobility population reveals microvilli and microvesicle like structure
- The proportion of high mobility population increases during apoptosis



CD47 single particle tracking reveals microvilli and microvesicle like structure

### D - CD47 mobility depends on integrin state and plasma membrane organisation

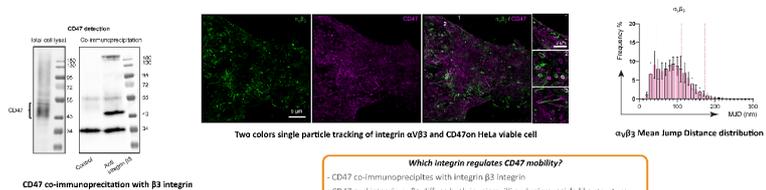


#### CD47 single particle tracking on HeLa treated cells

##### What regulate the diffusion of CD47 within the plasma membrane?

- One population of CD47 is constrained and the other diffuses freely within plasma membrane
- Cholesterol depletion increases the low mobility population proportion
- Activation of integrins decrease the low mobility population proportion

### E - CD47 and integrin β3 share diffusive domain on plasma membrane

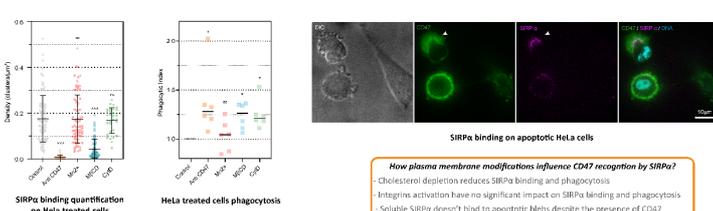


#### CD47 co-immunoprecipitation with β3 integrin

##### Which integrin regulates CD47 mobility?

- CD47 co-immunoprecipitates with integrin β3 integrin
- CD47 and integrin αVβ3 diffuse both in microvilli and microvesicle like structure
- MID distribution of αVβ3 is compatible with the low mobility population of CD47

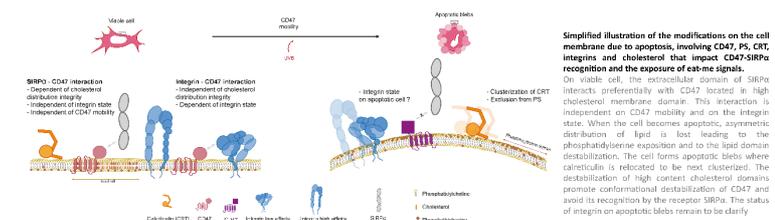
### F - Destabilization of cholesterol impacts the SIRPα binding and the phagocytosis efficiency



#### How plasma membrane modifications influence CD47 recognition by SIRPα?

- Cholesterol depletion reduces SIRPα binding and phagocytosis
- Integrin activation have no significant impact on SIRPα binding and phagocytosis
- Soluble SIRPα doesn't bind to apoptotic blebs despite the presence of CD47

### G - Schematic interpretation of the modifications on the cell membrane during apoptosis development involving CD47, PS and CRT



**Simplified illustration of the modifications on the cell membrane due to apoptosis, involving CD47, PS, CRT, integrins and cholesterol that impact CD47-SIRPα recognition and the exposure of eat-me signals.**  
On viable cell, the extracellular domain of SIRPα interacts preferentially with CD47 located in high cholesterol membrane domains. This interaction is independent on CD47 mobility and on the integrin state. When the cell becomes apoptotic, asymmetric distribution of lipid is lost leading to the phosphatidylserine exposition and to the lipid domain destabilization. The cell forms apoptotic blebs where calreticulin is relocated to be most clustered. The destabilization of high content cholesterol domains promote conformational destabilization of CD47 and avoid its recognition by the receptor SIRPα. The status of integrin on apoptotic blebs remain to be clarify.

Annexe 5 : Abstract publié dans le journal « Molecular Immunology » pour la 17<sup>ème</sup> rencontre européenne sur le complément dans les maladies humaines (EMCHD 2019, Madrid)

Référence : EMCHD2019 - Abstracts, Molecular Immunology, Volume 114, 2019, Pages 410-496, ISSN 0161-5890, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.08.016>.

## INVESTIGATING THE ARCHITECTURE OF APOPTOTIC CELLS ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS RECOGNIZED BY C1q AT THE NANOSCALE

Samy Dufour<sup>1</sup>, Pascale Tacnet<sup>1</sup>, Nicole M Thielens<sup>1</sup>, Jean-Philippe Kleman<sup>1</sup>, Dominique Bourgeois<sup>1</sup>, Philippe Frchet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institut de Biologie Structurale, Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS, Grenoble, France*

It is now admitted that the mechanism of the inflammatory-silent clearance of apoptotic cells is an essential process during development and tissue homeostasis. Dying cells are recognized and then engulfed by phagocytes and this determines the immunological response. Numerous interacting molecules present on the macrophage membrane and on the apoptotic cell surface have been discovered but how they participate to the “immunological symphony” remains mysterious. C1q senses various ACAMPs (Apoptotic Cells Associated-Molecular Patterns) and is recognized by macrophage receptors thus modulating the uptake and signaling events. Since C1q is believed to be one of the key elements that would organize the phagocytic synapse, it is crucial to decipher the organization of the multi-molecular complexes involving C1q at the phagocyte-apoptotic interface, to learn more about the functional relationship with the immune response. Until now, the architectures of these structures are poorly understood because they are organized into multi-molecular complexes typically much smaller than the diffraction limit of light. We decided to take advantage of advanced microscopy techniques to reach the nanoscale. Building on our previous data on the role of calreticulin, phosphatidylserine and C1q in the clearance of apoptotic cells, we investigated their localization on cell surface using Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). Nanoscale organization of these molecules was determined using single or multi-labeling approaches by STORM with exogenous C1q, Annexin V and anti-calreticulin antibody (labeled by Alexa 647 or 532 fluorophores well suited for STORM). Super resolution images reveal that C1q organizes in large nanoclusters (diameter of 200-300 nm) at the interface between an apoptotic cell and a THP-1 macrophage. Double labeling of calreticulin and PS shows that they are organized in domains with a peculiar spatial organization, where calreticulin and PS are mutually excluded on apoptotic HeLa cells. Analyses are underway on other membrane molecules involved in the cell removal process. Defining the nanoscale structural architecture of ligands on apoptotic cells and the corresponding receptors on phagocytes with which they engage is likely to lead to the development of novel ways of intervening in critical cellular mechanisms involved in pathophysiology of autoimmune and inflammatory diseases. This study was supported by grant ANR16-CE11-0019 from the French National Research Agency.

**Annexe 6 : Tableau récapitulatif du matériel utilisé pour les expériences présentées dans le manuscrit CD47**

Reagent or Resource	Source	Identifrier
<b>Antibodies</b>		
Chicken polyclonal anti calreticulin	ThermoFisher	PA1-902A
Mouse anti $\alpha_3\beta_1$ labelled phycoerythrin (PE)	BD Biosciences,	50037
Annexin V conjugated to Alexa Fluor 647	Biolegend	640912
Annexin V conjugated to Biotin	Biolegend	640904
Rabbit polyclonal anti ERp57	Abcam	ab10287
Mouse anti CD47 conjugated to Alexa Fluor A647 (Clone B6H12)	Santa Cruz	sc-12730 AF647
Mouse anti CD47 (Clone B6H12)	Santa Cruz	sc-12730
Rabbit polyclonal anti integrin beta 3	sigma	AB2984
Normal mouse IgG1	Santa Cruz	sc-3877
Rabbit Polyclonal anti Chicken labeled with Alexa Fluor 532	Cohesion Biosciences	CSA3314
F(ab') <sub>2</sub> Goat polyclonal anti-Mouse labeled with Alexa Fluor 488	ThermoFisher	A-11017
Goat polyclonal anti-mouse labeled with Alexa Fluor 647	ThermoFisher	A21236
Donkey polyclonal anti Chicken labeled with DyLight 488	JacksonImmunoResearch	703-485-155
Goat polyclonal anti Chicken labeled with Alexa Fluor 555	ThermoFisher	A21437
Donkey polyclonal anti Rabbit IgG labeled with FluoProbes 647H	Interchim	FP-SC5110
Streptavidin conjugated to Alexa Fluor 647	ThermoFisher	S32357
Goat polyclonal anti-Rabbit labelled with Peroxidase	Sigma	A0545
<b>Chemicals &amp; Recombinant Proteins</b>		
Recombinant SIRP $\alpha$ extracellular domain fusion protein (SIRP $\alpha$ .ex-Fc) labelled with biotin	R&D	BT4546B-050
MBCD (Methyl- $\beta$ -Cyclodextrins)	Santa Cruz	sc-215379
DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline)	ThermoFisher	14190144
PBS	Euromedex	ET330
Cysteamine	Sigma	30070
Poly-D-lysine hydrobromide	Sigma	P7886
Glycérol 99,5%	VWR	24388
Catalase from bovin liver (21850 units/mg)	Sigma	C40
Glucose Oxidase from Aspergillus niger (225970 units/g)	Sigma	G2133-50KU
Gold nanoparticles (100nm diameter)	Sigma	753688
16% Paraformaldehyde solution EM grade	Electron Microscopy Sciences	15710
8% Glutaraldehyde solution EM grade	Electron Microscopy Sciences	16020
Saponin from Quillaja	Sigma	S-4521
Annexin V-FITC Kit	Miltenyi Biotec	130-092-052
Bovine Serum Albumin	Sigma	A7030
Manganese(II) chloride tetrahydrate	Sigma	M3634
Cytochalasin D from Zygosporium mansonii	Sigma	C8273
CuSO <sub>4</sub>	Sigma	451657
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	ThermoFisher	C34554
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling	Sigma	MINI26-KT
Pierce™ RIPA Buffer	ThermoFisher	89900
Dynabeads™ Protein G	ThermoFisher	10003D
Complete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche	5056489001
Hoescht 33342	ThermoFisher	62249
Versene	ThermoFisher	15040066
Trypsin-EDTA (0.05%), phenol red	ThermoFisher	25300054
16:0-18:1 PC (POPC)	Avanti polar lipids	850457C-25 mg
16:0 PC (DPPC)	Avanti polar lipids	850355C-25mg
18:1 PS (DOPS)	Avanti polar lipids	840035C-10 mg
TopFluor® PS	Avanti polar lipids	810283C-1mg
<b>Experimental Models: Cell Lines</b>		
HeLa	ATCC (American Type Culture collection)	No. CCL2
J774 mouse macrophage	ATCC (American Type Culture collection)	TIB 67
<b>Software and Algorithms</b>		
MACSQuantify software	Miltenyi Biotec	RRID:SCR_020943
Illustrator	Adobe	RRID:SCR_010279ft
Fiji	<a href="https://fiji.sc/">https://fiji.sc/</a>	RRID:SCR_002285
Prism	GraphPad 8	RRID:SCR_002798
Imaris	Oxford instruments	RRID:SCR_007370
SWIFT	<a href="http://bit.ly/swiftracking">http://bit.ly/swiftracking</a>	
Coloc Tesseler	<a href="https://github.com/flevet/Coloc-Tesseler">https://github.com/flevet/Coloc-Tesseler</a>	
SR-Tesseler	<a href="https://github.com/flevet/SR-Tesseler">https://github.com/flevet/SR-Tesseler</a>	
Metamorph	Molecular Devices	RRID:SCR_002368
<b>Others</b>		
Nunc™ Lab-Tek™ Chambered Coverglass 8-well	ThermoFisher	155411
Nunc™ Lab-Tek™ II Chambered Coverglass 8-well	ThermoFisher	155409
DMEM fluorobrite medium	ThermoFisher	A1896701
Fluoromount G	SouthernBiotech	0100-20
ProLong™ Glass Antifade Mountant with Hoechst	ThermoFisher	P36982
Picodent twinsil®	Picodent	1300 1000
TetraSpeck™ microspheres 100nm	ThermoFisher	T7279
Mycoalert detection kit	Lonza	LT07-118
Micro BCA™ Protein Assay Kit	ThermoFisher	23235
Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare	RPN2235
Silica bead - 5 $\mu$ m	Bang laboratories	ssd5003
Mycoalert detection kit	Lonza	LT07-118

# Bibliographie

- Abitorabi, M.A., Pachynski, R.K., Ferrando, R.E., Tidswell, M., and Erle, D.J. (1997). Presentation of Integrins on Leukocyte Microvilli: A Role for the Extracellular Domain in Determining Membrane Localization. *J Cell Biol* 139, 563–571.
- Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., and Inoue, K. (1997). Expression Cloning of a Novel Scavenger Receptor from Human Endothelial Cells\*. *Journal of Biological Chemistry* 272, 31217–31220.
- Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun* 9, 1911.
- A-Gonzalez, N., Bensinger, S.J., Hong, C., Beceiro, S., Bradley, M.N., Zelcer, N., Deniz, J., Ramirez, C., Díaz, M., Gallardo, G., et al. (2009). Apoptotic Cells Promote Their Own Clearance and Immune Tolerance through Activation of the Nuclear Receptor LXR. *Immunity* 31, 245–258.
- Akakura, S., Singh, S., Spataro, M., Akakura, R., Kim, J.-I., Albert, M.L., and Birge, R.B. (2004). The opsonin MFG-E8 is a ligand for the  $\alpha\beta 5$  integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. *Experimental Cell Research* 292, 403–416.
- Albert, M.L., Kim, J.-I., and Birge, R.B. (2000).  $\alpha\beta 5$  integrin recruits the CrkII–Dock180–Rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* 2, 899–905.
- Alcor, D., Gouzer, G., and Triller, A. (2009). Single-particle tracking methods for the study of membrane receptors dynamics. *European Journal of Neuroscience* 30, 987–997.
- Appelt, U., Sheriff, A., Gaipl, U.S., Kalden, J.R., Voll, R.E., and Herrmann, M. (2005). Viable, apoptotic and necrotic monocytes expose phosphatidylserine: cooperative binding of the ligand Annexin V to dying but not viable cells and implications for PS-dependent clearance. *Cell Death & Differentiation* 12, 194–196.
- Arandjelovic, S., and Ravichandran, K.S. (2015). Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol* 16, 907–917.
- Arganda-Carreras, I., Kaynig, V., Rueden, C., Eliceiri, K.W., Schindelin, J., Cardona, A., and Sebastian Seung, H. (2017). Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics* 33, 2424–2426.
- Arlaud, G.J., Sim, R.B., Duplaa, A.M., and Colomb, M.G. (1979). Differential elution of Clq, C1r and C1s from human C1 bound to immune aggregates. Use in the rapid purification of C1 subcomponents. *Mol Immunol* 16, 445–450.
- Atkin-Smith, G.K., and Poon, I.K.H. (2017). Disassembly of the Dying: Mechanisms and Functions. *Trends in Cell Biology* 27, 151–162.
- Audiffred, J.F., Leo, S.E.D., Brown, P.K., Hale-Donze, H., and Monroe, W.T. (2010). Characterization and applications of serum-free induced adhesion in jurkat suspension cells. *Biotechnology and Bioengineering* 106, 784–793.

- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science* 317, 666–670.
- Bailey, R.W., Nguyen, T., Robertson, L., Gibbons, E., Nelson, J., Christensen, R.E., Bell, J.P., Judd, A.M., and Bell, J.D. (2009). Sequence of Physical Changes to the Cell Membrane During Glucocorticoid-Induced Apoptosis in S49 Lymphoma Cells. *Biophysical Journal* 96, 2709–2718.
- Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Perdiguero, E.G., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.McI. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in adult intestine. *Nat Immunol* 15, 929–937.
- Bakalar, M.H., Joffe, A.M., Schmid, E.M., Son, S., Podolski, M., and Fletcher, D.A. (2018). Size-Dependent Segregation Controls Macrophage Phagocytosis of Antibody-Opsonized Targets. *Cell* 174, 131-142.e13.
- Baldwin, G., Novitskaya, V., Sadej, R., Pochee, E., Litynska, A., Hartmann, C., Williams, J., Ashman, L., Eble, J.A., and Berditchevski, F. (2008). Tetraspanin CD151 Regulates Glycosylation of  $\alpha 3\beta 1$  Integrin\*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 35445–35454.
- Barkal, A.A., Weiskopf, K., Kao, K.S., Gordon, S.R., Rosental, B., Yiu, Y.Y., George, B.M., Markovic, M., Ring, N.G., Tsai, J.M., et al. (2018). Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nat Immunol* 19, 76–84.
- Barkal, A.A., Brewer, R.E., Markovic, M., Kowarsky, M., Barkal, S.A., Zaro, B.W., Krishnan, V., Hatakeyama, J., Dorigo, O., Barkal, L.J., et al. (2019). CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature* 572, 392–396.
- Bedoui, S., Herold, M.J., and Strasser, A. (2020). Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 678–695.
- Belardi, B., Son, S., Felce, J.H., Dustin, M.L., and Fletcher, D.A. (2020). Cell–cell interfaces as specialized compartments directing cell function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21, 750–764.
- Belz, G.T., Behrens, G.M.N., Smith, C.M., Miller, J.F.A.P., Jones, C., Lejon, K., Fathman, C.G., Mueller, S.N., Shortman, K., Carbone, F.R., et al. (2002). The CD8 $\alpha$ + Dendritic Cell Is Responsible for Inducing Peripheral Self-Tolerance to Tissue-associated Antigens. *Journal of Experimental Medicine* 196, 1099–1104.
- Benoit, M.E., Clarke, E.V., Morgado, P., Fraser, D.A., and Tenner, A.J. (2012). Complement protein C1q directs macrophage polarization and limits inflammasome activity during the uptake of apoptotic cells. *J. Immunol.* 188, 5682–5693.
- Berges, C., Naujokat, C., Tinapp, S., Wiczorek, H., Höh, A., Sadeghi, M., Opelz, G., and Daniel, V. (2005). A cell line model for the differentiation of human dendritic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333, 896–907.

- Bernardino de la Serna, J., Schütz, G.J., Eggeling, C., and Cebecauer, M. (2016). There Is No Simple Model of the Plasma Membrane Organization. *Front. Cell Dev. Biol.* *0*.
- Berwin, B., Delneste, Y., Lovingood, R.V., Post, S.R., and Pizzo, S.V. (2004). SREC-I, a Type F Scavenger Receptor, Is an Endocytic Receptor for Calreticulin. *J. Biol. Chem.* *279*, 51250–51257.
- Bevers, E.M., and Williamson, P.L. (2016). Getting to the Outer Leaflet: Physiology of Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane. *Physiological Reviews* *96*, 605–645.
- Bilyy, R.O., Shkandina, T., Tomin, A., Muñoz, L.E., Franz, S., Antonyuk, V., Kit, Y.Ya., Zirngibl, M., Fürnrohr, B.G., Janko, C., et al. (2012). Macrophages Discriminate Glycosylation Patterns of Apoptotic Cell-derived Microparticles\*. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 496–503.
- Birge, R.B., Boeltz, S., Kumar, S., Carlson, J., Wanderley, J., Calianese, D., Barcinski, M., Brekken, R.A., Huang, X., Hutchins, J.T., et al. (2016). Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ* *23*, 962–978.
- Blander, J.M. (2017). The many ways tissue phagocytes respond to dying cells. *Immunol Rev* *277*, 158–173.
- Boada-Romero, E., Martinez, J., Heckmann, B.L., and Green, D.R. (2020). Mechanisms and physiology of the clearance of dead cells by efferocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *21*, 398–414.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., et al. (2009). Origin of the Lamina Propria Dendritic Cell Network. *Immunity* *31*, 513–525.
- Bohlson, S.S., O’Conner, S.D., Hulsebus, H.J., Ho, M.-M., and Fraser, D.A. (2014). Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front Immunol* *5*, 402.
- Botto, M. (1998). C1q knock-out mice for the study of complement deficiency in autoimmune disease. *Exp. Clin. Immunogenet.* *15*, 231–234.
- Brown, E.J., and Frazier, W.A. (2001). Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends in Cell Biology* *11*, 130–135.
- Brown, E., Hooper, L., Ho, T., and Gresham, H. (1990). Integrin-associated protein: a 50-kD plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins. *J Cell Biol* *111*, 2785–2794.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Tramont, A.-C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R., and Ravichandran, K.S. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180–ELMO complex. *Nat Cell Biol* *4*, 574–582.
- Burger, P., Hilarius-Stokman, P., de Korte, D., van den Berg, T.K., and van Bruggen, R. (2012). CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood* *119*, 5512–5521.
- Cabeza-Cabrerizo, M., Cardoso, A., Minutti, C.M., Pereira da Costa, M., and Reis e Sousa, C. (2021). Dendritic Cells Revisited. *Annual Review of Immunology* *39*, 131–166.

- Carlin, L.M., Stamatiades, E.G., Auffray, C., Hanna, R.N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., Hedrick, C.C., Cook, H.T., Diebold, S., and Geissmann, F. (2013). Nr4a1-Dependent Ly6Clow Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal. *Cell* 153, 362–375.
- Castrillo, A., and Tontonoz, P. (2004). NUCLEAR RECEPTORS IN MACROPHAGE BIOLOGY: At the Crossroads of Lipid Metabolism and Inflammation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 455–480.
- Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Tang, C., Myklebust, J.H., Varghese, B., Gill, S., Jan, M., Cha, A.C., Chan, C.K., Tan, B.T., et al. (2010). Anti-CD47 Antibody Synergizes with Rituximab to Promote Phagocytosis and Eradicate Non-Hodgkin Lymphoma. *Cell* 142, 699–713.
- Chao, M.P., Takimoto, C.H., Feng, D.D., McKenna, K., Gip, P., Liu, J., Volkmer, J.-P., Weissman, I.L., and Majeti, R. (2019). Therapeutic Targeting of the Macrophage Immune Checkpoint CD47 in Myeloid Malignancies. *Front Oncol* 9, 1380.
- Chen, G.-Y., Chen, X., King, S., Cavassani, K.A., Cheng, J., Zheng, X., Cao, H., Yu, H., Qu, J., Fang, D., et al. (2011). Preserving Sialic Acid-dependent Pattern Recognition by CD24-Siglec G Interaction for Therapy of Polybacterial Sepsis. *Nat Biotechnol* 29, 428–435.
- Cheung, W.L., Ajiro, K., Samejima, K., Kloc, M., Cheung, P., Mizzen, C.A., Beeser, A., Etkin, L.D., Chernoff, J., Earnshaw, W.C., et al. (2003). Apoptotic Phosphorylation of Histone H2B Is Mediated by Mammalian Sterile Twenty Kinase. *Cell* 113, 507–517.
- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M.F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 3, 339–345.
- Colonna, L., Parry, G.C., Panicker, S., and Elkon, K.B. (2016). Uncoupling complement C1s activation from C1q binding in apoptotic cell phagocytosis and immunosuppressive capacity. *Clinical Immunology* 163, 84–90.
- Cotter, T.G., Lennon, S.V., Glynn, J.M., and Green, D.R. (1992). Microfilament-disrupting Agents Prevent the Formation of Apoptotic Bodies in Tumor Cells Undergoing Apoptosis. *Cancer Res* 52, 997–1005.
- Crawford, E.D., Seaman, J.E., Agard, N., Hsu, G.W., Julien, O., Mahrus, S., Nguyen, H., Shimbo, K., Yoshihara, H.A.I., Zhuang, M., et al. (2013). The DegraBase: A Database of Proteolysis in Healthy and Apoptotic Human Cells. *Mol Cell Proteomics* 12, 813–824.
- Culley, S., Albrecht, D., Jacobs, C., Pereira, P.M., Leterrier, C., Mercer, J., and Henriques, R. (2018). NanoJ-SQUIRREL: quantitative mapping and minimisation of super-resolution optical imaging artefacts. *Nat Methods* 15, 263–266.
- Cummings, R.J., Barbet, G., Bongers, G., Hartmann, B.M., Gettler, K., Muniz, L., Furtado, G.C., Cho, J., Lira, S.A., and Blander, J.M. (2016). Different tissue phagocytes sample apoptotic cells to direct distinct homeostasis programs. *Nature* 539, 565–569.
- Darwich, Z., Klymchenko, A.S., Kucherak, O.A., Richert, L., and Mély, Y. (2012). Detection of apoptosis through the lipid order of the outer plasma membrane leaflet. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818, 3048–3054.

- De Zitter, E., Thédié, D., Mönkemöller, V., Hugelier, S., Beaudouin, J., Adam, V., Byrdin, M., Van Meervelt, L., Dedecker, P., and Bourgeois, D. (2019). Mechanistic investigation of mEos4b reveals a strategy to reduce track interruptions in sptPALM. *Nat Methods* *16*, 707–710.
- deCathelineau, A.M., and Henson, P.M. (2003). The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays In Biochemistry* *39*, 105–117.
- Dempsey, G.T., Vaughan, J.C., Chen, K.H., Bates, M., and Zhuang, X. (2011). Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nature Methods* *8*, 1027–1036.
- Diekmann, R., Kahnwald, M., Schoenit, A., Deschamps, J., Matti, U., and Ries, J. (2020). Optimizing imaging speed and excitation intensity for single-molecule localization microscopy. *Nat Methods* *17*, 909–912.
- Dillon, S.R., Mancini, M., Rosen, A., and Schlissel, M.S. (2000). Annexin V Binds to Viable B Cells and Colocalizes with a Marker of Lipid Rafts upon B Cell Receptor Activation. *The Journal of Immunology* *164*, 1322–1332.
- Dransfield, I., Stocks, S.C., and Haslett, C. (1995). Regulation of Cell Adhesion Molecule Expression and Function Associated With Neutrophil Apoptosis. *Blood* *85*, 3264–3273.
- Dupuy, A.D., and Engelman, D.M. (2008). Protein area occupancy at the center of the red blood cell membrane. *PNAS* *105*, 2848–2852.
- Elliott, J.I., Surprenant, A., Marelli-Berg, F.M., Cooper, J.C., Cassady-Cain, R.L., Wooding, C., Linton, K., Alexander, D.R., and Higgins, C.F. (2005). Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol* *7*, 808–816.
- Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., et al. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* *461*, 282–286.
- Ellis, R.E., Jacobson, D.M., and Horvitz, H.R. (1991). Genes Required for the Engulfment of Cell Corpses during Programmed Cell Death in *Caenorhabditis Elegans*. *Genetics* *129*, 79–94.
- Erlendsson, S., and Teilum, K. (2021). Binding Revisited—Avidity in Cellular Function and Signaling. *Frontiers in Molecular Biosciences* *7*, 470.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology* *148*, 2207–2216.
- Fairm, G.D., Schieber, N.L., Ariotti, N., Murphy, S., Kuerschner, L., Webb, R.I., Grinstein, S., and Parton, R.G. (2011). High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine. *J Cell Biol* *194*, 257–275.
- Fenalti, G., Villanueva, N., Griffith, M., Pagarigan, B., Lakkaraju, S.K., Huang, R.Y.-C., Ladygina, N., Sharma, A., Mikolon, D., Abbasian, M., et al. (2021). Structure of the human marker of self 5-transmembrane receptor CD47. *Nat Commun* *12*, 5218.

- Feng, M., Marjon, K.D., Zhu, F., Weissman-Tsukamoto, R., Levett, A., Sullivan, K., Kao, K.S., Markovic, M., Bump, P.A., Jackson, H.M., et al. (2018). Programmed cell removal by calreticulin in tissue homeostasis and cancer. *Nat Commun* 9, 3194.
- Fischer, K., Voelkl, S., Berger, J., Andreesen, R., Pomorski, T., and Mackensen, A. (2006). Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 108, 4094–4101.
- Fish, K.N. (2009). Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Curr Protoc Cytom* 0 12, Unit12.18.
- Fisher, H.W., and Cooper, T.W. (1967). ELECTRON MICROSCOPE STUDIES OF THE MICROVILLI OF HELA CELLS. *J Cell Biol* 34, 569–576.
- Fletcher, D.A., and Mullins, R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485–492.
- van der Flier, A., and Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305, 285–298.
- Fouët, G., Gout, E., Wicker-Planquart, C., Bally, I., De Nardis, C., Dedieu, S., Chouquet, A., Gaboriaud, C., Thielens, N.M., Kleman, J.-P., et al. (2020). Complement C1q Interacts With LRP1 Clusters II and IV Through a Site Close but Different From the Binding Site of Its C1r and C1s-Associated Proteases. *Frontiers in Immunology* 11, 2706.
- Fouët, G., Bally, I., Chouquet, A., Reiser, J.-B., Thielens, N.M., Gaboriaud, C., and Rossi, V. (2021). Molecular Basis of Complement C1q Collagen-Like Region Interaction with the Immunoglobulin-Like Receptor LAIR-1. *IJMS* 22, 5125.
- Franz, S., Herrmann, K., Führrohr, B., Sheriff, A., Frey, B., Gaipf, U.S., Voll, R.E., Kalden, J.R., Jäck, H.-M., and Herrmann, M. (2007). After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. *Cell Death Differ* 14, 733–742.
- Freeman, S.A., Goyette, J., Furuya, W., Woods, E.C., Bertozzi, C.R., Bergmeier, W., Hinz, B., van der Merwe, P.A., Das, R., and Grinstein, S. (2016). Integrins Form an Expanding Diffusional Barrier that Coordinates Phagocytosis. *Cell* 164, 128–140.
- Freeman, S.A., Vega, A., Riedl, M., Collins, R.F., Ostrowski, P.P., Woods, E.C., Bertozzi, C.R., Tammi, M.I., Lidke, D.S., Johnson, P., et al. (2018). Transmembrane Pickets Connect Cyto- and Pericellular Skeletons Forming Barriers to Receptor Engagement. *Cell* 172, 305-317.e10.
- Fucikova, J. (2020). Calreticulin and cancer. *Cell Research* 12.
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2017). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol* 17, 97–111.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25, 486–541.
- Galvan, M.D., Greenlee-Wacker, M.C., and Bohlson, S.S. (2012a). C1q and phagocytosis: the perfect complement to a good meal. *Journal of Leukocyte Biology* 92, 489–497.

- Galvan, M.D., Foreman, D.B., Zeng, E., Tan, J.C., and Bohlson, S.S. (2012b). Complement Component C1q Regulates Macrophage Expression of Mer Tyrosine Kinase To Promote Clearance of Apoptotic Cells. *The Journal of Immunology* *188*, 3716–3723.
- Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.-A., Michalak, M., and Henson, P.M. (2005). Cell-Surface Calreticulin Initiates Clearance of Viable or Apoptotic Cells through trans-Activation of LRP on the Phagocyte. *Cell* *123*, 321–334.
- Garg, A.D., Krysko, D.V., Verfaillie, T., Kaczmarek, A., Ferreira, G.B., Marysael, T., Rubio, N., Firczuk, M., Mathieu, C., Roebroek, A.J.M., et al. (2012). A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death: CRT, ATP, and immunogenic cancer cell death. *The EMBO Journal* *31*, 1062–1079.
- Ge, Y., Gao, J., Jordan, R., and Naumann, C.A. (2018). Changes in Cholesterol Level Alter Integrin Sequestration in Raft-Mimicking Lipid Mixtures. *Biophysical Journal* *114*, 158–167.
- Ghebrehiwet, B., Hosszu, K., Valentino, A., and Peerschke, E.I.B. (2012). The C1q Family of Proteins: Insights into the Emerging Non-Traditional Functions. *Front. Immunol.* *3*.
- Gibbons, E., Pickett, K.R., Streeter, M.C., Warcup, A.O., Nelson, J., Judd, A.M., and Bell, J.D. (2013). Molecular Details of Membrane Fluidity Changes during Apoptosis and Relationship to Phospholipase A2 Activity. *Biochim Biophys Acta* *1828*, 887–895.
- Gimpl, G. (2016). Interaction of G protein coupled receptors and cholesterol. *Chemistry and Physics of Lipids* *199*, 61–73.
- Ginhoux, F., and Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* *44*, 439–449.
- Gordon, S., and Plüddemann, A. (2018). Macrophage Clearance of Apoptotic Cells: A Critical Assessment. *Front Immunol* *9*.
- Gordon, S.R., Maute, R.L., Dulken, B.W., Hutter, G., George, B.M., McCracken, M.N., Gupta, R., Tsai, J.M., Sinha, R., Corey, D., et al. (2017). PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* *545*, 495–499.
- Green, J.M., Zheleznyak, A., Chung, J., Lindberg, F.P., Sarfati, M., Frazier, W.A., and Brown, E.J. (1999). Role of Cholesterol in Formation and Function of a Signaling Complex Involving  $\alpha\beta 3$ , Integrin-Associated Protein (Cd47), and Heterotrimeric G Proteins. *J Cell Biol* *146*, 673–682.
- Gresham, H.D., Goodwin, J.L., Allen, P.M., Anderson, D.C., and Brown, E.J. (1989). A novel member of the integrin receptor family mediates Arg-Gly-Asp-stimulated neutrophil phagocytosis. *Journal of Cell Biology* *108*, 1935–1943.
- Gude, D.R., Alvarez, S.E., Paugh, S.W., Mitra, P., Yu, J., Griffiths, R., Barbour, S.E., Milstien, S., and Spiegel, S. (2008). Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a “come-and-get-me” signal. *FASEB J* *22*, 2629–2638.
- Guilliams, M., and van de Laar, L. (2015). A Hitchhiker’s Guide to Myeloid Cell Subsets: Practical Implementation of a Novel Mononuclear Phagocyte Classification System. *Front. Immunol.* *6*.

- Guilliams, M., Mildner, A., and Yona, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* *49*, 595–613.
- Han, C.Z., Juncadella, I.J., Kinchen, J.M., Buckley, M.W., Klibanov, A.L., Dryden, K., Onengut-Gumuscu, S., Erdbrügger, U., Shim, Y.M., Tung, K.S., et al. (2016). Macrophages redirect phagocytosis by non-professional phagocytes and influence inflammation. *Nature* *539*, 570–574.
- Harayama, T., and Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* *19*, 281–296.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* *38*, 792–804.
- Hatherley, D., Graham, S.C., Turner, J., Harlos, K., Stuart, D.I., and Barclay, A.N. (2008). Paired Receptor Specificity Explained by Structures of Signal Regulatory Proteins Alone and Complexed with CD47. *Molecular Cell* *31*, 266–277.
- Hayes, B.H., Tsai, R.K., Dooling, L.J., Kadu, S., Lee, J.Y., Pantano, D., Rodriguez, P.L., Subramanian, S., Shin, J.-W., and Discher, D.E. (2020). Macrophages show higher levels of engulfment after disruption of cis interactions between CD47 and the checkpoint receptor SIRP $\alpha$ . *Journal of Cell Science* *133*, jcs237800.
- Hesketh, E.E., Dransfield, I., Kluth, D.C., and Hughes, J. (2015). Circulating IgM Requires Plasma Membrane Disruption to Bind Apoptotic and Non-Apoptotic Nucleated Cells and Erythrocytes. *PLOS ONE* *10*, e0131849.
- Hirama, T., Das, R., Yang, Y., Ferguson, C., Won, A., Yip, C.M., Kay, J.G., Grinstein, S., Parton, R.G., and Fairn, G.D. (2017). Phosphatidylserine dictates the assembly and dynamics of caveolae in the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* *292*, 14292–14307.
- Hoogendoorn, E., Crosby, K.C., Leyton-Puig, D., Breedijk, R.M.P., Jalink, K., Gadella, T.W.J., and Postma, M. (2014). The fidelity of stochastic single-molecule super-resolution reconstructions critically depends upon robust background estimation. *Scientific Reports* *4*, 3854.
- Horton, E.R., Byron, A., Askari, J.A., Ng, D.H.J., Millon-Frémillon, A., Robertson, J., Koper, E.J., Paul, N.R., Warwood, S., Knight, D., et al. (2015). Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat Cell Biol* *17*, 1577–1587.
- Hughes, L.D., Wang, Y., Meli, A.P., Rothlin, C.V., and Ghosh, S. (2021). Decoding Cell Death: From a Veritable Library of Babel to Vade Mecum? *Annual Review of Immunology* *39*, 791–817.
- Humphries, J.D., Byron, A., and Humphries, M.J. (2006). Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science* *119*, 3901–3903.

- Iram, T., Ramirez-Ortiz, Z., Byrne, M.H., Coleman, U.A., Kingery, N.D., Means, T.K., Frenkel, D., and Khoury, J.E. (2016). Megf10 Is a Receptor for C1Q That Mediates Clearance of Apoptotic Cells by Astrocytes. *J. Neurosci.* *36*, 5185–5192.
- Ishii, H., Mori, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y., and Nakanishi, Y. (2005). Distinct localization of lipid rafts and externalized phosphatidylserine at the surface of apoptotic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *327*, 94–99.
- Ishii, J., Adachi, H., Aoki, J., Koizumi, H., Tomita, S., Suzuki, T., Tsujimoto, M., Inoue, K., and Arai, H. (2002). SREC-II, a new member of the scavenger receptor type F family, trans-interacts with SREC-I through its extracellular domain. *J. Biol. Chem.* *277*, 39696–39702.
- Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., and Inaba, K. (2002). The CD8+ Dendritic Cell Subset Selectively Endocytoses Dying Cells in Culture and In Vivo. *Journal of Experimental Medicine* *195*, 1289–1302.
- Jacobson, K., Liu, P., and Lagerholm, B.C. (2019). The Lateral Organization and Mobility of Plasma Membrane Components. *Cell* *177*, 806–819.
- Jaiswal, S., Jamieson, C.H.M., Pang, W.W., Park, C.Y., Chao, M.P., Majeti, R., Traver, D., van Rooijen, N., and Weissman, I.L. (2009). CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis. *Cell* *138*, 271–285.
- Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., et al. (2013). Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. *Immunity* *39*, 599–610.
- Jakubzick, C.V., Randolph, G.J., and Henson, P.M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology* *17*, 349–362.
- Jiang, J., Kini, V., Belikova, N., Serinkan, B.F., Borisenko, G.G., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., and Kagan, V.E. (2004). Cytochrome c release is required for phosphatidylserine peroxidation during fas-triggered apoptosis in lung epithelial A549 cells. *Lipids* *39*, 1133–1142.
- Jimenez, A., Friedl, K., and Leterrier, C. (2020). About samples, giving examples: Optimized Single Molecule Localization Microscopy. *Methods* *174*, 100–114.
- Joffe, A.M., Bakalar, M.H., and Fletcher, D.A. (2020). Macrophage phagocytosis assay with reconstituted target particles. *Nature Protocols* *15*, 2230–2246.
- Jorge, A.M., Lao, T., Kim, R., Licciardi, S., ElKhoury, J., Luster, A., Means, T.K., and Ramirez-Ortiz, Z.G. (2021). SCARF1-induced efferocytosis plays an immunomodulatory role in humans, and autoantibodies targeting SCARF1 are produced in patients with systemic lupus erythematosus. *BioRxiv* 2021.05.24.445434.
- Jost, P.J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M.D., Nachbur, U., Huang, D.C.S., Bouillet, P., Thomas, H.E., Borner, C., Silke, J., et al. (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* *460*, 1035–1039.
- Karaji, N., and Sattentau, Q.J. (2017). Efferocytosis of Pathogen-Infected Cells. *Front Immunol* *8*, 1863.

- Kaul, A., Gordon, C., Crow, M.K., Touma, Z., Urowitz, M.B., van Vollenhoven, R., Ruiz-Irastorza, G., and Hughes, G. (2016). Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Primers* 2, 1–21.
- Kaur, S., Kuznetsova, S.A., Pendrak, M.L., Sipes, J.M., Romeo, M.J., Li, Z., Zhang, L., and Roberts, D.D. (2011). Heparan Sulfate Modification of the Transmembrane Receptor CD47 Is Necessary for Inhibition of T Cell Receptor Signaling by Thrombospondin-1. *J Biol Chem* 286, 14991–15002.
- Kay, J.G., and Fairn, G.D. (2019). Distribution, dynamics and functional roles of phosphatidylserine within the cell. *Cell Communication and Signaling* 17, 126.
- Kay, J.G., Koivusalo, M., Ma, X., Wohland, T., and Grinstein, S. (2012). Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Mol Biol Cell* 23, 2198–2212.
- Ke, F.F.S., Vanyai, H.K., Cowan, A.D., Delbridge, A.R.D., Whitehead, L., Grabow, S., Czabotar, P.E., Voss, A.K., and Strasser, A. (2018). Embryogenesis and Adult Life in the Absence of Intrinsic Apoptosis Effectors BAX, BAK, and BOK. *Cell* 173, 1217-1230.e17.
- Kelleher, R.J., Balu-Iyer, S., Loyall, J., Sacca, A.J., Shenoy, G.N., Peng, P., Iyer, V., Fathallah, A.M., Berenson, C.S., Wallace, P.K., et al. (2015). Extracellular Vesicles Present in Human Ovarian Tumor Microenvironments Induce a Phosphatidylserine-Dependent Arrest in the T-cell Signaling Cascade. *Cancer Immunol Res* 3, 1269–1278.
- Kelley, S.M., and Ravichandran, K.S. (2021). Putting the brakes on phagocytosis: “don’t-eat-me” signaling in physiology and disease. *EMBO Rep* 22.
- Kenis, H., Genderen, H. van, Bennaghmouch, A., Rinia, H.A., Frederik, P., Narula, J., Hofstra, L., and Reutelingsperger, C.P.M. (2004). Cell Surface-expressed Phosphatidylserine and Annexin A5 Open a Novel Portal of Cell Entry. *J. Biol. Chem.* 279, 52623–52629.
- Kerppola, T.K. (2008). BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION (BiFC) ANALYSIS AS A PROBE OF PROTEIN INTERACTIONS IN LIVING CELLS. *Annual Review of Biophysics* 37, 465.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* 26, 239–257.
- Khater, I.M., Nabi, I.R., and Hamarneh, G. (2020). A Review of Super-Resolution Single-Molecule Localization Microscopy Cluster Analysis and Quantification Methods. *Patterns* 1, 100038.
- Kiernan, J.A. (2000). Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do. *Microsc. Today* 8, 8–13.
- Kinchen, J.M. (2010). A model to die for: signaling to apoptotic cell removal in worm, fly and mouse. *Apoptosis* 15, 998–1006.
- Klymchenko, A.S., and Kreder, R. (2014). Fluorescent Probes for Lipid Rafts: From Model Membranes to Living Cells. *Chemistry & Biology* 21, 97–113.

Komura, N., Suzuki, K.G.N., Ando, H., Konishi, M., Koikeda, M., Imamura, A., Chadda, R., Fujiwara, T.K., Tsuboi, H., Sheng, R., et al. (2016). Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat Chem Biol* *12*, 402–410.

Kook, S., Hoon Kim, D., Ryeol Shim, S., Kim, W., Chun, J.-S., and Song, W.K. (2003). Caspase-dependent cleavage of tensin induces disruption of actin cytoskeleton during apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *303*, 37–45.

Krysko, D.V., Garg, A.D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., and Vandenabeele, P. (2012). Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* *12*, 860–875.

Lane, J.D., Allan, V.J., and Woodman, P.G. (2005). Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells. *Journal of Cell Science* *118*, 4059–4071.

Lauber, K., Bohn, E., Kröber, S.M., Xiao, Y., Blumenthal, S.G., Lindemann, R.K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., et al. (2003). Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. *Cell* *113*, 717–730.

Lelek, M., Gyparaki, M.T., Beliu, G., Schueder, F., Griffié, J., Manley, S., Jungmann, R., Sauer, M., Lakadamyali, M., and Zimmer, C. (2021). Single-molecule localization microscopy. *Nat Rev Methods Primers* *1*, 1–27.

Levental, I., Levental, K.R., and Heberle, F.A. (2020). Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain. *Trends in Cell Biology* *30*, 341–353.

Levet, F., Hosal, E., Kechkar, A., Butler, C., Beghin, A., Choquet, D., and Sibarita, J.-B. (2015). SR-Tesseler: a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. *Nature Methods* *12*, 1065–1071.

Levet, F., Julien, G., Galland, R., Butler, C., Beghin, A., Chazeau, A., Hoess, P., Ries, J., Giannone, G., and Sibarita, J.-B. (2019). A tessellation-based colocalization analysis approach for single-molecule localization microscopy. *Nat Commun* *10*.

Levine, J.S., and Ucker, D.S. (2019). Voices from the dead: The complex vocabulary and intricate grammar of dead cells. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, (Elsevier), pp. 1–90.

Levkau, B., Herren, B., Koyama, H., Ross, R., and Raines, E.W. (1998). Caspase-mediated Cleavage of Focal Adhesion Kinase pp125FAK and Disassembly of Focal Adhesions in Human Endothelial Cell Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* *187*, 579–586.

Lillis, A.P., Greenlee, M.C., Mikhailenko, I., Pizzo, S.V., Tenner, A.J., Strickland, D.K., and Bohlson, S.S. (2008). Murine Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP) Is Required for Phagocytosis of Targets Bearing LRP Ligands but Is Not Required for C1q-Trigged Enhancement of Phagocytosis. *The Journal of Immunology* *181*, 364–373.

Lindberg, F.P., Gresham, H.D., Schwarz, E., and Brown, E.J. (1993). Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding. *J Cell Biol* *123*, 485–496.

- Lindberg, F.P., Bullard, D.C., Caver, T.E., Gresham, H.D., Beaudet, A.L., and Brown, E.J. (1996). Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. *Science* 274, 795–798.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.-X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., et al. (2000). The Combined Functions of Proapoptotic Bcl-2 Family Members Bak and Bax Are Essential for Normal Development of Multiple Tissues. *Molecular Cell* 6, 1389–1399.
- Ling, G.S., Crawford, G., Buang, N., Bartok, I., Tian, K., Thielens, N.M., Bally, I., Harker, J.A., Ashton-Rickardt, P.G., Rutschmann, S., et al. (2018). C1q restrains autoimmunity and viral infection by regulating CD8<sup>+</sup> T-cell metabolism. *Science* 360, 558–563.
- Liu, K., Iyoda, T., Saternus, M., Kimura, Y., Inaba, K., and Steinman, R.M. (2002). Immune Tolerance After Delivery of Dying Cells to Dendritic Cells In Situ. *J Exp Med* 196, 1091–1097.
- Liu, L., He, B., Liu, W.M., Zhou, D., Cox, J.V., and Zhang, X.A. (2007). Tetraspanin CD151 Promotes Cell Migration by Regulating Integrin Trafficking\*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 31631–31642.
- Liu, P., Zhao, L., Loos, F., Marty, C., Xie, W., Martins, I., Lachkar, S., Qu, B., Waeckel-Énée, E., Plo, I., et al. (2020). Immunosuppression by Mutated Calreticulin Released from Malignant Cells. *Molecular Cell* 77, 748-760.e9.
- Lorent, J.H., Diaz-Rohrer, B., Lin, X., Spring, K., Gorfe, A.A., Levental, K.R., and Levental, I. (2017). Structural determinants and functional consequences of protein affinity for membrane rafts. *Nat Commun* 8, 1219.
- Lorent, J.H., Levental, K.R., Ganesan, L., Rivera-Longworth, G., Sezgin, E., Doktorova, M., Lyman, E., and Levental, I. (2020). Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nat Chem Biol* 16, 644–652.
- Los, G.V., Encell, L.P., McDougall, M.G., Hartzell, D.D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M.G., Learish, R., Ohana, R.F., Urh, M., et al. (2008). HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chem. Biol.* 3, 373–382.
- Luo, B., Gan, W., Liu, Z., Shen, Z., Wang, J., Shi, R., Liu, Y., Liu, Y., Jiang, M., Zhang, Z., et al. (2016). Erythropoietin Signaling in Macrophages Promotes Dying Cell Clearance and Immune Tolerance. *Immunity* 44, 287–302.
- Luo, B.-H., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2007). Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annu Rev Immunol* 25, 619–647.
- Lv, Z., Bian, Z., Shi, L., Niu, S., Ha, B., Tremblay, A., Li, L., Zhang, X., Paluszynski, J., Liu, M., et al. (2015). Loss of cell surface CD47 ‘clustering’ formation and binding avidity to SIRP $\alpha$  facilitate apoptotic cell clearance by macrophage. *J Immunol* 195, 661–671.
- Ma, H., Jiang, W., Xu, J., and Liu, Y. (2021). Enhanced super-resolution microscopy by extreme value based emitter recovery. *Sci Rep* 11, 20417.
- Maekawa, M., and Fairn, G.D. (2015). Complementary probes reveal that phosphatidylserine is required for the proper transbilayer distribution of cholesterol. *J Cell Sci* 128, 1422–1433.

- Manzo, C., and Garcia-Parajo, M.F. (2015). A review of progress in single particle tracking: from methods to biophysical insights. *Rep. Prog. Phys.* 78, 124601.
- McConnell, H.M., and Kornberg, R.D. (1971). Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry* 10, 1111–1120.
- McDonald, J.F., Zheleznyak, A., and Frazier, W.A. (2004). Cholesterol-independent Interactions with CD47 Enhance  $\alpha\beta 3$  Avidity. *J. Biol. Chem.* 279, 17301–17311.
- McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B., et al. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95, 3489–3497.
- Medina, C.B., and Ravichandran, K.S. (2016). Do not let death do us part: ‘find-me’ signals in communication between dying cells and the phagocytes. *Cell Death Differ* 23, 979–989.
- Medina, C.B., Mehrotra, P., Arandjelovic, S., Perry, J.S.A., Guo, Y., Morioka, S., Barron, B., Walk, S.F., Ghesquière, B., Krupnick, A.S., et al. (2020). Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers. *Nature* 580, 130–135.
- van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112–124.
- Meredith, J., Mu, Z., Saido, T., and Du, X. (1998). Cleavage of the Cytoplasmic Domain of the Integrin  $\beta 3$  Subunit during Endothelial Cell Apoptosis \*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 19525–19531.
- Mestas, J., and Hughes, C.C.W. (2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology* 172, 2731–2738.
- Mevorach, D., Mascarenhas, J.O., Gershov, D., and Elkon, K.B. (1998). Complement-dependent Clearance of Apoptotic Cells by Human Macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 188, 2313–2320.
- Meyer, A.S., Zweemer, A.J.M., and Lauffenburger, D.A. (2015). The AXL Receptor Is a Sensor of Ligand Spatial Heterogeneity. *Cell Systems* 1, 25–36.
- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L.I., and Opas, M. (2009). Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal* 417, 651–666.
- Miksa, M., Amin, D., Wu, R., Dong, W., Ravikumar, T.S., and Wang, P. (2007). Fractalkine-Induced MFG-E8 Leads to Enhanced Apoptotic Cell Clearance by Macrophages. *Mol Med* 13, 553–560.
- Möckl, L. (2020). The Emerging Role of the Mammalian Glycocalyx in Functional Membrane Organization and Immune System Regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 253.
- Moffatt, O.D., Devitt, A., Bell, E.D., Simmons, D.L., and Gregory, C.D. (1999). Macrophage Recognition of ICAM-3 on Apoptotic Leukocytes. *The Journal of Immunology* 162, 6800–6810.

- Mollinedo, F., and Gajate, C. (2020). Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts. *J Lipid Res* 61, 611–635.
- Moodley, Y., Rigby, P., Bundell, C., Bunt, S., Hayashi, H., Misso, N., McAnulty, R., Laurent, G., Scaffidi, A., Thompson, P., et al. (2003). Macrophage Recognition and Phagocytosis of Apoptotic Fibroblasts Is Critically Dependent on Fibroblast-Derived Thrombospondin 1 and CD36. *Am J Pathol* 162, 771–779.
- Morioka, S., Maueröder, C., and Ravichandran, K.S. (2019). Living on the Edge: Efferocytosis at the Interface of Homeostasis and Pathology. *Immunity* 50, 1149–1162.
- Morrissey, M.A., Kern, N., and Vale, R.D. (2020). CD47 Ligation Repositions the Inhibitory Receptor SIRPA to Suppress Integrin Activation and Phagocytosis. *Immunity* 53, 290-302.e6.
- Moss, D.K., Betin, V.M., Malesinski, S.D., and Lane, J.D. (2006). A novel role for microtubules in apoptotic chromatin dynamics and cellular fragmentation. *Journal of Cell Science* 119, 2362–2374.
- Mukundan, L., Odegaard, J.I., Morel, C.R., Heredia, J.E., Mwangi, J.W., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goh, Y.P.S., Eagle, A.R., Dunn, S.E., Awakuni, J.U.H., et al. (2009). PPAR- $\delta$  senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nat Med* 15, 1266–1272.
- Munro, S. (2003). Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell* 115, 377–388.
- Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology* 36, 489–517.
- N'Diaye, E.-N., and Brown, E.J. (2003). The ubiquitin-related protein PLIC-1 regulates heterotrimeric G protein function through association with G $\beta\gamma$ . *Journal of Cell Biology* 163, 1157–1165.
- Nieuwenhuizen, R.P.J., Lidke, K.A., Bates, M., Puig, D.L., Grünwald, D., Stallinga, S., and Rieger, B. (2013). Measuring image resolution in optical nanoscopy. *Nat Methods* 10, 557–562.
- Nilsson, A., and Oldenborg, P.-A. (2009). CD47 promotes both phosphatidylserine-independent and phosphatidylserine-dependent phagocytosis of apoptotic murine thymocytes by non-activated macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 387, 58–63.
- Nishi, C., Toda, S., Segawa, K., and Nagata, S. (2014). Tim4- and MerTK-Mediated Engulfment of Apoptotic Cells by Mouse Resident Peritoneal Macrophages. *Molecular and Cellular Biology* 34, 1512–1520.
- Nishiuchi, R., Sanzen, N., Nada, S., Sumida, Y., Wada, Y., Okada, M., Takagi, J., Hasegawa, H., and Sekiguchi, K. (2005). Potentiation of the ligand-binding activity of integrin  $\alpha 3\beta 1$  via association with tetraspanin CD151. *PNAS* 102, 1939–1944.
- Noris, M., and Remuzzi, G. (2013). Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin Nephrol* 33, 479–492.

- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.-L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., et al. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* *13*, 54–61.
- Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A., and Henson, P.M. (2001). C1q and Mannose Binding Lectin Engagement of Cell Surface Calreticulin and Cd91 Initiates Macropinocytosis and Uptake of Apoptotic Cells. *J Exp Med* *194*, 781–796.
- Oldenborg, P.-A. (2000). Role of CD47 as a Marker of Self on Red Blood Cells. *Science* *288*, 2051–2054.
- Oldenborg, P.-A. (2013). CD47: A Cell Surface Glycoprotein Which Regulates Multiple Functions of Hematopoietic Cells in Health and Disease. *ISRN Hematol* *2013*.
- Osman, R., Tacnet-Delorme, P., Kleman, J.-P., Millet, A., and Frachet, P. (2017). Calreticulin Release at an Early Stage of Death Modulates the Clearance by Macrophages of Apoptotic Cells. *Front Immunol* *8*, 1034.
- Ovesný, M., Křížek, P., Borkovec, J., Švindrych, Z., and Hagen, G.M. (2014). ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics* *30*, 2389–2390.
- Paez Segala, M.G., Sun, M.G., Shtengel, G., Viswanathan, S., Baird, M.A., Macklin, J.J., Patel, R., Allen, J.R., Howe, E.S., Piszczek, G., et al. (2015). Fixation-resistant photoactivatable fluorescent proteins for correlative light and electron microscopy. *Nat Methods* *12*, 215–218.
- Païdassi, H., Tacnet-Delorme, P., Garlatti, V., Darnault, C., Ghebrehiwet, B., Gaboriaud, C., Arlaud, G.J., and Frachet, P. (2008). C1q Binds Phosphatidylserine and Likely Acts as a Multiligand-Bridging Molecule in Apoptotic Cell Recognition. *The Journal of Immunology* *180*, 2329–2338.
- Païdassi, H., Tacnet-Delorme, P., Verneret, M., Gaboriaud, C., Houen, G., Duus, K., Ling, W.L., Arlaud, G.J., and Frachet, P. (2011). Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition. *J. Mol. Biol.* *408*, 277–290.
- Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A.-C., Chapman, D.C., Durchschlag, M., Joza, N., Pierron, G., van Endert, P., et al. (2009). Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* *28*, 578–590.
- Park, D., Tosello-Trampont, A.-C., Elliott, M.R., Lu, M., Haney, L.B., Ma, Z., Klibanov, A.L., Mandell, J.W., and Ravichandran, K.S. (2007). BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* *450*, 430–434.
- Park, D., Hochreiter-Hufford, A., and Ravichandran, K.S. (2009). The Phosphatidylserine Receptor TIM-4 Does Not Mediate Direct Signaling. *Current Biology* *19*, 346–351.
- Park, S.-Y., Kang, K.-B., Thapa, N., Kim, S.-Y., Lee, S.-J., and Kim, I.-S. (2008). Requirement of Adaptor Protein GULP during Stabilin-2-mediated Cell Corpse Engulfment\*. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 10593–10600.

- Park, S.-Y., Kim, S.-Y., Kang, K.-B., and Kim, I.-S. (2010). Adaptor protein GULP is involved in stabilin-1-mediated phagocytosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 398, 467–472.
- Patten, D.A. (2018). SCARF1: a multifaceted, yet largely understudied, scavenger receptor. *Inflamm. Res.* 67, 627–632.
- Patten, D.A., Kamarajah, S.K., Rose, J.M., Tickle, J., Shepherd, E.L., Adams, D.H., Weston, C.J., and Shetty, S. (2017). SCARF-1 promotes adhesion of CD4<sup>+</sup> T cells to human hepatic sinusoidal endothelium under conditions of shear stress. *Sci Rep* 7, 17600.
- Penberthy, K.K., and Ravichandran, K.S. (2016). Apoptotic cell recognition receptors and scavenger receptors. *Immunol Rev* 269, 44–59.
- Penberthy, K.K., Rival, C., Shankman, L.S., Raymond, M.H., Zhang, J., Perry, J.S.A., Lee, C.S., Han, C.Z., Onengut-Gumuscu, S., Palczewski, K., et al. (2017). Context-dependent compensation among phosphatidylserine-recognition receptors. *Sci Rep* 7.
- Pereira, P.M., Albrecht, D., Culley, S., Jacobs, C., Marsh, M., Mercer, J., and Henriques, R. (2019). Fix Your Membrane Receptor Imaging: Actin Cytoskeleton and CD4 Membrane Organization Disruption by Chemical Fixation. *Front. Immunol.* 10.
- Peter, C., Waibel, M., Radu, C.G., Yang, L.V., Witte, O.N., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S., and Lauber, K. (2008). Migration to Apoptotic “Find-me” Signals Is Mediated via the Phagocyte Receptor G2A\*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 5296–5305.
- Peter, C., Waibel, M., Keppeler, H., Lehmann, R., Xu, G., Halama, A., Adamski, J., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S., and Lauber, K. (2012). Release of lysophospholipid ‘find-me’ signals during apoptosis requires the ATP-binding cassette transporter A1. *Autoimmunity* 45, 568–573.
- Phillips, M.C. (2014). Molecular Mechanisms of Cellular Cholesterol Efflux\*. *Journal of Biological Chemistry* 289, 24020–24029.
- Pike, L.J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research* 47, 1597–1598.
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with 2H<sub>2</sub>O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116, 625–627.
- Podolnikova, N.P., Hlavackova, M., Wu, Y., Yakubenko, V.P., Faust, J., Balabiyev, A., Wang, X., and Ugarova, T.P. (2019). Interaction between the integrin Mac-1 and signal regulatory protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) mediates fusion in heterologous cells. *J Biol Chem* 294, 7833–7849.
- Povea-Cabello, S., Oropesa-Ávila, M., de la Cruz-Ojeda, P., Villanueva-Paz, M., de la Mata, M., Suárez-Rivero, J.M., Álvarez-Córdoba, M., Villalón-García, I., Cotán, D., Ybot-González, P., et al. (2017). Dynamic Reorganization of the Cytoskeleton during Apoptosis: The Two Coffins Hypothesis. *Int J Mol Sci* 18, 2393.
- Preibisch, S., Saalfeld, S., and Tomancak, P. (2009). Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* 25, 1463–1465.

Proto, J.D., Doran, A.C., Gusarova, G., Yurdagul, A., Sozen, E., Subramanian, M., Islam, M.N., Rymond, C.C., Du, J., Hook, J., et al. (2018). Regulatory T cells promote macrophage efferocytosis during inflammation resolution. *Immunity*.

Pyrshv, K.A., Yesylevskyy, S.O., Mély, Y., Demchenko, A.P., and Klymchenko, A.S. (2017). Caspase-3 activation decreases lipid order in the outer plasma membrane leaflet during apoptosis: A fluorescent probe study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859, 2123–2132.

Qian, H., Sheetz, M.P., and Elson, E.L. (1991). Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys J* 60, 910–921.

Ralph, P., Prichard, J., and Cohn, M. (1975). Reticulum Cell Sarcoma: An Effector Cell in Antibody-Dependent Cell-Mediated Immunity. *The Journal of Immunology* 114, 898–905.

Ramirez-Ortiz, Z.G., Pendergraft, W.F., Prasad, A., Byrne, M.H., Iram, T., Blanchette, C.J., Luster, A.D., Hacohen, N., Khoury, J.E., and Means, T.K. (2013). The scavenger receptor SCARF1 mediates apoptotic cell clearance and prevents autoimmunity. *Nat Immunol* 14, 917–926.

Rebres, R.A., Vaz, L.E., Green, J.M., and Brown, E.J. (2001). Normal Ligand Binding and Signaling by CD47 (Integrin-associated Protein) Requires a Long Range Disulfide Bond between the Extracellular and Membrane-spanning Domains \*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 34607–34616.

Reid, K.B.M. (2018). Complement Component C1q: Historical Perspective of a Functionally Versatile, and Structurally Unusual, Serum Protein. *Frontiers in Immunology* 9, 764.

Reinhold, M.I., Lindberg, F.P., Plas, D., Reynolds, S., Peters, M.G., and Brown, E.J. (1995). In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *Journal of Cell Science* 108, 3419–3425.

Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walzer, S., Novak, A., Lohner, K., and Zwegtlick, D. (2011). In search of a novel target — Phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808, 2638–2645.

Ries, J. (2020). SMAP: a modular super-resolution microscopy analysis platform for SMLM data. *Nat Methods* 17, 870–872.

Ruthardt, N., Lamb, D.C., and Bräuchle, C. (2011). Single-particle Tracking as a Quantitative Microscopy-based Approach to Unravel Cell Entry Mechanisms of Viruses and Pharmaceutical Nanoparticles. *Molecular Therapy* 19, 1199–1211.

Sage, D., Kirshner, H., Pengo, T., Stuurman, N., Min, J., Manley, S., and Unser, M. (2015). Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy. *Nat Methods* 12, 717–724.

Sage, D., Pham, T.-A., Babcock, H., Lukes, T., Pengo, T., Chao, J., Velmurugan, R., Herbert, A., Agrawal, A., Colabrese, S., et al. (2019). Super-resolution fight club: assessment of 2D and 3D single-molecule localization microscopy software. *Nature Methods* 1.

- Santiago-García, J., Kodama, T., and Pitas, R.E. (2003). The Class A Scavenger Receptor Binds to Proteoglycans and Mediates Adhesion of Macrophages to the Extracellular Matrix\*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 6942–6946.
- Saxton, M.J. (1993). Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion. *Biophys J* 64, 1766–1780.
- Saxton, M.J. (1997). Single-particle tracking: the distribution of diffusion coefficients. *Biophys J* 72, 1744–1753.
- Saxton, M.J., and Jacobson, K. (1997). SINGLE-PARTICLE TRACKING: Applications to Membrane Dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 373–399.
- Scholnik-Cabrera, A., Oldak, B., Juárez, M., Cruz-Rivera, M., Flisser, A., and Mendlovic, F. (2019). Calreticulin in phagocytosis and cancer: opposite roles in immune response outcomes. *Apoptosis* 24, 245–255.
- Schermelleh, L., Ferrand, A., Huser, T., Eggeling, C., Sauer, M., Biehlmaier, O., and Drummen, G.P.C. (2019). Super-resolution microscopy demystified. *Nature Cell Biology* 21, 72–84.
- Schmid, E.M., Bakalar, M.H., Choudhuri, K., Weichsel, J., Ann, H.S., Geissler, P.L., Dustin, M.L., and Fletcher, D.A. (2016). Size-dependent protein segregation at membrane interfaces. *Nature Phys* 12, 704–711.
- Schneider, U., Schwenk, H.-U., and Bornkamm, G. (1977). 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.
- Schnell, U., Dijk, F., Sjollem, K.A., and Giepmans, B.N.G. (2012). Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nature Methods* 9, 152–158.
- Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., and Bréard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 3, 346–352.
- Seeberg, J.C., Loibl, M., Moser, F., Schwegler, M., Büttner-Herold, M., Daniel, C., Engel, F.B., Hartmann, A., Schlötzer-Schrehardt, U., Goppelt-Struebe, M., et al. (2019). Non-professional phagocytosis: a general feature of normal tissue cells. *Sci Rep* 9, 11875.
- Segawa, K., Suzuki, J., and Nagata, S. (2011). Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. *PNAS* 108, 19246–19251.
- Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T.R., Matsuda, F., and Nagata, S. (2014). Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science* 344, 1164–1168.
- Segawa, K., Kurata, S., and Nagata, S. (2016). Human Type IV P-type ATPases That Work as Plasma Membrane Phospholipid Flippases and Their Regulation by Caspase and Calcium\*. *Journal of Biological Chemistry* 291, 762–772.
- Seiffert, M., Cant, C., Chen, Z., Rappold, I., Brugger, W., Kanz, L., Brown, E.J., Ullrich, A., and Bühring, H.-J. (1999). Human Signal-Regulatory Protein Is Expressed on Normal, But Not

on Subsets of Leukemic Myeloid Cells and Mediates Cellular Adhesion Involving Its Counterreceptor CD47. *Blood* 94, 3633–3643.

Singh, R., Letai, A., and Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 175–193.

Son, M., Porat, A., He, M., Suurmond, J., Santiago-Schwarz, F., Andersson, U., Coleman, T.R., Volpe, B.T., Tracey, K.J., Al-Abed, Y., et al. (2016). C1q and HMGB1 reciprocally regulate human macrophage polarization. *Blood* 128, 2218–2228.

Sonnino, S., and Prinetti, A. (2009). Sphingolipids and membrane environments for caveolin. *FEBS Letters* 583, 597–606.

Sonnleitner, A., Schütz, G.J., and Schmidt, Th. (1999). Free Brownian Motion of Individual Lipid Molecules in Biomembranes. *Biophysical Journal* 77, 2638–2642.

Soto-Pantoja, D.R., Kaur, S., and Roberts, D.D. (2015). CD47 signaling pathways controlling cellular differentiation and responses to stress. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 50, 212–230.

Stanly, T.A., Fritzsche, M., Banerji, S., García, E., Bernardino de la Serna, J., Jackson, D.G., and Eggeling, C. (2016). Critical importance of appropriate fixation conditions for faithful imaging of receptor microclusters. *Biol Open* 5, 1343–1350.

Stegert, M., Bock, M., and Trendelenburg, M. (2015). Clinical presentation of human C1q deficiency: How much of a lupus? *Molecular Immunology* 67, 3–11.

Su, H.P., Nakada-Tsukui, K., Tosello-Tramont, A.-C., Li, Y., Bu, G., Henson, P.M., and Ravichandran, K.S. (2002). Interaction of CED-6/GULP, an Adapter Protein Involved in Engulfment of Apoptotic Cells with CED-1 and CD91/Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP)\*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 11772–11779.

Subramanian, S., Parthasarathy, R., Sen, S., Boder, E.T., and Discher, D.E. (2006). Species- and cell type-specific interactions between CD47 and human SIRP $\alpha$ . *Blood* 107, 2548–2556.

Sun, Z., Costell, M., and Fässler, R. (2019). Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nat Cell Biol* 21, 25–31.

Suzuki, E., and Nakayama, M. (2007). The mammalian Ced-1 ortholog MEGF10/KIAA1780 displays a novel adhesion pattern. *Experimental Cell Research* 313, 2451–2464.

Suzuki, J., Denning, D.P., Imanishi, E., Horvitz, H.R., and Nagata, S. (2013). Xk-Related Protein 8 and CED-8 Promote Phosphatidylserine Exposure in Apoptotic Cells. *Science* 341, 403–406.

Suzuki, J., Imanishi, E., and Nagata, S. (2016). Xkr8 phospholipid scrambling complex in apoptotic phosphatidylserine exposure. *PNAS* 113, 9509–9514.

Sviridov, D., and Miller, Y.I. (2020). Biology of Lipid Rafts: Introduction to the Thematic Review Series. *J Lipid Res* 61, 598–600.

Swiecki, M., and Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 15, 471–485.

- Tada, K., Tanaka, M., Hanayama, R., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2003). Tethering of Apoptotic Cells to Phagocytes through Binding of CD47 to Src Homology 2 Domain-Bearing Protein Tyrosine Phosphatase Substrate-1. *The Journal of Immunology* *171*, 5718–5726.
- Takemura, Y., Ouchi, N., Shibata, R., Aprahamian, T., Kirber, M.T., Summer, R.S., Kihara, S., and Walsh, K. (2007). Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies. *J Clin Invest* *117*, 375–386.
- Tamoutounour, S., Guilliams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity* *39*, 925–938.
- Tanaka, K.A.K., Suzuki, K.G.N., Shirai, Y.M., Shibutani, S.T., Miyahara, M.S.H., Tsuboi, H., Yahara, M., Yoshimura, A., Mayor, S., Fujiwara, T.K., et al. (2010). Membrane molecules mobile even after chemical fixation. *Nature Methods* *7*, 865–866.
- Tarr, J.M., Young, P.J., Morse, R., Shaw, D.J., Haigh, R., Petrov, P.G., Johnson, S.J., Winyard, P.G., and Eggleton, P. (2010). A Mechanism of Release of Calreticulin from Cells During Apoptosis. *Journal of Molecular Biology* *401*, 799–812.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *9*, 231–241.
- Thielens, N.M., Tedesco, F., Bohlsion, S.S., Gaboriaud, C., and Tenner, A.J. (2017). C1q: A fresh look upon an old molecule. *Molecular Immunology* *89*, 73–83.
- Tietjen, G.T., Gong, Z., Chen, C.-H., Vargas, E., Crooks, J.E., Cao, K.D., Heffern, C.T.R., Henderson, J.M., Meron, M., Lin, B., et al. (2014). Molecular mechanism for differential recognition of membrane phosphatidylserine by the immune regulatory receptor Tim4. *PNAS* *111*, E1463–E1472.
- Tixeira, R., Caruso, S., Paone, S., Baxter, A.A., Atkin-Smith, G.K., Hulett, M.D., and Poon, I.K.H. (2017). Defining the morphologic features and products of cell disassembly during apoptosis. *Apoptosis* *22*, 475–477.
- Todt, J.C., Hu, B., and Curtis, J.L. (2008). The scavenger receptor SR-A I/II (CD204) signals via the receptor tyrosine kinase Mertk during apoptotic cell uptake by murine macrophages. *J Leukoc Biol* *84*, 510–518.
- Torr, E.E., Gardner, D.H., Thomas, L., Goodall, D.M., Bielemeier, A., Willetts, R., Griffiths, H.R., Marshall, L.J., and Devitt, A. (2012). Apoptotic cell-derived ICAM-3 promotes both macrophage chemoattraction to and tethering of apoptotic cells. *Cell Death Differ* *19*, 671–679.
- Tran, M.T.N., Hamada, M., Jeon, H., Shiraishi, R., Asano, K., Hattori, M., Nakamura, M., Imamura, Y., Tsunakawa, Y., Fujii, R., et al. (2017). MafB is a critical regulator of complement component C1q. *Nature Communications* *8*, 1700.
- Trimble, W.S., and Grinstein, S. (2015). Barriers to the free diffusion of proteins and lipids in the plasma membrane. *J Cell Biol* *208*, 259–271.

Truman, L.A., Ford, C.A., Pasikowska, M., Pound, J.D., Wilkinson, S.J., Dumitriu, I.E., Melville, L., Melrose, L.A., Ogden, C.A., Nibbs, R., et al. (2008). CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood* *112*, 5026–5036.

Tsai, R.K., and Discher, D.E. (2008). Inhibition of “self” engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *J Cell Biol* *180*, 989–1003.

Tsai, R.K., Rodriguez, P.L., and Discher, D.E. (2010). Self inhibition of phagocytosis: the affinity of “marker of self” CD47 for SIRPalpha dictates potency of inhibition but only at low expression levels. *Blood Cells Mol Dis* *45*, 67–74.

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer* *26*, 171–176.

Tyurin, V.A., Balasubramanian, K., Winnica, D., Tyurina, Y.Y., Vikulina, A.S., He, R.R., Kapralov, A.A., Macphee, C.H., and Kagan, V.E. (2014). Oxidatively modified phosphatidylserines on the surface of apoptotic cells are essential phagocytic ‘eat-me’ signals: cleavage and inhibition of phagocytosis by Lp-PLA2. *Cell Death Differ* *21*, 825–835.

Ucker, D.S., Jain, M.R., Pattabiraman, G., Palasiewicz, K., Birge, R.B., and Li, H. (2012). Externalized Glycolytic Enzymes Are Novel, Conserved, and Early Biomarkers of Apoptosis\*. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 10325–10343.

Ura, S., Masuyama, N., Graves, J.D., and Gotoh, Y. (2001). Caspase cleavage of MST1 promotes nuclear translocation and chromatin condensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *98*, 10148–10153.

Vandivier, R.W., Ogden, C.A., Fadok, V.A., Hoffmann, P.R., Brown, K.K., Botto, M., Walport, M.J., Fisher, J.H., Henson, P.M., and Greene, K.E. (2002). Role of Surfactant Proteins A, D, and C1q in the Clearance of Apoptotic Cells In Vivo and In Vitro: Calreticulin and CD91 as a Common Collectin Receptor Complex. *The Journal of Immunology* *169*, 3978–3986.

Varol, C., Mildner, A., and Jung, S. (2015). Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu. Rev. Immunol.* *33*, 643–675.

Veillette, A., Thibaudeau, E., and Latour, S. (1998). High Expression of Inhibitory Receptor SHPS-1 and Its Association with Protein-tyrosine Phosphatase SHP-1 in Macrophages\*. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 22719–22728.

Vogelsang, J., Kasper, R., Steinhauer, C., Person, B., Heilemann, M., Sauer, M., and Tinnefeld, P. (2008). A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes. *Angewandte Chemie International Edition* *47*, 5465–5469.

Wang, F., Liu, Y., Zhang, T., Gao, J., Xu, Y., Xie, G., Zhao, W., Wang, H., and Yang, Y. (2020). Aging-associated changes in CD47 arrangement and interaction with thrombospondin-1 on red blood cells visualized by super-resolution imaging. *Aging Cell* *19*, e13224.

Wang, X., Li, W., Zhao, D., Liu, B., Shi, Y., Chen, B., Yang, H., Guo, P., Geng, X., Shang, Z., et al. (2010). *Caenorhabditis elegans* transthyretin-like protein TTR-52 mediates recognition of apoptotic cells by the CED-1 phagocyte receptor. *Nat Cell Biol* *12*, 655–664.

- Wang, Y., Schnitzbauer, J., Hu, Z., Li, X., Cheng, Y., Huang, Z.-L., and Huang, B. (2014). Localization events-based sample drift correction for localization microscopy with redundant cross-correlation algorithm. *Opt Express* 22, 15982–15991.
- Weis, W.I., and Kobilka, B.K. (2018). The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem* 87, 897–919.
- Westman, J., Grinstein, S., and Marques, P.E. (2020). Phagocytosis of Necrotic Debris at Sites of Injury and Inflammation. *Front. Immunol.* 10.
- Whelan, D.R., and Bell, T.D.M. (2015). Image artifacts in Single Molecule Localization Microscopy: why optimization of sample preparation protocols matters. *Sci Rep* 5.
- Wicker-Planquart, C., Dufour, S., Tacnet-Delorme, P., Bally, I., Delneste, Y., Frachet, P., Housset, D., and Thielens, N.M. (2020). Molecular and Cellular Interactions of Scavenger Receptor SR-F1 With Complement C1q Provide Insights Into Its Role in the Clearance of Apoptotic Cells. *Front Immunol* 11.
- Wijeyesakere, S.J., Bedi, S.K., Huynh, D., and Raghavan, M. (2016). The C-Terminal Acidic Region of Calreticulin Mediates Phosphatidylserine Binding and Apoptotic Cell Phagocytosis. *The Journal of Immunology* 196, 3896–3909.
- Williamson, A.P., and Vale, R.D. (2018). Spatial control of Draper receptor signaling initiates apoptotic cell engulfment. *J. Cell Biol.* 217, 3977–3992.
- Willingham, S.B., Volkmer, J.-P., Gentles, A.J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S.S., Wang, J., Contreras-Trujillo, H., Martin, R., Cohen, J.D., et al. (2012). The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6662–6667.
- Wimmi, S., Balinovic, A., Jeckel, H., Selinger, L., Lampaki, D., Eisemann, E., Meuskens, I., Linke, D., Drescher, K., Endesfelder, U., et al. (2021). Dynamic relocalization of cytosolic type III secretion system components prevents premature protein secretion at low external pH. *Nat Commun* 12, 1625.
- Wu, A.-L., Wang, J., Zheleznyak, A., and Brown, E.J. (1999). Ubiquitin-Related Proteins Regulate Interaction of Vimentin Intermediate Filaments with the Plasma Membrane. *Molecular Cell* 4, 619–625.
- Wu, Y., Singh, S., Georgescu, M.-M., and Birge, R.B. (2005). A role for Mer tyrosine kinase in  $\alpha\beta 5$  integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *Journal of Cell Science* 118, 539–553.
- Yin, C., and Heit, B. (2021). Cellular Responses to the Efferocytosis of Apoptotic Cells. *Frontiers in Immunology* 12, 1274.
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.
- Yu, J., Fischman, D.A., and Steck, T.L. (1973). Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J. Supramol. Struct.* 1, 233–248.

Zhou, Z., Hartwig, E., and Horvitz, H.R. (2001). CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* *104*, 43–56.

Ziccardi, R.J., and Tschopp, J. (1982). The dissociation properties of native C1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *107*, 618–623.

Zimmerman, B., Kelly, B., McMillan, B.J., Seegar, T.C.M., Dror, R.O., Kruse, A.C., and Blacklow, S.C. (2016). Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell* *167*, 1041-1051.e11.

Zwart, B., Ciurana, C., Rensink, I., Manoe, R., Erik Hack, C., and Aarden, L.A. (2004). Complement Activation by Apoptotic Cells Occurs Predominantly via IgM and is Limited to Late Apoptotic (Secondary Necrotic) Cells. *Autoimmunity* *37*, 95–102.